

**Part experimental**

# Índex part experimental

## I. Biologia molecular

I.1.- Equipament general	255
I.2.- Aspectes generals de biologia molecular, expressió i purificació enzimàtica	257
I.2.1.- Condicions d'esterilitat	257
I.2.2.- Medis de cultiu	257
I.2.3.- Antibiòtics	258
I.2.4.- Vectors	258
I.2.5.- Soques emprades	259
I.2.6.- Obtenció de cultius	260
I.3.- Mètodes d'ADN recombinant	260
I.3.1.- Mètodes preparatius d'obtenció d'ADN plasmídic.	260
I.3.2.- Electroforesi d'ADN en gels d'agarosa	265
I.3.3.- Quantificació d'ADN per electroforesi	267
I.3.4.- Purificació d'ADN plasmídic	268
I.3.5.- Tècniques de clonatge en plasmidis	270
I.3.6.- Mutagènesi dirigida per PCR	275
I.3.7.- Seqüenciació d'ADN	279
I.4.- Obtenció de l'ADN dels mutants W221A, W221F, Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	280
I.4.1.- Obtenció dels plasmidis pD6-2 W221A i W221F	280
I.4.2.- Obtenció del plasmidi pD6-2 Y152A	282
I.4.3.- Obtenció del plasmidi pD6-2 Y152F	283
I.5.- Expressió enzimàtica de l'enzim salvatge i mutants de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	283
I.6.- Purificació enzimàtica de l'enzim salvatge i mutants de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	284
I.6.1.- Processat del cultiu bacterià	285
I.6.2.- Cromatografia de bescanvi iònic	287
I.6.3.- Cromatografia de gel filtració	288
I.7.- Expressió i purificació de l'enzim salvatge i mutants de la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	289
I.7.1.- Transformació de cèl·lules competents i obtenció del cultiu preparatiu	289
I.7.2.- Processat del cultiu preparatiu	290
I.7.3.- Purificació per cromatografia d'afinitat	290
I.8.- Tècniques d'anàlisi de proteïnes	291
I.8.1.- Electroforesi discontinua en SDS (SDS-PAGE)	291
I.8.2.- Assaig d'activitat 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa en placa	293
I.8.3.- Determinació de la concentració proteica per mesura de l'absorbància a 280 nm	293
I.8.4.- Determinació de la concentració proteica amb l'assaig colorimètric de Bradford	294
I.8.5.- Determinació de la concentració proteica per mesura de l'activitat enzimàtica enfront de substrats cromofòrics	295

## II. Síntesi de substrats

II.0.- Relació de compostos referenciats en el capítol de síntesi de glicòsids	299
II.1.- Consideracions generals	301
II.1.1.- Preparació de reactius, dissolvents anhidres i tampons	301
II.1.2.- Control de reacció	302
II.1.3.- Separacions cromatogràfiques preparatives	302
II.1.4.- Dades físiques i espectroscòpiques	303
II.2.- Síntesi de l' <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-D-glucopiranosid ( <b>3</b> ) i l' <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-D-glucopiranosid ( <b>4</b> )	304
II.2.1.- Digestió enzimàtica de $\beta$ -glucà d'ordi	304
II.2.2.- Síntesi dels glicòsids <b>3</b> i <b>4</b>	305
II.3.- Síntesi de bromurs de glicosil	305
II.3.1.- Metodica general	305
II.3.2.- Síntesi dels glicòsids <b>5</b> , <b>6</b> , <b>46</b> i <b>52</b>	306
II.4.- Reaccions de glicosidació per catàlisi per transferència de fase (PTC)	307
II.4.1.- Metodica general	307
II.4.2.- Síntesi dels glicòsids <b>7-15</b> , <b>31-35</b>	307
II.5.- Síntesi del 2',4'-dinitrofenil <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -2,4,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>27</b> )	312
II.5.1.- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>26</b> )	312
II.5.2.- 2',4'-dinitrofenil <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>27</b> )	313
II.6.- Reaccions de des- <i>O</i> -acetilació per transesterificació amb NaOMe/MeOH (transesterificació de Zemplén)	313
II.6.1.- Metodica general	313
II.6.2.- Síntesi dels glicòsids <b>16-20</b> , <b>23</b> , <b>24</b> , <b>36-39</b>	314
II.7.- Des- <i>O</i> -acetilació amb clorur d'hidrogen en metanol	318
II.7.1.- Metodica general	318
II.7.2.- Síntesi dels glicòsids <b>21</b> , <b>22</b> , <b>28</b> i <b>40</b>	318
II.8.- Síntesi del 2',4'-dinitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>41</b> )	320
II.9.- Síntesi de glicals acetilats	320
II.9.1.- Síntesi de glicals seguint el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich	320
II.9.2.- Síntesi de glicals per reducció electroquímica	325
II.9.3.- Síntesi de glicals per glicosidació entre el glucal <b>44</b> i els donadors <b>46</b> i <b>48</b>	326
II.9.4.- Síntesi de glicals per reducció amb Cp <sub>2</sub> TiCl <sub>2</sub>	329
II.10.- Reaccions de des- <i>O</i> -acetilació de glicals	330
II.10.1.- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol	330
II.10.2.- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol ( <b>56</b> )	331

II.11.- Intent de síntesi de l' <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi-D-glucopiranososa ( <b>69</b> )	332
II.11.1.- Síntesi de l' <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di- <i>O</i> -acetil-2-desoxi-D-glucopiranososa ( <b>71</b> )	332
II.11.2.- Intent de síntesi de l' <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi-D-glucopiranososa ( <b>69</b> )	332
II.12.- Síntesi del 4'-nitrofenil <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>68</b> )	333
II.12.1.- Intent de síntesi del donador hemiacetàlic <b>59</b>	333
II.12.2.- Intent de síntesi del donador hemiacetàlic tetrasacàrid <b>61</b> a partir del tetrasacàrid <b>54</b> i síntesi del 4'-metilumbel-liferil glicòsid <b>62</b>	334
II.12.3.- Conversió del glical <b>54</b> al 2-desoxiglicòsid <b>64</b> i addició nucleòfila de 4-nitrofenol sobre el iodur de glicosil <b>66</b>	336
II.12.4.- 4'-nitrofenil <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosid ( <b>68</b> )	337

### III. Enzimologia

III.1.- Cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	339
III.1.1.- Solucions d'ús habitual	339
III.1.2.- Procediment general	339
III.1.3.- Determinació de les absortivitats i del factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència	341
III.2.- Reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en estat estacionari catalitzades per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	343
III.2.1.- Equipament emprat	343
III.2.2.- Solucions d'ús habitual	343
III.2.3.- Metodologia per a la selecció de les longituds d'ona de treball i determinació de les absortivitats corresponents	344
III.2.4.- Metodologia per a la determinació de la concentració de la solució de substrat per espectrofotometria d'UV-vis	345
III.2.5.- Metodologia per a la determinació de la concentració d'enzim	346
III.2.6.- Procediment general per al seguiment de les reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i>	346
III.2.7.- Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH	348
III.2.8.- Determinació de la constant d'inhibició, $K_I$	350
III.3.- Reaccions d'hidròlisi del $\beta$ -glucà d'ordi catalitzades per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	352
III.4.- Estudi de mètodes per al seguiment de la reacció d'hidratació del glical <b>56</b> per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	354
III.4.1. Avaluació de mètodes de determinació d'extrems reductors per al seguiment de la reacció d'hidratació de glicals	354
III.4.2.- Estudi de la reacció d'hidratació del glical <b>56</b> per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> per HPLC	359

III.4.3.- Cinètica de reacció d'hidratació del glical G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> amb seguiment per HPLC	363
III.5.- Enzimologia de la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814 amb substrats cromofòrics en estat estacionari	365
III.5.1.- Equipament emprat	365
III.5.2.- Solucions d'ús habitual	365
III.5.3.- Metodologia per a la selecció de les longituds d'ona de treball i determinació de les absortivitats corresponents	366
III.5.4.- Metodologia per a la determinació de la concentració de la solució de substrat per espectrofotometria d'UV-vis	366
III.5.5.- Metodologia per a la determinació de la concentració d'enzim	366
III.5.6. Procediment general per al seguiment de les reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en presència de la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	367
III.5.7. Perfil d'activitat enzimàtica enfront del pH per a la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	367
III.5.8. Perfil d'activitat enzimàtica enfront de la temperatura per a la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	367
<b>IV. Resultats d'enzimologia (CD adjunt)</b>	<b>368</b>

# I. Biologia molecular i obtenció d'enzims

## I.1. Equipament general

- Agitadors magnètics:
  - Agimatic-N (Selecta)
  - Multiagitador A-04 sèrie C (SBS)
- Agitador orbital KS125 basic (IKA Labortechnik)
- Agitador vòrtex Reax 2000 (Heidolph)
- Armari fred (Radiber, S.Q.)
- Autoclau per pressió de vapor d'aigua
- Balança A-150-SX (Cobos)
- Banys termostàtics:
  - HME (Huber)
  - Polystat (Huber)
  - Precistern S-387 (Selecta)
  - 7073 (Colora)
  - Bioblock *Bio-Ice Cooling Unit* 92617 (Bio-Rad Laboratories Ltd.)
- Bioreactor Applikon 187, equipat amb els següents accessoris:
  - Sensor d'O<sub>2</sub> dissolt de Ø=12 mm i amplificador mod. 170 (Ingold)
  - Sensor de pH mod. 465 (Ingold) acoblat a un transmissor mod. 212 (Crison) i a un receptor/controlador mod. 262 (Crison) connectat a l'ordinador
  - Sonda de temperatura Pt-100 de Ø=4 mm connectada a termòmetre digital (Crison)
  - Pou d'acer inoxidable per sensor de temperatura de Ø<sub>ext</sub>=6 mm i 34 mm de longitud
  - Resistència calefactora de 220 V i 200 W de Ø=14 mm
  - Pou per a la termoresistència de Ø<sub>ext</sub>=18 mm i 320 mm de longitud
  - Tub per inocular de Ø<sub>ext</sub>=6 mm i 150 mm de longitud
  - Serpentí de refrigeració d'acer inoxidable de Ø<sub>ext</sub>=6 mm.
  - Sensor de CO<sub>2</sub> (Edinburgh Sensors Ltd.), mesura el % de CO<sub>2</sub> per espectroscòpia IR en el marge 0-10%
  - Bomba peristàltica Minipuls 3 (Gilson France S.A.)
  - Agitador amb motor fraccional mod. 165 de corrent continu i variador de velocitat, amb el motor unit a l'eix de l'agitador mitjançant un acoblament flexible Miniflex LM de 60 mm de longitud
- Càmera fotogràfica Polaroid DS-34; rodets 665 i 667 (Polaroid)
- Centrífugues:
  - Minicentrífuga de tubs d'Eppendorf 112 (Sigma Chemical Co.)
  - D'alta velocitat Sorvall RC-5C; rotors SS34 i GSA (Du Pont Co., Biotechnology Systems Division); tubs de plàstic de centrífuga de 50 i 250 mL (Sorvall)
- Conductímetre micro CM 2201 (Crison)
- Concentradors Centricon<sup>®</sup>-10 i Centriprep<sup>®</sup> 10 (Amicon Corp.)
- Equip de cromatografia de baixa pressió:
  - Bombes peristàltiques Minipuls 3 (Gilson France S.A.)
  - Detector UV/VIS 112 (Gilson France S.A.)
  - Col·lector automàtic de fraccions FC 203 (Gilson France S.A.)
  - Enregistrador monocanal BD112 (Zipp & Zonen Zelft)

- Software Protech 1.0 mod. 740 System Controller

*Cromatografia de bescanvi catiònic:*

- Columna cromatogràfica Econo-Column<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories Ltd.) de 400 mL preparada amb reïna CM-Sepharose<sup>®</sup> CL-6B (Pharmacia-LKB Biotechnology AB)

*Cromatografia de gel filtració:*

- Columna cromatogràfica XK16 (Pharmacia-LKB Biotechnology AB), preparada amb reïna Superdex<sup>™</sup> 75 Preparative Grade (Pharmacia-LKB Biotechnology AB)
- Equip de cromatografia (Pharmacia-LKB Biotechnology AB):
  - Bomba peristàltica Pump-P1
  - Detector: Optical Unit UV-1 i Control Unit UV-1
  - Col·lector automàtic de fraccions GradiFrac
  - Enregistrador REC 102
  - Columna cromatogràfica HiTrap Chelating 5 mL
- Equips d'electroforesi:
  - Font d'alimentació 200/2.0 (Bio-Rad Laboratories Ltd.)
  - *Proteïnes*: Mini-protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad Laboratories Ltd.)
  - *ADN*: Mini-Sub<sup>™</sup> Cell (Bio-Rad Laboratories Ltd.)
- Espectrofotòmetre Cary 4E (Varian) provist del *CARY DOS System Software*
- Estufa de cultius Incubat 2000206 (Selecta)
- Filtres estèrils:
  - Per a solucions no proteïques: Millex<sup>®</sup>-GS 0.22 µm (Millipore Corp.)
  - Per a solucions de proteïnes: Millex<sup>®</sup>-GV 0.22 µm (Millipore Corp.)
- Incubador orbital Innova<sup>™</sup> 4000 (New Brunswick Scientific)
- Incubador orbital B. Braun
  - Termòstat i estufa: Certomat H
  - Agitador orbital: Certomat R
- Liofilitzador Telstar
- Micropipetes de volum variable:
  - Pluripipet (Kartell)
  - Pipetman (Gilson France S.A.)
- pH-metre micropH 2000 (Crison)
- Sonicador Branson 250
- Sonicador Braun Labsonic U
- Termociclador PTC-150-16 (MJ Research)
- Transil·luminador UV/VIS UVP TMW-20
- Tubs de diàlisi Spectra/Por<sup>®</sup> MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries)
- Unitat d'ultrafiltració PTGC Prep/Scale-TFF (Millipore Corp.)
  - Bomba peristàltica (Millipore Corp.)

## I.2. Aspectes generals de biologia molecular, expressió i purificació enzimàtica

### I.2.1. Condicions d'esterilitat

La manipulació genètica de les soques d'*Escherichia coli*, així com el creixement dels cultius bacterians s'han realitzat en condicions d'esterilitat. Sempre que ha estat possible s'ha treballat en una cabina de flux laminar. En el seu defecte, s'ha treballat en una zona de 50 cm al voltant de la flama oxidant d'un encenedor Bunsen, prèviament netejada amb alcohol.

L'esterilització de les diferents solucions i medis líquids no termosensibles es realitza en una autoclau a 120 °C durant 20 minuts. El material sòlid emprat en la manipulació cel·lular s'esterilitza a l'autoclau a la mateixa temperatura, però en aquest cas, durant 90 minuts. Les diferents solucions termosensibles s'esterilitzen per filtració emprant filtres estèrils de 0.22 µm.

### I.2.2. Medis de cultiu

El medi M9 és un medi mínim que es fa servir per al creixement en placa de Petri, mentre que els medis LB, 2YT i 2SB són medis de cultiu rics que es fan servir, el primer, generalment per al cultiu en placa de Petri, i els dos darrers, per al creixement en medi líquid.

*Medi M9.* S'esterilitza una suspensió d'agar (15 g) en aigua desionitzada (760 mL) a l'autoclau. Abans que l'agar gelifiqui (45 °C), s'addicionen asèpticament les següents solucions: 5xM9 (200 mL), 1 M MgSO<sub>4</sub> (2 mL), 540 mM CaCl<sub>2</sub> (2 mL), glucosa al 20% (20 mL) i 1 mg·mL<sup>-1</sup> tiamina (2 mL), que s'han esterilitzat prèviament. La solució salina 5xM9, i les solucions de MgSO<sub>4</sub> i CaCl<sub>2</sub> s'esterilitzen per separat a l'autoclau, i les solucions de glucosa i tiamina s'esterilitzen per filtració. La composició de la solució 5xM9 és de 0.239 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.11 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.043 M NaCl i 0.093 M NH<sub>4</sub>Cl. Per tal de preparar-la es dissolen Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (17.12 g, 47.8 mmol), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.99 g, 22 mmol), NaCl (0.50 g, 8.6 mmol) i NH<sub>4</sub>Cl (0.99 g, 18.6 mmol) en aigua desionitzada (200 mL).

*Medi LB.* Es dissolen bactotripton (10 g), extracte de llevat (5 g) i NaCl (5 g, 0.085 mol) en aigua desionitzada (1 L). S'esterilitza a l'autoclau. Si es desitja obtenir medi sòlid per tal de preparar plaques de Petri, abans de l'esterilització s'afegeix al medi l'agar (15 g).

*Medi 2xYT.* Es dissolen bactotripton (16 g), extracte de llevat (10 g) i NaCl (5 g, 0.085 mol) en aigua desionitzada (1 L). S'esterilitza a l'autoclau.

*Medi 2xSB.* Es dissolen bactotripton (24 g), extracte de llevat (48 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (31.5 g, 87.95 mmol) i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.7 g, 12.49 mmol) en aigua desionitzada (1 L). S'esterilitza a l'autoclau.



### I.2.2.1. Preparació de plaques de cultiu

#### - *Plaques per al creixement cel·lular*

S'aboca el medi de cultiu estèril sobre plaques de Petri situades en una cabina de flux laminar, abans de la solidificació de l'agar, que es produeix al voltant dels 45 °C. Es deixa refredar fins a temperatura ambient, i a continuació se segellen les plaques amb film de parafina i es guarden invertides a 4 °C.

#### - *Plaques emprades per determinar l'activitat glucanasa de les colònies en creixement*

Es procedeix com en el cas anterior emprant medi de cultiu LB. Sobre el medi de cultiu ja gelificat s'addiciona una solució 7 mg·mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) (1.5 mL), i es reparteix uniformement amb una espàtula de Drigalski sobre tota la superfície de la placa, aconseguint una concentració final aproximada de 0.35 mg·mL<sup>-1</sup>.

*Solució 7 mg·mL<sup>-1</sup> de 1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi:* es resuspèn  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (350 mg, Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) en aigua Milli-Q (50 mL), afegint el sòlid sobre el líquid a 60 °C amb agitació magnètica. S'escalfa a 95 °C fins a dissolució completa (aprox. 20 minuts).

### I.2.3. Antibiòtics

Es fa servir ampicil·lina per tal d'exercir una pressió positiva sobre el cultiu bacterià, de manera que només puguin créixer les cèl·lules que expressen una  $\beta$ -lactamasa capaç de degradar l'antibiòtic. En presència d'aquest antibiòtic, les cèl·lules sense el gen *Amp<sup>r</sup>* no poden multiplicar-se, però tampoc no moren, sinó que romanen en estat latent. Per això, en els cultius bacterians en placa de Petri s'ha d'intentar evitar el creixement de colònies satèl·lit, que es produeix quan el creixement bacterià és suficientment important com per degradar quantitativament l'ampicil·lina de l'entorn de la colònia, permetent d'aquesta manera el creixement d'altres microorganismes no resistent a l'antibiòtic. Per tal d'evitar-ho és important controlar el temps d'incubació.

D'aquesta manera, en el present treball, s'aconsegueix el creixement selectiu de les cèl·lules que contenen el plasmidi pUC119 o derivats. Es prepara una solució estoc 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina en aigua Milli-Q, s'esterilitza per filtració i es conserva a -20 °C. L'ampicil·lina s'addiciona, tant a medis líquids com a medis sòlids, en el moment de realitzar el creixement cel·lular. En els medis sòlids s'empra una concentració de l'antibiòtic de 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> i en els medis líquids una concentració entre 100 i 150  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>.

### I.2.4. Vectors

Els vectors es conserven en les soques transformades o bé en dissolució en tampó TE o aigua Milli-Q estèrils, a -20°C.

*pUC119*: S'ha utilitzat com a vector general de clonatge. El plasmidi *pUC119* està especialment dissenyat per a experiments de clonació i expressió en enginyeria de proteïnes i consta, bàsicament, de: a) un origen de replicació (*ori*); b) un gen de resistència a ampil·lina (*Amp<sup>r</sup>*); c) el *polylinker* interrompent el gen *LacZ*. El gen *Amp<sup>r</sup>* aporta un sistema de detecció de clons transformats amb èxit, ja que només els bacteris que l'expressin creixen en un medi suplementat amb aquest antibiòtic.

*pD6-2*: Plasmidi de 4.28 kb obtingut en anteriors treballs del grup [192] per inserció d'un fragment d'1.2 kb (*SacI/SphI*) d'ADN genòmic de *Bacillus licheniformis*, en la seqüència del *polylinker* del vector *pUC119*. L'insert conté el gen de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa objecte d'estudi, amb els seus promotor, pèptid senyal i terminador originals. Aquest vector s'ha utilitzat amb la finalitat d'obtenir els diferents mutants de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, i també com a vector d'expressió en les cèl·lules hoste.

### I.2.5. Soques emprades

S'han utilitzat com a organismes hoste les soques d'*Escherichia coli* DH5<sub>α</sub>, TG1 i BL21-SI, comercialitzades en forma de glicerinat o discos liofilitzats. El genotip de cadascuna d'elles es detalla a continuació:

DH5<sub>α</sub>: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hdsR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44  $\lambda$  thi-1 gyrA96 relA1*.

BL21-SI: F<sup>-</sup>, *ompT, hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal, dcm, endA1, proUp::T7RNAP::malQ-lacZ, Tet<sup>S</sup>*.

TG1: *supE hsd $\Delta$ 5 thi  $\Delta$ (lac-proAB) F<sup>+</sup> (traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>d</sup> lacZ $\Delta$ M15)*

#### I.2.5.1. Revifament de discos liofilitzats

Es transfereix un disc liofilitzat a un tub de plàstic de 10 mL en condicions asèptiques i s'afegeix medi líquid 2xYT, o ocasionalment medi LB (500  $\mu$ L). S'agita suaument durant un minut sense fer servir vòrtex, i se sembra una placa de medi mínim M9 per estries. S'incuba a 37 °C durant 24-36 hores, i posteriorment se segella amb film de parafina i s'emmagatzema invertida a 4 °C fins a 30 dies.

#### I.2.5.2. Conservació de soques

Les cèl·lules utilitzades, es conserven en plaques de Petri a 4 °C durant un mes. Passat aquest temps la placa es descarta i es treballa amb una de nova, obtinguda per replaquejat d'una placa estoc, que s'obté sembrant-la amb una alíquota d'un glicerinat de la soca, guardat a -80 °C.

Per a la conservació durant períodes llargs de temps es fan servir glicerinat, que s'obtenen per addició de glicerina estèril a un cultiu cel·lular en medi líquid (15% v/v). Aquests glicerinat es poden repartir en alíquotes i mantenir a -20 °C durant un màxim de 6 mesos o a -80 °C durant diversos anys.

## **I.2.6. Obtenció de cultius**

Els cultius en placa LB es fan créixer a l'estufa a 37 °C durant 12 h (ON).

### I.2.6.1. *Cultius en placa a partir de glicerinat*

Es descongela lentament el glicerinat fins a 0 °C. La nansa de Kolle, prèviament esterilitzada a la flama, se submergeix asèpticament en el glicerinat i se sembra per estries una placa de Petri amb medi M9. S'incuba a 37 °C durant 24-48 hores. Cada glicerinat es fa servir només una vegada.

### I.2.6.2. *De placa a medi líquid (obtenció del preinòcul)*

Es toca una colònia única de la placa de Petri amb la nansa de Kolle, esterilitzada prèviament a la flama, i s'introdueix asèpticament en medi líquid 2xYT (3 mL) contingut en un tub estèril de 10 mL. S'incuba agitant a 300 rpm i 37 °C ON. No s'ha de rosar massa fort el tub de forma que es doni una bona transferència d'O<sub>2</sub>, però evitant que es desenrosqui dins de l'incubador.

### I.2.6.3. *De medi líquid a medi líquid*

S'inocula asèpticament el nou medi de cultiu amb un cultiu crescut o preinòcul (1% v/v). S'incuba agitant a 300 rpm i 37 °C ON. El volum del nou cultiu no ha de superar una tercera part del volum del recipient on està contingut, per tal de permetre una bona oxigenació del mateix. El recipient es manté tapat amb cotó fluix i paper d'alumini durant tot el creixement.

## **I.3. Mètodes d'ADN recombinant**

### **I.3.1. Mètodes preparatius d'obtenció d'ADN plasmídic**

#### I.3.1.1. *Obtenció d'ADN a petita escala, mini-prep*

##### I.3.1.1.1. *Lisi alcalina i extracció amb fenol*

El tret característic d'aquest mètode és la purificació de l'ADN plasmídic realitzant una extracció amb fenol, que elimina les restes de proteïnes no precipitades en el pas de neutralització. Posteriorment, per tal de concentrar l'ADN obtingut s'efectua una precipitació amb EtOH. En l'escala de *mini-prep* s'obtenen entre 10 i 50 µg d'ADN plasmídic.

#### *Solucions necessàries*

- *Solució I*: es mesclen glucosa (0.9 g, 0.7 mmol), una solució 1 M de Tris·HCl pH 8.0 (2.5 mL) i una solució 0.5 M d'EDTA pH 8.0 (2 mL), i s'enrassa a 100 mL amb aigua Milli-Q. S'esterilitza amb autoclau i es conserva a 4 °C.

- *Solució II*: es barreja una solució 2 M de NaOH (300  $\mu\text{L}$ ), i una altra de SDS al 10% (300  $\mu\text{L}$ ) amb aigua Milli-Q (2.4 mL). Aquesta solució es prepara al moment, evitant agitar-la, a partir de les solucions estoc. No és necessari autoclavar-la i es pot conservar a temperatura ambient durant el procés.
- *Solució III*: es mesclen una solució 5 M de KAcO (60 mL), HAcO glacial (11.5 mL) i aigua Milli-Q (28.5 mL). Aquesta solució s'emmagatzema a 4 °C sense esterilitzar.
- *Tampó TE pH 8.0*: es barregen una solució 1 M de Tris (1 mL) i una altra 0.5 M d'EDTA (0.2 mL) amb aigua Milli-Q (80 mL) i s'ajusta el pH a 8.0 amb una solució 2 N d'HCl. S'enrassa a 100 mL amb aigua Milli-Q, i s'esterilitza amb autoclau.
- ARNasa lliure d'ADNasa: dilució 1/10 de la solució comercial de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Boehringer Mannheim GmbH), prèviament esterilitzada a 120 °C durant 10 minuts i conservada a -20 °C. És important que les solucions de tampó i enzim, que es guarden a -20 °C, fonguin totalment abans de la seva utilització.

### *Procediment*

Es prepara un preinòcul de 3 mL en medi 2xYT, suplementat amb una solució 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'ampicil·lina (15  $\mu\text{L}$ ), a partir d'una colònia única de la placa de cèl·lules transformades. Es fan dues alíquotes de 1.5 mL del cultiu, que s'introdueixen en sengles tubs d'Eppendorf estèrils, i se centrifuguen a 13500 rpm durant 2 minuts. Es descarta el sobrenedant per aspiració i es resuspèn el botó cel·lular en la solució I (100  $\mu\text{L}$ ). A continuació s'afegeix la solució II (200  $\mu\text{L}$ ), i es barreja molt suaument invertint el tub varies vegades, sense agitar. El tub d'Eppendorf es manté en gel durant 3 minuts. S'afegeix la solució III (150  $\mu\text{L}$ ) i es barreja amb vòrtex, es manté en gel durant 5 minuts, i se centrifuga a 13500 rpm, durant almenys 5 minuts, fins obtenir un sobrenedant transparent. Es transfereix asèpticament el sobrenedant a un altre tub d'Eppendorf estèril. S'afegeix una mescla 49.5:49.5:1 de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ). S'agita en vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. Es transfereix asèpticament la fase aquosa (fase superior) a un altre tub d'Eppendorf estèril, i es torna a afegir la mateixa mescla de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ), s'agita en vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. La fase aquosa es transfereix asèpticament a un altre tub d'Eppendorf estèril i s'afegeix una mescla 24:1 de cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ). S'agita amb vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. La fase aquosa (superior) es transfereix asèpticament a un altre tub d'Eppendorf estèril. Es precipita l'ADN plasmídic amb EtOH absolut fred (2.5 volums)<sup>1</sup>, agitant suaument i mantenint el tub durant 2 hores a -20 °C (alternativament es pot deixar el tub a -20 °C ON); o bé amb isopropanol (0.7 volums), agitant suaument i deixant 2 minuts a temperatura ambient. Se centrifuga a 13500 rpm durant 45 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. Es renta l'ADN precipitat amb EtOH al 70% (1 mL) a temperatura ambient, invertint el tub, amb la precaució de no desfer el botó. Se centrifuga a 13500 rpm durant 5 minuts a 4 °C i es retira el sobrenedant per aspiració. Es deixa eixugar el botó d'ADN a temperatura ambient durant 15 minuts i es resuspèn en aigua estèril<sup>2</sup> o bé tampó TE<sup>3</sup> (10  $\mu\text{L}$ ). S'afegeix ARNasa lliure d'ADNasa (4  $\mu\text{L}$ ) de forma que la concentració final de la mateixa sigui de 20  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La solució resultant s'emmagatzema a -20 °C.

<sup>1</sup> Si s'afegeix menys EtOH, l'ADN no precipita, i si se n'afegeix més, precipiten moltes sals.

<sup>2</sup> L'aigua s'esterilitza a 120 °C durant 20 minuts o bé per filtració amb filtres de 0.22  $\mu\text{m}$ .

<sup>3</sup> Per qüestions d'estabilitat plasmídica i eficàcia de transformació és millor resuspendre l'ADN en tampó TE, però quan el plasmidi està destinat a PCR ha de resuspendre's en aigua.

### 1.3.1.1.2. Obtenció d'ADN emprant el kit Qiagen Plasmid Miniprep

Aquest *kit* comercial utilitza minicolumnes que contenen una reïna composta per grups amino d'alta selectivitat en la unió d'ADN. L'ADN obtingut d'aquesta manera és d'elevada puresa i s'utilitza per a la seqüenciació.

#### *Composició de les solucions subministrades en el kit*

- *Solució P1 (tampó de resuspensió)*: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA i 100 µg·mL<sup>-1</sup> ARNasa. Es guarda a 4 °C.
- *Solució P2 (solució de lisi)*: 200 mM NaOH i SDS a l'1%.
- *Solució P3 (tampó de neutralització)*: 3 M NaAcO pH 5.5. Es guarda a 4 °C.
- *Solució QBT (tampó per equilibrar la columna)*: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, isopropanol al 15%, Triton<sup>R</sup> X-100 al 0.15%.
- *Solució QC (tampó de neteja)*: 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, i isopropanol al 15%.
- *Solució QF (tampó d'elució)*: 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, i isopropanol al 15%.

#### *Procediment*

Es prepara un preinòcul de 3 mL en medi 2xYT, suplementat amb una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina (15 µL), a partir d'una colònia única de la placa de cèl·lules transformades. S'introdueix en un tub d'Eppendorf estèril una alíquota del cultiu (1.4 mL) se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts, i es descarta el sobrenedant per aspiració. Sobre aquest botó cel·lular s'afegeix una altra alíquota del mateix cultiu (1.4 mL) i es repeteix el procés. Es resuspèn asèpticament el botó cel·lular en solució P1 (300 µL). S'afegeix asèpticament solució P2<sup>1</sup> (300 µL), s'inverteix el tub 6 vegades molt suaument i es deixa actuar a temperatura ambient no més de 5 minuts<sup>2</sup>. S'afegeix asèpticament solució P3 (300 µL) prèviament refredada a 4 °C, s'inverteix el tub 6 vegades molt suaument i es deixa actuar en gel durant 5 minuts. Posteriorment se centrifuga a 13500 rpm durant 10 minuts tantes vegades com calgui fins obtenir un sobrenedant transparent. Mentrestant, es prepara la columna subministrada en el *kit*. Amb aquest propòsit, s'acobla la columna a un tub estèril de 10 mL i s'equilibra amb solució QBT (1 mL). Es deixa eluir per gravetat fins que el menisc quedi a la part superior de la reïna. Es carrega el sobrenedant a la columna i es deixa eluir per gravetat. Es neteja la columna amb solució QC (4 x 1 mL), i es descarten tots els eluïts obtinguts fins al moment. S'elueix l'ADN plasmídic adherit a la columna amb solució QF (800 µL), i l'eluït es recull sobre un tub d'Eppendorf estèril. Es precipita l'ADN amb isopropanol (0.7 volums: 560 µL) a temperatura ambient. Se centrifuga a 13500 rpm durant 30 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. El botó d'ADN es renta amb EtOH al 70% (1 mL) fred, se centrifuga a 13500 rpm durant 3 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. El botó d'ADN es deixa assecar a l'aire a temperatura ambient durant 5 minuts, seguidament es resuspèn en aigua Milli-Q estèril (10 µL) i es conserva a -20 °C.

<sup>1</sup> La solució P2 conté SDS que pot precipitar en emmagatzemar-se a 4 °C. Per tant, cal assegurar-se de dissoldre'l totalment, escalfant a 37 °C, si és necessari.

<sup>2</sup> És important no excedir-se en el temps de lisi amb la solució P2, ja que es poden generar formes multimèriques d'ADN superenrotllat, que són resistents a la digestió amb enzims de restricció.

### I.3.1.2. Obtenció d'ADN a mitjana escala, midi-prep

#### I.3.1.2.1. Lisi alcalina i extracció amb fenol

Es purifica l'ADN plasmídic per precipitacions successives amb isopropanol i EtOH. En l'escala de *midi-prep* s'obtenen 2-5 mg d'ADN plasmídic.

#### *Solucions necessàries*

- *Solució I*: es mesclen glucosa (0.9 g, 0.7 mmol), una solució 1M de Tris-HCl pH 8.0 (2.5 mL), una solució 0.5 M d'EDTA pH 8.0 (2 mL) i s'enrassa a 100 mL amb aigua Milli-Q. S'esterilitza amb autoclau i es conserva a 4 °C.
- *Solució II*: es barreja una solució 2 M de NaOH (300 µL), i una altra de SDS al 10% (300 µL) amb aigua Milli-Q (2.4 mL). Aquesta solució es prepara al moment a partir de les solucions estoc, evitant agitar-la. No és necessari autoclavar-la i es pot conservar a temperatura ambient durant el procés.
- *Solució III*: es mesclen una solució 5 M de KAcO (60 mL), HAcO glacial (11.5 mL) i aigua Milli-Q (28.5 mL). Aquesta solució s'emmagatzema a 4 °C sense esterilitzar.
- *Tampó TE pH 8.0*: es barregen una solució 1 M de Tris (1 mL) i una altra 0.5 M d'EDTA (0.2 mL) amb aigua Milli-Q (80 mL) i s'ajusta el pH a 8.0 amb una solució 2 N d'HCl. S'enrassa a 100 mL amb aigua Milli-Q i s'esterilitza amb autoclau.
- ARNasa lliure d'ADNasa: dilució 1/10 de la solució comercial de 500 µg·mL<sup>-1</sup> (Boehringer Mannheim GmbH), prèviament esterilitzada a 120 °C durant 10 minuts i conservada a -20 °C. És important que les solucions de tampó i enzim, que es guarden a -20 °C, fonguin totalment abans de la seva utilització.

#### *Procediment*

Es prepara un preinòcul de 3 mL en medi 2xYT, suplementat amb una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina (15 µL), a partir d'una colònia única de la placa de cèl·lules transformades. Amb 100 µL d'aquest cultiu es fa créixer un altre cultiu en medi 2xYT (20 mL) suplementat amb una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina (100 µL), contingut en un matràs d'Erlenmeyer de 100 mL estèril. Es reparteix el contingut del matràs en 4 tubs de centrifuga estèrils i se centrifuga a 3000 rpm i 4 °C durant 10 minuts. S'elimina el sobrenedant, es resuspèn el botó cel·lular amb solució I (500 µL) i se centrifuga a 3000 rpm i 4 °C durant 15 minuts. S'elimina el sobrenedant i es torna a resuspendre el botó en solució I (500 µL), se centrifuga a 3000 rpm i 4 °C durant 15 minuts. S'elimina el sobrenedant, per tercera vegada es resuspèn el botó en solució I (200 µL) i es reparteix el contingut de cada tub de centrifuga en dos tubs d'Eppendorf estèrils (100 µL a cada tub d'Eppendorf). A continuació a cada tub s'afegeix solució II (200 µL), i es barreja molt suaument invertint el tub vàries vegades, sense agitar. El tub d'Eppendorf es manté en gel durant 3 minuts. S'afegeix la solució III (150 µL) i es barreja amb vòrtex, es manté en gel durant 5 minuts, i se centrifuga a 13500 rpm, durant almenys 5 minuts, fins obtenir un sobrenedant transparent. Es transfereix asèpticament el

sobrenedant a un altre tub d'Eppendorf estèril. S'afegeix una mescla 49.5:49.5:1 de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ). S'agita en vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. Es transfereix asèpticament la fase aquosa (fase superior) a un altre tub d'Eppendorf estèril, i es torna a afegir la mateixa mescla de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ), s'agita en vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. La fase aquosa es transfereix asèpticament a un altre tub d'Eppendorf estèril i s'afegeix una mescla 24:1 de cloroform/alcohol isoamílic (200  $\mu\text{L}$ ). S'agita amb vòrtex i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. La fase aquosa (superior) es transfereix asèpticament a un altre tub d'Eppendorf estèril. Es precipita l'ADN plasmídic amb EtOH absolut fred (2.5 volums)<sup>1</sup>, agitant suaument i mantenint el tub durant 2 hores a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (alternativament es pot deixar el tub a  $-20\text{ }^\circ\text{C ON}$ ); o bé amb isopropanol (0.7 volums), agitant suaument i deixant 2 minuts a temperatura ambient. Se centrifuga a 13500 rpm durant 45 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. Es renta l'ADN precipitat amb EtOH al 70% (1 mL) a temperatura ambient, invertint el tub, amb la precaució de no desfer el botó. Se centrifuga a 13500 rpm durant 5 minuts a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  i es retira el sobrenedant per aspiració. Es deixa eixugar el botó d'ADN a temperatura ambient durant 15 minuts i es resuspèn en 10  $\mu\text{L}$  d'aigua estèril<sup>2</sup> o bé tampó TE<sup>3</sup>. S'afegeix ARNasa lliure d'ADNasa (4  $\mu\text{L}$ ) de forma que la concentració final de la mateixa sigui de 20  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La solució resultant s'emmagatzema a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

<sup>1</sup> Si s'afegeix menys EtOH, l'ADN no precipita, i si se n'afegeix més, precipiten moltes sals.

<sup>2</sup> L'aigua s'esterilitza a  $120\text{ }^\circ\text{C}$  durant 20 minuts o bé per filtració amb filtres de 0.22  $\mu\text{m}$ .

<sup>3</sup> Per qüestions d'estabilitat plasmídica i eficàcia de transformació és millor resuspendre l'ADN en tampó TE, però quan el plasmidi està destinat a PCR ha de resuspendre's en aigua.

#### L3.1.2.2. *Obtenció d'ADN emprant el kit Wizard<sup>®</sup> Plus Midipreps DNA Purification System*

##### *Composició de les solucions subministrades en el kit*

- *Solució de resuspensió cel·lular*: 50 mM Tris·HCl, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ARNasa A i 10 mM EDTA.
- *Solució de lisi cel·lular*: 0.2 M NaOH i SDS a l'1%.
- *Solució de neutralització*: 1.32 M KAcO, pH 4.8.
- *Solució de neteja de columna*: 40  $\mu\text{M}$  EDTA, EtOH al 55%, 80 mM KAcO, 8.3 mM Tris·HCl, pH 7.5.

##### *Procediment*

S'incuba a 300 rpm i  $37\text{ }^\circ\text{C ON}$  un cultiu en medi LB (50 mL), suplementat amb una solució 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'ampicil·lina (125  $\mu\text{L}$ ), i sembrat a partir d'una colònia única de la placa de cèl·lules transformades. S'introdueixen asèpticament 2 alíquotes del cultiu (25 mL) en sengles tubs de centrífuga de 50 mL estèrils i se centrifuga a 9000 rpm i  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durant 10 minuts. Es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en solució de resuspensió cel·lular (3 mL). S'afegeix solució de lisi cel·lular (3 mL), es barreja suaument i es deixa actuar no més de 5 minuts. S'afegeix solució de neutralització (3 mL) i es barreja molt suaument invertint el tub 5 vegades. Se centrifuga a 9000 rpm i  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durant 15 minuts i el sobrenedant es traspassa asèpticament

a un altre tub estèril. Se centrifuga tantes vegades com sigui necessari fins obtenir un sobrenedant transparent. Aquest sobrenedant es traspasa asèpticament a un flascó estèril, s'afegeix una suspensió de reïna (10 mL) subministrada en el *kit* i es barreja per inversió del flascó. La barreja es carrega a la columna subministrada en el *kit*, que s'elueix aplicant el buit. Un cop dipositada tota la reïna al fons de la columna es desfà el buit, i s'afegeixen dues tandes de solució de neteja de columna (15 mL), que s'elueixen al buit. Es deixa eixugar la reïna aplicant el buit durant 30 segons. Se separa la part de la columna que conté la reïna, s'acobla a un tub d'Eppendorf, i se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts. Es transfereix el fragment de columna a un altre tub d'Eppendorf estèril i s'addiciona aigua o tampó TE (300 µL) prèviament esterilitzats. S'espera 1 minut i se centrifuga a 13500 rpm durant 30 segons, eluint l'ADN plasmídic. La solució d'ADN es conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### I.3.2. Electroforesi d'ADN en gels d'agarosa

L'electroforesi analítica en gel d'agarosa s'empra per a la determinació de la presència i puresa dels fragments d'ADN, així com per a la seva quantificació, mentre que l'electroforesi a nivell preparatiu s'utilitza com a mètode de purificació d'ADN.

#### I.3.2.1. Electroforesi analítica

##### *Solucions necessàries*

- *50 x tampó TAE*: Es dissolen Tris (242 g, 2 mol), HAcO glacial (57.1 mL) i EDTA (18.5 g, 49.7 mmol) en aigua desionitzada i s'enrassa a 1 L.
- *10 x tampó de càrrega*: Es barregen glicerina (500 mg), una solució 0.5 M d'EDTA pH 8.0 (200 µL), una solució de SDS al 10% (100 µL), blau de bromofenol (Bio-rad) (200 µL) i s'afegeix aigua desionitzada fins obtenir un volum final d'1 mL.
- *Tampó d'electroforesi*: Es mesclen 50 x tampó TAE (6 mL), una solució saturada de bromur d'etidi (15 µL) i aigua desionitzada (300 mL).

##### *Preparació del gel d'agarosa*

En un matràs d'Erlenmeyer de 100 mL es pesen els mg d'agarosa adequats a la longitud del fragment d'ADN lineal a analitzar (taula I.1), i s'afegeix aigua desionitzada (25 mL). Es tapa amb cotó fluix i es porta a ebullició, evitant que es formin massa bombolles. Es deixa refredar uns minuts, s'afegeix 50 x tampó TAE (500 µL) i s'agita suaument. S'afegeix una solució  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromur d'etidi<sup>1</sup> en tampó TAE (1.25 µL), es renta bé la pipeta, i s'agita suaument. Mentre s'acaba de refredar l'agarosa, es prepara l'equip electroforètic posant cinta adhesiva a ambdós extrems del motlle, es munta seguint les instruccions subministrades per la casa comercial, i s'equilibra horitzontalment amb un nivell de bombolla. Quan el contingut del matràs d'Erlenmeyer està tebi s'aboca dins del motlle, evitant la formació de bombolles, i es deixa solidificar durant mitja hora.

<sup>1</sup> També es pot realitzar l'electroforesi sense bromur d'etidi en el gel ni en el tampó de càrrega, i efectuar la tinció un cop finalitzada la migració, submergint el gel 30 min en una solució  $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromur d'etidi en aigua o tampó TAE.



**Taula I.1.** Concentració d'agarosa en % (p/v) emprada en els gels analítics d'ADN en funció de la longitud del fragment d'ADN lineal que es desitja analitzar. Per tal d'observar la presència dels plasmidis pD6-2 (4.2 kpb) o pUC119 (3.08 kpb) es prepara un gel d'agarosa a l'1%.

Concentració d'agarosa / % (p/v)	Marge de longituds d'ADN lineal per a una separació eficaç / kpb
0.3	5–60
0.6	1–20
0.7	0.8–10
0.9	0.5–7
1.2	0.4–6
1.5	0.2–3
2.0	0.1–2

### *Preparació de les mostres*

S'afegeix 10 x tampó de càrrega (1 µL) a les mostres, i la quantitat d'aigua Milli-Q estèril necessària per tal d'obtenir un volum final de 10 µL. Un cop triat el marcador de pes molecular adient, es prepara una dilució del mateix fins a una concentració final de 3:1:7 (v/v) en marcador/10 x tampó de càrrega/aigua, que es conserva a 4 °C.

La longitud dels fragments dels marcadors comercials de la casa Boehringer Mannheim GmbH en parells de bases són:

- *DNA Molecular Weight Marker III*: 125, 564, 831, 947, 1375, 1500, 1904, 2027, 3530, 4286, 4973, 5148, 21226 pb.
- *DNA Molecular Weight Marker VI*: (154/154), 220, (234/234), (298/298), 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176 pb.

### *Electroforesi analítica en gel d'agarosa*

Un cop ha solidificat el gel es treu amb cura la pinta i la cinta adhesiva, i es vessa el tampó d'electroforesi a la cubeta, començant pels dipòsits laterals, de forma que cobreixi totalment el gel d'agarosa. Amb ajuda d'una micropipeta es carreguen a les butxaques del gel les mostres, patrons i marcadors (12 µL per butxaca). Es tanca l'aparell d'electroforesi i es connecta a la font d'alimentació<sup>1</sup>. El gel es corre a un voltatge entre 90 i 110 V, fins que la banda blava del blau de bromofenol assoleix 3/4 parts del recorregut total del gel (aprox. 1 h 30 min). Un cop apagada la font de voltatge i desconnectat el muntatge d'electroforesi, s'observa el gel sobre un transil·luminador amb llum UV el menor temps possible, per tal d'evitar mutacions espontànies.

<sup>1</sup> L'ADN és una molècula polianiónica, i per tant, migra cap a l'ànode (vermell).

### I.3.2.2. *Electroforesi preparativa en gel d'agarosa*

Es realitza de la mateixa manera que l'electroforesi analítica, amb la diferència que per tal de preparar el gel s'utilitza el doble de quantitat de reactius, i es carrega el doble de volum de mostra per butxaca.

### I.3.3. Quantificació d'ADN per electroforesi

Quan es disposa una quantitat petita d'ADN (ng) es determina la concentració per electroforesi comparativa amb mostres comercials, que poden ser marcadors o bé patrons de banda única, que contenen una quantitat d'ADN coneguda. Com s'ha detallat en l'apartat anterior, la determinació de l'ADN es realitza sobre gels d'electroforesi d'agarosa en què les bandes d'ADN es tenyeixen amb bromur d'etidi. La correlació entre la intensitat de la banda corresponent a la mostra i el valor de la concentració d'ADN és tant més bona, com més semblant sigui el seu corriment electroforètic amb el d'una banda de referència.

Si s'empra com a patró un marcador de pesos moleculars en què els fragments d'ADN es troben en relació equimolar, els ng que conté la banda d'interès es calculen emprant l'equació I.1.

$$\text{ng ADN} = \frac{\text{n}^\circ \text{ pb de banda d'intensitat equivalent}}{\sum \text{pb de totes les bandes del marcador}} \cdot \text{ng totals del marcador carregats}$$

Equació I.1

**Taula I.2.** Patró de bandes del marcador *DNA Molecular Weight Marker III* (Boehringer Mannheim GmbH), i quantitat d'ADN associada a cada banda per a 1 µL de marcador. En negreta s'indica la banda de referència que s'utilitza per a la quantificació del plasmidi pD6-2 i derivats.

pb	Quantitat / ng
21226	109.4
5148	26.5
4973	25.6
<b>4268</b>	<b>22.0</b>
3530	18.2
2027	10.5
1904	9.8
1584	8.2
1375	7.1
947	4.9
831	4.3
564	2.9
125	0.6
$\Sigma=48502$	$\Sigma=250$

El marcador utilitzat és el *DNA Molecular Weight Marker III* (Boehringer Mannheim GmbH), de concentració 250 µg·mL<sup>-1</sup>. A la taula I.2 es mostren el patró de bandes que conté i els ng corresponents a cada banda. En aquest marcador hi ha una banda molt pròxima a la mida de 4.2 kpb, que és la longitud del plasmidi pD6-2. Per comparació amb la quantitat d'ADN d'aquesta banda es calcula la quantitat d'ADN present a la mostra.

### *Procediment*

Es linealitzava el plasmidi a quantificar amb un enzim de restricció de diana única, veure I.3.5.1. Es preparen diferents dilucions del marcador que es carreguen en els carrils contigus a la mostra, i es realitza una electroforesi en gel d'agarosa (I.3.2.1). Es compara la intensitat de la banda de 4.2 kpb de la mostra amb les de les diferents dilucions del marcador. Tenint en compte la dilució realitzada en el carril de marcador que presenta la mateixa intensitat que la mostra, es calcula la quantitat d'ADN present a la mostra.

### **I.3.4. Purificació d'ADN plasmídic**

#### *I.3.4.1. Obtenció d'ADN a partir d'una electroforesi preparativa en gel d'agarosa*

Un cop realitzada una electroforesi preparativa en gel d'agarosa (I.3.2.2), es localitza la banda d'interès amb un trasil·luminador d'UV<sup>1</sup>, i es retalla amb una fulla de bisturí estèril. S'introdueix en un tub d'Eppendorf estèril, prèviament tarat, i es pesa. S'afegeix una solució saturada de NaI (3 µL per cada mg de gel pesat) i s'incuba almenys 5 minuts en un bany a 55 °C, fins que fongui tota l'agarosa. La solució d'ADN que es treu del bany està llesta per tal de seguir algun altre procediment de purificació.

<sup>1</sup> S'ha d'il·luminar el gel el mínim temps possible amb llum UV per tal d'evitar mutacions espontànies de l'ADN.

#### *I.3.4.2. Purificació d'ADN plasmídic amb el kit GENE CLEAN<sup>®</sup> II<sup>TM</sup> (Bio101 Inc.)*

Aquest mètode de purificació aprofita les propietats de l'ADN d'adherir-se a les fibres de vidre en condicions d'alta força iònica i baixa temperatura, per tal de separar-lo d'altres molècules o compostos presents en el medi (ARN, SDS, traces de fenol,...). Per tal de recuperar posteriorment l'ADN s'ha de passar a unes condicions de baixa força iònica i alta temperatura. Aquest procediment és vàlid per a fragments d'ADN de més de 250 parells de bases.

#### *Solucions necessàries*

- *Solució New Wash*: es barreja solució de *New Concentrate*, subministrada en el *kit*, (7 mL) amb aigua Milli-Q (140 mL) i EtOH absolut (155 mL). S'emmagatzema a -20 °C.

#### *Procediment*

Si l'ADN a purificar no prové d'una electroforesi preparativa, s'afegeix una solució saturada de NaI (3 µL per cada µL de solució d'ADN). Amb aquesta solució es procedeix de la mateixa manera que amb l'ADN obtingut a partir d'una electroforesi preparativa: S'addiciona una solució de *glassmilk*<sup>1</sup> (5 µL per 5 µg d'ADN, més 1 µL per cada 0.5 µg d'ADN addicional). S'agita amb vòrtex uns segons i es manté en un bany de gel durant 5-10 minuts, agitant cada 1-2 minuts. Se centrifuga a 13500 rpm durant uns 15 segons i es descarta el sobrenedant<sup>2</sup> amb una pipeta automàtica o amb un cop sec de canell. Es renta el precipitat amb la solució *New wash* guardada a 0 °C (3 x 500 µL).

A cada rentat es resuspèn ben bé el botó per pipeteig, se centrifuga durant 10 segons a 13500 rpm, i es descarta el sobrenedant per aspiració al buit. S'asseca el botó en un dessecador de buit connectat a una trompa d'aigua durant 5 minuts. Es resuspèn el sediment en aigua desionitzada o tampó TE<sup>3</sup> (10-20 µL). S'agita uns segons en vòrtex i s'incuba a 55 °C durant 5 minuts. Se centrifuga 30 segons a 13500 rpm i es transfereix el sobrenedant (on es troba l'ADN purificat) a un nou tub d'Eppendorf. El botó es torna a assecar en un dessecador de buit i es repeteix l'extracció amb aigua desionitzada o tampó TE. S'ajunten els dos sobrenedants, se centrifuguen uns minuts a 13500 rpm per tal d'eliminar la sílica residual i es transfereixen a un nou tub d'Eppendorf estèril.

<sup>1</sup> La solució de *glassmilk*, que ve subministrada en el *kit*, s'ha d'agitar prèviament fins que estigui totalment resuspesa.

<sup>2</sup> Es pot conservar el sobrenedant per si no s'hagués unit tot l'ADN a la sílica.

<sup>3</sup> Per qüestions d'estabilitat plasmídica i eficàcia de transformació és millor resuspendre l'ADN en tampó TE, però quan el plasmidi està destinat a servir de motlle en experiments de PCR s'ha de resuspendre en aigua.

#### 1.3.4.3. Purificació d'ADN plasmídica amb el kit GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (Bio101 Inc.)

Aquest mètode de purificació també aprofita les propietats de l'ADN d'adherir-se a les fibres de vidre en unes condicions determinades. Aquest procediment és vàlid per a fragments d'ADN de més de 200 parells de bases.

##### *Procediment*

Si l'ADN a purificar no prové d'una electroforesi preparativa, s'afegeix una solució 6 M de NaI (3 µL per cada µL de solució d'ADN). Amb aquesta solució es procedeix de la mateixa manera que amb l'ADN obtingut a partir d'una electroforesi preparativa: S'addiciona una solució de *glassmilk*<sup>1,2</sup> (5 µL per 5 µg d'ADN, més 1 µL per cada 0.5 µg d'ADN addicional). Es transfereix a un mòdul de *Spin*<sup>1,3</sup> i s'espera 5 minuts, perquè s'hi adhireixi, invertint el tub ocasionalment. S'adapta el mòdul a un tub d'Eppendorf i se centrifuga a 13500 rpm fins que tot el líquid estigui a la part inferior del mòdul (aprox. 1 minut). Per al rentat s'afegeix solució *New Wash*<sup>1</sup> (500 µL), es resuspèn suaument el botó, i se centrifuga a 13500 rpm fins que tot el líquid està a la part inferior del mòdul (aprox. 1-3 minuts). Es repeteix el rentat. Opcionalment es pot rentar una tercera vegada amb EtOH al 80%. Es buida el tub d'Eppendorf que conté els rentats, i se centrifuga a 13500 rpm durant 1 minut per tal d'assecar el botó. Es transfereix el mòdul de *Spin* a un nou tub d'Eppendorf i s'afegeix solució d'elució<sup>1,4</sup> (20 µL), es resuspèn suaument el botó i se centrifuga a 13500 rpm fins que tot el líquid està a la part inferior (aprox. 1 minut). Per obtenir un 5-10% de rendiment addicional es pot tornar a eluir el mòdul, que finalment es descarta.

<sup>1</sup> Subministrada en el *kit*.

<sup>2</sup> La solució de *glassmilk* s'ha d'agitar prèviament fins que estigui totalment resuspesa.

<sup>3</sup> La capacitat del mòdul de *Spin* és de 750 µL. Per a volums superiors, l'adhesió de l'ADN al mòdul s'ha de realitzar per etapes.

<sup>4</sup> Es pot substituir la solució d'elució amb aigua desionitzada o tampó TE.

### I.3.5. Tècniques de clonatge en plasmidis

#### I.3.5.1. Digestió amb enzims de restricció

La digestió amb enzims de restricció s'ha emprat a nivell analític i a nivell preparatiu amb finalitats diferents. La digestió a escala analítica permet exercir un control sobre el bon funcionament del procés de mutagènesi dirigida, en aprofitar la creació o eliminació de dianes de restricció. La digestió a escala preparativa s'ha emprat amb dos objectius diferents. D'una banda, en el cas d'introduir la mutació desitjada pel mètode de SDM-PCR, es fan servir enzims de restricció per digerir, tant l'insert que conté el gen d'interès, com el vector on se subclonarà. En aquest cas, s'empren els mateixos enzims de restricció, o bé enzims de restricció que generin extrems equivalents, de manera que, posteriorment a la seva purificació, s'obtingui un nou vector recombinant per acció d'una lligasa. D'altra banda, en el cas que s'ha fet servir la SDM-LA-PCR per tal de generar la mutació, la digestió preparativa es fa servir per tal de linealitzar el vector recombinant i, amb l'ajuda d'una endonucleasa de restricció que reconeix dianes metilades, digerir l'ADN salvatge, preservant l'ADN mutat.

#### *Procediment*

Quan es treballa a escala analítica, s'afegeix en un tub d'Eppendorf estèril una solució d'ADN (entre 1 i 8 µL) corresponents a 50-100 ng d'ADN, els enzims de restricció<sup>1</sup> (1 µL de cada), 10 x tampó de digestió<sup>2</sup> (1 µL per cada enzim utilitzat), i aigua desionitzada fins a un volum de reacció total de 10 µL. Es deixa incubant dues hores a 37 °C<sup>3</sup>, i la mostra es prepara per a la seva posterior anàlisi electroforètica. Si aquesta no s'ha de realitzar a continuació, la mostra es pot conservar a -20 °C.

Quan es treballa a escala preparativa la quantitat d'ADN emprada és de 0.5-1 µg, i a la mescla de digestió s'afegeixen els enzims de restricció<sup>1</sup> (1 µL de cada), 10 x tampó de digestió<sup>2</sup> (2 µL per cada enzim utilitzat), i aigua desionitzada fins a un volum de reacció total de 20 µL. Es deixa incubant 3 hores a 37 °C<sup>3</sup> i les mostres digerides es conserven a -20 °C.

<sup>1</sup> Els enzims de restricció un cop fora del congelador s'han de conservar en un bany a -20 °C, i s'han de retornar al congelador tan aviat com sigui possible.

<sup>2</sup> Els tampons de digestió i els enzims de restricció estan subministrats per la mateixa casa comercial. S'ha d'escollir el tampó de màxima activitat per a l'enzim o la mescla d'enzims. Les digestions simultànies es poden realitzar sempre que les condicions de tampó i temperatura siguin compatibles, en cas contrari s'ha de realitzar la digestió per etapes (generalment es comença per la que comporta treballar a menor temperatura, per tal d'evitar activitats inespecífiques pel fet de treballar a una temperatura superior a l'òptima).

<sup>3</sup> Si les condicions de reacció no són les òptimes (temperatura, temps d'incubació, concentració d'enzim...) pot donar-se l'efecte *star*, degut a una relaxació en l'especificitat de l'enzim de restricció, generant fragments d'ADN no desitjats. En el cas d'emprar l'enzim DpnI, aquest efecte no s'ha observat fins passades 16 hores d'incubació.

**Taula I.3.** Enzims de restricció, i tampons corresponents, emprats. S'indiquen també les dianes de restricció pròpies de cada enzim.

Enzim <sup>a</sup>	Tampó de digestió <sup>b</sup>	Diana de restricció
EcoRI	H	3' G/AATTC 5' 5' CTTAA/G 3'
HindIII	B	3' A/AGCTT 5' 5' TTCGA/A 3'
EcoRI + HindIII	B	
DpnI	1X	3' CT/A <sup>m</sup> G 5' 5' GA <sup>m</sup> /TC 3'
EcoRI + DpnI	H + 1X <sup>c</sup>	
HindIII + DpnI	B + 1X <sup>c</sup>	
SacI	A	3' GAGCT/C 5' 5' C/TCGAG 3'
HaeII	A	3' (A/G)GCGC/(T/C) 5' 5' (T/C)/CGCG(A/G) 3'

<sup>a</sup> La concentració de l'estoc dels enzims és de 10 u·µL<sup>-1</sup>. Es defineix *u*, la unitat d'activitat enzimàtica, com la quantitat d'enzim que degrada 1 µg d'ADN en 1 hora.

<sup>b</sup> Els tampons A, B i H són tampons proporcionats per la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH, el tampó 1X està subministrat per la casa comercial Stratagene. Composició dels tampons: **H**: 50 mM Tris·HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.5; **B**: 10 mM Tris·HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 8.0; **A**: 33 mM Tris·AcO, 66 mM KAcO, 10 mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 7.9; **1X**: 10 mM Tris·HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 10 µg·mL<sup>-1</sup> BSA, 1 mM DTT, pH 7.7.

<sup>c</sup> S'observa que l'activitat de cada enzim no s'altera significativament en mesclar els tampons i que no es produeix l'efecte *star*.

### I.3.5.2. Lligació

#### *Procediment*

- Per als mutants que s'han generat per SDM-PCR (W221A, W221F i Y152A):

En un tub d'Eppendorf autoclavat s'afegeixen el vector pUC119<sup>1</sup> digerit i purificat (1 µL, aprox. 160 ng·µL<sup>-1</sup>), l'insert<sup>1</sup> digerit (en proporció insert/vector 1:1-10:1 mol/mol), tampó<sup>2</sup> de lligasa d'ADN T4 (2 µL), una solució 10 mM d'ATP<sup>3</sup> (1 µL), aigua desionitzada estèril fins un volum de 10 µL, i posteriorment la lligasa<sup>2</sup> d'ADN T4 (1 µL, 1 u·µL<sup>-1</sup>), mantenint-la el mínim temps possible fora del congelador. La mescla de reacció s'incuba a 10 °C durant 5 hores. El producte de lligació pot conservar-se a -20 °C.

<sup>1</sup> Els fragments a lligar han d'estar dissolts en aigua, ja que la lligació es veu afectada per tampons que contenen EDTA.

<sup>2</sup> Proporcionat per la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH.

<sup>3</sup> Aquesta solució s'obté per dilució 1/10 de la solució estoc 100 mM subministrada per la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH. Donat que l'ATP fàcilment es desfosforila a AMP, s'ha d'emmagatzemar repartit en fraccions de 10 µL a -20 °C, i no tornar a congelar l'alíquota un cop oberta.

- Per al mutant generat per SDM-LA-PCR (Y152F):

En el mateix tub on s'ha realitzat la digestió preparativa s'afegeixen tampó<sup>1</sup> de lligasa d'ADN T4 (2 µL), una solució 10 mM ATP<sup>2</sup> (2 µL) i la lligasa<sup>1</sup> d'ADN T4 (1 µL), i s'incuba a 10 °C durant 5 hores. El producte de lligació es pot conservar a -20 °C.

<sup>1</sup> Proporcionat per la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH.

<sup>2</sup> Aquesta solució s'obté per dilució 1/10 de la solució estoc 100 mM subministrada per la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH. Donat que l'ATP fàcilment es desfosforila a AMP, s'ha d'emmagatzemar repartit en fraccions de 10 µL a -20 °C, i no tornar a congelar l'alíquota un cop oberta.

### I.3.5.3. Preparació de cèl·lules competents

S'obté un cultiu líquid de medi 2×YT (3 mL) a partir d'una colònia única. S'inocula asèpticament un nou medi de cultiu 2×YT (30 mL), contingut en un matràs d'Erlenmeyer estèril de 100 mL, amb una alíquota del cultiu anterior (300 µL). S'incuba a 37 °C i 300 rpm fins que  $A_{600\text{ nm}} \approx 0.3$  uA<sup>1</sup> (aproximadament 2 hores per a cèl·lules TG1; aquest temps depèn molt de la soca i de la qualitat de l'inòcul de 3 mL). Per tal de llegir la terbolesa del cultiu a 600 nm es transfereix asèpticament 1 mL de cultiu a una cubeta de quars, i es determina la seva absorbància a 600 nm front a una altra cubeta que conté medi de cultiu verge. A continuació, el cultiu es transfereix asèpticament a un tub de centrífuga estèril de 50 mL, es manté a 0 °C durant 20 minuts i se centrifuga a 4 °C i 3000 rpm durant 10 minuts. Posteriorment es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn suaument el botó cel·lular per pipeteig amb una solució 50 mM de CaCl<sub>2</sub> estèril (15 mL) conservat a 4 °C. La suspensió resultant es manté en gel durant 15 minuts i se centrifuga a 4 °C i 3000 rpm durant 10 minuts. Es decanta el sobrenedant asèpticament i es torna a resuspendre el botó cel·lular suaument per pipeteig amb una solució 50 mM de CaCl<sub>2</sub> estèril (3 mL) conservat a 4 °C. Finalment la suspensió es reparteix asèpticament en alíquotes de 100 µL en tubs d'Eppendorf estèrils, que es mantenen durant 20 hores a 4 °C per tal de procedir a la seva transformació. L'eficiència de transformació és màxima entre les 16 i 24 hores, però la transformació es podria efectuar a partir de les 5 hores d'estar a 4 °C.

<sup>1</sup> Si es deixa créixer massa el cultiu de 30 mL l'eficàcia de transformació disminueix.

### I.3.5.4. Transformació de cèl·lules competents

#### *Solucions necessàries*

- *Tampó TE pH 8.0*: es barregen una solució 1 M de Tris (1 mL) i una solució 0.5 M d'EDTA (0.2 mL) amb aigua desionitzada (80 mL), i s'ajusta el pH a 8.0 amb una solució 2 N d'HCl. S'enrasa a 100 mL i s'esterilitza amb autoclau.

#### *Procediment*

S'afegeix asèpticament a una suspensió de cèl·lules competents (100 µL), ADN (50 ng) en un volum inferior a 5 µL, i es barreja suaument (no vòrtex). És important transformar amb varies dilucions de la solució d'ADN per tal d'assegurar l'obtenció d'una placa de

transformació amb colònies aïllades, en algun dels casos. S'incuba durant 30 minuts en gel, agitant suauement de forma ocasional. S'incuba a 42 °C exactament 2 minuts (en el cas concret de fer servir cèl·lules BL21-SI el temps d'incubació és d'1 minut i 15 segons). Es transfereix ràpidament a gel i es manté durant 5 minuts. S'afegeix medi de cultiu líquid LB o 2xYT (300 µL) i s'homogeneïtza per inversió suau del tub. A continuació s'incuba a 37 °C i 250 rpm durant 45 minuts per expressió del fenotip (resistència a ampicil·lina). Mentrestant s'afegeix a les plaques de medi LB, una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina (100 µL), si no en contenen, i s'estén amb l'espàtula de Drigalski, prèviament esterilitzada per immersió en etanol i flamejat. Sobre aquestes plaques se sembren, per extensió amb l'espàtula de Drigalski, diferents alíquotes del cultiu anterior (100 µL i 300 µL) i es deixa absorbir el líquid durant uns 10 minuts. S'incuben les plaques invertides a 37 °C *ON*, mirant de no allargar el cultiu més de 12 hores per tal d'evitar la formació de colònies satèl·lit. A partir d'una colònia única de la placa obtinguda, se sembra per estries amb la nansa de Kolle una nova placa de medi LB suplementat amb ampicil·lina, i s'incuba a 37 °C durant 12 hores. Aquesta placa se segella amb film de parafina i es guarda invertida a 4 °C durant un màxim d'un mes, com a estoc de cèl·lules transformades.

#### I.3.5.5. Controls de transformació de cèl·lules competents

És aconsellable efectuar un control negatiu del procés de transformació afegint tampó TE (5 µL) enlloc d'ADN, i un control positiu amb una solució estandarditzada de plasmidi de referència, pD6-2 (25 ng).

Quan el vector de transformació prové d'un procés de digestió i lligació s'inclou un mètode de selecció, basat en la degradació d'X-Gal, per tal de controlar les diferents etapes del procés, i diferenciar els clons transformats desitjats dels que han incorporat el vector sense insert.

#### *Solucions necessàries per al control amb X-Gal i IPTG*

- *Solució estoc d'IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranòsid)*: es dissol IPTG (2.0 g) en aigua desionitzada (8 mL) i s'enrasa fins a 10 mL. S'esterilitza per filtració. Es conserva aquesta solució, de concentració 200 mg·mL<sup>-1</sup>, en alíquotes d'1 mL a -20 °C. La solució de treball és una dilució 1/10 d'aquesta solució estoc.
- *Solució estoc d'X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranòsid)*: es dissol X-Gal (20 mg) en *N,N*-dimetilformamida (1 mL). No cal esterilitzar. Aquesta solució es conserva a -20 °C, protegida de la llum.
- *Preparació de plaques de cultiu per al control del procés de transformació*: sobre plaques de medi LB suplementades amb ampicil·lina (a una concentració final de 100 µg·mL<sup>-1</sup>) s'estenen una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'IPTG (160 µL) i una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'X-Gal en *N, N*-dimetilformamida (160 µL) i es deixa absorbir.

#### *Controls*

- *Control de digestió*: es transforma amb vector pUC119 digerit amb els enzims de restricció EcoRI i HindIII (5 µL), i se segueix el procediment realitzant el cultiu en placa, en les plaques suplementades amb X-Gal i IPTG. S'ha d'observar creixement de



colònies blanques però en molt poca quantitat, ja que els fragments d'ADN linealitzats tenen una eficàcia de transformació molt baixa.

- *Control de digestió-lligació*: es transforma amb vector pUC119 relligat (5 µL), i se segueix el procediment realitzant el cultiu en placa, en les plaques suplementades amb X-Gal i IPTG. S'ha d'observar creixement de colònies blanques. Aquest seria el mateix resultat que s'obtindria en el cas que les cèl·lules haguessin incorporat el vector pUC119 intacte.

- *Clons transformats que han incorporat l'insert*: en realitzar el creixement en plaques suplementades amb X-Gal i IPTG, s'ha d'observar creixement de colònies blanques.

#### I.3.5.6. Selecció de clons transformats

##### *- Assaig d'activitat en placa*

En aquest assaig s'aprofita el fet que els substrats naturals de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa són polisacàrids que s'absorbeixen al colorant roig Congo, donant un color vermell intens, a diferència del que passa amb els oligosacàrids resultants de la hidròlisi del substrat [517]. Així doncs, en un assaig d'activitat en placa suplementada amb  $\beta$ -glucà i tenyida amb roig Congo, els clons que presentin activitat  $\beta$ -glucanasa es distingeixen per uns halos que deixen entreveure el medi de cultiu, sobre un fons vermell, indicatiu de substrat sense hidrolitzar. El diàmetre i intensitat dels halos són proporcionals a l'activitat enzimàtica. D'aquesta manera es poden distingir els mutants inactius o amb poca activitat, dels clons que presenten la  $\beta$ -glucanasa salvatge. En els dos casos, s'obtenen colònies blanques en plaques de cultiu suplementades amb X-Gal i IPTG, però mentre que l'enzim salvatge presenta halos perfectament distingibles en una placa d'activitat, els mutants inactius no en generen o bé, aquests són molt petits.

##### *Solucions necessàries*

- *Solució 7 mg·mL<sup>-1</sup> de 1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi*: es resuspèn  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (350 mg, Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) en aigua Milli-Q (50 mL), afegint el sòlid sobre el líquid a 60 °C amb agitació magnètica. S'escalfa a 95 °C fins a dissolució completa (aprox. 20 minuts).

- *Solució per a tenyir (roig Congo (1% p/v))*: es dissol colorant roig Congo (1 g) en aigua Milli-Q (100 mL).

- *Solució per a destenyir*: es dissol NaCl (5 g, 86 mmol) i NaOH (20 g, 0.5 mol) en aigua Milli-Q (500 mL).

##### *Procediment*

Se suplementen plaques de medi LB amb una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi (1.5 mL, 7 mg·mL<sup>-1</sup>), s'estén amb una espàtula de Drigalski i es deixa absorbir el temps necessari a temperatura ambient. Es realitzen dos cultius en paral·lel de diferents colònies escollides de la placa de cèl·lules transformades, un d'ells sobre la placa d'activitat i l'altre sobre una placa de cultiu amb medi LB suplementat amb ampicil·lina (placa mestra): es toquen amb escuradents estèrils diferents colònies de la placa de cèl·lules transformades i se sembren en posicions idèntiques en les dues plaques (amb ajuda d'una plantilla). S'incuben les plaques a 37 °C durant 12 hores per a l'expressió del

fenotip. Es cobreix la placa suplementada amb  $\beta$ -glucà amb una solució de roig Congo (1% p/v) i s'agita en un agitador orbital durant 15 minuts. Es decanta el sobrenedant i es decolora la placa cobrint-la amb una solució de NaCl a l'1% i 1 M de NaOH, i agitant a l'agitador orbital durant 5 minuts. Es decanta el sobrenedant i se seleccionen els clons d'interès sobre la placa mestra.

#### - Anàlisi de restricció

Com ja s'ha esmentat anteriorment, si la diferència d'activitat entre l'enzim salvatge i el mutant d'interès és gran, es poden seleccionar els clons que expressen el mutant amb un assaig d'activitat en placa. Ara bé, si la diferència d'activitat entre els enzims no és clarament significativa, o bé es desconeix, es recorre a una anàlisi de restricció per tal de seleccionar els clons del mutant d'interès, sempre que sigui possible. Això suposa que en realitzar la mutació s'ha introduït o eliminat alguna diana per a algun enzim de restricció. En cas contrari, l'única manera de diferenciar entre els clons que expressen l'enzim salvatge o el mutant d'interès, és la seqüenciació del gen.

#### *Procediment*

Es trien uns quants clons (aprox. 12) de la placa mestra que presentin l'activitat esperada per al mutant d'interès i es prepara un estoc d'ADN plasmídic de cadascun d'ells (I.3.1.1). S'incuba cada mostra d'ADN plasmídic amb els enzims de restricció corresponents (I.3.5.1) i s'analitza la mescla de digestió per electroforesi analítica en gel d'agarosa (I.3.2.1).

#### I.3.5.7. Conservació de l'ADN mutat

Per a cada mutant se seleccionen un mínim de 12 clons de la placa mestra (I.3.5.6) i es prepara un estoc d'ADN plasmídic a petita escala (I.3.1.1), que es conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **I.3.6. Mutagènesi dirigida per PCR**

Per a l'obtenció dels mutants W221A, W221F i Y152A es fa servir el mètode de mutagènesi dirigida posat a punt a l'equip [226], basat en el mètode de Landt *et al.* [518]. En aquest mètode s'introdueix la mutació desitjada fent servir l'amplificació d'ADN amb dues reaccions de PCR acoblades, de manera que el producte de reacció de la primera reacció de PCR serveix de motlle a la segona reacció. Per a l'obtenció del mutant Y152F es fa servir el mètode de SDM-LA-PCR, en el que la mutació s'introdueix en una única reacció de PCR, ja que aquest mètode permet l'amplificació de fragments d'ADN suficientment llargs.

#### I.3.6.1. SDM-PCR

##### *Material biològic necessari*

- *Motlle*: vector pD6-2 obtingut per altres membres de l'equip amb la puresa necessària per a la seva utilització en reaccions de PCR.

- *Encebadors universals*: *FUP* (*Forward Universal Primer*): oligonucleòtid de seqüència idèntica a la cadena (-) del vector i adjacent a l'extrem 3' del *polylinker*. *RUP* (*Reverse Universal Primer*): oligonucleòtid de seqüència idèntica a la cadena (+) del vector i adjacent a l'extrem 5' del *polylinker*. Per a la primera reacció de PCR, es tria l'encebador universal que, junt amb l'encebador mutagènic corresponent, genera el fragment d'ADN més curt en la reacció de PCR (en el cas dels mutants que s'obtenen en el present treball es tria el *FUP*). A la segona reacció de PCR es tria l'altre encebador universal, junt amb el nou fragment generat a la primera reacció de PCR.

*FUP*: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

*RUP*: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

- *Encebadors mutagènics*: es dissenyen seguint la seqüència de la cadena codificant del motlle (5'→3'), alterant específicament les bases necessàries del codó que codifica per a l'aminoàcid a mutar. La seva síntesi s'encarrega a Boehringer Mannheim GmbH. Es mostra en negreta el codó que introdueix la mutació.

W221A: 5'-GCAGGTGTCGATGAAG**CG**CTCGGCTCCTACA-3'

W221F: 5'-GCAGGTGTCGATGAAT**TC**CTCGGCTCCTACA-3'

Y152A: 5'-TCAGTTTAATTATG**CT**ACCAATGGTGTCCG-3'

- *Polimerasa*: s'ha emprat la polimerasa d'ADN BioTaq de *Thermus aquaticus* (Ecogen) per a l'obtenció dels mutants en la posició Trp221 i la polimerasa DeepVent<sup>®</sup> de *Pyrococcus furiosus* sp. GB-D (New England Biolabs Inc.) per a l'obtenció del mutant Y152A.

#### *Solucions necessàries*

- *Solució 0.25% en acrilamida*: Es dissolen, amb agitació magnètica, acrilamida (5 g, 70.3 mmol), Tris (485 mg, 4 mmol), NaAcO (164 mg, 2 mmol) i EDTA (74 mg, 253 µmol) en aigua Milli-Q (80 mL), i s'ajusta el pH a 7.8. S'afegeix (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (100 mg, 0.44 mmol) i TEMED (100 µL), s'enrasa a 100 mL amb aigua Milli-Q i es deixa polimeritzar a temperatura ambient.

#### *Procediment*

##### *- Primera reacció de PCR*

En un tub d'Eppendorf estèril de 500 µL es prepara la següent mescla de reacció, mantenint, en tot moment, tant els reactius com la mescla de reacció en gel: 10 x tampó *BioTaq Polymerase Sequencing Buffer* (Ecogen) (10 µL) o 10 x tampó de polimerasa DeepVent<sup>®</sup> (New England Biolabs Inc.) (10 µL), solució estoc 10 mM de cada dNTP (2 µL), solució estoc 25 ng·µL<sup>-1</sup> d'ADN motlle (2 µL), solució estoc 5 pmol·µL<sup>-1</sup> d'oligonucleòtid mutagènic (4 µL), solució 5 pmol·µL<sup>-1</sup> de *FUP* (4 µL) i aigua Milli-Q estèril fins a un volum total de 99 µL. Es connecta el programa de preescalfament del termociclador a 94 °C. Mentrestant s'addiciona ràpidament a la mescla de reacció la polimerasa BioTaq<sup>1</sup> (1 µL, 2.5 u) o la polimerasa DeepVent<sup>®1</sup> (1 µL), s'homogeneïtza bé per pipeteig i s'afegeixen 2 gotes d'oli mineral, per tal d'evitar l'evaporació. S'introdueix el tub d'Eppendorf en el termociclador, s'atura el programa de preescalfament i s'inicia el programa d'amplificació de l'ADN immediatament, sense donar temps al descens de temperatura. Així es passa directament de la inactivitat de la polimerasa a 4 °C a la temperatura de separació de les dues cadenes d'ADN motlle. El programa bàsic d'amplificació es mostra a la taula I.4, però no és infreqüent que s'hagi d'ajustar per als diferents mutants. Un cop amplificat l'ADN s'extreuen 90 µL de la

mescla de reacció, evitant agafar oli mineral, i s'introdueixen en un nou tub d'Eppendorf, on es purifica per precipitació amb alcohol.

**Taula I.4.** Programa d'amplificació d'ADN en la SDM-PCR.

Desnaturalització inicial	1 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 15 s	94 °C
hibridació	1 min 30 s	$T_H$ <sup>2</sup> °C
elongació	1 min per kb	72 °C
Extensió final	5 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

<sup>1</sup> La polimerasa d'ADN té activitat correctora de prova 3'→5', que podria corregir la mutació desitjada sobre l'encebador mutagènic. Per tal d'evitar-ho s'afegeix sempre la polimerasa just abans d'iniciar el cicle d'amplificació i es mantenen tots els reactius i la barreja de reacció a 0 °C, temperatura a la qual aquest enzim no mostra l'esmentada activitat.

<sup>2</sup> Temperatura d'hibridació. Aquesta temperatura és altament dependent de la longitud dels encebadors, i no té perquè coincidir amb la temperatura de fusió dels oligonucleòtids.

*- Purificació del producte de la primera reacció de PCR per precipitació amb alcohol*

S'afegeix al tub d'Eppendorf una barreja 49.5:49.5:1 de fenol/CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílic (90 µL), es barreja bé amb vòrtex, se centrifuga a 13500 rpm durant 2 minuts i es transfereix la fase aquosa (superior) a un nou tub d'Eppendorf. S'afegeixen una solució 3 M d'AcONa pH 4.8 (9 µL), una solució de poliacrilamida<sup>1</sup> al 0.25% (8 µL) i EtOH absolut<sup>2</sup> (270 µL) a 0 °C. Es barreja varies vegades per inversió del tub, i es deixa precipitar l'ADN a -20 °C durant 30 minuts. Se centrifuga a 13500 rpm durant 10 minuts, es decanta el sobrenedant i es renta bé el botó d'ADN (no sempre apreciable) amb EtOH al 70% (500 µL). Se centrifuga a 13500 rpm durant 10 minuts, es retira el sobrenedant per aspiració i s'asseca en un dessecador de buit connectat a una bomba d'aigua durant almenys 15 minuts. Es resuspèn en aigua Milli-Q estèril (10 µL). L'ADN pot seguir-se purificant amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (I.3.4.3) i resuspendre l'ADN en aigua Milli-Q estèril (20 µL). En aquest pas es pot estimar la concentració de la solució d'ADN obtingut en la primera reacció de PCR per electroforesi analítica en gel d'agarosa (I.3.3).

<sup>1</sup> La poliacrilamida s'utilitza com a promotor de precipitació de fragments d'ADN de longitud inferior a 1 kb.

<sup>2</sup> Es conserva a -20 °C.

*- Segona reacció de PCR*

En un tub d'Eppendorf estèril de 500 µL es prepara la següent mescla de reacció, mantenint, en tot moment, tant els reactius com la mescla de reacció en gel: 10 x tampó de seqüenciació per a la polimerasa BioTaq (Ecogen) (10 µL) o 10 x tampó per a la polimerasa DeepVent<sup>®</sup> (New England Biolabs Inc.) (10 µL), solució estoc 10 mM de cada dNTP (2 µL), solució estoc 25 ng·µL<sup>-1</sup> d'ADN motlle (2 µL), solució del producte

de la primera reacció de PCR (10 µL), solució 5 pmol·µL<sup>-1</sup> de *RUP* (4 µL) i aigua Milli-Q estèril fins a un volum total de 99 µL. Es connecta el programa de preescalfament del termociclador a 94 °C. Mentrestant s'addiciona ràpidament a la mescla de reacció la polimerasa BioTaq<sup>1</sup> (1 µL) o la polimerasa DeepVent<sup>®1</sup> (1 µL), s'homogeneïtza bé per pipeteig i s'afegeixen 2 gotes d'oli mineral, per tal d'evitar l'evaporació. S'introdueix el tub d'Eppendorf en el termociclador, s'atura el programa de preescalfament i s'inicia el programa d'amplificació de l'ADN immediatament. El programa d'amplificació s'ha d'ajustar per a cada mutació, partint del programa bàsic que es mostra a la taula 4. Un cop amplificat l'ADN s'extreuen 90 µL de la mescla de reacció, evitant agafar oli mineral, i s'introdueixen en un nou tub d'Eppendorf.

<sup>1</sup> La polimerasa d'ADN té activitat correctora de prova 3'→5', que podria corregir la mutació desitjada sobre el producte de la primera reacció de PCR. Per tal d'evitar-ho s'afegeix sempre la polimerasa just abans d'iniciar el cicle d'amplificació i es mantenen tots els reactius i la barreja de reacció a 0 °C, temperatura a la qual aquest enzim no mostra l'esmentada activitat.

#### - Purificació del producte de la segona reacció de PCR

El fragment d'ADN producte de la segona reacció de PCR es pot purificar fent servir el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (I.3.4.3); o per precipitació amb isopropanol, electroforesi preparativa en gel d'agarosa (I.3.4.1) i finalment amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> II<sup>TM</sup> (I.3.4.2). Per últim es resuspèn l'ADN en aigua Milli-Q estèril (20 µL).

### I.3.6.2. SDM-LA-PCR

#### *Material biològic necessari*

- *Motlle*: vector pD6-2 obtingut per altres membres de l'equip amb la puresa necessària per a la seva utilització en reaccions de PCR.
- *Encebadors mutagènics*: complementaris a les dues cadenes d'ADN i prèviament dissenyats per tal d'introduir la mutació desitjada. La seva síntesi s'encarrega a Life Technologies.
- *Polimerasa*: s'ha emprat la polimerasa DeepVent<sup>®</sup> de *Pyrococcus furiosus* sp. GB-D (New England Biolabs Inc.).

#### *Procediment*

##### - Reacció de PCR

En un tub d'Eppendorf estèril de 500 µL es prepara la següent mescla de reacció, mantenint, en tot moment, tant els reactius com la mescla de reacció en gel: 10 x tampó per a la polimerasa DeepVent<sup>®</sup> (New England Biolabs Inc.) (10 µL), solució 100 mM de MgSO<sub>4</sub> (4 µL)<sup>1</sup>, solució estoc 10 mM de cada dNTP (4 µL), solucions estoc 5 pmol·µL<sup>-1</sup> dels dos oligonucleòtids mutagènics (5 µL de cadascuna) i aigua Milli-Q estèril (50 µL). S'afegeix una gota de cera fosa, i es preescalfa la mostra al termociclador a 94 °C, permetent que la cera cobreixi tota la solució. S'atura el programa del termociclador en aquest pas, es posa el tub d'Eppendorf en gel i s'afegeix sobre la cera l'ADN motlle (50 ng), la polimerasa DeepVent<sup>®</sup> (1 µL), i la quantitat

d'aigua Milli-Q estèril necessària per tal d'assolir un volum de reacció total de 100  $\mu\text{L}$ . Es torna a introduir el tub d'Eppendorf en el termociclador i es continua amb el programa que s'indica a la taula I.5.

**Taula I.5.** Programa d'amplificació d'ADN emprant la SDM-LA-PCR.

Desnaturalització inicial	1 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 15 s	94 °C
hibridació	1 min 30 s	$T_H^2$ °C
elongació	15 min	72 °C
Extensió final	5 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

<sup>1</sup> La concentració efectiva d'ió  $\text{Mg}^{2+}$  s'ha d'ajustar per a cada cas concret.

<sup>2</sup> Temperatura d'hibridació. Aquesta temperatura és altament dependent de la longitud dels encebadors, i no té perquè coincidir amb la temperatura de fusió dels oligonucleòtids.

*- Purificació del producte de la reacció de PCR per precipitació amb alcohol*

Es transfereix el màxim volum de reacció possible a un nou tub d'Eppendorf estèril, s'afegeixen la mescla 49.5:49.5:1 fenol/cloroform/alcohol isoamílic (90  $\mu\text{L}$ ) i es barreja suaument. Es transfereix la fase aquosa (fase superior) a un nou tub d'Eppendorf estèril i s'afegeixen una solució 3 M de NaAcO estèril (6  $\mu\text{L}$ ), i EtOH absolut<sup>1</sup> (270  $\mu\text{L}$ ). Es mescla i es deixa a  $-20$  °C durant 3 hores. Se centrifuga a 13500 rpm durant 10 minuts, s'extreu el sobrenedant per aspiració i es renta el botó d'ADN amb una solució d'EtOH al 70% (500  $\mu\text{L}$ ). Se centrifuga a 13500 rpm durant 10 minuts, s'elimina el sobrenedant per aspiració i es deixa eixugar el botó d'ADN, que es resuspèn posteriorment en aigua Milli-Q estèril (8  $\mu\text{L}$ ).

<sup>1</sup> Es conserva a  $-20$  °C.

### I.3.7. Seqüenciació d'ADN

S'empra el *kit* ABI Prims BigDye<sup>TM</sup> Terminator (Perkin Elmer Applied Biosystems)

*Procediment*

- *Reacció de PCR*: En un tub d'Eppendorf estèril de 500  $\mu\text{L}$  es prepara la següent mescla de reacció, mantenint, en tot moment, tant els reactius com la mescla de reacció en gel: una solució de DMSO al 50% (1  $\mu\text{L}$ ), solució estoc d'ADN motlle (150-200 ng), solució 5 pmol- $\mu\text{L}^{-1}$  de *FUP* o *RUP*, un per a cada reacció de PCR (1.5  $\mu\text{L}$ ), i aigua estèril fins a un volum total de 16  $\mu\text{L}$ . Es preescalfa a 98 °C durant 5 minuts. Es deixa en gel 2 minuts i se centrifuga uns segons en minifuga a 13500 rpm. Es torna a posar en gel i s'afegeix solució de *Premix*<sup>1</sup> (4  $\mu\text{L}$ ) i oli mineral per tal de cobrir totalment la solució (15  $\mu\text{L}$ ). S'introdueix el tub d'Eppendorf en el termociclador i s'inicia el programa indicat a la taula I.6.

**Taula I.6.** Programa d'amplificació d'ADN per a la posterior seqüenciació emprant el *kit* ABI Prims BigDye™ Terminator (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Desnaturalització inicial	3 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	30 s	96 °C
hibridació	15 s	50 °C
elongació	4 min	60 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

<sup>1</sup> La solució de *Premix*, que ve subministrada en el *kit*, inclou la polimerasa i els ddNTP's marcats per fluorescència juntament amb un tampó.

- *Eliminació dels ddNTPs no incorporats per precipitació amb EtOH*: S'extreuen en fred 18 µL del cru de reacció sense agafar oli i es transfereix a un tub d'Eppendorf estèril. S'afegeix aigua Milli-Q estèril (19 µL) i EtOH absolut fred (61 µL). Es deixa en gel durant 10 minuts. Se centrifuga a 13500 rpm durant 24 minuts. S'elimina la solució d'etanol per aspiració i es renta el botó d'ADN amb EtOH al 70% (200 µL). Se centrifuga a 13500 rpm durant 3 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. Es deixa assecar el botó d'ADN a temperatura ambient durant 15-20 minuts.

- Un cop sec s'envia al servei de seqüenciació d'ADN del Servei Científic-tècnic de la Universitat de Barcelona.

#### I.4. Obtenció de l'ADN dels mutants W221A, W221F, Y152A i Y152F de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*

##### I.4.1. Obtenció dels plasmidis pD6-2 W221A i W221F

Es realitza la mutació del Trp221 de la 1,3-1,4-β-glucanasa emprant el mètode de SDM-PCR (I.3.6.1) fent servir la polimerasa d'ADN BioTaq. A la primera reacció de PCR s'utilitza com a motlle el vector pD6-2, els encebadors mutagènics corresponents a cada mutació i l'encebador universal *FUP*. Les seqüències dels encebadors emprats es mostren a continuació:

*FUP*: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 W221A: 5'-GCAGGTGTCGATGAAGCGCTCGGCTCCTACA-3'  
 W221F: 5'-GCAGGTGTCGATGAATTCCTCGGCTCCTACA-3'

El programa de la primera reacció de PCR es detalla a continuació:

Desnaturalització inicial	1 min 15 s	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 20 s	94 °C
hibridació	1 min 15 s	55 °C
elongació	1 min 10 s	72 °C
Extensió final	5 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

El producte de la primera reacció de PCR es purifica per precipitació amb alcohol i es realitza la segona reacció de PCR<sup>1</sup> emprant com encebadors el producte de la primera reacció de PCR i l'encebador universal *RUP*. La seqüència de l'encebador *RUP* es mostra a continuació:

*RUP*: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- 3'

El programa que segueix la segona reacció de PCR és el següent:

Desnaturalització inicial	1 min 15 s	94 °C
40 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 20 s	94 °C
hibridació	1 min 50 s	T <sub>H</sub> <sup>2</sup> °C
elongació	1 min 45 s	72 °C
Extensió final	10 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

<sup>1</sup> Per al mutant W221A s'afegeixen 2 µL de polimerasa BioTaq.

<sup>2</sup> La temperatura d'hibridació ha estat de 45 °C per al mutant W221A i de 44 °C per al mutant W221F.

El producte de la segona reacció de PCR es purifica per precipitació amb alcohol i l'ADN obtingut es resuspèn en 20 µL d'aigua Milli-Q estèril. Es realitza una electroforesi preparativa en gel d'agarosa (I.3.2.2), es quantifica l'ADN obtingut (I.3.3), aproximadament 90 ng per al mutant W221A i 40 ng per al mutant W221F, es retalla la banda d'ADN del gel (I.3.4.1) i es purifica amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> II<sup>TM</sup> (I.3.4.2). Com a primer pas per a la subclonació s'hidrolitza l'ADN dels mutants i del vector de clonació, el pUC119, amb els enzims de restricció corresponents (I.3.5.1): W221A (EcoRI/HindIII) i W221F (SacI/HindIII). Es realitza una electroforesi preparativa en gel d'agarosa (I.3.2.2), es quantifica l'ADN obtingut (I.3.3), aproximadament 60 ng per al mutant W221A, 10 ng per al mutant W221F, i 150 ng per al vector pUC119, es retalla la banda d'ADN del gel (I.3.4.1) i es purifica amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> II<sup>TM</sup> (I.3.4.2). Es realitza la lligació (I.3.5.2) amb una relació equimolar insert/vector de 5:1 en el cas del mutant W221A i de 1:1 en el cas del mutant W221F. Es preparen cèl·lules competents de la soca DH5<sub>α</sub> d'*Escherichia coli* (I.3.5.3), i es transformen amb el producte de la lligació (I.3.5.4). El control de transformació es realitza amb plaques suplementades amb X-Gal i IPTG, i amb plaques d'activitat (I.3.5.6). Per a cada mutant se seleccionen 12 clons de la placa mestra, se n'obté l'ADN plasmídic a petita escala (I.3.1.1.1) i es realitza una anàlisi de restricció (I.3.5.1) amb l'enzim HaeI per al mutant W221A i amb els enzims EcoRI i HindIII per al mutant W221F. De cada mutant s'escull un clon, del que s'obté més ADN plasmídic (I.3.1.1.1) per tal de confirmar la mutació per seqüenciació (I.3.7.1), i guardar un estoc de plasmidi mutat. En el cas del mutant W221A s'obtenen entre 20 i 30 µg de plasmidi mutat, i en el cas del W221F s'obtenen entre 10 i 15 µg.



I.4.2. Obtenció del plasmidi pD6-2 Y152A

Es realitza la mutació de la Tyr152 de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa per Ala emprant el mètode de SDM-PCR (I.3.6.1), i fent servir la polimerasa DeepVent<sup>®</sup>. A la primera reacció de PCR s'utilitza com a motlle el vector pD6-2, l'encebador mutagènic que introdueix la mutació i l'encebador universal *FUP*. Les seqüències dels encebadors emprats es mostren a continuació:



El programa de la primera reacció de PCR es detalla a continuació:

Desnaturalització inicial	1 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 15 s	94 °C
hibridació	1 min 30 s	41 °C
elongació	59 s	72 °C
Extensió final	5 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

El producte de la primera reacció de PCR es purifica per precipitació amb alcohol i posteriorment amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (I.3.4.3), es resuspèn en 20  $\mu$ L d'aigua Milli-Q estèril, i es realitza la segona reacció de PCR emprant com encebadors el producte de la primera reacció de PCR i l'encebador universal *RUP*. La seqüència de l'encebador *RUP* es mostra a continuació:



El programa que segueix la segona reacció de PCR és el següent:

Desnaturalització inicial	1 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 15 s	94 °C
hibridació	1 min 30 s	42.2 °C
elongació	1 min 20 s	72 °C
Extensió final	10 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

El producte de la segona reacció de PCR es purifica per precipitació amb alcohol, i posteriorment amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (I.3.4.3). L'ADN obtingut es resuspèn en 20  $\mu$ L d'aigua Milli-Q estèril. Com a primer pas per a la subclonació s'hidrolitza l'ADN del mutant i del vector de clonació, el pUC119, amb els enzims de restricció EcoRI i HindIII (I.3.5.1). Els fragments obtinguts es purifiquen per electroforesi preparativa en gel d'agarosa (I.3.2.2), (I.3.4.1) i a continuació amb el *kit* GENE CLEAN<sup>®</sup> with Spin (I.3.4.3). Es realitza la lligació (I.3.5.2) amb una relació equimolar insert/vector de 3:1, es preparen cèl·lules competents de la soca TG1 d'*Escherichia coli* (I.3.5.3), i es transformen amb el producte de la lligació (I.3.5.4). El control de transformació es realitza amb plaques suplementades amb X-Gal i IPTG, i amb plaques d'activitat (I.3.5.6). Per a cada mutant se seleccionen uns quants clons de la placa mestra, se n'obté l'ADN plasmídic a petita escala (I.3.1.1.2) i es procedeix a la seva seqüenciació (I.3.7.1) per tal de confirmar la presència de la mutació.

#### I.4.3. Obtenció del plasmidi pD6-2 Y152F

Es realitza la mutació de la Tyr152 de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa a Phe emprant el mètode de SDM-LA-PCR (I.3.6.2), i fent servir la polimerasa DeepVent<sup>®</sup>. El motlle per a la reacció de PCR és el vector pD6-2, i els encebadors mutagènics que introdueixen la mutació es mostren a continuació:



El programa de la reacció de PCR es detalla a continuació:

Desnaturalització inicial	1 min	94 °C
30 cicles que inclouen: desnaturalització	1 min 15 s	94 °C
	1 min 30 s	58 °C
	15 min	72 °C
Extensió final	5 min	72 °C
Conservació	fins a 24 h	4 °C

El producte de la reacció de PCR es purifica per precipitació amb alcohol i l'ADN obtingut es resuspèn en 8  $\mu$ L d'aigua Milli-Q estèril. Per tal de millorar l'eficiència de transformació s'eliminen les osques (*nicks*) existents a les dues cadenes amb una lligasa (I.3.5.2); i amb un enzim de restricció que reconeix seqüències metilades, el DpnI, es fracciona l'ADN plasmídic de l'enzim salvatge utilitzat com a motlle (I.3.5.1). Es preparen cèl·lules competents de la soca TG1 d'*Escherichia coli* (I.3.5.3), i es transformen amb el producte de la hidròlisi amb DpnI (I.3.5.4). El control de transformació es realitza amb plaques suplementades amb X-Gal i IPTG, i amb plaques d'activitat (I.3.5.6). Tot i així, es comprova que en un assaig d'activitat sobre placa de Petri el mutant no presenta activitat 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa. Per a cada mutant se seleccionen diversos clons de la placa mestra, se n'obté l'ADN plasmídic a petita escala (I.3.1.1.2) i es procedeix a la seva seqüenciació (I.3.7.1) per tal de confirmar la presència de la mutació. Un cop verificada la seqüència del mutant s'empra el *kit Wizard<sup>®</sup> Plus Midipreps DNA Purification* per tal d'obtenir més quantitat d'ADN (I.3.1.2.2) i s'emmagatzema (I.3.5.7).

### **I.5. Expressió enzimàtica de l'enzim salvatge i mutants de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis***

Amb la finalitat d'obtenir 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa a gran escala s'han fet servir les soques TG1 i BL21-SI d'*Escherichia coli* per a l'expressió enzimàtica, i el cultiu a escala preparativa s'ha realitzat en biorreactor, tot i que ocasionalment també s'ha realitzat en matrassos d'Erlenmeyer .

A partir d'un estoc de l'ADN que expressa l'enzim d'interès (enzim salvatge o algun dels mutants obtinguts de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*) es transformen cèl·lules competents (I.3.5.3 i I.3.5.4) i, a partir d'aquesta placa, se n'obté una de nova per estries en medi LB suplementat amb ampilicil·lina (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>). S'obtenen diversos preinòculs de 3 mL en medi 2xYT suplementat amb ampilicil·lina

(150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) i, a partir d'aquests, uns quants inòculs de 30 mL en medi 2xYT suplementat amb ampicil·lina (150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (I.2.6). Entre els diferents preinòculs i inòculs sempre es trien els de major terbolesa (indicatiu de major creixement cel·lular), per tal de passar a la següent fase. En aquest punt es poden obtenir cultius preparatius en matràs d'Erlenmeyer de 2 L o bé en biorreactor. Si es treballa amb matrassos d'Erlenmeyer, s'inoculen 4 matrassos que contenen 750 mL de medi 2xSB estèril i ampicil·lina (150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cadascun, amb inòcul (30 mL cadascun) i s'incuba a 37 °C en un incubador orbital durant 21 hores. Si es treballa amb biorreactor, prèviament s'han de calibrar els elèctrodes de pH i d'oxigen. S'introdueix el medi 2xYT (4 L), suplementat amb  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (94 g, 0.26 mol) i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5.1 g, 37.5 mmol), per tal d'augmentar la capacitat tamponant del medi, dins del biorreactor i s'esterilitza, amb tots els components acoblats (sensor de temperatura, elèctrode de pH i d'oxigen i filtre d'entrada d'aire) a 120 °C durant 20 minuts. Una vegada temperat a temperatura ambient, es posa en marxa l'agitador del biorreactor (nivell d'agitació al 2) i en quant s'estabilitza la temperatura entre 36-37 °C i la  $\text{pO}_2$  a 16-20%, s'introdueixen asèpticament els inòculs crescuts (60 mL) i una solució 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'ampicil·lina (20 mL). Passades quatre hores s'afegeixen asèpticament unes gotes d'antiescumant (esterilitzat a l'autoclau) i s'augmenta la pressió d'oxigen (s'augmenta l'agitació a nivell 4), ja que el cultiu es troba en l'etapa exponencial de creixement, i el consum d'oxigen augmenta. El cultiu s'incuba durant un temps total de 20-21 hores.

## I.6. Purificació enzimàtica de l'enzim salvatge i mutants de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

### *Solucions necessàries*

- *Solució de roig Congo al 0.2%*: es dissol colorant roig Congo (0.5 g) en aigua desionitzada (250 mL).
- *Tampó 0.5 M NaAcO, pH 5.0*: es dissol NaAcO (41 g, 0.5 mol) en aigua Milli-Q (900 mL), i s'ajusta el pH a 5.0 amb AcOH. S'enrassa a 1 L amb aigua Milli-Q, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 5 mM NaAcO, pH 5.5*: es prepara per dilució 1/100 del tampó 0.5 M NaAcO, pH 5.0 en aigua Milli-Q. Abans d'enrassar s'ajusta el pH a 5.5 amb una solució de NaOH (0.1 N o 1 N). S'enrassa al volum desitjat, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 5 mM NaAcO, 0.3 M NaCl, pH 5.5*: es dissol NaCl (17.5 g, 0.3 mol) en tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 (1 L). Es comprova que el pH és l'adient, i en cas de ser necessari s'ajusta amb una solució d'AcOH o de NaOH (0.1 N o 1 N). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 5 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.5*: es dissol  $\text{CaCl}_2$  (2.22 g, 20 mmol) en tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 (1 L). Es comprova que el pH és l'adient, i en cas de ser necessari s'ajusta amb una solució d'AcOH o de NaOH (0.1 N o 1 N). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, pH 6.0*: es dissolen NaAcO (1.64 g, 20 mmol),  $\text{CaCl}_2$  (2.22 g, 20 mmol) i NaCl (5.84 g, 0.1 mol) en aigua Milli-Q (900 mL), i s'ajusta el pH a 6.0 amb AcOH. S'enrassa a 1 L amb aigua Milli-Q, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 5 mM NaAcO, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0*: es dissolen NaAcO (410 mg, 5 mmol) i  $\text{CaCl}_2$  (111 mg, 1 mmol) en aigua Milli-Q (900 mL), i s'ajusta el pH a 6.0 amb AcOH.

S'encerca a 1 L amb aigua Milli-Q, es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C.

- *Tampó 2 mM MOPS, pH 7.0*: es dissol MOPS (308.34 mg, 2 mmol) en aigua Milli-Q (900 mL), i s'ajusta el pH a 7.0. S'encerca a 1 L amb aigua Milli-Q, es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C.

### I.6.1. Processat del cultiu bacterià

Per tal de separar el medi extracel·lular, que en principi conté la major part de la 1,3-1,4-β-glucanasa, del medi intracel·lular, que a més conté un major nombre de proteïnes, se centrifuga el cultiu a 10000 rpm i 4 °C durant 45 minuts. És important mantenir el cultiu en gel mentre dura el procés de centrifugació per tal de minimitzar la degradació proteica. A continuació se separa el medi extracel·lular per decantació i es manté en gel fins a finalitzar tot el procés. Donat que es dona prioritat al tractament del medi extracel·lular, el sediment bacterià es conserva a -20 °C, fins al seu posterior processat.

*Tractament del medi extracel·lular.* El medi extracel·lular s'ha de preparar abans de la primera etapa cromatogràfica. Aquesta preparació, que té com a objectiu l'ajust de pH a 5.5 i la disminució de la seva força iònica, s'ha realitzat de dues formes diferents: d'una banda per diàlisi, i de l'altra, per ajust de pH directe seguit d'una etapa d'ultrafiltració tangencial.

- *Tractament per diàlisi.* Es fan servir sacs de diàlisi de mida de por de 6000-8000 Da. Abans d'utilitzar els sacs de diàlisi per primera vegada s'han de netejar, portant-los a ebullició durant 2 minuts en una solució de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% i 10 mM d'EDTA, i esbandint-los després amb aigua desionitzada. Si es reaprofiten<sup>1</sup> uns sacs de diàlisi (que s'hauran conservat en una solució de MeOH al 20% a 4 °C), només cal esbandir-los generosament amb aigua desionitzada. A continuació s'introdueix el medi extracel·lular dins dels sacs de diàlisi, i es dialitza a 4 °C i amb agitació fins arribar a l'equilibri (4-5 hores) enfront de les següents solucions: primer, aigua desionitzada (24 L) i després tres vegades amb una solució de 5 mM d'AcONa pH 5.5 (24 L). Un cop finalitzada la diàlisi es recull el medi en un mateix recipient i es comprova que el pH és el desitjat (entre 5.5 i 5.0), si no és així, s'acaba d'ajustar amb una solució 0.5 M AcONa pH 5.0. Si s'observa terbolesa<sup>2</sup> en el medi se centrifuga a 13000 rpm i 4 °C durant 40 minuts. Es decanta el sobrenedant amb precaució, ja que el botó proteic es desfà amb facilitat, i es conserva a 4 °C fins a la primera etapa cromatogràfica. El botó proteic es descarta.

- *Tractament per ajust directe del pH i ultrafiltració tangencial.* S'ajusta el pH del medi extracel·lular a 5.5 amb tampó 0.5 M AcONa pH 5.0. Si s'observa terbolesa<sup>2</sup> en el medi se centrifuga a 13000 rpm i 4 °C durant 40 minuts. Es decanta el sobrenedant amb precaució, ja que el botó proteic es desfà amb facilitat i es conserva en gel. El botó proteic es descarta. L'objectiu del procés d'ultrafiltració tangencial és el de concentrar la mostra alhora que s'eliminen sals i molècules de baix pes molecular que es troben dissoltes al medi. Es fa servir una unitat d'ultrafiltració que conté una membrana de polièter-sulfona amb un pes nominal de 10000 Da. Aquest filtre quan no es fa servir es conserva en una solució 0.1 M de NaOH a 4 °C, per tant el primer pas consisteix en la neteja del filtre. Es prepara el muntatge del sistema<sup>3</sup> amb una bomba peristàltica d'acord amb les instruccions del fabricant i es neteja amb aigua desionitzada (5 L), fent passar els 3 primers litres sense recircular, i fent recircular els 2 darrers. Es comprova que el

pH de l'aigua que recircula no sigui bàsic, en cas contrari s'ha de continuar amb la neteja. Es fa passar pel sistema el medi extracel·lular, que es manté en gel, de forma que recirculi a una pressió màxima de 20 psi<sup>4</sup>. El filtrat es guarda per tal de comprovar que no s'observa activitat 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa i la resta es concentra fins a un volum final d'uns 400 mL. A continuació s'afegeix tampó 5 mM AcONa pH 5.5 (1 L) i es fa recircular a les mateixes condicions fins obtenir un volum final de 400 mL. Es repeteix el procés tantes vegades com sigui necessari fins que el pH del líquid recirculat és de 5.5 i la seva conductivitat és inferior a 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Es fa circular una mica d'aigua desionitzada pel muntatge, per tal de recollir tot el que pugui quedar retingut en el circuit. D'aquesta manera no només s'aconsegueix preparar el medi extracel·lular per a la següent etapa cromatogràfica, sinó que a més a més es concentra, facilitant, d'aquesta manera la càrrega de mostra a la primera etapa cromatogràfica. El conjunt del líquid que s'obté per recirculació es guarda a 4 °C fins a la seva purificació per cromatografia. Un cop finalitzat el procés es neteja el muntatge fent passar 3 L d'aigua desionitzada, 2 dels quals es fan passar sense recircular, i posteriorment 2 L d'una solució 0.1 M de NaOH, un dels quals es fa passar sense recircular. Es desmunta el sistema i es netegen les gomes amb aigua desionitzada abans de guardar-les. El filtre es guarda a la nevera.

<sup>1</sup> Només es poden reaprofitar els sacs de diàlisi que s'hagin fet servir prèviament per a la purificació del mateix enzim, per tal d'evitar contaminacions.

<sup>2</sup> La terbolesa és deguda a proteïnes que precipiten en aquestes condicions de força iònica i pH.

<sup>3</sup> És recomanable posar greix en la zona del tub de goma que interacciona amb la bomba peristàltica, per tal d'allargar la seva vida útil.

<sup>4</sup> S'ha d'evitar l'entrada d'aire al muntatge, ja que genera cavitació i la formació d'escuma, que va associada a desnaturalització proteica.

*Tractament del sediment bacterià.* El sediment bacterià se sotmet a un procés de lisi cel·lular mitjançant ultrasons per tal d'extreure la proteïna intracel·lular, i a continuació s'ajusten les condicions del medi de manera que precipitin la majoria de proteïnes pròpies d'*Escherichia coli*.

Es resuspèn el sediment bacterià en tampó 5 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.5 (200 mL) i es manté en gel<sup>1</sup>. Abans de fer servir el sonicador s'ha de netejar amb una solució 1 M de NaOH i després amb aigua desionitzada. A continuació el sonicador se submergeix en la suspensió cel·lular de manera que quedi a mitja alçada del volum de líquid, per tal d'evitar la formació d'escuma. Se sonica la suspensió amb cicles de 5 minuts a una intensitat d'1 mA, amb agitació constant i evitant que la temperatura augmenti per sobre dels 10 °C. Amb aquesta finalitat durant tot el procés la solució del sediment bacterià es manté en un bany d'aigua/gel. Es realitzen tants cicles com sigui necessari fins observar que la suspensió passa d'un color crema a un gris clar<sup>2</sup>, moment en què es dona per finalitzada la lisi. S'ajusta el pH a 5.5 amb una solució d'àcid acètic diluïda, i es deixen precipitar les proteïnes d'*Escherichia coli* a 4 °C durant 12 hores. Se centrifuga a 10000 rpm i 4 °C durant 30 minuts, per tal de separar els fragments de membrana i les proteïnes precipitades, i es decanta amb cura el sobrenedant, on es troba dissolta la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa. Es dilueix el sobrenedant amb aigua Milli-Q fins assolir una conductivitat inferior a 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , per tal de preparar-lo per a la primera etapa cromatogràfica.

<sup>1</sup> Una bona part de les proteïnes intracel·lulars són proteases, i s'ha de minimitzar la hidròlisi de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa per part d'aquests enzims, treballant a unes condicions subòptimes per a la hidròlisi.

<sup>2</sup> Amb el mutant W221A s'ha realitzat un seguiment del grau de lisi cel·lular, mesurant la quantitat de proteïna alliberada després de cada cicle amb un assaig colorimètric de Bradford (I.8.4), i s'ha comprovat que la concentració proteica es manté constant a partir del tretzè cicle.

### I.6.2. Cromatografia de bescanvi iònic

En aquesta etapa cromatogràfica se separen les proteïnes segons el seu punt isoelèctric (pI). Donat que es treballa amb una reïna de bescanvi catiònic (carboximetil cel·lulosa), i que es treballa a un pH de 5.5, la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, que té un pI bàsic (8.5-8.6), es troba carregada positivament i s'adhereix fortament a la reïna. A diferència, la majoria de proteïnes d'*Escherichia coli* tenen un pI àcid, de manera que no queden retingudes. A continuació s'elueix la columna per augment gradual de força iònica, de manera que les diferents proteïnes ancorades a la reïna van eluint en funció del seu grau d'interacció. Es fa servir la reïna CM Sepharose CL-6B de Pharmacia-Biotech, compactada en una columna HiLoad SP 16/10 de Pharmacia. El seguiment de la purificació es realitza enregistrant en continu l'absorbància a 280 nm de les diferents fraccions que passen per la columna.

Tant la reïna de bescanvi catiònic com els tubs de goma emprats en el muntatge cromatogràfic es conserven en una solució d'EtOH al 20%, per tant, abans d'utilitzar-los s'han de netejar i preparar. Pel que fa als tubs de goma es connecta el muntatge amb les dues bombes peristàltiques i sense la columna, i es fa circular aigua Milli-Q fins haver eliminat l'EtOH, i posteriorment tampó 5 mM NaAcO pH 5.5. Pel que fa a la reïna s'omple un embut Rossich amb 200 mL de reïna i es neteja amb agitació amb aigua Milli-Q, fins eliminar l'EtOH; i a continuació, es neteja primer amb tampó 0.5 M NaAcO pH 5.0, i posteriorment amb tampó 5 mM NaAcO pH 5.5, amb la finalitat d'assolir un pH de 5.5 i una conductivitat inferior a 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . S'ha de parlar especial atenció per tal que la reïna no s'assequi en cap moment. S'aboca la reïna en suspensió en tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 dins d'un embut kitasatos, es desgasifica amb ajuda d'una bomba d'aigua durant 15 minuts i s'introdueix a la columna. Es compacta fent circular tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 a un flux<sup>1</sup> de 1.7 mL·min<sup>-1</sup>, fins observar que no hi ha disminució en el volum que ocupa la reïna. En aquest moment s'ajusta a zero l'absorbància del detector i es comença a carregar la mostra a la columna amb el mateix flux. La solució resultant després de la càrrega no es descarta fins comprovar que l'activitat 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de la mateixa no és significativa<sup>2</sup>. A continuació es fa circular tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 fins que l'absorbància del detector recupera el valor de base i llavors es procedeix a l'elució de la columna. Es programa un gradient lineal que en cinc hores es passa des d'un 100% de tampó 5 mM NaAcO pH 5.5 fins a un 100% de tampó 5 mM NaAcO, 0.3 M NaCl pH 5.5, amb ajuda de dues bombes peristàltiques<sup>3</sup>, a un flux de 1.7 mL·min<sup>-1</sup>. Es recullen fraccions de columna de 4 mL aproximadament, amb l'ajuda d'un col·lector de fraccions automàtic. La proteïna d'interès s'elueix cap al final del gradient. En funció del cromatograma a 280 nm s'escullen una sèrie de fraccions en què en principi es troba la proteïna d'interès i es realitza un gel d'electroforesi d'acrilamida per tal de determinar la seva puresa (I.8.1). En aquest mateix gel es pot avaluar el contingut residual de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa que es troba a les aigües de càrrega de la columna o a les aigües de rentat. En base als resultats obtinguts en l'electroforesi es recombinen les fraccions que contenen la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb un grau de puresa similar. Si hi ha fraccions especialment impures, o la solució que conté l'enzim d'interès no és incolora, és recomanable tornar-ho a

columnar. Una vegada recombinades les fraccions, es determina la concentració de proteïna fent servir l'assaig de Bradford (I.8.4). Una vegada finalitzada la cromatografia la neteja de la columna es realitza passant, en l'ordre indicat, les següents solucions: 2 M NaCl (200 mL), aigua desionitzada (100 mL), 1 M NaOH (300 mL), aigua desionitzada (300 mL), i la darrera solució depèn de l'ús posterior que se li doni a la columna, si s'ha de continuar fent servir per tal de purificar més enzim es neteja amb tampó 5 mM NaAcO pH 5.5, i si s'ha de guardar, es tracta amb EtOH al 20%.

<sup>1</sup> El flux de totes les etapes cromatogràfiques és el mateix, de 1.7 mL·min<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> La presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa a les diferents fraccions de columna es pot determinar a través d'un assaig d'activitat en placa (I.8.2), o a través d'un gel d'electroforesi d'acrilamida (SDS-PAGE) (I.8.1).

<sup>3</sup> També es pot realitzar el gradient amb un muntatge de vasos comunicants, amb 400 mL de tampó a cadascun. En aquest cas només es necessita una bomba peristàltica que és la que governa el flux de l'elució.

### I.6.3. Cromatografia de gel filtració

La cromatografia de gel filtració separa les proteïnes en funció de la seva mida molecular. S'utilitza la reïna Superdex 75 de Pharmacia-Biotech, compactada en una columna XK-16 de Pharmacia. El seguiment de la purificació es realitza enregistrant en continu l'absorbància a 280 nm de les diferents fraccions que passen per la columna. En aquest tipus de cromatografia és recomanable que la mostra es carregui en un volum reduït, i que no es carreguin més de 8 mg de proteïna. Si s'arriba a aquest pas amb més quantitat de proteïna, es realitzen tantes cromatografies de gel filtració com siguin necessàries. La mostra es pot preparar de dues formes diferents per a aquesta segona etapa cromatogràfica, per concentració i canvi de tampó utilitzant els concentradors Centriprep<sup>1</sup>, o bé per diàlisi i posterior liofilització.

- *Tractament de la mostra utilitzant els concentradors Centriprep.* Si el volum de mostra obtingut en la cromatografia de bescanvi catiònic supera els 4 mL, es concentra amb l'ajuda d'uns concentradors de tipus Centriprep, centrifugant a 8000 rpm i 4 °C durant el temps necessari per tal d'obtenir el volum desitjat. A continuació s'afegeix tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6.0, al compartiment superior, que és on està la mostra concentrada, i se centrifuga a 8000 rpm i 4 °C. Es repeteix el procés de canvi de tampó fins que la solució filtrada tingui el mateix pH i força iònica del tampó. S'ha de finalitzar el procés amb fraccions de proteïna al voltant dels 8 mg dissolts en un volum de mostra al voltant dels 4 mL. Si la solució proteica està tèrbola, se centrifuga en tubs d'Eppendorf a 13500 rpm durant 5 minuts, i es recupera el sobrenedant per pipeteig.

- *Tractament de la mostra per diàlisi i posterior liofilització.* La mostra de proteïna procedent de la primera etapa cromatogràfica es dialitza enfront de tampó 5 mM NaAcO, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0, per tal de disminuir la concentració salina, i a continuació es liofilitza. Abans de la liofilització la solució proteica se separa en fraccions que continguin al voltant de 8 mg de proteïna. En el moment de realitzar la cromatografia de gel filtració es dissol una de les fraccions proteiques en 4 mL de tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6.0.

Mentrestant es prepara la columna. Si la reina està mullada amb EtOH al 20%, es passa inicialment aigua desionitzada (100 mL) a un flux de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. Seguidament s'equilibra la columna amb tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6.0, a un flux de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, fins que l'eluent de sortida tingui les mateixes característiques de pH i conductivitat que el tampó utilitzat. S'ajusta el zero d'absorbància al detector i es carrega la mostra a un flux de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. S'elueix la columna amb tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6.0, a un flux de 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. Es recullen els primers 40 mL en un matràs d'Erlenmeyer, i la resta sobre tubs d'Eppendorf, en fraccions de 1.2 mL, amb un col·lector automàtic. En funció del cromatograma a 280 nm s'escullen les fraccions corresponents a la proteïna d'interès i es realitza un gel d'electroforesi d'acrilamida per tal de determinar la seva puresa (I.8.1). Després d'aquesta etapa cromatogràfica s'obté la proteïna d'interès amb un 95% de puresa determinada per electroforesi en gel d'acrilamida. Es recombinen aquelles fraccions que contenen la proteïna d'interès pura i es determina la concentració proteica fent servir una anàlisi de Bradford (I.8.4) o per determinació de l'absorbància de la mostra a 280 nm (I.8.3). Es dialitza la solució proteica primer enfront de tampó 2 mM MOPS pH 7.0 i després enfront d'aigua Milli-Q, per tal de disminuir la concentració salina. Si la proteïna s'ha d'utilitzar seguidament, es conserva a 4 °C en solució aquosa, altrament, és recomanable conservar-la liofilitzada a -20 °C. Una vegada finalitzades totes les cromatografies de gel filtració es neteja la columna fent servir les següents solucions en l'ordre indicat, a un flux de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>: 1 M NaOH (300 mL), aigua desionitzada (300 mL), i finalment, si s'ha de tornar a utilitzar immediatament, es neteja la columna amb tampó 20 mM NaAcO, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 6.0 i, si no s'ha de fer servir, es guarda en una solució d'EtOH al 20% a 4 °C.

<sup>1</sup> Els concentradors Centriprep i Centricon estan formats per dos compartiments separats per una membrana de 10000 Da de mida de porus, que amb ajuda de la força centrífuga permeten concentrar molècules de pes molecular superior a la seva mida de porus.

## **I.7. Expressió i purificació de l'enzim salvatge i mutants de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814**

### **I.7.1. Transformació de cèl·lules competents i obtenció del cultiu preparatiu**

Per tal d'obtenir la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 es transformen cèl·lules de la soca BL21 (DE3) d'*Escherichia coli* amb un plasmidi pET21d. En primer lloc es descongela una alíquota de cèl·lules competents (100  $\mu$ L) mantenint-la en gel durant 10 minuts. S'afegeix l'ADN d'interès (50 ng) i s'incuba en gel durant 30 minuts. S'incuba a 42 °C durant 2 minuts i es torna a transferir a gel on es manté durant 5 minuts. S'afegeix medi LB (0.9 mL) i s'incuba a 37 °C i 300 rpm durant 60 minuts. Se sembren alíquotes de 100  $\mu$ L en plaques de Petri amb medi 2xYT suplementades amb una solució 20 mg·mL<sup>-1</sup> d'ampicil·lina (100  $\mu$ L), i s'incuben a 37 °C durant no més de 24 hores, per tal d'evitar la formació de colònies satèl·lit. S'inocula medi 2xYT (10 mL), suplementat amb ampicil·lina a una concentració final de 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, amb una colònia aïllada de la placa de transformants. S'incuba en un agitador orbital a 37 °C i 300 rpm fins que l'absorbància a 595 nm és de 0.6 uAbs (al voltant de les 8 hores). S'atura el creixement refredant en gel i se centrifuguen les cèl·lules a 3500 rpm i 4 °C



durant 5 minuts. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en medi 2xYT (5 mL), suplementat amb ampicil·lina a una concentració de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . S'inocula medi 2xYT (400 mL), suplementat amb ampicil·lina a una concentració de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , amb suspensió del botó cel·lular (2 mL) i s'incuba a  $37^\circ\text{C}$  i 300 rpm durant 12 hores.

### I.7.2. Processat del cultiu preparatiu

El cultiu es refreda en gel i se centrifuga a 5550 rpm i  $4^\circ\text{C}$  durant 10 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en tampó d'unió<sup>1</sup> (16 mL). Es transfereix al tub de sonicació i s'afegeix Triton X-100 a una concentració del 0.5% i PMSF (fluorur de fenilmetilsulfonil) a una concentració de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (s'ha observat pèrdua de la cua d'histidines quan no es fa servir un inhibidor de proteases). Se sonica amb una sonda mitjana, amb un cicle de treball de 0.5 segons, fent 6 sèries de 1.5 minuts. Se centrifuga a 18000 rpm i  $4^\circ\text{C}$  durant 20 minuts. Es decanta el sobrenedant i es filtra a través d'una membrana de  $45 \mu\text{m}$ .

<sup>1</sup> Aquest tampó s'obté per dilució 1/8 del tampó d'unió que se subministra al *kit* emprat per tal de purificar la proteïna: His-Bind Buffer Kit de la casa comercial Novagen (I.7.3).

### I.7.3. Purificació per cromatografia d'afinitat

Per a la purificació tant de l'enzim salvatge com del mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 es fa servir el *kit* His-Bind Buffer Kit de la casa comercial Novagen, que es basa en la cromatografia d'afinitat per a la purificació de proteïnes que contenen una cua d'histidines. En un primer pas s'ancoren a la reïna cations  $\text{Ni}^{2+}$ , que en un principi uneixen l'imidazole del tampó d'unió. En carregar la proteïna a la columna, aquesta queda unida a la reïna per quelació dels cations  $\text{Ni}^{2+}$ , mentre que les proteïnes sense cua d'histidines no queden retingudes a la columna, o cas de fer-ho, no ho fan tan fortament. La proteïna d'interès finalment s'elueix amb un tampó que conté imidazole a elevada concentració, que competeix amb la proteïna per quelar els cations  $\text{Ni}^{2+}$  de la reïna.

#### *Solucions subministrades al kit*

- 8 x *Tampó d'unió*: 40 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9.
- 8 x *tampó de neteja*: 480 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9.
- 4 x *Tampó d'elució*: 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7.9.
- 4 x *Ttampó Strip*: 400 mM EDTA, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7.9. S'utilitza per tal de regenerar la columna.
- 8 x *Tampó de càrrega*: 400 mM  $\text{NiSO}_4$ .

#### *Procediment*

Es prepara la columna Hi Trap Chelating de 5 mL fent circular al seu través a un flux de  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , primer aigua desionitzada (15 mL), seguit de tampó de càrrega<sup>1</sup> (25 mL), i tampó d'unió<sup>1</sup> (25 mL). Es carrega la mostra a un flux de  $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Es fan circular a  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  tampó d'unió<sup>1</sup> (50 mL), tampó de neteja<sup>1</sup> (30 mL) i finalment tampó d'elució<sup>2</sup> (50 mL), amb el que es recupera la proteïna d'interès de la columna. L'elució

de la columna es controla realitzant un assaig d'activitat (I.8.5) de cadascuna de les fraccions recollides. Les fraccions de columna on es troba la proteïna es concentren amb centripres (Amicon) centrifugant a 3000 rpm. A continuació es realitza un canvi de tampó en què es troba dissolta la mostra afegint tampó 50 mM fosfat sòdic pH 7.0 als centripres i concentrant 2 o 3 vegades. La proteïna es conserva en dissolució en tampó 50 mM fosfat sòdic pH 7.0 a 4 °C.

<sup>1</sup> Obtingut per dilució (1/8) del tampó subministrat al *kit*.

<sup>2</sup> Obtingut per dilució (1/4) del tampó subministrat al *kit*.

## I.8. Tècniques d'anàlisi de proteïnes

### I.8.1. Electroforesi discontinua en SDS (SDS-PAGE)

Aquest mètode permet l'anàlisi de mesclures complexes de proteïnes per separació electroforètica, sobre un suport físic de poliàcrilamida, atenent a la seva mida molecular. S'ha utilitzat el muntatge *Mini-protean II Dual Slab Cell* de Bio-rad, amb una font d'alimentació model 200/2 (EEUU) de Bio-Rad o model PS-II-VC de TDISA.

*Solucions necessàries:*

- *Solució d'acrilamida al 30%, i bis-acrilamida al 2.67%:* es dissolen acrilamida (29.2 g, 0.411 mol), i *N,N'*-bismetilen-acrilamida (0.8 g, 5.19 mmol) en aigua desionitzada (100 mL) i es filtra a través de filtres de 0.22 µm. Es guarda a 4 °C.
- *Solució 1.5 M de Tris-HCl, pH 8.8:* es dissol Tris (18.15 g, 0.15 mol) en aigua desionitzada (80 mL), s'ajusta el pH amb una solució 1 N d'HCl i s'enrasa a 100 mL amb aigua desionitzada. Es guarda a 4 °C.
- *Solució 0.5 M de Tris-HCl, pH 6.8:* es dissol Tris (6 g, 0.046 mol) en aigua desionitzada (80 mL), s'ajusta el pH amb una solució 1 N d'HCl i s'enrasa a 100 mL amb aigua desionitzada. Es guarda a 4 °C.
- *SDS al 10%:* es dissol SDS (10 g, 0.035 mol) amb molt de compte en aigua desionitzada (100 mL).
- *Solució de persulfat amònic al 10%:* es dissol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (50 mg, 0.22 mmol) en aigua desionitzada (500 µL). Es prepara just en el moment que s'ha de fer servir.
- *Tampó de càrrega:* es barregen una solució 0.5 M de Tris-HCl pH 6.8 (0.5 mL, 0.25 mmol), glicerol (0.4 mL), una solució de SDS al 10% (0.8 mL, 0.28 mmol), 2-mercaptoetanol (0.2 mL), una solució de blau de bromofenol al 0.05% (p/v) (0.1 mL) i aigua desionitzada (2 mL).
- *5 x Tampó d'electroforesi:* es dissolen Tris (9 g, 0.069 mol), glicina (43.2 g, 0.757 mol) i SDS (3 g, 0.01 mol) en aigua desionitzada (600 mL).
- *Solució tenyidora:* es dissol Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) (5 g) en una mescla 1:4.5:4.5 de AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (500 mL).
- *Solució per destenyir el gel:* MeOH al 40% i HAcO al 10% en aigua desionitzada.

*Procediment*

Es munten els vidres i la cubeta seguint les especificacions del fabricant, fent servir els espaiadors de 0.8 mm adequats per a una càrrega de fins a 30 µL de mostra. Es prepara el gel separador (16% en acrilamida): es mesclen aigua desionitzada (1.72 mL), glicerina (0.6 mL), solució 1.5 M de Tris-HCl pH 8.8 (2.5 mL, 3.7 mmol), solució de SDS al 10% (100 µL, 35 µmol), solució d'acrilamida al 30% (5.03 mL, 0.021 mol), solució<sup>1</sup> de persulfat amònic al 10% (50 µL, 19 µmol), i TEMED<sup>1</sup> (5 µL). S'homogeneïtza, s'aboca en l'espai que queda entre els vidres i s'afegeix aigua desionitzada a sobre. Es deixa polimeritzar durant 30 minuts i es retira l'aigua, que s'acaba d'assecar amb paper absorbent. Es prepara el gel apilador (4% en acrilamida): es mescla aigua desionitzada (6.1 mL), solució 0.5 M de Tris-HCl pH 6.8 (2.5 mL, 3.7 mmol), solució de SDS al 10% (100 µL, 35 µmol), solució d'acrilamida al 30% (1.3 mL, 5.4 mmol), solució<sup>1</sup> de persulfat amònic al 10% (50 µL, 19 µmol), i TEMED<sup>1</sup> (10 µL). S'homogeneïtza i s'aboca en l'espai que queda entre els vidres a sobre el gel separador. Es col·loca la pinta per tal de generar les butxaques. Perquè aquestes quedin ben definides s'ha d'anar reposant amb aquesta solució fins sobreixir, ja que el gel es contrau en polimeritzar. Es deixa polimeritzar durant 30 minuts. S'enretira la pinta i es realitza el muntatge del conjunt. S'aboca també d'electroforesi, obtingut per dilució del tampó d'electroforesi 5x (60 mL) en aigua desionitzada (240 mL), omplint-se en primer terme el compartiment interior que es genera entre els dos gels. Mentrestant es preparen les mostres: les mostres es dilueixen en tampó de càrrega en una proporció (1:4)<sup>2</sup> i s'escalfen a 95 °C durant 4 minuts. Com a marcador de pesos moleculars es fa servir el preparat comercial *SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range*<sup>3</sup> de la casa Bio-Rad i com a patró, una solució de 1,3-1,4-β-glucanasa. El marcador es dilueix (1 µL) amb tampó de càrrega (19 µL), la dilució del patró amb tampó de càrrega depèn de la seva concentració<sup>2</sup>. Tant el marcador de pesos moleculars com el patró de 1,3-1,4-β-glucanasa se sotmeten al mateix tractament tèrmic que les mostres. Es carreguen les mostres i el patró al gel (30 µL) amb ajuda d'una xeringa Hamilton, deixant un carril lliure per al marcador de pesos moleculars (en aquest cas no cal carregar més que 5 µL de mostra). S'electroelueix el gel a un voltatge entre 150 i 200 V (intensitat constant de 20 mA) fins que el colorant brau de bromofenol arribi a la part inferior del gel (aproximadament 1 h 30 min). Es desconnecta l'aparell, es treuen els gels dels vidres amb cura per tal de no trencar-los, i se submergeixen en la solució tenyidora<sup>4</sup>. S'agita durant 20 minuts. Es decanta la solució tenyidora, s'afegeix la solució per destenyir, i s'agita. Es realitzen 2 o 3 canvis de solució destenyidora fins observar amb bon contrast les bandes de proteïna en el gel. El gel es guarda segellat entre dues làmines de plàstic, humit amb la solució emprada per tal de destenyir-lo.

<sup>1</sup> La solució de persulfat amònic al 10% i el TEMED s'afegeixen en l'últim moment, just abans d'abocar la solució per a la seva polimerització.

<sup>2</sup> Si bé la proporció mostra/tampó de càrrega generalment és de 1:4, depèn molt de la concentració proteica de la mostra. Així, si la mostra és molt concentrada és preferible fer una dilució més gran. En funció de la concentració es poden realitzar dilucions entre 1:3 i 1:8.

<sup>3</sup> La composició proteica del marcador de pesos moleculars és: fosforilasa (97.4 kDa), albúmina de sèrum boví (66.2 kDa), ovoalbúmina (45.0 kDa), anhidrasa carbònica (31.0 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) i lisozim (14.4 kDa).

<sup>4</sup> El colorant s'uneix covalentment als grups amino accessibles de les proteïnes. El seu límit de detecció és de 0.3-1 µg de proteïna.

### I.8.2. Assaig d'activitat 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa en placa

Aquest assaig, descrit anteriorment (I.3.5.6), es pot fer servir per a l'anàlisi de les fraccions de columna, durant la purificació de l'enzim salvatge i els mutants actius de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa.

#### *Solucions necessàries*

- *Solució 7 mg·mL<sup>-1</sup> de 1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi*: es resuspèn  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (350 mg, Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) en aigua Milli-Q (50 mL), afegint el sòlid sobre el líquid a 60 °C amb agitació magnètica. S'escalfa a 95 °C fins a solució completa (aprox. 20 minuts).

#### *Procediment*

Se suplementen plaques de medi LB amb una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucà de 7 mg·mL<sup>-1</sup> (1.43 mL), s'estén amb una espàtula de Drigalski i es deixa absorbir el temps necessari. S'afegeixen 1-2  $\mu$ L de les diferents mostres de proteïna en les diferents posicions d'una plantilla i es deixen absorbir. S'incuben les plaques a 37 °C durant 30 min, i es tenyeix la placa amb una solució de colorant roig Congo a l'1% (p/v), cobrint tota la placa i agitant durant 15 min en un agitador orbital. Es decanta el colorant, i es decolora amb una solució de NaCl a l'1% i 1 M de NaOH durant 5 min. Les solucions que contenen 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa activa mostren un halo d'intensitat i diàmetre proporcionals a la seva activitat sobre el fons de color vermell.

### I.8.3. Determinació de la concentració proteica per mesura de l'absorbància a 280 nm

Aquest mètode aprofita el fet que els residus aromàtics absorbeixen a 280 nm. Així doncs, aplicant la llei de Lambert i Beer es pot determinar la concentració de proteïna sempre que es conegui la seva absorptivitat a 280 nm. Aquesta es pot determinar experimentalment, o bé es pot deduir a partir del nombre (n) i tipus de residus aromàtics presents a la proteïna, aplicant l'algorisme de Gill i von Hippel [519], a partir de les absorptivitats individuals dels diferents residus (equació I.2):

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{280, \text{Tyr}} \cdot n_{\text{Tyr}} + \epsilon_{280, \text{Trp}} \cdot n_{\text{Trp}} + \epsilon_{280, \text{Cys}} \cdot n_{\text{Cys}} \quad \text{Equació I.2.}$$

Aquest mètode és aplicable a solucions de la proteïna d'interès d'elevada puresa, ja que d'altra banda, l'absorbància de les altres proteïnes interfereix en la lectura.

#### *Procediment*

Es realitza el zero d'absorbància a 280 nm amb aigua (1 mL) a l'espectrofotòmetre. A continuació sobre la mateixa cubeta es realitzen 5 addicions successives de la mostra (de 5  $\mu$ L cadascuna) i a cada addició es determina l'absorbància a 280 nm. S'obté el pendent de la recta d'absorbàncies enfront del paràmetre  $x/(x+1000)$ , on x és el volum total de mostra afegit, i dividint aquest pendent per l'absortivitat<sup>1</sup> pròpia de la proteïna d'interès, es determina la seva concentració. És recomanable que l'absorbància

mesurada se situï entre 0.1 i 1 unitats d'absorbància, ja que valors inferiors porten a una sobreestimació de la quantitat de proteïna, mentre que valors superiors comporten l'efecte contrari.

<sup>1</sup> L'absortivitat de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a 280 nm és de 14.5  $\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$  ( $3.534\cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) [520].

També es pot fer servir la metodologia d'addicions successives per a la determinació de l'absortivitat a 280 nm d'una solució d'enzim d'elevada puresa de concentració coneguda. En aquest cas, es representen els diferents valors d'absorbància a 280 nm enfront del factor de dilució de la mostra, i a partir del pendent de l'ajust es calcula l'absortivitat. En el present treball s'ha determinat d'aquesta forma l'absortivitat a 280 nm dels mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, per tal de poder determinar la concentració de posteriors solucions estoc d'enzim. Es fan servir solucions d'aquests dos mutants acabades de purificar, i es determina la seva concentració pel mètode de Bradford (I.8.4). Les absortivitats determinades d'aquesta manera, que no són absortivitats absolutes sinó que estan referides a un patró de BSA, es presenten a la taula 7.

**Taula I.7.** Absortivitats a 280 nm determinades per als mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Enzim	$\epsilon$ (280 nm) / $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
Y152A	323988
Y152F	316680

#### I.8.4. Determinació de la concentració proteica amb l'assaig colorimètric de Bradford

S'empra el *kit* Coomassie<sup>®</sup> Protein Assay Reagent (Pierce) que es basa en el mètode de Bradford [521]. Aquest mètode es basa en la mesura del desplaçament d'absorbància des de 465 a 595 nm degut a la unió del reactiu de Coomassie als grups amino de les proteïnes en medi àcid. La concentració de la proteïna d'interès es determina a partir de la lectura d'absorbància a 595 nm, per interpolació sobre una recta patró d'una proteïna de referència.

##### *Procediment*

Es mescla bé l'ampolla de reactiu per a l'anàlisi de proteïnes<sup>1</sup> (Coomassie Brilliant Blue G-250). Es preparen una sèrie de solucions d'albumina sèrica bovina (BSA)<sup>1</sup>. Es mescla la mostra o les dilucions del patró (0.1  $\text{mL}^2$ , o bé 1  $\text{mL}^3$ ) amb el reactiu per a l'anàlisi de proteïnes (5  $\text{mL}^2$ , o bé 1  $\text{mL}^3$ ) i es determina l'absorbància a 595 nm enfront d'aigua desionitzada. El zero d'absorbància a 595 nm es fa amb la solució en què està dissolta la mostra. Es genera la recta patró amb les lectures de l'albumina i es determina la concentració proteica de la mostra, per interpolació en aquesta recta.

Per a la determinació de concentracions proteiques en el marge entre 125 i 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  les concentracions de la recta patró d'albumina són de 125, 250, 500, 1000,

1500 i 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Per a la determinació de concentracions proteiques en el marge entre 1 i 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  les concentracions de la recta patró d'albumina són de 1, 5, 10, 15 i 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

<sup>1</sup> Subministrat en el *kit*.

<sup>2</sup> Per tal de determinar concentracions de proteïna en el marge de 125-2000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

<sup>3</sup> Per tal de determinar concentracions de proteïna en el marge de 1-25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

S'han fet servir també dues variants sobre el mètode tradicional:

- *Bradford en microplaca:*

En una placa d'ELISA es preparen diferents solucions de BSA de 200  $\mu\text{L}$ , cobrint un marge de concentracions entre 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  i 14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  per dilució d'una solució estoc de BSA de concentració 0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A la mateixa placa es preparen diferents dilucions de 200  $\mu\text{L}$  de la mostra d'enzim del qual es desitja determinar la concentració. S'afegeix el reactiu de Coomassie (200  $\mu\text{L}$ ) a les cubetes que contenen les mostres i el patró, i es determina l'absorbància a 590 nm en un lector d'ELISA. El valor de la concentració de la mostra d'enzim que es vol determinar s'interpola en la recta patró de BSA.

- *Colorimetria a nivell visual*

Aquesta variació del mètode permet determinar la concentració de proteïna de forma ràpida sense necessitat de mesurar l'absorbància. S'ha comprovat amb diverses mesures que, per a la determinació de concentracions de proteïna intermèdies, l'error comès respecte del mètode tradicional no supera el 15%. El mètode es descriu a continuació:

Es mescla bé l'ampolla de reactiu per a l'anàlisi de proteïnes (Coomassie Brilliant Blue G-250). Es preparen una sèrie de solucions d'albumina sèrica bovina (BSA) de concentracions 10, 50, 100, 150 i 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Es mescla la mostra o les dilucions del patró (10  $\mu\text{L}$ ) amb el reactiu per a l'anàlisi de proteïnes (200  $\mu\text{L}$ ), es deixa reposar durant 10 minuts a temperatura ambient, i es determina la concentració proteica de la mostra, per comparació visual sobre la recta patró de BSA.

### **I.8.5. Determinació de la concentració proteica per mesura de l'activitat enzimàtica enfront de substrats cromofòrics**

La concentració d'una solució de proteïna activa de la que es coneixen els paràmetres cinètics es pot determinar a partir de la velocitat d'hidròlisi inicial a una concentració de substrat fixa. Aquest mètode, a l'igual que l'anterior, només és aplicable per a enzims actius i prèviament caracteritzats enzimològicament, però és molt específic, i proporciona una mesura de concentració molt més exacta que la lectura d'absorbància a 280 nm, donat que la presència de traces de proteïnes contaminants a la solució no hi interfereixen.

1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis**Solucions necessàries*

- *Tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat pH 7.2*: es dissolen àcid cítric (0.635 g, 3.25 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15.579 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es comprova que el pH és l'adient a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques (55 °C). Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'enrassa a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *Solució 4 mM de G4G3G-MU en tampó 87 mM fosfat 6.5 mM citrat pH 7.2*: es dissol G4G3G-MU (26.5 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) en tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2 (10 mL). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *Solució 10 mM de  $\text{CaCl}_2$* : es dissol  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.146 g, 1 mmol) en aigua Milli-Q i s'enrassa a 100 mL. Es filtra la solució a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$ , i es conserva a 4 °C.

*Procediment*

Es comprova la concentració de la solució de G4G3G-MU per determinació de la seva absorbància a 316 nm aplicant el mètode de les addicions successives. Es comença realitzant un zero d'absorbància a 316 nm amb aigua (1 mL). A continuació sobre la mateixa cubeta es realitzen 5 addicions successives de la mostra (5  $\mu\text{L}$ ) i a cada addició es determina l'absorbància a la mateixa longitud d'ona. S'obté el pendent de la recta d'absorbàncies enfront del paràmetre  $x/(x+1000)$ , on x és el volum total de mostra afegit, i aplicant la llei de Lambert i Beer ( $\epsilon_{316 \text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), es determina la seva concentració.

Per tal de realitzar la reacció enzimàtica s'afegeixen, en cinc cubetes diferents, solució de substrat de manera que la concentració final sigui de  $2 \text{ mM}^1$  (al voltant dels  $500 \mu\text{L}$ )<sup>2</sup>, solució de  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{L}$ ), i tampó 87 mM fosfat 6.5 mM citrat pH 7.2, fins assolir un volum total d'1 mL (al voltant dels  $490 \mu\text{L}$ )<sup>2</sup>. Es preescalfen a 55 °C durant 5 minuts a l'espectrofotòmetre i es fa un zero d'absorbància a 365 nm. A cada cubeta s'afegeix un volum diferent de la solució d'enzim (entre 5 i 25  $\mu\text{L}$ ), s'homogeneïtza per inversió, es tornen les cubetes a l'espectrofotòmetre, i es mesura la velocitat inicial de reacció a 365 nm i 55 °C durant 10 minuts. Es determina el pendent de la recta de velocitat inicial respecte del paràmetre  $x/(x+1000)$ , on x és el volum total de mostra afegit. Dividint el pendent obtingut per la  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  a 365 nm per al G4G3G-MU en aquestes condicions,  $5076 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , s'obté el valor de la velocitat inicial en  $\text{M} \cdot \text{temps}^{-1}$ . Amb aquest valor de velocitat es determina la concentració d'enzim, aplicant l'equació de Michaelis-Menten, a partir dels paràmetres cinètics de l'enzim a les condicions de reacció emprades. En el cas de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'ha d'aplicar l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació I.3). Els paràmetres cinètics a aquestes condicions determinats amb anterioritat [200] són:  $k_{\text{cat}} = 4.58 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_M = 2.69 \text{ mM}$ ;  $K_I = 37.8 \text{ mM}$ .

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad \text{Equació I.3.}$$

<sup>1</sup> La concentració de substrat de la cinètica no ha de ser necessàriament de 2 mM, n'hi ha prou amb que sigui la mateixa en les cinc reaccions. Tot i així, és preferible que sigui una concentració de substrat superior a  $2xK_M$ .

<sup>2</sup> El volum exacte depèn de la concentració de la solució estoc de substrat determinada espectrofotomètricament a 316 nm.

### *$\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814*

Donada la baixa estabilitat de la  $\beta$ -glucosidasa en solució aquosa, abans de fer servir la solució estoc d'enzim per tal de realitzar estudis enzimològics, s'ha de determinar la concentració de  $\beta$ -glucosidasa activa. Això implica que la primera vegada que s'expressa i purifica la proteïna salvatge o algun dels seus mutants, el primer que s'ha de fer és determinar la concentració de la solució proteica emprant el mètode de Bradford (I.8.4) i a continuació determinar els seus paràmetres cinètics a unes condicions concretes, que posteriorment es faran servir sempre que sigui necessari avaluar la concentració de  $\beta$ -glucosidasa activa. En el present treball s'han determinat els paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 per a la hidròlisi del substrat 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid en tampó 50 mM fosfat pH 6.5 a 30 °C.

#### *Solucions necessàries*

- *Tampó 50 mM fosfat pH 6.5*: es dissol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (8.95 g, 25 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es tempera a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques amb ajuda d'un bany termostàtic (30 °C). A la temperatura desitjada, s'ajusta el pH a 6.5 amb una solució 1 M de NaOH. S'enrassa a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *Solució 6 mM de 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid en tampó 50 mM fosfat pH 6.5*: es dissol 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid (18.1 mg, 60  $\mu\text{mol}$ ) en tampó 50 mM fosfat pH 6.5 (10 mL). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

#### *Procediment*

Es comprova la concentració de la solució de 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid per determinació de la seva absorbància a 301 nm aplicant el mètode de les addicions successives. Es comença realitzant un zero d'absorbància a 301 nm amb aigua (1 mL). A continuació sobre la mateixa cubeta es realitzen 5 addicions successives de la mostra (5  $\mu\text{L}$ ) i a cada addició es determina l'absorbància a 301 nm. S'obté el pendent de la recta d'absorbàncies enfront del paràmetre  $x/(x+1000)$ , on x és el volum total de mostra afegit, i aplicant la llei de Lambert i Beer ( $\epsilon_{301 \text{ nm}} = 8236 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), es determina la concentració de la solució de substrat.

Per tal de realitzar la reacció enzimàtica s'afegeixen, en cinc cubetes diferents, solució de substrat de manera que la concentració final sigui de 0.3 mM<sup>1</sup> (al voltant dels 50  $\mu\text{L}$ )<sup>2</sup> i tampó 50 mM fosfat pH 6.5, fins assolir un volum total d'1 mL (al voltant dels 950  $\mu\text{L}$ )<sup>2</sup>. Es preescalfen a 30 °C durant 5 minuts a l'espectrofotòmetre i es fa un zero d'absorbància a 400 nm. A cada cubeta s'afegeix un volum diferent de la solució



d'enzim (entre 5 i 25  $\mu\text{L}$ ), s'homogeneïtza per inversió, es tornen les cubetes a l'espectrofotòmetre, i es mesura la velocitat inicial de reacció a 400 nm i 30 °C durant 10 minuts. Es determina el pendent de la recta de velocitat inicial respecte del paràmetre  $x/(x+1000)$ , on  $x$  és el volum total de mostra d'enzim afegit. Dividint el pendent obtingut per la  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  a 400 nm per al G-4NP en aquestes condicions,  $5088 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , s'obté el valor de la velocitat inicial en  $\text{M}\cdot\text{temps}^{-1}$ . Amb aquest valor de velocitat es determina la concentració d'enzim, aplicant l'equació de Michaelis-Menten, a partir dels paràmetres cinètics de l'enzim a les condicions de reacció emprades. En el cas de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 el model que millor s'ajusta és el de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació I.3), i els paràmetres cinètics en aquestes condicions són:

- enzim salvatge:  $k_{\text{cat}} = 8.1 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_{\text{M}} = 104 \pm 19 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{I}} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$
- mutant C181A:  $k_{\text{cat}} = 10.1 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_{\text{M}} = 126 \pm 7 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{I}} = 10 \pm 2 \text{ mM}$

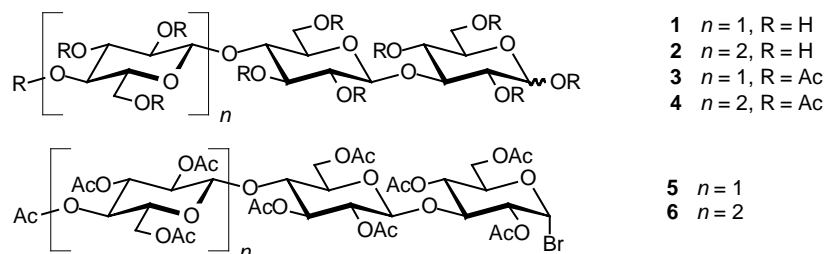
<sup>1</sup> La concentració de substrat de la cinètica no ha de ser necessàriament de 0.3 mM, n'hi ha prou amb que sigui la mateixa en les cinc reaccions. Tot i així, és preferible que sigui una concentració de substrat superior a  $2xK_{\text{M}}$  i donat que amb aquest substrat l'enzim salvatge presenta una notable inhibició acompetitiva per substrat, és recomanable que la concentració estigui al voltant de la indicada.

<sup>2</sup> El volum exacte depèn de la concentració de la solució estoc de substrat obtinguda per determinació de la seva absorbància a 301 nm.

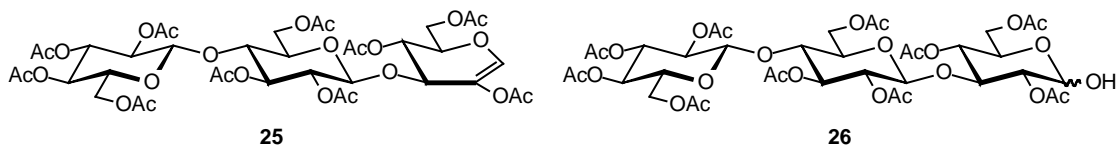
## II. Síntesi de substrats

### II.0. Relació de compostos referenciats en el capítol de síntesi de glicòsids

#### Anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucosidasa de *Bacillus licheniformis*



R = Ac		R = H	
<b>7</b>	$n = 1, Ar = P$	<b>16</b>	$n = 1, Ar = P$
<b>8</b>	$n = 1, Ar = 3NP$	<b>17</b>	$n = 1, Ar = 3NP$
<b>9</b>	$n = 1, Ar = MU$	<b>18</b>	$n = 1, Ar = MU$
<b>10</b>	$n = 1, Ar = 4NP$	<b>19</b>	$n = 1, Ar = 4NP$
<b>11</b>	$n = 1, Ar = 3,5NP$	<b>20</b>	$n = 1, Ar = 3,5NP$
<b>12</b>	$n = 1, Ar = 3,4NP$	<b>21</b>	$n = 1, Ar = 3,4NP$
<b>13</b>	$n = 1, Ar = 2,3NP$	<b>22</b>	$n = 1, Ar = 2,3NP$
<b>14</b>	$n = 2, Ar = MU$	<b>23</b>	$n = 2, Ar = MU$
<b>15</b>	$n = 2, Ar = 4NP$	<b>24</b>	$n = 2, Ar = 4NP$
<b>27</b>	$n = 1, Ar = 2,4NP$	<b>28</b>	$n = 1, Ar = 2,4NP$

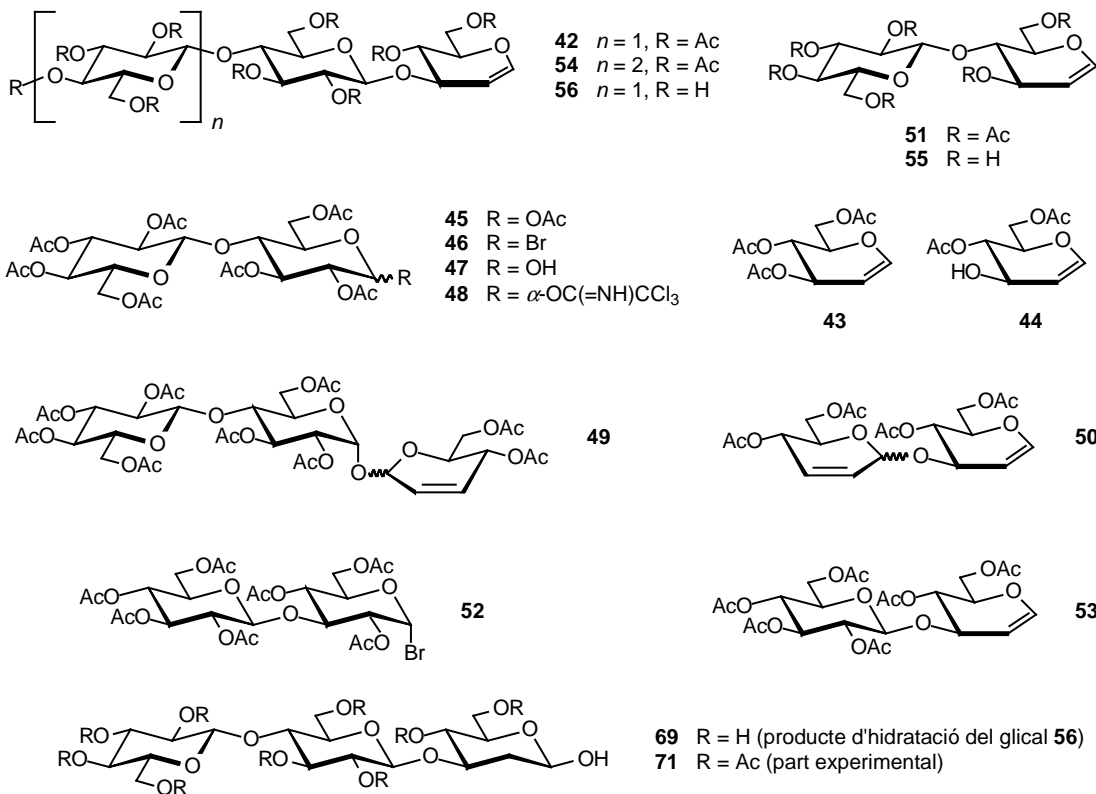


#### Anàlisi de Hammett de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

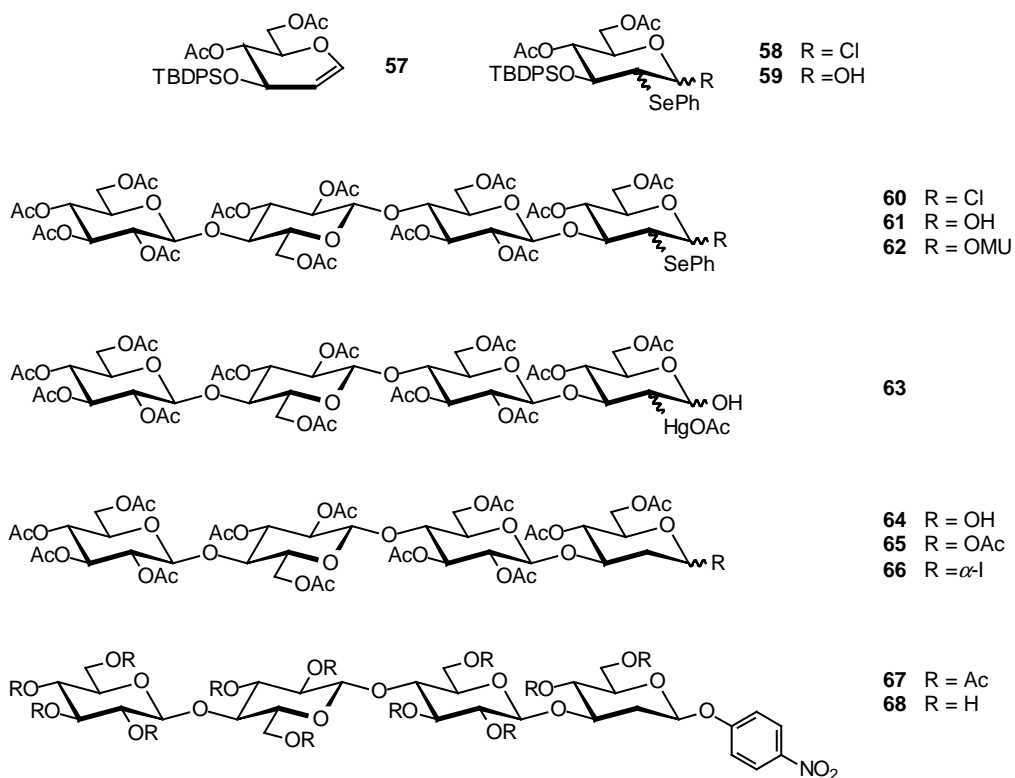


	R = Ac	R = H
Ar = 4BrP	<b>31</b>	<b>36</b>
Ar = 3NP	<b>32</b>	<b>37</b>
Ar = 3,5NP	<b>33</b>	<b>38</b>
Ar = 3,4NP	<b>34</b>	<b>39</b>
Ar = 2,3NP	<b>35</b>	<b>40</b>
Ar = 2,4NP	----	<b>41</b>

Síntesi de glicals



Síntesi de l'anèleg 2-desoxiglicòsid **68**



## II.1. Consideracions generals

### II.1.1. Preparació de reactius, dissolvents anhidres i tampons

#### Reactius

- *Anhídrid acètic (Ac<sub>2</sub>O)*: s'asseca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, es decanta i es destil·la.
- *Bromur mercúric (HgBr<sub>2</sub>)*: s'asseca al buit, a 70 °C i durant 12 hores.
- *Cianur mercúric (Hg(CN)<sub>2</sub>)*: s'asseca al buit, a 70 °C i durant 12 hores.
- *Clorur d'hidrogen (HCl) en metanol*: sobre una solució saturada d'HCl (35%) amb NaCl sòlid en suspensió s'afegeix gota a gota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%), generant un corrent d'HCl<sub>(g)</sub>. Aquest s'asseca amb una trampa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, es fa passar a través d'una columna de llana de vidre i es fa bombollear sobre metanol anhidre. L'excés de gas es fa passar per una columna de CaCl<sub>2</sub> i es bombolleja sobre NaOH (aq.). La solució de clorur d'hidrogen en metanol es valora amb una solució 1 N de NaOH, amb indicador de fenolftaleïna.
- *Manganès (Mn)*: s'asseca al buit, a 60 °C i durant 6 hores.
- *Metòxid sòdic (NaOMe) en metanol 1 M*: es pesen 230 mg de Na (rentats amb MeOH i EtOEt) sota toluè i es dissolen en 10 mL de metanol anhidre en un matràs tapat amb un tub de CaCl<sub>2</sub>.
- *Reïna de bescanvi iònic Amberlite® IR-120 (H<sup>+</sup>)*: es renta varies vegades amb MeOH, fins que el rentat sigui incolor.
- *Tamisos moleculars de 4 Å activats*: s'escalfen a 500 °C durant un mínim de 3 hores i es guarden en un dessecador amb CaCl<sub>2</sub>.

#### Dissolvents

- *Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN)*: s'asseca sobre CaH<sub>2</sub>, es decanta i es destil·la de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El destil·lat es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Acetat d'etil (AcOEt)*: es destil·la de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- *Benzè*: es destil·la de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Cloroform (CHCl<sub>3</sub>)*: es destil·la de CaH<sub>2</sub> i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Diclorometà (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)*: es destil·la de CaH<sub>2</sub> i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Metanol (MeOH)*: es destil·la de iode (1 g·L<sup>-1</sup>) i magnesi (5 g·L<sup>-1</sup>).
- *N,N-Dimetilformamida (DMF)*: s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es decanta, es destil·la a pressió reduïda (56 mm Hg, T<sub>eb</sub> = 52 °C) i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Piridina (Py)*: es destil·la de KOH i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Tetrahidrofurà (THF)*: es destil·la de LiAlH<sub>4</sub> i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.
- *Toluè*: es destil·la de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i es recull sobre tamisos moleculars de 4 Å recent activats.

### Tampons

- *Tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat pH 7.2:* es dissolen àcid cítric (0.635 g, 3.25 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15.579 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es comprova que el pH és l'adient a la temperatura de treball. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'enrassa a 0.5 L en un matràs aforat, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó 8.7 mM fosfat, 0.65 mM citrat pH 7.2:* s'obté per dilució 1/10 del tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat pH 7.2, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó fosfat 0.25 M pH 7.0:* Es dissol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.237 g, 0.0103 mol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (5.293 g, 0.0148 mol) en aigua Milli-Q (aproximadament 75 mL). A la temperatura de treball s'ajusta el pH a 7.0 amb una solució 1 M de NaOH i s'enrassa el volum a 100 mL en un matràs aforat amb aigua Milli-Q. Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Tampó TAPS 50 mM pH 7.9:* solució aquosa d'àcid *N*-tris[hidroximetil]metil-3-amino-propanosulfònic. El pH s'ajusta a 7.9 amb una solució 1 M de NaOH.

### **II.1.2. Control de reacció**

- *Cromatografia de capa fina:* es duu a terme sobre plaques de gel de sílice Macherey-Nagel Polygram SIL G/UV<sub>254</sub> (mida de gra 0.20 mm, suport plàstic) o Merck 60 F<sub>254</sub> (mida de gra 0.20 mm, suport vidre) i plaques de fase reversa Merck RP-18 F<sub>254</sub>S (mida de gra 0.25 mm, suport vidre). Les plaques de fase reversa s'escalfen a 110 °C durant 15 minuts prèviament a la seva utilització. Els compostos es detecten per observació directa amb llum UV de 254 i 360 nm, i, després de polvorització amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% i calefacció a 125 °C, per observació amb llum visible i amb llum UV de 254 i 360 nm.
- *Control per HPLC:* es realitza en un cromatògraf (Waters 600E) amb un detector d'absorbància UV/VIS (Waters 486), acoblat a un mòdul processador de dades (Waters 746). Columna analítica: Waters Millipore de fase reversa (NOVA-PAK<sup>®</sup> C-18, 4  $\mu\text{m}$ , 60 Å, 3.9 x 150 mm). La mostra es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  (Waters/Millipore) i es carrega amb un *loop* de 10  $\mu\text{L}$ .

### **II.1.3. Separacions cromatogràfiques preparatives**

- *Cromatografia flash:* gel de sílice SDS (230-400 mesh, 35-70  $\mu\text{m}$ ) amb una proporció fase estacionària/cru de 60:1. L'adsorbent s'introdueix en sec sobre la columna, es compacta per succió i s'humecta, prèviament a l'aplicació de la mostra, amb l'eluent al que se li ha afegit trietilamina (1 mL per litre d'eluent, aproximadament) per tal de neutralitzar l'acidesa de la sílica. La mostra es carrega dissolta en l'eluent inicial o el seu component més apolar, en un altre dissolvent o en càrrega seca, indicant-se de manera explícita en els darrers dos casos. S'elueix sota pressió de  $\text{N}_2$ , amb una pressió màxima de 0.5 bar (flux aproximat 50  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ).
- *Cromatografia de gravetat:* gel de sílice SDS (70-200  $\mu\text{m}$ ) amb una proporció fase estacionària/cru de 100:1. L'adsorbent s'introdueix en la columna prèviament humectat

amb l'eluent i desgasificat per succió. A l'humectar, s'addiciona a l'eluent una petita quantitat de trietilamina per tal de neutralitzar l'acidesa de la sílica. Es compacta l'adsorbent copejant suaument la columna fins que no s'observa disminució en l'alçada de l'adsorbent. La mostra es carrega dissolta en l'eluent inicial o el seu component més apolar, en un altre dissolvent o en càrrega seca, indicant-se de manera explícita en els darrers dos casos. Les fraccions, d'un volum de 1300 gotes (15 mL aproximadament), es recullen automàticament amb un col·lector Amersham Pharmacia Biotech RediFrac.

- *Cromatografia de mitja pressió*: s'utilitza una columna Merck LiChroprep Si 60 o RP-18 (230-400 mesh, 40-63  $\mu\text{m}$ ) amb una proporció fase estacionària/cru de 50:1. La mostra es carrega dissolta en l'eluent, en el component més apolar de l'eluent o en un altre dissolvent, indicant-se explícitament en aquest darrer cas, després de filtrar-la a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  Waters/Millipore. S'elueix mitjançant una bomba dosificadora de polsos Duramat amb un esmorteïdor a una pressió de treball de 3-4 bar i les fraccions es recullen automàticament, a un ritme de 4 minuts per fracció, amb un col·lector de fraccions Ultra-Rack LKB-700 (Pharmacia Biotech).

#### II.1.4. Dades físiques i espectroscòpiques

*Punts de fusió* (p.f.): es determinen en un aparell Büchi 535 amb bany de silicona, i en capil·lar obert.

*Rotacions òptiques* ( $[\alpha]_D$ ): es determinen en un polarímetre Perkin-Elmer 241 fixant la temperatura a 20 °C. En cada cas s'indica el dissolvent emprat i la concentració expressada en  $\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ .

*Anàlisis elementals quantitatives* (A.E.): es determinen amb un analitzador CHNS-O Carlo Erba EA 1108. Els valors presentats corresponen a la mitjana aritmètica de dues determinacions.

*Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear* (RMN): els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN s'han enregistrat en un aparell Varian-Gemini 300 (300 MHz). La posició dels senyals es dona en valors de  $\delta$  (ppm) prenent com a referència interna ( $\delta = 0$  ppm) els senyals dels protons del tetrametilsilà (TMS) o del 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteropropionat de sodi (TSPNa) en el cas d'enregistrar els espectres en  $\text{D}_2\text{O}$ . Entre parèntesis s'indica el tipus de senyal, seguit del nombre de protons, les constants d'acoblament i l'assignació del senyal.

- *Tipus de senyal*: el tipus de senyal s'indica com a s (singlet), sa (senyal ample), d (doblet), dd (doblet de doblets), ddd (doblet de doblat de doblets), t (triplet), q (quadruplet), o m (multiplet).

- *Nombre de protons*: es mesura per integració electrònica de l'àrea del senyal.

- *Constants d'acoblament* (J): s'expressen en Hz, i es calculen a partir de la fórmula que es mostra a continuació:

$$J \text{ (Hz)} = \text{Freqüència de l'espectre (MHz)} \cdot \Delta\text{senyals (ppm)}$$

El valor obtingut s'arrodoneix a la mitja unitat més propera, ja que aquesta és la màxima exactitud que permet la resolució de l'aparell. Quan és possible,

s'indiquen els protons entre els que es produeix l'acoblament mitjançant dos subíndexs numèrics ( $J_{x,y}$ ); per a les constants notades amb un subíndex alfabètic ( $J_a$ ) no s'ha establert entre quins protons s'estableix l'acoblament.

Els espectres bidimensionals d'homocorrelació COSY (*correlated spectroscopy*) i NOESY (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) s'han enregistrat en el mode sensible a la fase en el mateix aparell Varian-Gemini 300.

Els espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN s'han enregistrat en un aparell Varian-Gemini 300 (75 MHz) en les condicions de *proton noise decoupling*. La posició dels senyals es dona en valors de  $\delta$  referits indirectament al senyal del dissolvent, relatiu al senyal del TMS; per als espectres enregistrats en  $\text{D}_2\text{O}$  s'utilitza dioxà com a referència interna. La multiplicitat dels senyals s'ha determinat mitjançant la seqüència DEPT (*distorsionless enhancement by polarization transfer*).

Els espectres bidimensionals HETCOR (*heteronuclear correlation*) s'han enregistrat en el mode de detecció de  $^1\text{H}$  i utilitzant una sonda reversa.

## II.2. Síntesi de l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glucopiranososa (3) i l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glucopiranososa (4)

### II.2.1. Digestió enzimàtica de $\beta$ -glucà d'ordi

Es dissol  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (10.0 g, Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) en tampó 0.65 mM citrat, 8.72 mM fosfat, pH 7.2 (1.7 L) a 60 °C amb agitació. Es deixa refredar fins uns 40 °C, moment en què s'afegeix una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* fins una concentració final de 120  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i s'incuba en un agitador orbital a 45 °C i 140 rpm durant 12 hores. Posteriorment s'afegeix més enzim fins a obtenir una concentració final de 180  $\mu\text{g}/\text{L}$ . El control de reacció es realitza per c.c.f. (MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOEt 4:3:8). La reacció finalitza 6 hores després de la segona addició d'enzim. El cru de digestió es destil·la a pressió reduïda i 50 °C fins a sequedat, i el residu obtingut s'asseca al buit durant 24 hores. S'obtenen 11.25 g de sòlid, que s'utilitzen en el següent pas de reacció sense més processament.

## II.2.2. Síntesi de l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranososa (**3**) i de l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranososa (**4**)

Sobre el cru de digestió sec (11.25 g) provinent de la hidròlisi enzimàtica de  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana, prèviament polvoritzat amb l'ajut d'ultrasons, s'addicionen Ac<sub>2</sub>O (300 mL, 3.18 mol) i piridina recent destil·lada (300 mL, 3.72 mol). La suspensió s'agita a temperatura ambient en un matràs, protegit de la llum amb paper d'alumini i de la humitat amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. El control de reacció es realitza per c.c.f. (AcOEt/CHCl<sub>3</sub> 3:2; les mostres s'han d'evaporar 2 o 3 vegades de toluè per tal d'eliminar les traces de piridina, que emmascaren les taques sobre la c.c.f.). Després de 24 hores, el cru de reacció s'aboca lentament sobre aigua/gel (1.5 L) amb agitació continuada. Es forma un precipitat marró que es filtra, es renta amb aigua freda i es dissol amb CHCl<sub>3</sub> (100 mL). La fase aquosa s'extreu amb cloroform (4 x 100 mL) i les fases orgàniques es combinen. La fase orgànica obtinguda es renta amb una solució saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 x 200 mL) i amb aigua (3 x 100 mL), s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i es destil·la a pressió reduïda fins a sequedat. Les restes d'HAcO, que donen olor picant, i de piridina s'eliminen per codestil·lació amb ciclohexà i amb toluè respectivament. S'asseca a pressió reduïda. El cru d'acetilació es purifica per cromatografia *flash* (AcOEt/CHCl<sub>3</sub> 1:2  $\rightarrow$  2:3  $\rightarrow$  1:1  $\rightarrow$  2:1), obtenint-se els dos productes d'interès, que es purifiquen per digestió amb èter diisopropílic. S'obtenen el trisacàrid **3** (8.35 g, 8.64 mmol, 44% respecte de la massa inicial de  $\beta$ -glucà) i el tetrasacàrid **4** (4.43 g, 3.46 mmol, 23% respecte de la massa inicial de  $\beta$ -glucà), i s'identifiquen a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**Trisacàrid 3:** <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.21 (d, 0.5 H,  $J_{1,2}$  = 3.5, H-1A $_{\alpha}$ ), 5.61 (d, 0.5 H,  $J_{1,2}$  = 8.5, H-1A $_{\beta}$ ), 5.12-3.60 (m, 20 H, H-1B, H-1C, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.19-1.96 (11 s, 33 H, CH<sub>3</sub>CO).

**Tetrasacàrid 4:** <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.21 (d, 0.5 H,  $J_{1,2}$  = 3.5, H-1A $_{\alpha}$ ), 5.60 (d, 0.5 H,  $J_{1,2}$  = 8.0, H-1A $_{\beta}$ ), 5.12-3.60 (m, 27 H, H-1B-D, H-2A-D, H-3A-D, H-4A-D, H-5A-D, H-6aA-D, H-6bA-D), 2.18-1.96 (14 s, 42 H, CH<sub>3</sub>CO).

## II.3. Síntesi de bromurs de glicosil

### II.3.1. Metodica general

Se suspèn el per-*O*-acetat corresponent (1 mmol) en una solució de HBr en HAcO (33%, 4.1 M) (10 mL) i s'agita vigorosament en un sistema protegit amb un tub de CaCl<sub>2</sub> fins observar la completa dissolució del sòlid (típicament uns 30 minuts). S'aboca la solució sobre aigua/gel (100 mL) i s'extreu amb CHCl<sub>3</sub> (4 x 50 mL). Els extractes orgànics combinats es renten amb NaHCO<sub>3</sub> (aq., sat.) (2 x 50 mL) i aigua (50 mL), s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El residu sòlid obtingut s'asseca al buit i s'identifica com al producte d'interès a partir del seu espectre de <sup>1</sup>H-RMN i/o per c.c.f. mitjançant comparació amb un patró.



Degut a la inestabilitat dels productes, és recomanable fer-los servir immediatament després d'obtenir-los. Altrament s'han de conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sota atmosfera inerta.

### II.3.2. Síntesi dels bromurs 5, 6, 46 i 52

#### Bromur d'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil (46)

S'obtenen 1.42 g (1.98 mmol, 96%), a partir de 1.4 g (2.06 mmol) de l'octaacetat de cel·lobiosa (45).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.54 (d,  $J_{1,2} = 4.0$ , 1 H, H-1A $_{\alpha}$ ), 5.54 (dd,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ , 1 H, H-3A), 5.16 (dd,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ , 1 H, H-3B), 5.08 (dd,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ , 1 H, H-4B), 4.95 (dd,  $J_{2,3} = 9.0$ ,  $J_{1,2} = 8.0$ , 1 H, H-2B), 4.77 (dd,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{1,2} = 4.0$ , 1 H, H-2A), 4.55 (d,  $J_{1,2} = 8.0$ , 1 H, H-1B), 4.53 (m, 1 H, H-6bA), 4.38 (dd,  $J_{\text{gem}} = 12.5$ ,  $J_{5,6b} = 4.5$ , 1 H, H-6bB), 4.21-4.15 (m, 2 H, H-5A, H-6aA), 4.05 (dd,  $J_{\text{gem}} = 12.5$ ,  $J_{5,6a} = 2.0$ , 1 H, H-6aB), 3.84 (dd,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ , 1 H, H-4A), 3.68 (m, 1 H, H-5B), 2.14-1.99 (7s, 21 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### Bromur d'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil (52).

S'obtenen 0.17 g (0.24 mmol, 96%) a partir de 0.17 g (0.25 mmol) d'octaacetat d' $\alpha$ -laminaribiosa.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.47 (d,  $J_{1,2} = 4.0$ , 1 H, H-1A $_{\alpha}$ ), 5.16 (dd,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ , 1 H, H-3A), 5.11-4.91 (m, 3 H, H-3B, H-4A, H-4B), 4.82 (dd,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{1,2} = 4.0$ , 1 H, H-2A), 4.69 (d,  $J_{1,2} = 8.0$ , 1 H, H-1B), 4.39 (m, 1 H, H-6aA), 4.29-4.19 (m, 3 H, H-5A, H-6bA, H-6aB), 4.09 (dd,  $J_{\text{gem}} = 12.0$ ,  $J_{5,6a} = 2.0$ , 1 H, H-6bB), 3.75 (m, 1 H, H-5B), 2.06-1.91 (7s, 21 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### Bromur d'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil (5)

S'obtenen 2.04 g (2.02 mmol, 98%) a partir de 2.00 g (2.07 mmol) del trisacàrid 3.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.50 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$ , H-1A), 4.65 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1C), 5.40-4.55 i 4.55-4.00 (m, 15 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A, H-4C, H-5A, H-6aA-C, H-6bA-C), 3.79 (dd, 1 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.0$ , H-4B), 3.70-3.60 (m, 2 H, H-5A, H-5B), 2.19-1.96 (10 s, 30 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**Bromur d'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil (6)**

S'obtenen 4.98 g (3.91 mmol, 98%) a partir de 5.00 g (3.99 mmol) del tetrasacàrid **4**.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.50 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.0$ , H-1A), 4.65 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), [5.15-4.85, 4.83-4.68, 4.49-3.83, 3.76-3.62 i 3.61-3.50 (m, 26 H, H-1C, H-1D, H-2A-D, H-3A-D, H-4A-D, H-5A-D, H-6aA-D, H-6bA-D)], 2.20-1.90 (13 s, 39 H, CH<sub>3</sub>CO).

## II.4. Reaccions de glicosidació per catàlisi per transferència de fase (PTC)

### II.4.1. Metodica general

S'addiciona una solució del bromur de glicosil (1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CHCl<sub>3</sub> (10 mL) a una altra solució del fenol corresponent (2 mmol) i bromur de benziltriethylamoni (0.85 mmol) en una solució 1.25 M de NaOH (2 mL), i s'escalfa a reflux amb agitació vigorosa i protegint el matràs de la llum amb paper d'alumini. Acabada la reacció, el cru es dilueix amb aigua (5 mL) i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CHCl<sub>3</sub> (20 mL) i se separen les fases. La fase aquosa s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL) i la combinació de totes les fases orgàniques es renta amb una solució 1.25 M de NaOH, es neutralitza amb una solució 1 N d'HCl, i es renta amb aigua. A continuació s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es purifica per cromatografia *flash* i, si és necessari, es recristal·litza.

La impuresa majoritària que s'obté en aquestes glicosidacions és el producte d'eliminació: en el cas del trisacàrid l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil-1,5-anhidro-D-*arabino*-hex-1-enitol (**25**), identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.57 (s, 1 H, H-1A), 5.36-5.03 (m, 4 H, H-3B, H-3C, H-4A, H-4C), 4.94 i 4.86 (dd, 2 H,  $J_{2,1} = 8.0$ ,  $J_{2,3} = 10.0$ , H-2B, H-2C), 4.65 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.55 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.58 (dd, 1 H,  $J_{5,6a} = 2.0$ ,  $J_{gem} = 12.0$ , H-5A), 4.41-4.02 (m, 7 H, H-3A, H-6aA-C, H6bA-C), 3.79 (dd, 1 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.0$ , H-4B), 3.73 i 3.70 (m, 2 H, H-5B, H-5C), 2.15-1.98 (10 s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

### II.4.2. Síntesi dels glicòsids 7-15, 31-35

**Fenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (7)**

S'obtenen 500 mg (0.50 mmol, 22%) a partir de 2.62 g (2.59 mmol) del bromur de glicosil **5**.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.29 (dd, 2 H,  $J_{3',2'} = 8.0$ ,  $J_{3',4'} = 7.5$ , H-3', H-5'), 7.06 (t, 1 H,  $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 7.5$ , H-4'), 6.95 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 8.0$ , H-2', H-6'), 5.26 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 8.0$ , H-3A), 5.05 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 10.0$ , H-1A), 4.59 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.47 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 5.15-4.82 i 4.42-3.62 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.14-1.98 (10 s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.7-168.8 (COCH<sub>3</sub>), 156.9 (C-1'), 129.5 (C-3'), 129.5 (C-5'), 123.2 (C-4'), 116.8 (C-6'), 116.8 (C-2'), 100.9, 100.8 (C-1B, C-1C), 99.1 (C-1A), 78.6, 76.2 (C-3A, C-4B), 72.8, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.0, 71.6, 71.1, 68.2, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.2, 62.0, 61.5 (C-6A-C), 20.9-20.4 (COCH<sub>3</sub>).

**3'-nitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (8)**

S'obtenen 1.20 g (1.15 mmol, 57%) a partir de 2.04 g (2.02 mmol) del bromur de glicosil **5**.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.95 (dd, 1 H,  $J_{4',5'} = 8.0$ ,  $J_{4',2'} = 3.0$ , H-4'), 7.83 (dd, 1 H,  $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 3.0$ , H-2'), 7.47 (dd, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ , H-5'), 7.30 (d, 1 H,  $J_{6',2'} = 3.0$ ,  $J_{6',5'} = 8.0$ , H-6'), 5.30 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 8.5$ , H-3A), 5.03 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.59 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 5.16-4.63 i 4.43-3.62 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.17-1.99 (10 s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.7-168.1 (COCH<sub>3</sub>), 157.0 (C-1'), 149.1 (C-3'), 130.2 (C-5'), 123.8 (C-6'), 118.1 (C-4'), 110.8 (C-2'), 101.0, 100.8 (C-1B, C-1C), 98.0 (C-1A), 78.6, 76.2 (C-3A, C-4B), 72.9, 72.8, 72.7, 72.6, 72.4, 72.2, 72.0, 71.6, 71.4, 71.1 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 68.2, 68.0, 67.7 (C-6A-C), 20.9-20.3 (COCH<sub>3</sub>).

**4'-metilumbel·liferil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (9)**

S'obtenen 3.31 g (3.06 mmol, 49%) a partir de 6.13 g (6.07 mmol) del bromur de glicosil **5** i de 2.41 g (12.24 mmol) de 4-metilumbel·liferona monohidratada.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.51 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-5'), 6.90-6.89 (m, 2 H, H-6', H-8'), 6.19 (q, 1 H,  $J_{3',Me} = 1.0$ , H-3'), 5.29 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 8.0$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ , H-2A), 5.16-4.99 (m, 5H, H-1A, H-3B, H-3C, H-4A, H-4C), 4.91 i 4.86 (dd, 2H,  $J_{2,1} = 8.0$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ , H-2B, H-2C), 4.60 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.48 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.43-4.03 (m, 6H, H-6aA-C, H-6bA-C), 3.95 (dd, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ , H-3A), 3.86 (m, 1H, H-5A), 3.79 (dd, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$ , H-4B), 3.67-3.58 (m, 2H, H-5B, H-5C), 2.40 (d, 3H,  $J_{Me,3'} = 1.0$ , Me), 2.20-1.90 (10s, 30H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.6-169.0 (COCH<sub>3</sub>), 160.7 (C-2'), 159.2 (C-7'), 154.8 i 152.1 (C-1a', C-4'), 125.7 (C-5'), 115.4 (C-4a'), 114.1 (C-6'), 113.1 (C-3'), 103.6 (C-8'), 101.0, 100.8, 98.3 (C-1A, C-1B, C-1C), 78.8 (C-3A), 76.2 (C-4B), 72.9, 72.8, 72.7, 72.5, 72.2, 72.0, 71.6, 71.1, 67.9, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.1, 62.0, 61.5 (C-6A-C), 20.8-20.3 (COCH<sub>3</sub>), 18.6 (Me).

**4'-nitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (10)**

S'obtenen 1.33 g (1.27 mmol, 62%) a partir de 2.06 g (2.04 mmol) del bromur de glicosil **5**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.20 (d, 2 H,  $J_{3',2'} = 10.0$ , H-3', H-5'), 7.04 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 10.0$ , H-2', H-6'), 5.29 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 8.0$ , H-3A), 5.09 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.60 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 5.17-4.63 i 4.35-3.60 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.16-1.99 (10 s, 30 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 170.4-168.1 ( $\text{COCH}_3$ ), 161.2 (C-1'), 143.2 (C-4'), 125.7 (C-3'), 125.7 (C-5'), 116.5 (C-2'), 116.5 (C-6'), 100.9, 100.8 (C-1B, C-1C), 98.0 (C-1A), 78.6, 76.2 (C-3A, C-4B), 72.9, 72.8, 72.7, 72.4, 72.1, 72.0, 71.6, 71.1, 67.9, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.1, 62.0, 61.5 (C-6A-C), 20.8-20.3 ( $\text{COCH}_3$ ).

**3',5'-dinitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (11)**

S'obtenen 1.19 g (1.09 mmol, 51%) a partir de 2.05 g (2.03 mmol) del bromur de glicosil **5**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.77 (dd, 1 H,  $J_{4',6'} = J_{4',2'} = 2.0$ , H-4'), 8.15 (d, 2 H,  $J_{2',4'} = J_{6',4'} = 2.0$ , H-2', H-6'), 5.33 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3A), 5.08 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 9.0$ , H-1A), 4.60 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 5.17-4.82 i 4.46-3.58 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.21-1.99 (10 s, 30 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 170.7-168.5 ( $\text{COCH}_3$ ), 157.3 (C-1'), 149.1 (C-3'), 149.1 (C-5'), 117.2 (C-2'), 117.2 (C-6'), 113.0 (C-4'), 100.8, 100.1 (C-1B, C-1C), 98.4 (C-1A), 78.5, 76.2 (C-3A, C-4B), 73.0, 72.8, 72.8, 72.6, 72.0, 71.9, 71.6, 71.0, 67.8, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.2, 62.1, 61.5 (C-6A-C), 20.9-20.2 ( $\text{COCH}_3$ ).

**3',4'-dinitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (12)**

S'obtenen 1.47 g (1.35 mmol, 67%) a partir de 2.04 g (2.02 mmol) del bromur de glicosil **5**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.99 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 10.0$ , H-5'), 7.36 (d, 1 H,  $J_{2',6'} = 3.5$ , H-2'), 7.23 (dd, 1 H,  $J_{6',2'} = 3.5$ ,  $J_{6',5'} = 9.0$ , H-6'), 5.09 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 9.0$ , H-1A), 4.59 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 9.0$ , H-1B), 4.47 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 9.0$ , H-1C), 5.17-4.83 i 4.36-3.62 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.17-1.99 (10 s, 30 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.5-168.7 (COCH<sub>3</sub>), 159.7 (C-1'), 145.0 (C-3'), 136.7 (C-4'), 127.1 (C-5'), 120.4 (C-6'), 112.2 (C-2'), 101.0, 100.8 (C-1B, C-1C), 98.0 (C-1A), 78.3, 76.2 (C-3A, C-4B), 72.9, 72.8, 72.7, 72.6, 72.0, 71.9, 71.7, 71.1, 67.8, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.1, 61.7, 61.5 (C-6A-C), 20.8-20.3 (COCH<sub>3</sub>).

**2',3'-dinitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (13)**

S'obtenen 0.71 g (0.65 mmol, 31%) a partir de 2.05 g (2.03 mmol) del bromur de glicosil **5**, després de recristal·lització d'EtOEt/hexà.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.99 (d, 1 H,  $J_{4',5'} = 8.0$ , H-4'), 7.71 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 8.0$ , H-6'), 7.62 (d, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ , H-5'), 5.26 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3A), 5.00 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 9.0$ , H-1A), 4.58 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.47 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 5.29-4.83 i 4.42-3.56 (m, 17 H, H-2A-C, H-3B, H-3C, H-4A-C, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 2.24-1.98 (10 s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.5-168.9 (COCH<sub>3</sub>), 148.6 (C-1'), 140.0 (C-3'), 137.2 (C-5'), 130.9 (C-2'), 126.4 (C-6'), 120.2 (C-4'), 101.0, 101.0 (C-1B, C-1C), 100.8 (C-1A), 78.2, 76.1 (C-3A, C-4B), 72.9, 72.7, 72.7, 72.7, 72.0, 71.6, 71.5, 71.0, 67.8, 67.7 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 62.1, 61.7, 61.5 (C-6A-C), 20.7-20.4 (COCH<sub>3</sub>).

**4'-metilumbel·liferil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (14)**

S'obtenen 1.79 g (1.31 mmol, 41%) a partir de 4.55 g (3.56 mmol) del bromur de glicosil **6** i de 1.34 g (7.38 mmol) de 4-metilumbel·liferona monohidratada.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.51 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-5'), 6.91-6.89 (m, 2 H, H-6', H-8'), 6.19 (q, 1 H,  $J_{3',Me} = 1.0$ , H-3'), 5.29 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 8.0$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ , H-2A), 5.20-5.00 (m, 6 H, H-1A, H-3B-D, H-4A, H-4D), 4.92- 4.80 (m, 3 H, H-2B-D), 4.59 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.47 (d, 2 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C-D), 4.45-4.00 (m, 8 H, H-6aA-D, H-6bA-D), 3.95 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ , H-3A), 3.85 (m, 1H, H-5A), 3.76 (dd, 2 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 8.5$ , H-4B, H-4C), 3.66-3.55 (m, 3 H, H-5B-D), 2.41 (d, 3 H,  $J_{Me,3'} = 1.0$ , Me), 2.15-1.96 (13 s, 39 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.6-168.8 (COCH<sub>3</sub>), 160.7 (C-2'), 159.2 (C-7'), 154.8 i 152.1 (C-1a', C-4'), 125.7 (C-5'), 115.4 (C-4a'), 114.1 (C-6'), 113.1 (C-3'), 103.6 (C-8'), 100.9, 100.8, 100.6, 98.3 (C-1A-D), 78.8 (C-3A), 76.3, 76.0 (C-4B, C-4C), 72.9, 72.7, 72.6, 72.5, 72.2, 71.7, 71.5, 71.3, 71.2, 70.0, 67.9, 67.7, 67.5 (C-2A-D, C-3B-D, C-4A, C-4D, C-5A-D), 62.1, 62.0, 61.8, 61.5 (C-6A-D), 20.8-20.3 (COCH<sub>3</sub>), 18.6 (Me).

**4'-nitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (15)**

S'obtenen 2.34 g (1.76 mmol, 55%) a partir de 4.08 g (3.20 mmol) del bromur de glucosil **6**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.20 (d, 2 H,  $J_{3',2'} = 9.5$ , H-3', H-5'), 7.04 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 9.5$ , H-2', H-6'), 5.29 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3A), 5.20-5.00 (m, 6 H, H-1A, H-3B-D, H-4A, H-4D), 4.59 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.46 (t, 2 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C-D), 4.93-4.80 i 4.38-3.96 (m, 12 H, H-2A-D, H-6aA-D, H-6bA-D), 3.85 (m, 1 H, H-5A), 3.76 (dd, 2 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 8.5$ , H-4B, H-4C), 3.66-3.54 (m, 3 H, H-5B-D), 2.15-1.96 (13 s, 39 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 170.5-168.7 ( $\text{COCH}_3$ ), 161.2 (C-1'), 143.2 (C-4'), 125.7 (C-3'), 125.7 (C-5'), 116.5 (C-2'), 116.5 (C-6'), 100.9, 100.8, 100.6 (C-1B-D), 98.0 (C-1A), 78.6 (C-3A), 76.2, 76.0 (C-4B, C-4C), 72.8, 72.7, 72.6, 72.4, 72.1, 72.0, 71.7, 71.5, 71.2, 71.1, 67.9, 67.7, 67.6 (C-2A-D, C-3B-D, C-4A, C-4D, C-5A-D), 62.1, 62.0, 61.8, 61.5 (C-6A-D), 20.8-20.3 ( $\text{COCH}_3$ ).

**4'-bromofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (31)**

S'obtenen 2.44 g (4.75 mmol, 30%) a partir de 6.58 g (16.00 mmol) del bromur de glucosil **29**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.40 (dd, 2 H,  $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 9.0$ , H-3', H-5'), 6.85 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 9.0$ , H-2', H-6'), 5.38-5.22 (m, 2 H, H-1, H-3), 5.16 (dd, 1 H,  $J_{4,5} = J_{4,3} = 9.0$ , H-4), 5.04 (d, 1 H,  $J_{2,1} = 8.0$ , H-2), 4.32 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.0$ ,  $J_{6a,5} = 5.5$ , H-6a), 4.16 (dd, 1 H,  $J_{6b,6a} = 12$ ,  $J_{6b,5} = 2.5$ , H-6b), 3.68 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 9.0$ ,  $J_{5,6a} = 5.5$ ,  $J_{5,6b} = 2.5$ , H-5), 2.10 (4 s, 12 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**3'-nitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (32)**

S'obtenen 1.64 g (3.49 mmol, 22%) a partir de 6.49 g (15.76 mmol) del bromur de glucosil **29**.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.96 (ddd, 1 H,  $J_{4',6'} = 1.0$ ,  $J_{4',2'} = 2.0$ ,  $J_{4',5'} = 8.0$ , H-4'), 7.87 (t, 1 H,  $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 2.0$ , H-2'), 7.47 (t, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ , H-5'), 7.32 (ddd, 1 H,  $J_{6',4'} = 1.0$ ,  $J_{6',2'} = 2.0$ ,  $J_{6',5'} = 8.0$ , H-6'), 5.42-5.26 (m, 2 H, H-1, H-3), 5.26-5.04 (m, 2 H, H-2, H-4), 4.28-4.14 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.02 (m, 1 H, H-5), 2.10 (4 s, 12 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**3',5'-dinitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (33)**

S'obtenen 1.20 g (3.47 mmol, 38%) a partir de 3.75 g (9.12 mmol) del bromur de glucosil **29**.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 8.78 (t, 1 H,  $J_{4',2'} = J_{4',6'} = 2.0$ , H-4'), 8.10 (d, 2 H,  $J_{2',4'} = J_{6',4'} = 2.0$ , H-2', H-6'), 5.40-5.28 (m, 3 H, H-1, H-3, H-4), 5.14 (m, 1 H, H-2), 4.26 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.5$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 4.19 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 6.5$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 4.03 (ddd, 1 H,  $J_{5,6a} = 6.5$ ,  $J_{5,6b} = 2.5$ , H-5), 2.10 (4 s, 12 H, CH<sub>3</sub>CO).

### 3',4'-dinitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (34)

S'obtenen 2.06 g (4.00 mmol, 48%) a partir de 3.42 g (8.32 mmol) del bromur de glucosil **29**, després de recristal·lització d'etanol del sòlid obtingut després del processat del cru de reacció.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 8.02 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.41 (d, 1 H,  $J_{2',6'} = 2.5$ , H-2'), 7.26 (dd, 1 H,  $J_{6',2'} = 2.5$ ,  $J_{6',5'} = 9.0$ , H-6'), 5.38-5.22 (m, 3 H, H-1, H-3, H-4), 5.15 (m, 1 H, H-2), 4.20 (d, 2 H,  $J_{6a,5} = J_{6b,5} = 4.0$ , H-6a, H-6b), 3.97 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 9.0$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 4.0$ , H-5), 2.10 (4 s, 12 H, CH<sub>3</sub>CO).

### 2',3'-dinitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (35)

S'obtenen 580 mg (1.13 mmol, 50%) a partir de 1.12 g (2.72 mmol) del bromur de glucosil **29**, després de recristal·lització d'acetona/hexà.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.98 (dd, 1 H,  $J_{4',6'} = 1.5$ ,  $J_{4',5'} = 8.0$ , H-4'), 7.76 (dd, 1 H,  $J_{6',4'} = 1.5$ ,  $J_{6',5'} = 8.0$ , H-6'), 7.64 (t, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ , H-5'), 5.32-5.06 (m, 4 H, H-1, H-2, H-3, H-4), 4.26 (d, 2 H,  $J_{6a,5} = J_{6b,5} = 3.5$ , H-6a, H-6b), 3.88 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 8.0$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 3.5$ , H-5), 2.10 (4 s, 12 H, CH<sub>3</sub>CO).

## II.5. Síntesi de 2',4'-dinitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (27)

### II.5.1. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (26)

Sobre una solució del trisacàrid per-*O*-acetilat **3** (6.00 g, 6.21 mmol) en DMF anhidra (25 mL) s'addiciona a t.a. acetat d'hidrazina (720 mg, 7.82 mmol) i es protegeix el sistema amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. S'escalfa a 50 °C durant 8 min i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, eliminant les darreres traces de DMF per codestil·lació amb toluè. El residu es dilueix amb AcOEt (200 mL) i es renta amb NaCl (aq., sat.) (2 x 200 mL). Els rentats aquosos combinats s'extreuen amb AcOEt (50 mL), i les fases orgàniques combinades s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid blanc s'asseca al buit i s'utilitza en el següent pas de reacció sense més purificació. Rendiment: 5.57 g (6.02 mmol, 97%).

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 5.51 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ , H-3A), 5.37 (d,  $J_{1,2} = 3.5$ , H-1A $\alpha$ ), 5.14 (d,  $J_{1,2} = 3.5$ , H-1A $\beta$ ), 4.63 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1B), 4.54 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1C), 5.26-3.64 (m, 17 H, H-2A-C, 3B, 3C, 4A-C, 5A-C, 6aA-C, 6bA-C), 2.14-1.99 (10 s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

### II.5.2. 2',4'-dinitrofenil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosid (27)

S'agita a t.a. una solució del trisacàrid **26** (5.18 g, 6.44 mmol) i DABCO (diazabicclo[2.2.2]octà) (2.53 g, 22.5 mmol) en DMF anhidra (75 mL), sota atmosfera d'Ar i en presència de tamisos moleculars de 4 Å en pols durant 3 h. Passat aquest temps, s'escalfa a 30 °C, s'addiciona 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè (1.59 g, 8.27 mmol) i s'agita el sistema, protegit de la llum amb paper d'alumini, durant 18 hores. Es filtra el cru sobre Celite, es renta el precipitat amb CHCl<sub>3</sub> (200 mL) i es destil·la a pressió reduïda el dissolvent de les fases orgàniques combinades, amb addicions de toluè per tal de codestil·lar les restes de DMF. El residu es redissol en CHCl<sub>3</sub> (200 mL) i es renta amb NaHCO<sub>3</sub> (aq., sat.) (3 x 200 mL) i aigua (2 x 200 mL). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut es purifica per cromatografia *flash* (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 3:2). S'obtenen 3.54 g (3.24 mmol, 50%) del producte d'interès, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 8.68 (d, 1 H,  $J_{3',5'} = 2.5$ , H-3'), 8.38 (dd, 1 H,  $J_{3',5'} = 2.5$ ,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-5'), 7.46 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-6'), 5.33 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.5$ , H-2A), 5.11 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.0$ , H-3C), 5.10 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.0$ , H-3B), 5.08 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.5$ , H-1A), 5.04 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ , H-4C), 5.01 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 8.0$ , H-4A), 4.88 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.5$ , H-2C), 4.83 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.0$ , H-2B), 4.58 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.46 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.42-3.65 (m, 12 H, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 3.96 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.0$ , H-3A), 3.77 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 8.0$ , H-4B), 2.20-1.96 (10s, 30 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.5-168.7 (COCH<sub>3</sub>), 153.4 (C-1'), 142.5 (C-4'), 140.7 (C-2'), 128.4 (C-5'), 121.2 (C-3'), 119.6 (C-6'), 101.0 (C-1B), 100.8 (C-1C), 99.8 (C-1A), 78.2 (C-3A), 76.2 (C-4B), 72.8 (C-5A, C-5C), 72.6 (C-3A, C-3B), 72.0 (C-5B), 71.6 (C-2C), 71.3 (C-2A), 67.8-67.7 (C-4A, C-4C), 62.1 (C-6B), 61.7 (C-6A), 61.5 (C-6C), 20.9-20.4 (COCH<sub>3</sub>).

## II.6. Reaccions de des-*O*-acetilació per transesterificació amb NaOMe/MeOH (transesterificació de Zemplen)

### II.6.1. Metodica general

A una suspensió del glicòsid en MeOH anhidre (30 mM) s'afegeix una solució 0.1 M de NaOMe en MeOH (Na (46 mg) dissolt en MeOH anhidre (20 mL)) de manera que la concentració final de NaOMe sigui de 25 mM. S'agita a temperatura ambient amb un tub de CaCl<sub>2</sub> i protegit de la llum. Si en finalitzar la reacció el producte d'interès ha precipitat, es filtra. En tot cas, la solució resultant es neutralitza amb Amberlite IR-120, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut es purifica per recristal·lització, si no s'indica el contrari.



## II.6.2. Síntesi dels glicòsids 16-20, 23, 24, 36-39

### Fenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (16)

S'obtenen 193 mg (0.33 mmol, 45%) a partir de 0.73 g (0.73 mmol) del glicòsid acetilat **7**, després de recristal·lització de MeOH/H<sub>2</sub>O.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 7.42 (dd, 2 H,  $J_{3',2'} = J_{3',4'} = 8.5$ , H-3', H-5'), 7.17 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 8.5$ , H-2', H-6'), 7.15 (t, 1 H,  $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8.5$ , H-4'), 5.17 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 10.0$ , H-1A), 4.84 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.04-3.30 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 159.4 (C-1'), 132.8 (C-3'), 132.8 (C-5'), 126.3 (C-4'), 119.5 (C-2'), 119.5 (C-6'), 105.4 (C-1B), 105.4 (C1-C), 102.8 (C1-A), 86.8 (C-3A), 81.4 (C-4B), 79.0-71.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.4, 63.3, 62.9 (C-6A-C).

A.E.: Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub>·2H<sub>2</sub>O: C (46.75%), H (6.54%). Determinat: C (46.29%), H (6.49%).

$[\alpha]_D^{20}$ : -32.52° (H<sub>2</sub>O, c = 0.0984).

p.f.: 235-250 °C.

### 3'-nitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (17)

S'obtenen 145 mg (0.18 mmol, 26%) a partir de 0.75 g (0.70 mmol) del glicòsid acetilat **8**, després de purificació per cromatografia de polsos de mitja pressió en fase reversa (RP-18) emprant l'eluent H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 1:0 $\rightarrow$ 9:1, i posterior recristal·lització de MeOH/H<sub>2</sub>O.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 7.95 (dd, 1 H,  $J_{4',5'} = 8.0$ ,  $J_{4',2'} = 3.0$ , H-4'), 7.83 (dd, 1 H,  $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 3.0$ , H-2'), 7.47 (t, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.0$ , H-5'), 7.30 (dd, 1 H,  $J_{6',2'} = 3.0$ ,  $J_{6',5'} = 8.0$ , H-6'), 5.25 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1A), 4.83 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.04-3.33 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 157.0 (C-1'), 149.1 (C-3'), 130.2 (C-5'), 123.8 (C-6'), 118.1 (C-4'), 110.8 (C-2'), 105.4 (C-1B), 105.4 (C1-C), 101.9 (C1-A), 86.7 (C-3A), 81.4 (C4-B), 79.0-70.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.4, 63.3, 62.9 (C-6A-C).

A.E.: Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>18</sub>·4H<sub>2</sub>O: C (41.34%), H (6.21%), N (2.01%). Determinat: C (41.34%), H (6.08%), N (1.94%).

$[\alpha]_D^{20}$ : -43.41° (H<sub>2</sub>O, c = 0.09675).

p.f.: 233-234 °C.

### 4'-metilumbel·liferil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (18)

S'obtenen 1.86 g (2.81 mmol, 93%) a partir de 3.28 g (3.03 mmol) del glicòsid acetilat **9**, després de la cristal·lització directa des del cru de reacció.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO+D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 7.75 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 8.5$ , H-5'), 7.14 (dd, 1 H,  $J_{6',5'} = 8.5$ ,  $J_{6',8'} = 2.5$ , H-6'), 7.10 (d, 1 H,  $J_{8',6'} = 2.5$ , H-8'), 6.26 (q, 1 H,  $J_{3',Me} = 1.5$ , H-3'), 5.23 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.0$ , H-1A), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.31 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 3.88-3.02 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C), 2.44 (d, 3 H,  $J_{Me,3'} = 1.0$ , Me).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  (ppm) = 160.0 (C-2'), 159.9 (C-7'), 154.4 (C-1a'), 153.3 (C-4'), 126.4 (C-5'), 114.2 (C-4a'), 113.4 (C-6'), 111.8 (C-3'), 103.5 (C-1B), 103.2 (C-1C), 103.2 (C-8'), 99.3 (C-1A), 87.2 (C-3A), 80.5 (C-4B), 76.8 (C-5C), 76.6 (C-5A), 76.5 (C-3C), 74.9 (C-5B), 74.4 (C-3B), 73.6 (C-2B), 73.3 (C-2C), 71.9 (C-2A), 70.0 (C-4C), 67.9 (C-4A), 61.0 (C-6C), 60.4 (C-6A), 60.4 (C-6B), 18.5 (Me).

**4'-nitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (19)**

S'obtenen 285 mg (0.45 mmol, 36%) a partir de 1.30 g (1.24 mmol) del glicòsid acetilat **10**, després de recristal·lització d'etanol/H<sub>2</sub>O.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 8.27 (d, 2 H,  $J_{3',2'} = 10.0$ , H-3', H-5'), 7.26 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 10.0$ , H-2', H-6'), 5.31 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.86 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.04-3.30 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 164.5 (C-1'), 145.5 (C-4'), 129.0 (C-3'), 129.0 (C-5'), 119.4 (C-2'), 119.4 (C-6'), 105.4 (C-1B), 105.4 (C1-C), 102.1 (C1-A), 86.5 (C-3A), 81.4 (C4-B), 79.0-70.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.4, 63.3, 62.9 (C-6A-C).

**A.E.:** Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub>·4H<sub>2</sub>O: C (41.34%), H (6.21%), N (2.01%).  
Determinat: C (40.92%), H (5.98%), N (1.95%).

**$[\alpha]_D^{20}$ :** -35.54° (H<sub>2</sub>O, c = 0.110).

**p.f.:** 187-189 °C.

**3',5'-dinitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (20)**

S'obtenen 400 mg (0.60 mmol, 66%) a partir de 1.0 g (0.92 mmol) del glicòsid acetilat **11**, després de recristal·lització de MeOH/H<sub>2</sub>O.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 8.82 (d, 1 H,  $J_{4',2'} = J_{4',6'} = 2.0$ , H-4'), 8.34 (d, 2 H,  $J_{2',4'} = J_{6',4'} = 2.0$ , H-2', H-6'), 5.38 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.85 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.06-3.30 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 160.2 (C-1'), 151.7 (C-3'), 151.7 (C-5'), 120.6 (C-2'), 120.6 (C-6'), 116.1 (C-4'), 105.5 (C-1B), 105.5 (C1-C), 102.9 (C1-A), 86.4 (C-3A), 81.5 (C4-B), 79.0-70.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.4, 63.3, 62.9 (C-6A-C).

**A.E.:** Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>·3H<sub>2</sub>O: C (39.78%), H (5.56%), N (3.87%).  
Determinat: C (39.34%), H (5.48%), N (3.63%).

**$[\alpha]_D^{20}$ :** -51.43° (H<sub>2</sub>O, c = 0.101).

**p.f.:** 163-165 °C.

**4'-metilumbel·liferil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (23)**

S'obtenen 1.01 g (1.23 mmol, 95%) a partir de 1.76 g (1.29 mmol) del glicòsid acetilat **14**, després de la cristal·lització directa des del cru de reacció.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.75 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.14 (dd, 1 H,  $J_{6',5'} = 9.0$ ,  $J_{6',8'} = 2.5$ , H-6'), 7.10 (d, 1 H,  $J_{8',6'} = 2.5$ , H-8'), 6.27 (q, 1 H,  $J_{3',\text{Me}} = 1.0$ , H-3'), 5.25 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.83 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.53 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.50 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.5$ , H-1D), 4.02-3.27 (m, 24 H, H-2A-D, H-3A-D, H-4A-D, H-5A-D, H-6<sub>a</sub>A-D, H-6<sub>b</sub>A-D), 2.45 (d, 3 H,  $J_{\text{Me},3'} = 1.0$ , Me).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 160.9 (C-2'), 160.2 (C-7'), 154.7 (C-1a'), 154.1 (C-4'), 127.0 (C-5'), 114.7 (C-4a'), 114.0 (C-6'), 112.2 (C-3'), 103.7 (C-1B), 103.7 (C-8'), 103.5 (C-1D), 103.1 (C-1C), 99.7 (C-1A), 86.9 (C-3A), 80.4 (C-4B), 80.4 (C-4C), 77.1, 76.9, 76.6, 75.4, 75.3, 75.0, 74.7, 73.8, 73.6, 73.3, 72.5 (C-2A-D, C-3B-D, C-5A-D), 70.3, 68.3 (C-4A, C-4D), 61.3, 60.8, 60.5, 60.5 (C-6A-D), 18.6 (Me).

**4'-nitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (24)**

S'obtenen 840 mg (1.07 mmol, 62%) a partir de 2.30 g (1.73 mmol) del glicòsid acetilat **15**, després de purificació per cromatografia de polsos de mitja pressió en fase reversa (RP-18), emprant l'eluent  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  4:1.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.29 (d, 2 H,  $J_{3',2'} = 9.0$ , H-3', H-5'), 7.26 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = 9.0$ , H-2', H-6'), 5.32 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.85 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.53 (t, 2 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C, H-1D), 4.03-3.29 (m, 24 H, H-2A-D, H-3A-D, H-4A-D, H-5A-D, H-6<sub>a</sub>A-D, H-6<sub>b</sub>A-D).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 164.6 (C-1'), 145.5 (C-4'), 129.1 (C-3'), 129.1 (C-5'), 119.4 (C-2'), 119.4 (C-6'), 105.4, 105.4, 105.2 (C1-B-D), 102.1 (C1-A), 86.5 (C-3A), 81.4 (C4-B), 81.3 (C-4C), 79.2-70.0 (C-2A-D, C-3B-D, C-4A, C-4D, C-5A-D), 63.4, 63.3, 62.9, 62.8 (C-6A-D).

**4'-bromofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid (36)**

S'obtenen 187 mg (0.54 mmol, 12%) a partir de 2.40 g (4.67 mmol) del glucòsid acetilat **31**, després de digestió en acetona.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.40 (d, 2 H,  $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 9.0$ , H-3', H-5'), 7.05 (d, 2 H,  $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 9.0$ , H-2', H-6'), 3.88 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.0$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 5.5$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.48-3.32 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5), el senyal del protó anomèric està tapat pel senyal del  $\text{D}_2\text{O}$ .

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 158.3 (C-1'), 133.3 (C-3'), 133.3 (C-5'), 119.8 (C-2'), 119.8 (C-6'), 115.5 (C-4'), 102.3 (C-1), 78.2 (C-5), 77.9 (C-3), 74.8 (C-2), 71.3 (C-4), 62.5 (C-6).

**3'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid (37)**

S'obtenen 416 mg (1.38 mmol, 41%) a partir de 1.60 g (3.40 mmol) del glucòsid acetilat **32**, després de digestió en èter diisopropílic.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.92 (m, 2 H, H-2', H-4'), 7.52 (m, 2 H, H-5', H-6'), 5.01 (dd, 1 H,  $J_{1,3} = 2.0$ ,  $J_{1,2} = 4.5$ , H-1), 3.91 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 2.0$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.71 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 5.5$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.58-3.44 (m, 3 H, H-2, H-3, H-5), 3.39 (m, 1 H, H-4).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 159.5 (C-1'), 150.5 (C-3'), 131.4 (C-5'), 124.1 (C-6'), 118.0 (C-4'), 112.8 (C-2'), 102.4 (C-1), 78.4 (C-5), 77.9 (C-3), 74.8 (C-2), 71.2 (C-4), 62.4 (C-6).

**3',5'-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid (38)**

S'obtenen 533 mg (1.54 mmol, 68%) a partir de 1.17 g (2.27 mmol) del glucòsid acetilat **33**, després de recristal·lització de MeOH/èter diisopropílic.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.66 (t, 1 H,  $J_{4',2'} = J_{4',6'} = 2.0$ , H-4'), 8.30 (d, 2 H,  $J_{2',4'} = J_{6',4'} = 2.0$ , H-2', H-6'), 5.15 (dd, 1 H,  $J_{1,3} = 1.0$ ,  $J_{1,2} = 4.0$ , H-1), 3.92 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.0$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 6.0$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.64-3.44 (m, 3 H, H-2, H-3, H-5), 3.37 (m, 1 H, H-4).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 159.9 (C-1'), 150.5 (C-3'), 150.5 (C-5'), 118.5 (C-4'), 113.0 (C-2'), 113.0 (C-6'), 102.6 (C-1), 78.7 (C-5), 77.7 (C-3), 74.7 (C-2), 71.2 (C-4), 62.4 (C-6).

**3',4'-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid (39)**

S'obtenen 755 mg (2.18 mmol, 55%) a partir de 2.06 g (3.94 mmol) del glucòsid acetilat **34**, després de recristal·lització de MeOH/èter diisopropílic. Una fracció (180 mg) del producte obtingut se sotmet a una purificació addicional emprant cromatografia de polsos de mitja pressió de fase reversa (RP-18), emprant l'eluent MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  desionitzada 4:6. La puresa de les fraccions aïllades es determina mitjançant HPLC (MeOH/tampó TAPS 30:70), amb detecció per absorbància a 280 nm. S'obtenen 40 mg de producte, que s'utilitza en les cinètiques enzimàtiques.

**$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.16 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.64 (d, 1 H,  $J_{2',6'} = 2.5$ , H-2'), 7.48 (dd, 1 H,  $J_{6',2'} = 2.5$ ,  $J_{6',5'} = 9.0$ , H-6'), 5.12 (dd, 1 H,  $J_{1,3} = 2.0$ ,  $J_{1,2} = 4.5$ , H-1), 3.91 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.0$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 6.0$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.58-3.34 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5).

**$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 162.7 (C-1'), 146.5 (C-3'), 137.2 (C-4'), 128.5 (C-5'), 120.9 (C-6'), 114.2 (C-2'), 102.0 (C-1), 78.6 (C-5), 77.7 (C-3), 74.6 (C-2), 71.1 (C-4), 62.4 (C-6).

## II.7. Des-*O*-acetilació amb clorur d'hidrogen en metanol

### II.7.1. Metodica general

A una solució del glicòsid en MeOH anhidre (20  $\mu$ M) s'addiciona HCl en MeOH (17.6% p/v), de manera que la concentració final d'HCl sigui de 3 M. S'agita a 4 °C, sota atmosfera d'Ar i protegit de la llum. Acabada la reacció, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es codestil·la amb acetona o EtOEt per tal d'eliminar les traces de clorur d'hidrogen. El producte obtingut es purifica per recristal·lització o bé per cromatografia.

### II.7.2. Síntesi dels glicòsids 21, 22, 28, 40

#### 3',4'-dinitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (21)

En aquest cas, el control de reacció es realitza per HPLC (gradient d'aigua (A)/metanol (B): 0'-3' (100% A), 3'-8' (100% A $\rightarrow$ 70% A), 8'-18' (70% A), 18'-23' (70% A $\rightarrow$ 0% A)), amb detecció per absorbància a 280 nm.

S'obtenen 0.49 g (0.72 mmol, 49%) a partir de 1.62 g (1.46 mmol) del glicòsid acetilat **12**, després de recristal·lització d'H<sub>2</sub>O i posterior purificació per cromatografia de gravetat, amb l'eluent AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O 30:4:1.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 8.21 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.68 (d, 1 H,  $J_{2',6'} = 2.5$ , H-2'), 7.51 (dd, 1 H,  $J_{6',2'} = 2.5$ ,  $J_{6',5'} = 9.0$ , H-6'), 5.34 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1A), 4.85 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.06-3.30 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 159.7 (C-1'), 145.0 (C-3'), 136.7 (C-4'), 127.1 (C-5'), 120.4 (C-6'), 112.2 (C-2'), 104.0 (C-1B), 104.0 (C1-C), 101.9 (C1-A), 86.7 (C-3A), 81.4 (C4-B), 79.0-70.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.7, 63.3, 61.9 (C-6A-C).

A.E.: Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>·3H<sub>2</sub>O: C (39.78%), H (5.56%), N (3.78%). Determinat: C (39.58%), H (5.09%), N (3.48%).

$[\alpha]_D^{20}$ : -36.79° (H<sub>2</sub>O, c = 0.09785).

p.f.: 180-185 °C.

#### 2',3'-dinitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (22)

S'obtenen 100 mg (0.15 mmol, 23%) a partir de 0.69 g (0.63 mmol) del glicòsid acetilat **13**, després de recristal·lització de MeOH i posterior purificació per cromatografia de polsos de mitja pressió en fase reversa (RP-18) emprant l'eluent H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 3:1.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 8.06 (dd, 1 H,  $J_{4',6'} = 1.0$ ,  $J_{4',5'} = 8.5$ , H-4'), 7.86 (dd, 1 H,  $J_{6',4'} = 1.0$ ,  $J_{6',5'} = 8.5$ , H-6'), 7.80 (d, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.5$ , H-5'), 5.29 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1A), 4.86 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.51 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.03-3.30 (m, 18 H, H-2A-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A-C, H-6<sub>a</sub>A-C, H-6<sub>b</sub>A-C).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 151.6 (C-1'), 142.7 (C-3'), 137.8 (C-5'), 135.2 (C-2'), 126.7 (C-6'), 122.4 (C-4'), 105.4 (C-1B), 105.4 (C1-C), 103.7 (C1-A), 86.1 (C-3A), 81.0 (C4-B), 79.0-70.0 (C-2A-C, C-3B, C-3C, C-4A, C-4C, C-5A-C), 63.4, 63.3, 62.9 (C-6A-C).

**A.E.:** Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>·H<sub>2</sub>O: C (41.87%), H (5.27%), N (4.07%).  
Determinat: C (41.43%), H (5.02%), N (4.13%).

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** -50.48° (H<sub>2</sub>O, c = 0.105).

**p.f.:** 169-171 °C.

### 2',4'-dinitrofenil O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranosid (28)

S'obtenen 701 mg (1.05 mmol, 33%) a partir de 3.49 g (3.20 mmol) del glicòsid acetilat **27**, després de purificació per cromatografia *flash* (càrrega seca) emprant com eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 6:1 $\rightarrow$ 4:3, i posterior recristal·lització de MeOH.

**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 8.77 (d, 1 H,  $J_{3',5'} = 3.0$ , H-3'), 8.42 (dd, 1 H,  $J_{3',5'} = 3.0$ ,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-5'), 7.50 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.5$ , H-6'), 5.32 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1A), 4.73 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.41 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 3.81 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3A), 3.90-3.53 (m, 15 H, H-2A, H-4A-B, H-5A-C, H-6aA-C, H-6bA-C), 3.41 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3C), 3.39 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ , H-3B), 3.33 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.0$ , H-4C), 3.32 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.0$ , H-2B), 3.22 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.0$ , H-2C).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 157.2 (C-1'), 144.4 (C-4'), 141.8 (C-2'), 132.7 (C-5'), 125.0 (C-3'), 120.6 (C-6'), 105.4 (C-1B-C), 102.9 (C-1A), 86.3 (C-3A), 81.5 (C-4B), 79.0 (C-4A), 78.9 (C-3B), 78.4 (C-3C), 77.7-77.0 (C-5A, C-5C), 76.1 (C-4C), 76.0 (C-2C), 75.2 (C-2A), 72.3 (C-2B), 70.4 (C-5B), 63.5 (C-6A), 63.2 (C-6C), 62.9 (C-6B).

**A.E.:** Calculat per a C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>·1/2H<sub>2</sub>O: C (42.40%), H (5.19%), N (4.12%).  
Determinat: C (42.41%), H (5.30%) N (4.01%).

### 2',3'-dinitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosid (40)

S'obtenen 150 mg (0.44 mmol, 40%) a partir de 560 mg (1.09 mmol) del glicòsid acetilat **35**, després de purificació per cromatografia de polsos de mitja pressió en fase reversa (RP-18) emprant l'eluent H<sub>2</sub>O/MeOH 4:1. En aquest cas, el control de reacció es realitza per HPLC (MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60), amb detecció per absorbància a 200 nm.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 7.91 (dd, 1 H,  $J_{4',5'} = 8.5$ ,  $J_{4',6'} = 1.0$ , H-4'), 7.84 (dd, 1 H,  $J_{6',5'} = 8.5$ ,  $J_{6',4'} = 1.0$ , H-6'), 7.72 (t, 1 H,  $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 8.5$ , H-5'), 5.15 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$ , H-1), 3.90 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.5$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 6.0$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.58-3.36 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 150.9 (C-1'), 142.0 (C-3'), 136.6 (C-5'), 132.8 (C-2'), 124.4 (C-4'), 119.2 (C-6'), 102.6 (C-1), 78.6 (C-5), 78.0 (C-3), 74.5 (C-2), 71.0 (C-4), 62.4 (C-6).

## II.8. Síntesi del 2',4'-dinitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosid (41)

A una solució de glucosa (2 g, 9.08 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (2 g, 23.8 mmol) en aigua (20 mL) se li afegeix una solució de FDNB (4 g, 22.16 mmol) en etanol (40 mL). S'agita el cru durant 12 hores a temperatura ambient i protegit de la llum. S'atura la reacció portant el cru a pH neutre amb Amberlite IR-120, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El producte obtingut es purifica per cromatografia *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1→7:1→2:1), i posteriorment es recristalitza d'acetona. S'obtenen 285 mg del producte d'interès **41** (0.82 mmol, 9%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 8.72 (d, 1 H,  $J_{3',5'} = 3.0$ , H-3'), 8.45 (dd, 1 H,  $J_{5',3'} = 3.0$ ,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.62 (d, 1 H,  $J_{6',5'} = 9.0$ , H-6'), 5.23 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 7.5$ , H-1), 3.90 (dd, 1 H,  $J_{6a,5} = 2.0$ ,  $J_{6a,6b} = 12.0$ , H-6a), 3.70 (dd, 1 H,  $J_{6b,5} = 6.0$ ,  $J_{6b,6a} = 12.0$ , H-6b), 3.60-3.36 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 155.8 (C-1'), 142.6 (C-4'), 141.0 (C-5'), 129.7 (C-2'), 122.1 (C-3'), 118.9 (C-6'), 102.1 (C-1), 78.7 (C-5), 77.9 (C-3), 74.5 (C-2), 70.9 (C-4), 62.3 (C-6).

## II.9. Síntesi de glicals acetilats

### II.9.1. Síntesi de glicals seguint el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich

#### II.9.1.1. Metòdica general

L'activació del Zn es fa mitjançant successius rentats del Zn emprant HCl 10%, solució 1 M de CuSO<sub>4</sub>, aigua, acetona i EtOEt (20 mL cadascun), i es deixa assecat a l'aire.

Sota una atmosfera d'Ar, es prepara una suspensió de Zn en pols (6 equivalents, nivell 1X) i NaAcO·3H<sub>2</sub>O (5 equivalents) en AcOH glacial (0.7 mL), aigua (1 mL) i solució 1 M de CuSO<sub>4</sub> (0.161 mL, nivell 1X). Es refreda a -20 °C en un bany de sal/gel i s'addiciona lentament, durant 1 h, una solució del bromur de glicosil corresponent (1 mmol) en AcOH glacial (7.5 mL). Seguidament s'agita durant 3 h deixant assolir la temperatura escollida, i passat aquest temps, es filtra la suspensió sobre Celite i es renta el sòlid amb una solució al 50% de AcOH (15 mL). Els filtrats combinats es dilueixen amb aigua (10 mL) i s'extreuen amb CHCl<sub>3</sub> (4 x 5 mL). Les fases orgàniques es renten amb NaHCO<sub>3</sub> (aq., sat.) (10 mL) fins neutralitat, amb aigua (10 mL), s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per cromatografia de polsos de mitja pressió (eluent AcOEt/Cy) i s'identifica el producte d'interès a partir de les seves dades espectroscòpiques.

En les experiències realitzades per al disseny factorial i el disseny de Doehlert, amb la finalitat d'optimitzar les condicions de reacció, es varien sistemàticament la concentració de Cu(II), la de Zn, la temperatura de reacció i el rentat previ del Zn amb una solució 1 M de CuSO<sub>4</sub>. Una vegada processat el cru de reacció, s'afegeix una quantitat coneguda de DMSO (0.05 g aproximadament, prèviament destil·lat de CaCl<sub>2</sub>) a una petita fracció (0.4 g aproximadament) del sòlid obtingut, i s'enregistra l'espectre

de  $^1\text{H}$ -RMN. La relació entre la integral del senyal del protó H-1A del glical i la del senyal corresponent al DMSO a 2.61 ppm permet quantificar la massa de glical present en la mostra, i a través de la massa del residu obtingut després del processament del cru de reacció, es determina la massa de glical formada i el rendiment de la reacció.

II.9.1.2. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-*D*-arabino-hex-1-enitol (51)

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.42 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.5$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1A), 5.43 (dd, 1 H,  $J_{3,1} = 1.0$ ,  $J_{3,2} = 3.0$ , H-3A), 5.23-4.94 (m, 4 H, H-2B, H-3B, H-4A, H-4B), 4.83 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.5$ ,  $J_{2,3} = 3.0$ , H-2A), 4.71 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.90-3.77 (m, 6 H, H-5A, H-5B, H-6aA, H-6aB, H-6bA, H-6bB), 2.13-2.00 (6 s, 18 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).



**Taula II.1.** Efecte sobre el % de glicial **51** en el cru de reacció, de variar sistemàticament els paràmetres [Zn], [Cu(II)] (com a múltiples de la concentració especificada a la metòdica), rentat el Zn abans de la reacció i temperatura, seguint la metòdica de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich. S'inclouen el pes de DMSO i el del cru de reacció emprats en l'enregistrament de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN, així com les àrees relatives del protó H-1A del cel·lobial acetilat **51** respecte del senyal del DMSO afegit com a referència interna.

Reacció	[Zn]	[Cu(II)]	Rentat del Zn	T / °C	DMSO / g	Cru reacció / g	Integrals relatives H-1A/DMSO	Glicial en el cru / % massa
1	1X	1X	No	25	0.0508	0.4969	0.85/13.83	27.0
2	2X	1X	No	25	0.0675	0.4575	1.64/17.80	58.6
3	1X	2X	No	25	0.0531	0.4378	1.39/15.10	48.0
4	1X	1X	Sí	25	0.0552	0.5603	1.87/12.65	62.7
5	2X	1X	Sí	25	0.0477	0.4580	2.08/13.77	67.7
6	1X	2X	Sí	25	0.0573	0.3548	1.40/18.20	53.5
7	2X	2X	No	25	0.0558	0.4559	1.73/15.09	60.4
8	2X	2X	Sí	25	0.0553	0.4663	2.03/14.40	71.9
9	1X	1X	No	0	0.0328	0.4449	0.60/10.27	18.5
10	2X	2X	Sí	0	0.0461	0.4472	1.08/13.43	35.7
11	2X	1X	Sí	0	0.0392	0.4278	1.38/12.14	44.8
12	1X	2X	No	0	0.0371	0.4454	0.48/10.72	17.7
13	2X	1X	No	0	0.0223	0.3319	0.59/8.98	19.0
14	2X	2X	No	0	0.0490	0.4927	1.03/13.49	32.7
15	1X	1X	Sí	0	0.0483	0.4235	0.89/15.04	29.1
16	1X	2X	Sí	0	0.0503	0.5402	1.47/12.15	48.5
17	4X	4X	Sí	0	0.0317	0.4544	1.79/8.73	61.6
18	3X	3X	Sí	10	0.0335	0.4626	1.93/9.32	64.6
19	5X	5X	Sí	10	0.0188	0.3402	1.91/7.34	61.9
20	2X	2X	Sí	10	0.0305	0.5334	1.96/7.50	64.3
21	4X	4X	Sí	20	0.0143	0.3066	2.02/6.03	67.3
22	2X	2X	Sí	20	0.0286	0.5096	1.93/7.33	63.7
23	3X	3X	Sí	30	0.0396	0.4008	2.03/12.19	70.8
24	5X	5X	Sí	30	0.0206	0.4837	2.06/5.92	63.8
25	2X	2X	Sí	30	0.0325	0.4445	2.14/9.39	71.7
26	4X	4X	Sí	40	0.0159	0.2255	1.68/9.21	55.3
27	2X	2X	Sí	40	0.0486	0.4152	1.63/15.86	51.8
28	3X	3X	Sí	50	0.0182	0.2794	0.96/8.39	32.1

**Taula II.2.** Condicions dels quatre paràmetres en les reaccions emprades en el disseny factorial per a l'estudi de la reacció de síntesi de cel·lobial acetilat **51**, aplicant el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich. S'indica la massa del bromur de partida, la massa del cru de reacció i el % en massa de cel·lobial acetilat en el cru. Les concentracions de Zn i Cu(II) s'expressen com a múltiple de les concentracions especificades a la metòdica.

Reacció	[Zn]	[Cu(II)]	Rentat del Zn	T / °C	Massa bromur / g	Massa cru / g	Cel·lobial <b>51</b> en el cru / %	Rendiment / %
1	1X	1X	No	25	1.479	1.150	27.0	26.5
2	2X	1X	No	25	1.393	1.018	58.6	53.6
3	1X	2X	No	25	1.371	0.971	48.0	42.4
4	1X	1X	Sí	25	1.605	1.122	62.7	54.8
5	2X	1X	Sí	25	1.386	1.031	67.7	61.0
6	1X	2X	Sí	25	1.416	1.026	53.5	48.3
7	2X	2X	No	25	1.338	0.941	60.4	51.9
8	2X	2X	Sí	25	1.265	1.018	71.9	72.2
9	1X	1X	No	0	1.540	1.236	18.5	18.5
10	2X	2X	Sí	0	1.347	1.167	35.7	38.6
11	2X	1X	Sí	0	1.391	1.095	44.8	44.0
12	1X	2X	No	0	1.447	0.872	17.7	13.4
13	2X	1X	No	0	1.369	0.845	19.0	14.6
14	2X	2X	No	0	1.391	1.137	32.7	33.4
15	1X	1X	Sí	0	1.355	1.138	29.1	30.5
16	1X	2X	Sí	0	1.372	1.123	48.5	49.5

**Taula II.3.** Condicions dels quatre paràmetres en les reaccions emprades en l'optimització de Doehlert de la reacció de síntesi de cel·lobial acetilat **51** aplicant el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich. S'indica la massa del bromur de partida, la massa del cru de reacció i el % en massa de cel·lobial acetilat en el cru. Les concentracions de Zn i Cu(II) s'expressen com a múltiple de les concentracions especificades a la metòdica.

Reacció	[Zn]	[Cu(II)]	Rentat del Zn	T / °C	Massa bromur / g	Massa cru / g	Cel·lobial <b>51</b> en el cru / %	Rendiment / %
Primer hexàgon								
18	3X	3X	Sí	10	1.441	1.062	64.6	59.4
21	4X	4X	Sí	20	1.338	1.017	67.3	63.8
22	2X	2X	Sí	20	1.350	1.054	63.7	62.1
23	3X	3X	Sí	30	1.431	1.144	70.8	70.6
26	4X	4X	Sí	40	1.400	0.913	55.3	45.1
27	2X	2X	Sí	40	1.314	0.975	51.8	47.9
28	3X	3X	Sí	50	1.402	0.884	32.1	25.3
Segon hexàgon								
17	4X	4X	Sí	0	1.266	1.020	61.6	61.9
19	5X	5X	Sí	10	1.478	1.189	61.9	62.1
18	3X	3X	Sí	10	1.441	1.062	64.6	59.4
21	4X	4X	Sí	20	1.338	1.017	67.3	63.8
24	5X	5X	Sí	30	1.406	1.073	63.8	60.8
23	3X	3X	Sí	30	1.431	1.144	66.9	66.7
26	4X	4X	Sí	40	1.400	0.913	55.4	45.1

II.9.1.3. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-*D*-arabino-hex-1-enitol (**53**)

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.46 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.5$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1A), 5.25-4.94 (m, 5 H, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B), 4.83 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.5$ ,  $J_{2,3} = 3.0$ , H-2A), 4.71 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.90-3.77 (m, 6 H, H-5A, H-5B, H-6aA, H-6aB, H-6bA, H-6bB), 2.13-2.00 (6 s, 18 H, CH<sub>3</sub>CO).

**Taula II.4.** Efecte sobre el % de glicial **53** en el cru de reacció de variar sistemàticament els paràmetres [Zn], [Cu(II)] (com a múltiples de la concentració especificada a la metòdica), rentat el Zn abans de la reacció i temperatura, seguint la metòdica de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich. S'inclouen el pes de DMSO i el del cru de reacció emprats en l'enregistrament de l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN, així com les àrees relatives del protó H-1A del laminaribial acetilat **53** respecte del senyal del DMSO afegit com a referència interna.

Reacció	[Zn]	[Cu(II)]	Rentat del Zn	T / °C	DMSO / g	Cru reacció / g	Integrals relatives H-1A/DMSO	Glicial en el cru / % massa
1	3X	3X	Sí	10	0.0091	0.0898	0	No detectat
2	4X	4X	Sí	20	0.0206	0.1276	0.73/19.71	25.4
3	2X	2X	Sí	20	0.0090	0.1193	0.81/9.98	26.4
4	3X	3X	Sí	30	0.0100	0.0597	0.79/19.93	28.6
5	4X	4X	Sí	40	0.0101	0.1715	0.73/7.96	23.3
6	2X	2X	Sí	40	0.0106	0.1674	0.83/8.41	26.9
7	3X	3X	Sí	50	0.0111	0.1492	1.28/10.15	40.4

**Taula II.5.** Condicions dels quatre paràmetres en les reaccions emprades en l'optimització de Doehlert de la reacció de síntesi de laminaribial acetilat **53** aplicant el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich. S'indica la massa del bromur de partida, la massa del cru de reacció i el % en massa de cel·lobial acetilat en el cru. Les concentracions de Zn i Cu(II) s'expressen com a múltiple de les concentracions especificades a la metòdica.

Reacció	[Zn]	[Cu(II)]	Rentat del Zn	T / °C	Massa bromur / g	Massa cru / g	laminaribial <b>53</b> en el cru / %	Rendiment / %
1	3X	3X	Sí	10	0.1442	0.0925	No detectat	0
2	4X	4X	Sí	20	0.1905	0.1276	25.4	21.3
3	2X	2X	Sí	20	0.1863	0.1193	26.4	21.1
4	3X	3X	Sí	30	0.1219	0.0967	28.6	28.3
5	4X	4X	Sí	40	0.1863	0.1193	23.3	21.1
6	2X	2X	Sí	40	0.2125	0.1532	26.9	24.2
7	3X	3X	Sí	50	0.2143	0.1494	40.4	35.1

II.9.1.4. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-*D*-arabino-hex-1-enitol (42)

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.45 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.5$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1A), 4.83 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.5$ ,  $J_{2,3} = 3.0$ , H-2A), 5.25-4.87 i 4.40-4.00 (m, 14 H, H-2B, H-2C, H-3A-C, H-4A, H-4C, H-5A, H-6aA-C, H-6bA-C), 4.66 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.51 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 3.78 (dd, 1 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$ , H-4B), 3.70-3.60 (m, 2 H, H-5B, H-5C), 2.13-2.00 (9 s, 27 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 170.5-169.0 ( $\text{COCH}_3$ ), 145.1 (C-1A), 100.8 (C-1B), 100.0 (C-1C), 97.3 (C-2A), 76.3, 73.9, 73.0, 72.8, 72.5, 72.0, 71.6, 71.5, 69.9, 67.9, 67.7 (C-2B, C-2C, C-3A-C, C-4A-C, C-5A-C), 61.7, 61.6, 61.5 (C-6A-C), 20.9-20.5 ( $\text{COCH}_3$ ).

**Taula II.6.** S'indica el pes del bromur de partida **5**, així com el del glicol **42** obtingut a cada temperatura, i el rendiment corresponent. S'aplica el mètode de Fischer i Zach amb la modificació de Helferich i amb la concentració de Zn modificada (nivell 3X).

Temperatura / °C	(G4G3G-Br) <sub>Ac</sub>	(G4G3G') <sub>Ac</sub>	Rendiment / %
25	86 mg (0.087 mmol)	16 mg (0.019 mmol)	22
35	100 mg (0.101 mmol)	25 mg (0.029 mmol)	29
50	94 mg (0.095 mmol)	29 mg (0.034 mmol)	36
60	185 mg (0.187 mmol)	53 mg (0.063 mmol)	34
70	169 mg (0.171 mmol)	36 mg (0.043 mmol)	25

## II.9.2. Síntesi de glicals per reducció electroquímica

### II.9.2.1. *3,4,6*-tri-*O*-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-*D*-arabino-hex-1-enitol (43)

Es dissol  $\alpha$ -acetobromoglucosa comercial en AcOEt i s'aboca sobre aigua/gel (100 mL). Es filtra el producte precipitat i es redissol en  $\text{CHCl}_3$ . S'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit. Emprant un sistema amb un ànode de grafit, càtode de Pb i Ag/Ag<sup>+</sup> com a electrode de referència, se sotmet una solució 0.1 M de TBABF<sub>4</sub> en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidre (70 mL) a un potencial constant de -1.55 V fins observar una intensitat constant propera a 0, i després es fa el mateix a un potencial de -1.35 V. A continuació s'afegeix  $\alpha$ -acetobromoglucosa **29** (1.25 g, 3.0 mmol) i es duu a terme la reacció a potencial constant -1.35 V. La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/Cy 1:3). Un cop finalitzada la reacció, s'aboca el cru sobre 1.5 L d'aigua, i s'extreu amb èter diisopropílic (4 x 350 mL). La fase orgànica s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut es purifica per cromatografia *flash* (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt/Cy 1:5), s'obtenen 0.53 g de producte d'interès (1.9 mmol, 65%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.48 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.0$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1), 5.35 (ddd, 1 H,  $J_{3,4} = 5.5$ ,  $J_{3,2} = 3.0$ ,  $J_{3,1} = 1.0$ , H-3), 5.23 (dd, 1 H,  $J_{4,5} = 7.5$ ,  $J_{4,3} = 5.5$ , H-4), 4.86 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.0$ ,  $J_{2,3} = 3.0$ , H-2), 4.41 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.0$ ,  $J_{6a,5} = 5.5$ , H-6a), 4.26 (dd, 1 H,  $J_{5,4} = 7.5$ ,  $J_{5,6a} = 5.5$ ,  $J_{5,6b} = 3.0$ , H-5), 4.21 (dd, 1 H,  $J_{6b,6a} = 12.0$ ,  $J_{6b,5} = 3.0$ , H-6b), 2.10-2.05 (3 s, 9 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

II.9.2.2. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-*D*-arabino-hex-1-enitol (42)

Emprant un sistema amb un ànode de grafit, càtode de Pb i Ag/Ag<sup>+</sup> com a elèctrode de referència, se sotmet una solució de TBABF<sub>4</sub> 0.1 M en CH<sub>3</sub>CN anhidre (60 mL) a un potencial constant de -1.65 V fins observar una intensitat constant propera a 0, i després es fa el mateix a un potencial de -1.45 V. A continuació s'afegeix el bromur **5** (200 mg, 0.20 mmol) dissolt en solució d'electròlit (0.1 M TBABF<sub>4</sub> en CH<sub>3</sub>CN) (10 mL) i dos equivalents de AcOH glacial (23.2  $\mu$ L) i es duu a terme la reacció a potencial constant -1.45 V. La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/Cy 2:1). Un cop finalitzada la reacció es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El cru s'extreu amb EtOEt en un Soxhlet fent servir com a fluid refrigerant una mescla d'alcohol isopropílic i CO<sub>2</sub>. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es purifica el sòlid obtingut per cromatografia *flash* (càrrega en CHCl<sub>3</sub>, eluent: AcOEt/Cy 1:2 $\rightarrow$ 1:1 $\rightarrow$ 2:1), s'obtenen 76 mg de producte d'interès (90  $\mu$ mol, 44%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

### II.9.3. Síntesi de glicals per glicosidació entre el glucal **44** i els donadors **46** i **48**

#### II.9.3.1. Síntesi del 4,6-di-*O*-acetil-*D*-glucal (44)

Una suspensió de 3,4,6-tri-*O*-acetil-*D*-glucal (**43**) (1.502 g, 5.52 mmol) i lipasa PS "Amano" (1.500 g) en tampó 0.25 M fosfat, pH 7.0 (15 mL) s'agita a temperatura ambient durant 4 hores. El cru es filtra al buit per tal d'eliminar l'enzim insoluble; l'enzim dissolt se separa amb una unitat Centriprep, centrifugant a 4200 rpm i 4 °C durant 90 minuts, l'enzim queda en el retintut. Tant el filtrat com el retintut s'extreuen amb CHCl<sub>3</sub> (4 x 50 mL i 4 x 15 mL, respectivament), formant-se una emulsió durant l'extracció de la fracció que conté l'enzim. Les fases orgàniques combinades s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i es concentren per destil·lació a pressió reduïda. El concentrat es purifica per cromatografia *flash* (Cy:AcOEt 4:1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 5:2). S'obtenen 1.096 g del producte d'interès **44** (4.76 mmol, 86%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.40 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.0$ ,  $J_{1,3} = 1.5$ , H-1), 4.99 (dd, 1 H,  $J_{4,5} = 9.0$ ,  $J_{4,3} = 6.0$ , H-4), 4.87 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.0$ ,  $J_{2,3} = 3.0$ , H-2), 4.41 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.0$ ,  $J_{6a,5} = 5.5$ , H-6a), 4.30 (ddd, 1 H,  $J_{3,4} = 6.0$ ,  $J_{3,2} = 3.0$ ,  $J_{3,1} = 1.5$ , H-3), 4.24 (dd, 1 H,  $J_{6b,6a} = 12.0$ ,  $J_{6b,5} = 2.5$ , H-6b), 4.14 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 9.0$ ,  $J_{5,6a} = 5.5$ ,  $J_{5,6b} = 2.5$ , H-5), 3.69 (sa, 1 H, OH), 2.14-2.10 (2 s, 6 H, CH<sub>3</sub>CO).

#### II.9.3.2. Síntesi del donador glicosídic **48**

##### *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-acetil-*D*-glucopiranosil (47)

Se suspèn octaacetat de cel·lobiosa (**45**) (2.28 g, 3.36 mmol) i acetat d'hidrazina (484 mg, 5.26 mmol) en DMF anhidra (10 mL). S'agita la suspensió a 55 °C en un sistema

equipat amb un refrigerant de reflux i protegit amb tub de CaCl<sub>2</sub> durant 30 minuts, fins la dissolució total del sòlid. El cru es deixa reposar durant 10 minuts a temperatura ambient, es dilueix amb AcOEt (100 mL) i es renta amb NaCl (aq., sat.) (2 x 100 mL). La fase aquosa es dilueix amb aigua fins redissoldre la sal precipitada i s'extreu amb AcOEt (50 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, co-destil·lant les restes de DMF amb toluè. El sòlid obtingut (2.26 g) es recristal·litza d'etanol, obtenint-se 1.70 g del producte d'interès **47** (2.67 mmol, 79%), identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5.51 (dd, 0.72 H, J<sub>a</sub> = J<sub>b</sub> = 10.0), 5.38 (dd, 0.72 H, J<sub>1eq,OH</sub> = J<sub>1eq,2</sub> = 3.5, H-1Aeq), 5.23 (dd, 0.28 H, J<sub>c</sub> = J<sub>d</sub> = 9.0), 5.19-5.04 (m, 2 H), 4.94 (m, 1 H), 4.82 (m, 1 H), 4.72 (dd, 0.28 H, J<sub>1,OH</sub> = J<sub>1,2</sub> = 8.0, H-1Aax), 4.54 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 8.0, H-1B), 4.52 (m, 1 H), 4.38 (dd, 1 H, J<sub>6a,6b</sub> = 12.5, J<sub>6a,5</sub> = 4.5, H-6a), 4.20-4.02 (m, 2.72 H), 3.80-3.65 (m, 2.28 H), 3.56 (d, 0.28 H, J<sub>OH,1ax</sub> = 8.0, OH<sub>eq</sub>), 3.16 (d, 0.72 H, J<sub>OH,1eq</sub> = 3.5, OH<sub>ax</sub>), 2.14-1.99 (7 s, 21 H, CH<sub>3</sub>CO).

*Tricloroacetimidat d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil (48)*

Es dissol *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetil-D-glucopiranosil (**47**) (2.89 g, 4.54 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (25 mL), i s'addicionen Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (296 mg, 0.91 mmol) i Cl<sub>3</sub>CCN (2.62 g, 18.14 mmol). S'agita la mescla en un sistema protegit amb tub de CaCl<sub>2</sub> durant 1 hora i 30 minuts. Es filtra la sal i es destil·la el filtrat a pressió reduïda, obtenint-se 3.607 g d'un sòlid que es purifica per cromatografia *flash* (càrrega seca, eluent: Cy/AcOEt 3:2). S'obtenen 3.00 g (3.84 mmol, 85%) de producte d'interès **48**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques (Urban *et al.*, 1990).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8.66 (s, 1 H, NH), 6.49 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.5, H-1A), 5.53 (dd, 1 H, J<sub>a</sub> = J<sub>b</sub> = 10.0), 5.18-5.05 (m, 3 H), 4.94 (dd, 1 H, J<sub>c</sub> = 9.0, J<sub>d</sub> = 8.0), 4.56-4.50 (m, 2 H), 4.39 (dd, 1 H, J<sub>6a,6b</sub> = 12.5, J<sub>6a,5</sub> = 4.5, H-6a), 4.16-4.03 (m, 3 H), 3.85 (dd, 1 H, J<sub>e</sub> = J<sub>f</sub> = 9.5), 3.66 (m, 1 H), 2.12-1.99 (7 s, 21 H, CH<sub>3</sub>CO).

### II.9.3.3. *Intent de glicosidació del donador 48 amb el glucal 44*

Sobre una solució a -20 °C de l'acceptor **44** (126 mg, 547 μmol) i del donador **48** (470 mg, 602 μmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (5 mL) amb tamisos moleculars de 4 Å en pols (500 mg), i sota atmosfera de N<sub>2</sub>, s'addiciona una solució (1 mL) de triflat de trimetilsilil (0.2 mL, 55 μmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (20 mL). El cru de reacció adquireix un color marró, passant pel groc. Després d'una hora d'agitació a -20 °C, la reacció s'atura addicionant trietilamina (1 mL). S'agita durant 5 minuts més, es filtra el cru sobre Celite, es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit el residu obtingut. Els 666 mg de sòlid marró obtinguts es purifiquen per cromatografia *flash* (càrrega en CHCl<sub>3</sub>, eluent Cy/AcOEt 5:2 →7:12). S'obtenen 49 mg (58 μmol, 11%) de producte **49**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques. L'assignació completa dels senyals s'aconsegueix amb l'ajut dels espectres COSY i HETCOR del producte.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 5.98 (dd, 1 H,  $J_a = 11.0$ ,  $J_b < 1.0$ , H-2A), 5.84 (ddd, 1 H,  $J_{3,2} = 10.0$ ,  $J_c = 2.5$ ,  $J_d = 2.0$ , H-3A), 5.47 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = 10.0$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ , H-3B), 5.37 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.0$ , H-1B), 5.31-5.26 (m, 2 H, H-1A, H-4A), 5.15-5.08 (m, 2 H, H-3C, H-4C), 4.95 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.0$ ,  $J_{2,1} = 8.0$ , H-2C), 4.92 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 10.0$ ,  $J_{2,1} = 4.0$ , H-2B), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.47 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.0$ ,  $J_{6a,5} = 2.0$ , H-6Ba), 4.38 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.5$ ,  $J_{6a,5} = 4.0$ , H-6Ca), 4.23 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.5$ ,  $J_{6a,5} = 6.5$ , H-6Aa), 4.13 (dd, 1 H,  $J_{6b,6a} = 12.0$ ,  $J_{6b,5} = 5.0$ , H-6Bb), 4.11-4.03 (m, 3 H, H-5A, H-6Ab, H-6Cb), 3.94 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 9.5$ ,  $J_{5,6b} = 5.0$ ,  $J_{5,6a} = 2.0$ , H-5B), 3.74 (dd, 1 H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$ , H-4B), 3.66 (ddd, 1 H,  $J_{5,4} = 10.0$ ,  $J_{5,6a} = 4.0$ ,  $J_{5,6b} = 2.0$ , H-5C), 2.13-1.99 (9 s, 27 H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 170.8-169.0 (CH<sub>3</sub>C=O), 129.9 (C-2A), 126.6 (C-3A), 100.8 (C-1C), 91.5 (C-1A), 89.5 (C-1B), 76.7 (C-4B), 73.0 (C-3C), 71.9 (C-5C), 71.6 (C-2C), 70.1 (C-2B), 69.4 (C-3B), 68.8 (C-5B), 67.7 (C-4C), 67.2 (C-5A), 65.1 (C-4A), 62.8 (C-6A), 61.6 (C-6B), 61.5 (C-6C), 20.9-20.5 (CH<sub>3</sub>CO).

II.9.3.4. Síntesi de l'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol (42)

Procediment 1:

Sobre una solució a  $-78$  °C de l'acceptor **44** (226 mg, 982  $\mu$ mol) i del donador **48** (817 mg, 1.05 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (10 mL), amb tamisos moleculars de 4 Å en pols (300 mg), i sota atmosfera de N<sub>2</sub>, s'addiciona triflat de trimetilsilil (20  $\mu$ L, 110  $\mu$ mol). El cru de reacció adquireix una coloració groguenca. S'agita a  $-78$  °C durant 3 hores i s'atura la reacció addicionant trietilamina (1.5 mL). El cru de reacció es dilueix amb CHCl<sub>3</sub> (10 mL) i es filtra sobre Celite. El sòlid es renta amb CHCl<sub>3</sub> (10 mL), es concentren les fases orgàniques combinades i es carreguen en una columna de cromatografia *flash* (eluent Cy/AcOEt 4:1 $\rightarrow$ 1:1). S'obtenen 125 mg (147  $\mu$ mol, 15%) de producte d'interès **42**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** veure l'apartat II.9.1.4.

Procediment 2:

Sobre una solució a  $-78$  °C del donador **48** (75 mg, 96  $\mu$ mol) i de l'acceptor **44** (22 mg, 96  $\mu$ mol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (10 mL), amb tamisos moleculars de 4 Å en suspensió (50 mg), i sota atmosfera de N<sub>2</sub>, s'addiciona BF<sub>3</sub>·EtOEt (5  $\mu$ L, 40  $\mu$ mol) i s'agita a  $-78$  °C. El control de reacció per c.c.f. als 60 minuts mostra un cru de reacció de composició similar a l'obtingut amb el procediment anterior. No s'investiga més la reacció.

Procediment 3:

Sobre una solució de l'acceptor **44** (56 mg, 243  $\mu$ mol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre (2 mL), amb HgBr<sub>2</sub> (11 mg, 316  $\mu$ mol), Hg(CN)<sub>2</sub> (8 mg, 316  $\mu$ mol), i tamisos moleculars de 4 Å en suspensió (150 mg), s'addiciona el donador **46** (376 mg, 538  $\mu$ mol) sota atmosfera de N<sub>2</sub>, i s'agita a temperatura ambient i sota atmosfera de N<sub>2</sub>. El control de reacció per c.c.f. a les 4 hores mostra un cru de composició semblant a l'obtingut amb el procediment 1, raó per la que no s'investiga més la reacció.

## II.9.4. Síntesi de glicals per reducció amb $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$

### II.9.4.1. 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal (43)

En un baló de dues boques es dipositen bromur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil (**29**) (204 mg, 516  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$  (267 mg, 1.072 mmol) i Mn en pols (111 mg, 2.018 mmol). Se segellen les juntures amb film de parafina, es purga el sistema amb nitrogen durant 10 minuts i s'addiciona via xeringa THF anhidre (4 mL). S'agita a temperatura ambient durant 15.5 hores sense control intermedi. El control de la reacció per c.c.f. mostra un cru en el que s'observa la formació gairebé quantitativa del glucal triacetilat **43**.

### II.9.4.2. O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol (42)

Al bromur de glicosil **5** (1.5 g, 1.52 mmol) s'addicionen  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$  (0.805 g, 3.23 mmol) i Mn en pols (0.344 g, 6.25 mmol). Se segellen les juntures del baló amb film de parafina, i es purga el sistema amb nitrogen durant 10 minuts. Aleshores s'addiciona via xeringa tetrahidrofurà anhidre (18 mL) i s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . Als 15-20 minuts el cru de reacció passa de verd a vermell. Es continua agitant fins les 13 hores de reacció, moment en el que el cru es filtra sobre Celite i es renta el filtre amb tetrahidrofurà. S'addiciona al filtrat sílica per a columna *flash* (25 g), es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit la càrrega seca. Un cop sec, es carrega en una columna de cromatografia *flash* i es purifica el producte (Cy/AcOEt 2:1 $\rightarrow$ 3:4). S'obtenen 764 mg d'un sòlid blanc, identificat com al producte d'interès **42** (0.9 mmol, 59%) a partir de les seves dades espectroscòpiques.

### II.9.4.3. O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol (54)

#### *Síntesi del bromur de glicosil 6*

Se suspèn tetrasacàrid **4** (5.48 g, 4.37 mmol) en solució al 33% de HBr en HAcO (45 mL) i s'agita vigorosament, en un sistema protegit amb un tub de  $\text{CaCl}_2$ , durant 30 minuts, fins la total dissolució del sòlid. El cru s'aboca sobre aigua/gel (300 mL) i es filtra el sòlid precipitat, que es redissol en  $\text{CHCl}_3$  (150 mL); el filtrat s'extreu amb  $\text{CHCl}_3$  (3 x 150 mL). Les fases orgàniques combinades es renten amb  $\text{NaHCO}_3$  (aq., sat.) (4 x 150 mL) i s'assequen sobre  $\text{MgSO}_4$ . Es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit el sòlid blanc obtingut, que s'utilitza sense més purificació en el següent pas de reacció.



*Síntesi del glicol 54*

Al bromur de glicosil **6** obtingut s'addicionen  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$  (2.36 g, 9.48 mmol) i Mn en pols (1.000 g, 18.18 mmol). Se segellen les juntures del baló amb film de parafina, i es purga el sistema amb  $\text{N}_2$  durant 10 minuts. Aleshores s'addiciona via xeringa tetrahidrofurà anhidre (35 mL) i s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . Als 15-20 minuts el cru de reacció passa de verd a vermell. Es continua agitant fins les 13 hores de reacció, moment en el que el cru es filtra sobre Celite i es renta el filtre amb tetrahidrofurà. S'addiciona al filtrat sílica per columna *flash* (30 g), es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit la càrrega seca. Un cop sec, es carrega en una columna de cromatografia *flash* i es purifica el producte (eluent Cy/AcOEt 2:1→3:4). S'obtenen 2.49 g d'un sòlid blanc, identificat com al producte d'interès **54** (2.19 mmol, 50% des del tetrasacàrid **4**) a partir de les seves dades espectroscòpiques.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.45 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.5$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1A), 5.23 (dd, 1 H,  $J_a = 3.5$ ,  $J_b = 2.5$ ), 5.18-5.09 (m, 3 H), 5.05 (dd, 1 H,  $J_c = J_d = 9.5$ ), 4.93-4.80 (m, 4 H), 4.65 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.59 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.0$ ,  $J_{5,6a} = 2.0$ , H-6a), 4.48-4.47 (2 d, 2 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C, H-1D), 4.42-4.33 (m, 4H), 4.14-4.01 (m, 5 H), 3.76 (2 dd, 2 H,  $J_e = J_f = 10.0$ ), 3.67-3.54 (m, 3 H), 2.15-1.97 (12 s, 36 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**II.10. Reaccions de des-*O*-acetilació de glicals****II.10.1. *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1→4)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol**

Protocol 1: desprotecció amb HCl/MeOH

Es dissol el cel·lobial peracetilat **51** (150 mg, 0.27 mmol) en MeOH anhidre (7.3 mL), s'afegeix HCl (g) en MeOH (17.6% p/v, 7.4 mL). S'agita a temperatura ambient, sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  25:8:5), i es dóna per finalitzada passades 25 hores, detectant-se un únic producte per c.c.f. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda sota atmosfera inerta i en un bany d'aigua/gel i es codestil·la amb EtOEt per tal d'eliminar les traces de clorur d'hidrogen, fins que desapareix la seva olor picant característica. L'anàlisi mitjançant c.c.f. (AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  25:8:5) permet comprovar que el producte descompon durant el processament posterior a la reacció.

Protocol 2: desprotecció amb la reacció de Zemplén

Es prepara una suspensió de cel·lobial peracetilat **51** (114.5 mg, 0.20 mmol) en MeOH anhidre (2.63 mL) i s'addiciona una solució 0.1 M de NaOMe en MeOH (0.53 mL). S'agita a temperatura ambient amb un tub de  $\text{CaCl}_2$ . La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  25:8:5) i s'atura a les 1:20 hores. El cru resultant es neutralitza amb  $\text{CO}_2$  i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda en un bany d'aigua/gel. S'obtenen 50.5 mg de producte que s'identifica per c.c.f. com el glicol d'interès **55** per comparació amb un patró. Per tal d'eliminar les restes de  $\text{NaHCO}_3$  que es genera, es dissol el producte en el mínim volum d'una solució MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:3) i fa passar a través d'una petita columna de sílica (Set-Pack) on queda retintut el bicarbonat. S'elimina el MeOH a pressió reduïda en un bany d'aigua/gel, i l'aigua restant s'elimina per liofilització. Es

comprova l'absència de sílice i bicarbonat en la mostra per comparació de l'espectre d'infraroig del producte obtingut amb els del bicarbonat i de la sílice. S'obtenen 46 mg del glical d'interès **55** (0.15 mmol, 73%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 6.37 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.0$ ,  $J_{1,3} = 2.0$ , H-1A), 4.70 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.0$ ,  $J_{2,3} = 2.5$ , H-2A), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.30 (m, 1 H, H-5A), 3.99-3.21 (m, 10 H, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-5B, H-6aA, H-6aB, H-6bA, H-6bB).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 145.1 (C-1A), 104.7 (C-1B), 103.6 (C-2A), 79.9, 78.8, 78.0, 77.9, 75.1, 71.6, 69.6 (C-2B, C-3A, C-3B, C-4A, C-4B, C-5A, C-5B), 62.5, 61.5 (C-6A, C-6B).

### II.10.2. *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol (**56**)

Protocol 1: desprotecció amb la reacció de Zemplen i neutralització amb reïna Amberlite IR-120

A una suspensió de (G4G3G')<sub>Ac</sub> (**42**) (1.27 g, 1.50 mmol) en MeOH anhidre (18 mL) s'afegeix una solució 0.1 M de NaOMe en MeOH (3.8 mL). S'agita a temperatura ambient amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O 16:4:3). La reacció s'atura a les 1.5 hores. Part del glical precipita durant la reacció, es filtra i es neteja amb MeOH fred. El filtrat es neutralitza amb Amberlite IR-120, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut purifica per cromatografia *flash* (AcOEt/MeOH 1:0 $\rightarrow$ 4:1). En total s'obtenen 600 mg del glical d'interès **56** (1.27 mmol, 85%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 6.50 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.5$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1A), 4.96 (dd, 1 H,  $J_{2,1} = 6.5$ ,  $J_{2,3} = 2.5$ , H-2A), 4.66 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 4.51 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1C), 4.41 (m, 1 H, H-5A), 4.02-3.29 (m, 16 H, H-2B, H-2C, H-3A-C, H-4A-C, H-5B, H-5C, H-6aA-C, H-6bA-C).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 146.5 (C-1A), 104.2, 102.0 (C-1B, C-1C), 101.2 (C-2A), 80.3, 79.8, 77.9, 77.6, 77.2, 76.5, 76.0, 74.8, 74.4, 71.1, 68.5 (C-2B, C-2C, C-3A-C, C-4A-C, C-5A-C), 62.2, 61.7, 61.7 (C-6A-C).

Protocol 2: desprotecció amb la reacció de Zemplen i neutralització amb CO<sub>2</sub>

A una suspensió de (G4G3G')<sub>Ac</sub> (**42**) (207 mg, 244  $\mu$ mol) en MeOH anhidre (3.3 mL) s'afegeix una solució 0.1 M de NaOMe en MeOH (0.66 mL). S'agita a temperatura ambient amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. La reacció es controla per c.c.f. (AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O 16:4:3) i s'atura passada una hora. El cru resultant es neutralitza amb CO<sub>2</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda en un bany d'aigua/gel. Per tal d'eliminar el bicarbonat generat en la neutralització es dissol el producte en el mínim volum d'una solució MeOH/H<sub>2</sub>O (1:3) i fa passar a través d'una petita columna de sílice (Set-Pack) on queda retint el bicarbonat. S'elimina el MeOH a pressió reduïda en un bany d'aigua/gel, i l'aigua restant s'elimina per liofilització. Es comprova l'absència de sílice i bicarbonat en la mostra per comparació de l'espectre d'infraroig del producte obtingut amb els del bicarbonat i de la sílice. En concret, s'observa que no estan presents les bandes a 1293,

838 i 696  $\text{cm}^{-1}$  característiques del bicarbonat, i la de 1093  $\text{cm}^{-1}$  pròpia de la sílice. S'obtenen 108 mg del glicol d'interès **56** (228  $\mu\text{mol}$ , 94%), que s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

## II.11. Intent de síntesi del *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi-D-glucopiranososa (**69**)

### II.11.1. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-glucopiranososa (**71**)

A una solució a 0 °C del glicol **42** (754 mg, 0.90 mmol) en tetrahidrofurà (29 mL) s'afegeix una solució (7.2 mL) de  $\text{Hg}(\text{AcO})_2$  (1.83 g, 5.74 mmol) en aigua (15 mL) a 0 °C. La suspensió groga resultant s'agita a 0 °C durant 45 minuts. Aleshores el cru es dilueix amb aigua a 0 °C (110 mL) i s'addiciona  $\text{NaBH}_4$  (205.1 mg, 5.42 mmol). S'agita durant 1 minut, observant-se l'aparició d'un sòlid gris, i es neutralitza mitjançant l'addició de  $\text{CO}_2$  sòlid triturat. El cru de reacció s'extreu amb  $\text{AcOEt}$  (3 x 60 mL), i la combinació d'aquests extractes orgànics es renta amb  $\text{NaCl}$  (aq., sat.) (3 x 60 mL), s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut després d'assecar-lo al buit (0.83 g) es purifica per cromatografia *flash* (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent  $\text{Cy}/\text{AcOEt}$  1:1) i es recristal·litza la fracció d'interès de  $\text{CHCl}_3$ /èter diisopropílic. S'obtenen 374 mg del 2-desoxiglicòsid **71** (0.43 mmol, 49%), caracteritzat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 5.41 (sa, 1 H, H-1A), [5.17-5.03 (m, 2 H), 5.12 (d, 1 H,  $J_{a,b} = 9$ ), 4.95-4.88 (m, 2 H), 4.80 (dd, 1 H,  $J_{c,d} = J_{e,f} = 8.0$ ), 4.53-4.45 (m, 2 H), 4.5 (d, 1 H,  $J_{g,h} = 8.0$ ), 4.37 (dd, 1 H,  $J_{k,l} = 12.0$ ,  $J_{m,n} = 4.0$ ), 4.23- 4.07 (m, 5 H), 4.04 (dd, 1 H,  $J_{o,p} = 12.0$ ,  $J_{q,r} = 2.0$ ), 3.78 (t, 1 H,  $J_{s,t} = 9.5$ ), H-1B, H1-C, H-2B, H2-C, H-3A-C, H-4A-C, H-5A, H-6aA-C, H6bA-C], 3.67-3.55 (m, 2 H, H-5B, H-5C), 2.13-1.98 (m, 28 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ , H-2Aa), 1.80 (m, 1 H, H-2Ab).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 170.9-169.0 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 100.7, 99.4 (C-1B, C-1C), 91.7 (C-1A), 76.3, 74.8, 72.9, 72.7, 72.6, 72.0, 71.7, 71.6, 69.5, 68.4, 67.8 (C-2B,C-2C, C-3A-C, C-4A-C, C-5A-C), 62.6, 61.9, 61.5 (C-6A-C), 35.3 (C-2A), 20.8-20.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### II.11.2. Intent de síntesi de l'*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi-D-glucopiranososa (**69**)

Es dissol el 2-desoxiglicòsid **71** (355 mg, 0.41 mmol) en una solució 0.1 M de  $\text{NaOMe}$  en  $\text{MeOH}$  (13 mL). S'agita a temperatura ambient amb un tub de  $\text{CaCl}_2$ . La reacció es controla per c.c.f. ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  4:1). A les cinc hores es filtra el sòlid blanc precipitat que es neteja amb  $\text{MeOH}$  fred, i el filtrat es neutralitza amb Amberlite IR-120, es filtra i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut (110 mg) es caracteritza com cel·lobiosa a partir de les seves dades espectroscòpiques.

**$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 5.23 (d, 0.15 H,  $J_{1ax,2} = 4.0$ , H-1Aax), 4.67 (d, 0.85 H,  $J_{1eq,2} = 8.0$ , H-1Aeq), 4.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B), 3.99-3.26 (m, 12 H, H-2A, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-5A, H-5B, H-6Aa, H-6Ba, H-6Ab, H-6Bb).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) = 103.2 (C-1B), 96.4 (C-1A), 79.3 (C-4A), 76.6 (C-5B), 76.1 (C-3B), 75.4 (C-5A), 74.9 (C-3A), 74.5 (C-2A), 73.8 (C-2B), 70.1 (C-4B), 61.2 (C-6B), 60.7 (C-6A).

## II.12. Síntesi del 4'-nitrofenil *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosid (68)

### II.12.1. Intent de síntesi del donador hemiacetàlic 59

#### II.12.1.1. 4,6-di-*O*-acetil-3-*O*-*tert*-butildifenilsilil-D-glucal (57)

Sobre una solució de glucal **44** (2.22 g, 9.64 mmol) i de trietilamina (2.7 mL, 18.45 mmol) en tetrahidrofurà anhidre (10 mL), s'addiciona 4-dimetilaminopiridina (75 mg, 614  $\mu\text{mol}$ ) i clorur de *tert*-butildifenilsilil (2.70 mL, 2.91 g, 10.59 mmol), i s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen. A les 22 hores de reacció s'addiciona més 4-dimetilaminopiridina (75 mg, 614  $\mu\text{mol}$ ), per tal d'intentar accelerar la reacció. A les 40 hores s'afegeix més clorur de *tert*-butildifenilsilil (0.5 mL, 537 mg, 1.95 mmol) i es continua agitant. A les 63 hores, es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i l'oli obtingut es dissol en *N,N*-dimetilformamida anhidra (20 mL), s'addiciona imidazole (1.31 g, 19.24 mmol) i s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . Passades 4.5 hores es dilueix el cru amb  $\text{CHCl}_3$  (40 mL) i es renta amb aigua (2 x 50 mL) i NaCl (aq., sat.) (2 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. L'oli obtingut es purifica per cromatografia *flash* (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent Cy/AcOEt 11:1), obtenint-se 4.01 g del producte **57** en forma d'oli, i una mescla del producte d'interès i clorur de *tert*-butildifenilsilil. Aquesta mescla es purifica mitjançant c.c.f. preparativa (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent Cy/AcOEt 11:1) i s'obtenen 0.18 g més de producte **57**. Rendiment global: 4.19 g (8.94 mmol, 93%).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.76-7.36 (m, 10 H, Ph), 6.26 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 6.0$ ,  $J_{1,3} = 1.0$ , H-1), 5.20 (dd, 1 H,  $J_a = J_b = 5.0$ ), 4.55-4.52 (m, 2 H), 4.26-4.16 (m, 3 H), 2.10-1.94 (2 s, 6 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.05 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

#### II.12.1.2. Intent de síntesi de 4,6-di-*O*-acetil-3-*O*-(*tert*-butildifenil)silil-2-desoxi-2-fenilseleno-D-glucopiranosid (59)

##### Procediment 1:

A una solució a 0 °C del glucal **57** (150 mg, 320  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (5 mL), sota atmosfera de  $\text{N}_2$ , s'addicionen via xeringa una solució de clorur de fenilselenil (100 mg, 522  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (2 mL). S'agita a 0 °C durant 2 hores i 45 minuts, es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i el residu es redissol en una mescla de tetrahidrofurà/ $\text{H}_2\text{O}$  1:1 (15 mL). S'addiciona  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sòlid (55 mg, 519  $\mu\text{mol}$ ), s'agita la solució a temperatura ambient durant 15 minuts i, seguidament, a 50 °C. A les 17 hores s'afegeix més  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (60 mg, 566  $\mu\text{mol}$ ) i es continua escalfant a 50 °C fins que a les 22.5 hores la reacció es completa. El control de reacció per c.c.f. mostra la formació d'un cru complex en el que només s'observa un producte cromofòric que es revela en ruixar amb  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i escalfar, característiques que hauria de tenir el producte

d'interès. El cru es dilueix amb aigua (15 mL) i s'extreu amb  $\text{CHCl}_3$  (2 x 25 mL). La fase orgànica es renta amb  $\text{NaCl}$  (aq., sat.) (2 x 20 mL), s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit el residu obtingut. Els 200 mg d'oli groc obtinguts es purifiquen mitjançant cromatografia de mitja pressió (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent Cy/AcOEt 4:1). S'enregistra l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN de la fracció del producte aïllada, i les dades obtingudes permeten concloure que el producte obtingut no és el producte desitjat, ja que no s'observa cap senyal assignable al grup *tert*-butildifenilsilil ni cap senyal assignable a un protó hidroxílic. El producte no s'identifica.

**$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.65-7.25 (m, 10 H, Ph), 5.99 (dd, 0.26 H,  $J_a \approx 2.0$ ,  $J_b \leq 1.0$ ), 5.93 (dd, 0.74 H,  $J_c = 4.0$ ,  $J_d = 1.0$ ), 5.89 (dd, 1 H,  $J_f = 1.5$ ,  $J_g = 1.0$ ), 5.81 (dd, 0.74 H,  $J_h = 1.5$ ,  $J_k = 1.0$ ), 5.76 (dd, 1 H,  $J_l = 1.5$ ,  $J_m = 1.0$ ), 5.40-5.36 (ddd, 0.26 H), 5.32 (d, 0.26 H,  $J_n \leq 1.0$ ), 4.86 (m, 2.74 H), 4.51 (dd, 1 H,  $J_o = 12.0$ ,  $J_p = 4.5$ ), 4.36 (dd, 1 H,  $J_q = 12.0$ ,  $J_r = 3.0$ ), 4.23 (m, 1 H), 4.11 (dd, 1 H,  $J_s = 12.0$ ,  $J_t = 6.0$ ), 4.07 (dd, 1 H,  $J_u = 12.0$ ,  $J_v = 5.5$ ), 2.09-2.03 (4 s, 12 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### Procediment 2:

A una solució a 0 °C del glucal **57** (162 mg, 346  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (5 mL), sota atmosfera de  $\text{N}_2$ , s'addiciona via xeringa una solució de clorur de fenilselenil (132 mg, 692  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (2 mL). S'agita a 0 °C durant 1 hora i 45 minuts, es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el residu en una mescla de tetrahidrofurà/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (5 mL). S'addiciona  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (278 mg, 1.01 mmol) i s'agita en la foscor a temperatura ambient. El cru es dilueix amb una mescla de tetrahidrofurà/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (10 mL) per tal d'intentar redissoldre el precipitat present, però no s'aconsegueix. A les 16 hores s'afegeix més  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (282 mg, 1.02 mmol) amb la finalitat d'augmentar la velocitat de reacció. El control de reacció per c.c.f. als 5 dies mostra la formació d'un cru d'aspecte similar a l'obtingut amb el procediment 1, raó per la qual no s'investiga més la reacció.

## **II.12.2. Intent de síntesi del donador hemiacetàlic tetrasacàrid **61** a partir del tetrasacàrid **54** i síntesi del 4'-metilumbel·liferil glicòsid **62****

II.12.2.1. Intent de síntesi de l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-fenilseleno-*D*-glucopiranòsid (**61**)

### Procediment 1:

Sobre una solució a 0 °C del glicol **54** (190 mg, 167  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (5 mL) s'addiciona clorur de fenilselenil (44 mg, 230  $\mu\text{mol}$ ). El cru s'agita sota atmosfera de  $\text{N}_2$ , deixant que es temperi, durant 4 hores. Es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, s'asseca al buit el residu obtingut durant 20 minuts, i es redissol en una mescla tetrahidrofurà/ $\text{H}_2\text{O}$  2:1 (6 mL). S'addiciona  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sòlid (24 mg, 226  $\mu\text{mol}$ ) i s'agita a temperatura ambient durant 15 minuts, i després a 50 °C durant 90 minuts. El cru es dilueix amb aigua (25 mL) i s'extreu amb  $\text{CHCl}_3$  (2 x 25 mL). La fase orgànica s'asseca

sobre  $\text{MgSO}_4$ , es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i el residu s'asseca al buit. S'obtenen 240 mg d'un oli groguenc que es purifica mitjançant cromatografia de mitja pressió (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent Cy/AcOEt 4:1). Es perd accidentalment part del cru en carregar la columna. S'aïllen 14 mg d'un producte, l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del qual és idèntic al del producte obtingut en realitzar la mateixa reacció amb el glucal **57** (veure apartat II.12.1.2).

#### Procediment 2:

Sobre una solució a 0 °C del glicol **54** (190 mg, 167  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (5 mL) s'afegeix clorur de fenilselenil (44 mg, 230  $\mu\text{mol}$ ). S'agita sota atmosfera de  $\text{N}_2$  i es deixa temperar durant 4 hores. Es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut, després d'assecar-lo al buit durant 20 minuts, es redissol en una mescla de tetrahidrofurà/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (5 mL). S'addiciona  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (391 mg, 1.42 mmol) i s'agita en la foscor i a temperatura ambient durant 6 dies i 12 hores. El control de reacció per c.c.f. mostra un cru molt similar a l'obtingut amb el procediment anterior, raó per la que no s'investiga més la reacció.

#### II.12.2.2. 4'-metilumbel·liferil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acetil-2-desoxi-2-fenilseleno-D-glucopiranòsid (**62**)

Sobre una solució a 0 °C del glicol **54** (100 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre (2 mL) s'addiciona clorur de fenilselenil (25 mg, 132  $\mu\text{mol}$ ), i s'agita, deixant assolir la temperatura ambient, durant 3 hores. Després de prendre una alíquota del cru de reacció (pes sec: 6 mg), s'afegeix 4-metilumbel·liferona monohidratada (32 mg, 165  $\mu\text{mol}$ ), hidrogensulfat de tetrabutylamoni (25 mg, 74  $\mu\text{mol}$ ), i una solució 1 N de NaOH (1 mL). S'agita vigorosament la mescla, protegida de la llum, durant 3.5 hores. El cru es dilueix amb  $\text{CHCl}_3$  (20 mL) i es renta amb una solució 1 N de NaOH (3 x 20 mL) i aigua (3 x 20 mL). La fase orgànica s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, i s'asseca al buit el residu obtingut. Els 67 mg d'oli groguenc obtinguts es purifiquen mitjançant cromatografia de mitja pressió (càrrega en  $\text{CHCl}_3$ , eluent Cy/AcOEt 3:1 $\rightarrow$ 1:1). D'entre tots els productes, se n'aïllen dos. El primer producte s'identifica com al glicol de partida **54** (13 mg, 12  $\mu\text{mol}$ , 13%) a partir de les seves dades espectroscòpiques. Al segon producte (5 mg, 3  $\mu\text{mol}$ , 4%) se li assigna com a estructura més probable l'estructura **62**, després de l'anàlisi del seu espectre de  $^1\text{H}$ -RMN:

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.56-7.52 (m, 2 H, Ph), 7.46 (d, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ , H-5'), 7.36-7.22 (m, 3 H, Ph), 6.75 (d, 1 H,  $J_{6',8'} = 2.5$ , H-8'), 6.67 (dd, 1 H,  $J_{5',6'} = 9.0$ ,  $J_{6',8'} = 2.5$ , H-6'), 6.17 (d, 1 H,  $J_{3',\text{Me}} = 1.0$ , H-3'), 5.25-4.80 (m, 9 H), 4.50-4.30 (m, 5 H), 4.30-4.00 (m, 5 H), 3.95-3.70 (m, 4 H), 3.70-3.40 (m, 5 H), 2.39 (d, 3 H,  $J_{3',\text{Me}} = 1.0$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.16-1.97 (9 s, 36 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### II.12.3. Conversió del glicial **54** al 2-desoxiglicòsid **64**, i addició nucleòfila de 4-nitrofenol sobre el iodur de glicosil **66**

#### II.12.3.1. *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-*D*-glucopiranososa (**64**)

A una solució a 0 °C del glicial **54** (2.16 g, 1.90 mmol) en tetrahidrofurà (60 mL) s'afegeix una solució a 0 °C de Hg(AcO)<sub>2</sub> (1.83 g, 5.74 mmol) en aigua (15 mL). La suspensió groga resultant s'agita a 0 °C durant 45 minuts. Aleshores el cru es dilueix amb aigua a 0 °C (225 mL) i s'addiciona NaBH<sub>4</sub> (430 mg, 11.4 mmol). S'agita durant 1 minut, observant-se l'aparició d'un sòlid gris, i es neutralitza mitjançant l'addició de CO<sub>2</sub> sòlid triturat. El cru de reacció s'extreu amb AcOEt (4 x 100 mL), i la combinació d'aquests extractes es renta amb NaCl (aq., sat.) (4 x 100 mL), s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda. El sòlid obtingut després d'assecar-lo al buit (2.30 g) es purifica per cromatografia *flash* (càrrega en CHCl<sub>3</sub>, eluent Cy/AcOEt 3:2 $\rightarrow$ 1:3). S'obtenen 1.03 g (891  $\mu$ mol, 47%) de producte d'interès **64**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.41 (sa, 1 H, H-1A), 5.15-5.02 (m, 4 H), 4.93-4.76 (m, 4 H), 4.50-4.33 (m, 6 H), 4.23-4.00 (m, 7 H), 3.76 (dd, 2 H,  $J_a = J_b = 9.5$ ), 3.66-3.52 (m, 3 H), 2.15-1.97 (m, 38 H, CH<sub>3</sub>CO, H-2Aa, H-2Ab).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 170.9-169.1 (CH<sub>3</sub>CO), 100.8, 100.5, 99.3 (C-1B-D), 91.6 (C-1A), 76.2, 76.1, 74.8, 72.8, 72.7, 72.6, 72.6, 72.5, 72.0, 71.7, 71.7, 71.5, 69.4, 68.3, 67.7 (C-2B-D, C-3A-D, C-4A-D, C-5A-D), 62.6, 62.1, 61.8, 61.4 (C-6A-D), 35.3 (C-2A), 20.8-20.4 (CH<sub>3</sub>CO).

#### II.12.3.2. Acetil *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-*D*-glucopiranosid (**65**)

El tetrasacàrid **64** (2.07 g, 1.79 mmol) es dissol en una mescla d'Ac<sub>2</sub>O/piridina 1:1 (48 mL) i s'agita a temperatura ambient, protegit de la llum i amb tub de CaCl<sub>2</sub>, durant 7 hores (sense control intermedi). El cru s'aboca sobre aigua/gel (300 mL) i es filtra el sòlid precipitat, que es redissol en CHCl<sub>3</sub> (200 mL); el filtrat s'extreu amb CHCl<sub>3</sub> (3 x 100 mL). Les fases orgàniques combinades es renten amb NaHCO<sub>3</sub> (aq., sat.) (3 x 100 mL), s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub> i es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, co-destil·lant amb toluè les darreres traces de piridina. El sòlid blanc resultant s'asseca al buit, obtenint-se 2.13 g (1.78 mmol, 99%) del producte **65**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.23 (dd, 0.81 H,  $J_{1,2ax} = 3.0$ ,  $J_{1,2eq} = 1.0$ , H-1Aeq), 5.73 (dd, 0.19 H,  $J_{1,2ax} = 9.5$ ,  $J_{1,2eq} = 2.0$ , H-1Aax), 5.16-5.05 (m, 4 H), 5.02-4.76 (m, 4 H), 4.56-4.33 (m, 6 H), 4.25 (m, 1 H), 4.13-3.92 (m, 6 H), 3.81-3.76 (m, 2 H), 3.656-3.56 (m, 3 H), 2.15-1.97 (m, 40 H, CH<sub>3</sub>CO, H-2Aeq), 1.80 (m, 1 H, H-2Aax).

II.12.3.3. 4'-nitrofenil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acetil-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosid (67 $\beta$ )

El tetrasacàrid **65** (2.13 g, 1.78 mmol) es dissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> recent destil·lat (15 mL) i es refreda a 0 °C sota atmosfera de N<sub>2</sub>. S'addiciona iodotrimetilsilà (270  $\mu$ L, 1.98 mmol) i s'agita a 0 °C durant 45 minuts. Es destil·la el dissolvent a pressió reduïda, s'addiciona toluè anhidre (10 mL) i es torna a destil·lar a pressió reduïda. L'oli ataronjat obtingut es redissol en tetrahidrofurà anhidre recent destil·lat (15 mL) i s'addiciona a una solució, en tetrahidrofurà anhidre (15 mL) i sota atmosfera de N<sub>2</sub>, de 4-nitrofenol (401 mg, 2.88 mmol), 15-crown-5 (430  $\mu$ L, 2.17 mmol) i una solució 1 M d'hexametildisalzazant sòdic en tetrahidrofurà (2.20 mL, 2.20 mmol). S'agita a temperatura ambient durant 45 minuts. El cru es dilueix amb CHCl<sub>3</sub> (100 mL), es renta amb una solució 1N de NaOH (4 x 100 mL) i NaCl (aq., sat.) (100 mL). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit. El cru es purifica per cromatografia *flash* (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 3:2). S'obtenen 390 mg (306  $\mu$ mol) del producte d'interès **67 $\beta$** , junt amb algunes fraccions barreja que també el contenen. Aquestes s'ajunten i es purifiquen amb una cromatografia de polsos de mitja pressió (Lobar-Merck) (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 1:1), obtenint-se 291 mg addicionals (228  $\mu$ mol) del producte **67 $\beta$** , per obtenir un rendiment total del 30% (534  $\mu$ mol). El producte **67 $\beta$**  s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 8.20-7.08 (2 d, 4 H,  $J$  = 9.5, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>), 5.30 (dd, 1 H,  $J_{1,2ax}$  = 8.5,  $J_{1,2eq}$  = 2.5, H-1A), 5.19-4.82 (m, 8 H), 4.58-4.33 (m, 6 H), 4.27 (dd, 1 H,  $J_{gem}$  = 12.0,  $J_{5,6}$  = 6.5, H-6), 4.16-3.92 (m, 5 H), 3.86-3.75 (m, 3 H), 3.67-3.54 (m, 3 H), 2.45 (ddd, 1 H,  $J_{gem}$  = 13.0,  $J_{2eq,3}$  = 4.5,  $J_{1,2eq}$  = 2.0, H-2Aeq), 2.15-1.98 (m, 37 H, CH<sub>3</sub>CO, H-2Aax).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 170.5-169.1 (CH<sub>3</sub>CO), 161.3 (C-1'), 142.7 (C-4'), 125.7 (C-3', C-5'), 116.2 (C-2', C-6'), 100.8, 100.5, 99.0, 96.0 (C-1A-D), 76.2, 76.0, 75.0, 72.8, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.3, 72.0, 71.7, 71.5, 71.5, 68.5, 67.6 (C-2B-D, C-3A-D, C-4A-D, C-5A-D), 62.7, 62.0, 61.6, 61.4 (C-6A-D), 34.7 (C-2A), 20.8-20.4 (CH<sub>3</sub>CO).

II.12.4. 4'-nitrofenil O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosid (68)

S'addiciona una solució 0.165 M de NaOMe en MeOH (2.2 mL) al tetrasacàrid acetilat **67 $\beta$**  (403 mg, 316  $\mu$ mol) suspès en MeOH anhidre recent destil·lat (12 mL). El sistema es protegeix de la llum i s'agita, sota tub de CaCl<sub>2</sub>, durant 13.5 hores a temperatura ambient. Es filtra el sòlid precipitat, es renta amb MeOH i s'asseca al buit, obtenint-se 215 mg (279  $\mu$ mol, 88%) del producte d'interès **68**, identificat a partir de les seves dades espectroscòpiques. El filtrat es neutralitza fent-lo passar a través d'una columna d'Amberlyst 15 (3.5 cm d'alçada per 4 cm de diàmetre), es destil·la el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit el sòlid aparegut. L'anàlisi per c.c.f. dels 10 mg obtinguts indica que es tracta majoritàriament del producte d'interès **68**, però amb una quantitat relativament important d'impureses, raó per la que es decideix no combinar aquest sòlid amb l'obtingut per precipitació en el cru de reacció.



Part experimental

**<sup>1</sup>H-RMN (d<sub>6</sub>-DMSO, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.23-8.20, 7.24-7.21, (2 d, 4 H,  $J = 9.5$ , C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>), 5.49 (dd, 1 H,  $J_{1,2ax} \approx 9.0$ ,  $J_{1,2eq} < 1.0$ , H-1A), 4.39, 4.33, 4.24 (3 d, 3 H,  $J_{1,2} = 8.0$ , H-1B-D), 3.85-3.69 (m, 4 H), 3.65-3.50 (m, 3 H), 3.43-2.96 (m, 16 H), 2.45 (ddd, 1 H,  $J_{gem} \approx 11.0$ ,  $J_{2eq,3} \approx 4.5$ ,  $J_{1,2eq} < 1.0$ , H-2Aeq), 1.67 (ddd, 1 H,  $J_{gem} \approx 11.0$ ,  $J_{1,2ax} \approx J_{2ax,3} \approx 9.0-10.0$ , H-2Aax).

### III. Enzimologia

#### III.1. Cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

##### III.1.1. Solucions d'ús habitual

- *Tampó citrat/fosfat* (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ : es dissolen àcid cítric (0.624 g, 3.25 mmol),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15.579 g, 43.5 mmol) i  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7.35 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) en aigua Milli-Q (400 mL) i es comprova que el pH és l'adient. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'enrassa a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C. Per a la preparació dels tampons de la mateixa composició, però de pH 6.9 i 7.8, s'ajusta el pH corresponent amb una solució 0.1 M d'HCl i una solució 0.1 M de NaOH, respectivament.

- *Solució de substrat/inhibidor*: els diferents substrats o inhibidors es dissolen en el mateix tampó en què es realitzen les reaccions, generalment tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ . En el cas dels glicòsids no cromofòrics la concentració de la solució estoc, es determina directament a partir de la pesada, i en el cas dels substrats cromofòrics, la concentració es determina a partir de la seva absorbància (III.2.4). Les solucions de diferents concentracions de substrat/inhibidor que es fan servir a la reacció, s'obtenen prèviament a la seva realització, per dilució seriada de la solució estoc amb el mateix tampó que es fa servir en la reacció. S'ha de tenir present que la concentració del substrat/inhibidor en la mescla de reacció és la meitat que la concentració de la solució que es fa servir.

- *Solució d'enzim*: l'enzim es dissol en el mateix tampó en què es realitzen les reaccions, generalment tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ . La determinació de la seva concentració es realitza a partir de l'absorbància de la solució a 280 nm i aplicant el factor de proporcionalitat d'absortivitat molar basat en el nombre de tirosines i triptòfans de la proteïna que és de  $67400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  per a la proteïna salvatge i els mutants E134A i M58A; i de  $61700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , per al mutant W221A, de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. S'ha de tenir present que la concentració d'enzim en la reacció passa a ser la meitat de la concentració de la solució estoc.

##### III.1.2. Procediment general

Tal i com s'exposa a l'apartat de solucions d'ús habitual es preparen, d'una banda, la solució d'enzim i, de l'altra, la de glicòsid, en el tampó triat per tal de realitzar la reacció. Partint de la base que a l'aparell de flux interromput (de l'anglès *stopped-flow*) es barreja un mateix volum de cadascuna de les dues solucions, la concentració en la reacció és la meitat de la concentració de les solucions emprades. Les solucions de substrat de diferents concentracions, emprades a les reaccions, s'obtenen realitzant un banc de dilucions de la solució estoc, prèviament a l'inici de l'experiment. Es treballa a una concentració d'enzim suficientment elevada per tal de poder mesurar els canvis de senyal en les cinètiques, i amb un marge de concentracions de substrat al voltant de  $K_M$ .

Les reaccions es realitzen en dos instruments de flux interromput diferents, un d'ells el DX17MV d'Applied Photophysics, i l'altre, el Hi-Tech Scientific PQ/SF-53. Tots dos estan equipats amb làmpades d'arc de xenó d'alta intensitat i detectors de transmissió i emissió en la gamma de longituds d'ona corresponents a l'UV-vis. Tant les cubetes per als reactius com la cubeta de reacció estan sotmeses a control de temperatura.

En el cas de treballar amb el substrat G4G3G-MU la cinètica se segueix mesurant l'emissió de fluorescència de la mostra al llarg del temps. En funció del què es vulgui mesurar es treballa en dues condicions diferents: per tal de mesurar variacions en la fluorescència del substrat es treballa amb una longitud d'ona d'excitació de 350 nm amb una escletxa de 2 mm, en què absorbeixen tant el G4G3G-MU com la MU, i es fa servir un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400); i per tal de mesurar la formació del producte de reacció, es treballa amb una longitud d'ona d'excitació de 360 nm amb una escletxa de 5 mm, en què l'absorbància del G4G3G-MU es pot considerar menyspreable, de manera que bàsicament només absorbeix la MU, i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455); obtenint finalment, en els dos casos, un valor integrat d'intensitat de fluorescència, expressat en V. En el cas de treballar amb els substrats G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP, el seguiment de la cinètica es realitza determinant els canvis d'absorbància a 400 nm produïts per l'alliberament de l'aglicona cromofòrica. Després de la barreja ràpida (menys d'un ms) que té lloc a l'instrument en cada nova addició de reactius a la cubeta de reacció, se segueix la cinètica en continu prenent 400 o 1000 parells de dades per experiment. Per tal de començar les cinètiques s'afegeix també a les dues cubetes de reactius, s'espera cinc minuts, perquè es temperin a 30 °C (temperatura de treball), i es realitzen 5 addicions a la cubeta de reacció, per tal d'obtenir la lectura de fluorescència corresponent al tampó. A continuació es buiden les cubetes de reactius i s'introdueix la solució d'enzim a una d'elles, i la de substrat a l'altra, s'espera que es temperin a la temperatura de treball, i després de realitzar dos o tres addicions a la cubeta de reacció per tal d'assolir el nou nivell de base, es realitzen 5 addicions més, la mitjana de les quals, defineix la traça que descriu la cinètica de reacció en aquestes condicions concretes. Per tal d'obtenir una cinètica enzimàtica a diferents concentracions de substrat, una vegada finalitzada una reacció, es buida la cubeta que conté la solució de substrat, s'omple amb una nova solució d'una altra concentració, s'espera 5 minuts, perquè es temperi a la temperatura de treball, i es repeteix el procés. El resultat a cada concentració de substrat s'obté per tant, com a mitjana de 4 o 5 cinètiques diferents, realitzades a les mateixes condicions de reacció. Les traces obtingudes s'ajusten a les equacions apropiades fent servir el mateix software de l'aparell Hi-Tech o bé amb el programa SX18 MV v4.36.

En el cas del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, les cinètiques mostren un decaïment monoexponencial del senyal a les que s'ajusta l'equació III.1, després d'una primera fase de retardament (de l'anglès *lag*) d'aproximadament 30 ms.

$$\Delta F([S], t) = \Delta F([S], \infty) \cdot [1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)] \quad \text{Equació III.1.}$$

on  $\Delta F([S], t)$  és el canvi de fluorescència observat a una concentració de substrat  $[S]$  i a un temps  $t$ ,  $\Delta F([S], \infty)$  és el canvi de fluorescència màxim que es dona un cop establert l'equilibri, i la  $k_{obs}$  és la constant de velocitat de primer ordre que descriu el procés en estat preestacionari.

En el cas de l'enzim salvatge i altres mutants actius de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, després d'una fase de retardament d'aproximadament 30 ms, les cinètiques mostren una fase d'acumulació (de l'anglès *burst*) de producte que decau de forma monoexponencial fins assolir la velocitat d'estat estacionari, d'acord amb l'equació III.2.

$$\Delta\text{Senyal}([S], t) = \Delta\text{Senyal}_p \cdot [1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)] + v_{ss} \cdot t \quad \text{Equació III.2.}$$

on  $\Delta\text{Senyal}([S], t)$ , és el canvi de senyal associat a una concentració de substrat concreta  $[S]$ , a un temps,  $t$ ,  $\Delta\text{Senyal}_p$  és el canvi de senyal que es dona en estat preestacionari, obtingut per extrapolació de la constant de velocitat en estat estacionari a temps inicial,  $v_{ss}$  és la velocitat en estat estacionari, i  $k_{obs}$  és la constant de velocitat de primer ordre observada, que descriu el comportament en estat preestacionari.

En les reaccions amb enzims actius s'avalua també la velocitat inicial de reacció just després de la fase de retardament i anterior a la fase d'acumulació de producte, seguint l'equació III.3.

$$v_i = k_{cat,i} \cdot [ES_i^*] = k_{obs} \cdot \Delta P + v_{ss} \quad \text{Equació III.3.}$$

### III.1.3. Determinació de les absortivitats i del factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència vs [fluoròfor]

- En el cas de les cinètiques amb els substrats G4G3G-2,4DNP i G4G3G-3,4DNP, es determina l'absortivitat de les aglicones, 3,4DNP i 2,4DNP, dissoltes en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, a una longitud d'ona de 400 nm, en l'aparell de flux interromput Hi-Tech Scientific PQ/SF-53. A l'aparell es barregen d'una banda, les solucions de diferents concentracions de l'aglicona, i de l'altra, el tampó de treball. Cada determinació es realitza per duplicat i es pren el valor de la mitjana. L'absortivitat així mesurada del 2,4DNP és de  $6985 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  i de  $5385 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  per al 3,4DNP.

- Per al seguiment de les cinètiques de reacció amb els 4'-metilumbel·liferil glicòsids es realitza una determinació del factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència de la 4-metilumbel·liferona dissolta en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH desitjat, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, en l'aparell de flux interromput Hi-Tech Scientific PQ/SF-53. Es treballa amb una longitud d'ona d'excitació de 360 nm amb una escletxa de 5 mm, i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Com s'ha treballat a tres pH diferents, les rectes patrons es realitzen a aquests tres pH: 6.9, 7.2, 7.8. S'observa que el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència varia en funció de la presència de G4G3G-MU, a cada pH s'obtenen diferents rectes per a concentracions de MU entre 0 i 10  $\mu\text{M}$  a diferents concentracions de G4G3G-MU. Així doncs, en l'aparell de flux interromput es barregen d'una banda, diferents solucions de MU (0-20  $\mu\text{M}$ ) en el tampó corresponent, i de l'altra, el tampó de treball o bé una solució de substrat de concentració coneguda (0-5 mM) en el mateix tampó. Cada determinació es realitza per duplicat i es pren el valor de la mitjana. El factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_S$ ) s'ajusta en funció de la  $[G4G3G-MU]$  a l'equació III.4. Per als tres pH assajats els valors de les tres constants de l'equació III.4 (A, k, B) es resumeixen en la taula III.1.

$$\alpha_s = A \cdot \exp(-k \cdot [G4G3G - MU]) + B \quad \text{Equació III.4.}$$

**Taula III.1.** Valors de les tres constants de l'equació  $\alpha_s = A \cdot \exp(-k \cdot [G4G3G - MU]) + B$ , que descriu el comportament del factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència de la MU en presència del substrat G4G3G-MU a l'aparell de flux interromput Hi-Tech Scientific PQ/SF-53, a diferents pH. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

pH	A / mV· $\mu$ M <sup>-1</sup>	k / mM <sup>-1</sup>	B / mV· $\mu$ M <sup>-1</sup>
6.9	7.3 ± 0.6	0.8 ± 0.1	12.5 ± 0.6
7.2	13 ± 3	0.5 ± 0.3	9 ± 3
7.8	29 ± 3	0.5 ± 0.2	37 ± 3

- Per a l'estudi de les cinètiques d'unió del G4G3G-MU al mutant inactiu E134A es determina el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència del substrat a les mateixes condicions emprades per a l'estudi de les cinètiques d'unió del substrat. Es treballa amb una longitud d'ona d'excitació de 350 nm amb una escletxa de 2 mm, i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400). Es barregen d'una banda, diferents solucions de G4G3G-MU de concentració coneguda (0-12.28 mM) en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, i de l'altra, el mateix tampó, en l'aparell de flux interromput DX17MV d'Applied Photophysics. Cada determinació es realitza per quintuplicat i es pren el valor de la mitjana. Es comprova que en el marge de concentracions de substrat emprat, una part dels resultats estan fora del marge de linealitat de l'aparell. La corba patró es pot ajustar a una equació polinomial de segon ordre amb els resultats que es mostren a la taula III.2; a la taula també es mostra l'ajust de la recta obtingut en el marge de resposta lineal del senyal (aproximadament fins a 1.5 mM de G4G3G-MU).

**Taula III.2.** Corba patró d'emissió de fluorescència del G4G3G-MU en l'aparell de flux interromput DX17MV d'Applied Photophysics. Es presenta el senyal de fluorescència obtingut (F) en V i el valor referit a la lectura del blanc (F-F<sub>tampó</sub>) també en V, a cada concentració de substrat. Es mostra també el resultat de l'ajust d'una equació de segon ordre als resultats obtinguts, així com el resultat de l'ajust d'una recta als valors corresponents a les concentracions de G4G3G-MU fins a 1.53 mM. Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

[G4G3G-MU] / mM	F / V	F-F <sub>tampó</sub> / V	
0	-3.9657	0	F-F <sub>tampó</sub> = a · [S] <sup>2</sup> + b · [S] + c
0.05	-3.8591	0.1066	
0.10	-3.7663	0.1994	a = -0.164 ± 0.05
0.19	-3.6143	0.3514	b = 2.22 ± 0.03
0.38	-3.2438	0.7219	c = -0.04 ± 0.03
0.77	-2.4612	1.5045	
1.53	-0.966	2.9997	F-F <sub>tampó</sub> = a · [S] + b
3.07	1.3321	5.2978	
4.10	2.3124	6.2781	a = 1.96 ± 0.01
4.92	2.8711	6.8368	b = -0.05 ± 0.06
6.14	3.4619	7.4276	

Es comprova que el senyal a temps zero obtingut, a les diferents concentracions de substrat, en les diferents reaccions realitzades, defineix un patró de resposta que segueix el mateix comportament que el de la corba patró. Per tant, a cada experiment es fa servir la recta patró definida pel senyal obtingut a l'inici. Donat que en l'estudi de les cinètiques d'unió es treballa amb un marge de concentracions de substrat que s'estén més enllà del marge de linealitat de la lectura de fluorescència, s'ha de realitzar una correcció de les dades obtingudes. Així doncs, s'ajusta una recta a la zona lineal de les lectures de fluorescència i es projecten els resultats obtinguts sobre la recta. La mateixa correcció es realitza amb els resultats del canvi de senyal observat en les traces, i com aquest canvi és  $\leq 1\%$  del valor inicial del senyal, es considera que l'error comès en la correcció és assumible.

## **III.2. Reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en estat estacionari catalitzades per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis***

### **III.2.1. Equipament emprat**

Les reaccions en estat estacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb substrats cromofòrics es realitzen en un espectrofotòmetre Cary 4E (Varian), amb làmpades de deuteri per a l'UV i de QI per al visible, i acoblat a un bany termostàtic. L'espectrofotòmetre està equipat amb el *Cary DOS System Software* de Varian que controla el funcionament de l'espectrofotòmetre, en permet realitzar les validacions i correccions adients i possibilita l'adquisició automàtica de dades. Aquest aparell està proveït d'un controlador de temperatura per efecte Peltier i un sistema multicubeta que permet treballar amb sis cubetes en paral·lel.

Per al seguiment de reaccions amb substrats cromofòrics, i determinació de la concentració de substrats o enzim per mesura de l'absorbància de la mostra, es treballa amb cubetes de quars d'1.5 mL de capacitat i 1 cm de camí òptic. Per a la determinació de la concentració d'enzim pel mètode de Bradford i per a les lectures d'absorbància en els assaigs d'extrems reductors es treballa amb cubetes de plàstic d'un o tres mL. Ocasionalment, s'han fet servir plaques d'ELISA per a realitzar l'assaig de Bradford, per tal de llegir-les en el lector d'ELISA, MRX Microplate Reader de Dynex Technologies, amb un filtre de 590 nm i làmpada de 75 W d'halur de tungstè. La recollida de dades s'ha realitzat mitjançant el software Riowin 12 de Microtec Produkte AG.

El tractament de dades, així com l'ajust de les equacions cinètiques posterior s'ha realitzat amb els programes de regressió no lineal Enzfitter 1.03, FigP, i OriginPro.

### **III.2.2. Solucions d'ús habitual**

- *Tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2*: es dissolen àcid cítric (0.624 g, 3.25 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15.58 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es comprova que el pH és l'adient a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una

solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'encerba a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- 2 x *Tampó citrat/fosfat* (13 mM citrat, 174 mM fosfat) pH 7.2: es dissolen àcid cítric (0.624 g, 3.25 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15.58 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (200 mL) i es comprova que el pH és l'adient a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'encerba a 0.25 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *Solució 10 mM CaCl<sub>2</sub>*: es dissol  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.146 g, 1 mmol) en aigua Milli-Q (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- 2 x *Tampó citrat/fosfat* (22 mM citrat, 22 mM fosfat),  $I=0.2\text{ M}$ : es mesclen una solució 0.1 M d'àcid cítric (11 mL, 1.1 mmol) i una solució 0.25 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4.4 mL, 1.1 mmol). Es tempera la solució a la temperatura de treball, s'ajusta el pH al valor desitjat amb una solució 1 M d'HCl o 1 M de NaOH. S'addiciona el volum adequat d'una solució 0.5 M de KCl per tal d'obtenir una força iònica de 0.2 M al pH de treball, i s'encerba a 50 mL amb aigua Milli-Q. La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C. Aquest tampó és el que es fa servir generalment en els perfils d'activitat enfront del pH.

- *Solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa*: es resuspèn una fracció liofilitzada d'enzim en el volum desitjat d'aigua Milli-Q a 0 °C. Es reparteix la solució en tubs d'Eppendorf per tal de centrifugar-la a 13500 rpm durant 2 minuts. El sobrenedant es transfereix a un altre tub i es repeteix aquesta etapa tantes vegades com sigui necessari per tal d'obtenir una solució d'enzim sense terbolesa. Es conserva a 4 °C.

- *Solució de substrats cromofòrics*: Es dissol el substrat en la quantitat adient d'aigua Milli-Q per tal d'obtenir la concentració desitjada en un bany amb control de temperatura a 40-50 °C. Si fos necessari s'assegura la total dissolució aplicant ultrasons. Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C. En cas de baixa solubilitat del substrat és recomanable dissoldre'l en el mateix tampó en el que es realitzarà la cinètica.

- *Solució d'inhibidors (G4G3G, G4G4G3G)*: Es dissol l'inhibidor en la quantitat adient d'aigua Milli-Q per tal d'obtenir la concentració desitjada. Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

### III.2.3. Metodologia per a la selecció de les longituds d'ona de treball i determinació de les absortivitats corresponents

El fet de treballar amb substrats cromofòrics permet determinar la concentració de les solucions estoc dels mateixos a partir de la seva absorbància. D'altra banda, i donat que els substrats cromofòrics emprats i les aglicones que aquests alliberen durant la seva hidròlisi, presenten espectres d'absorbància d'UV-vis diferents, possibilita el seguiment de la reacció d'hidròlisi per espectrofotometria d'UV-vis. Així doncs, pel que respecta a la determinació de la longitud d'ona i absortivitat del substrat amb la finalitat de determinar la seva concentració, la solució de substrat es prepara en aigua Milli-Q i les determinacions es realitzen a temperatura ambient; mentre que per a la determinació de la longitud d'ona i la variació d'absortivitat per al seguiment de la cinètica de la reacció, es treballa a les mateixes condicions a les que posteriorment es realitza la reacció enzimàtica, amb solucions de substrat i aglicona preparades en el tampó de treball.

Per a l'elecció de la longitud d'ona a la que se seguiran les reaccions enzimàtiques s'enregistren espectres d'absorbància del substrat i l'aglicona alliberada en la seva hidròlisi, en un marge de longituds d'ona entre 250 i 500 nm, a les mateixes condicions a les que posteriorment es realitzen les cinètiques. A partir d'aquests espectres es tria la longitud d'ona en què la diferència d'absortivitats entre l'aglicona i el substrat cromofòric és màxima. En el cas que a aquesta longitud d'ona, l'absortivitat del substrat sigui significativa, s'ha d'arribar a un compromís entre un valor de  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{aglicona}} - \varepsilon_{\text{substrat}}$  elevat i un valor d'absortivitat del substrat petit per tal d'evitar la saturació del senyal de l'aparell a altes concentracions del mateix. Per a l'elecció de la longitud d'ona a la que es determina la concentració de substrat en base a la seva absortivitat, s'enregistra un espectre d'absorbància del substrat en un marge de longituds d'ona entre 250 i 500 nm a temperatura ambient. S'escull aquella longitud d'ona a la que l'absortivitat del substrat és màxima.

Per tal de poder determinar l'absortivitat a la longitud d'ona d'interès és precís fer solucions de concentració coneguda, a partir de les quals es determina l'absortivitat aplicant la llei de Lambert-Beer. A continuació, es realitzen les dilucions necessàries de la solució estoc per tal que la lectura d'absorbància se situï dins del marge de linealitat de l'espectrofotòmetre, entre 0.1 i 0.9 unitats d'absorbància. Si bé la determinació de l'absortivitat es pot realitzar a partir dels mateixos espectres d'UV-vis dels compostos, per tal d'evitar errors puntuals de lectura, la determinació d'absorbància es realitza amb una mostra sobre la que es realitzen addicions seriades de la solució corresponent. Així, en una cubeta de quars s'afegeix 1 mL del tampó de treball (o aigua Milli-Q) i es realitza el zero d'absorbància a les condicions d'interès ( $\lambda$ , temperatura), enfront d'una altra cubeta amb el mateix tampó (o aigua Milli-Q). A continuació s'afegeix un volum conegut de la solució problema sobre la cubeta i es realitza una lectura d'absorbància en les mateixes condicions; aquest procediment es repeteix 4 vegades més, obtenint un total de 5 lectures d'absorbància a un volum conegut. Aplicant l'equació III.5, basada en la llei de Lambert-Beer, i coneixent la concentració de la solució corresponent s'obté la seva absortivitat a partir del pendent de la recta definida en representar els diferents valors d'absorbància enfront del paràmetre  $V_{\text{afegit}} / (V_{\text{afegit}} + V_{\text{inicial}})$ .

$$Abs_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot [X] \cdot \frac{V_{\text{afegit}}}{V_{\text{afegit}} + V_{\text{inicial}}} + Abs_0 \quad \text{Equació III.5.}$$

On:

- $Abs_{\lambda}$  són les diferents determinacions d'absorbància, a la longitud d'ona escollida, a cada addició de solució problema.
- $\varepsilon_{\lambda}$  és l'absortivitat de cada compost a la longitud d'ona escollida, que és el paràmetre a determinar.
- $b$  és el recorregut òptic, en aquest cas 1 cm.
- $[X]$  és la concentració del compost en qüestió.

#### III.2.4. Metodologia per a la determinació de la concentració de la solució de substrat per espectrofotometria d'UV-vis

El substrat d'interès es dissol en aigua o en el tampó corresponent per tal d'obtenir aproximadament una solució de la concentració desitjada, i es filtra la solució a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  (III.2.2). Es determina la concentració de la solució de substrat a



partir de la seva absorbància al seu màxim d'absorció, i posterior aplicació de la llei de Lambert-Beer. Aquest mètode només és aplicable en el cas de substrats cromofòrics.

Per tal d'evitar errors puntuals de lectura, la determinació d'absorbància es realitza amb una mostra sobre la que es realitzen addicions seriadades de la solució de substrat. En una cubeta de quars s'afegeix 1 mL d'aigua Milli-Q, o tampó en què està dissolt el substrat, i es realitza el zero d'absorbància enfront d'una altra cubeta que conté el mateix a la longitud d'ona triada i a temperatura ambient. A continuació s'afegeix un volum conegut de la solució problema sobre la cubeta i es realitza una lectura d'absorbància a les mateixes condicions ( $\lambda$ , T); aquest procediment es repeteix 4 vegades més, obtenint un total de 5 lectures d'absorbància a un volum conegut. Si la solució problema és molt diluïda és possible que el volum inicial de la cubeta hagi de ser inferior a 1 mL per tal de poder obtenir lectures d'absorbància dins del marge de linealitat de l'aparell, ja que les addicions de la solució problema han de ser de volums més importants. El volum de partida ha de ser com a mínim de 0.7 mL per tal d'obtenir una bona lectura d'absorbància. El marge de linealitat de l'aparell se situa en el marge entre 0.1 i 0.9 unitats d'absorbància. Aplicant l'equació III.6, basada en la llei de Lambert-Beer, s'obté la concentració de substrat a partir del pendent de la recta definida en representar els diferents valors d'absorbància enfront del paràmetre  $V_{afegit}/(V_{afegit} + V_{inicial})$ . L'absortivitat de cada substrat es determina prèviament (III.2.3)

$$Abs_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot [S] \cdot \frac{V_{afegit}}{V_{afegit} + V_{inicial}} + Abs_0 \quad \text{Equació III.6.}$$

On:

- $Abs_{\lambda}$  són les diferents determinacions d'absorbància, a la longitud d'ona corresponent, a cada addició de solució problema.
- $\varepsilon_{\lambda}$  és l'absortivitat del substrat a la longitud d'ona escollida.
- $b$  és el recorregut òptic, en aquest cas 1 cm.

### III.2.5. Metodologia per a la determinació de la concentració d'enzim

En el present treball s'han fet servir diferents mètodes per a la determinació de la concentració d'una solució d'enzim. D'una banda s'ha fet servir la determinació de l'absorbància de la solució d'enzim a 280 nm (I.8.3), d'altra banda s'ha determinat la concentració d'enzim actiu en base als seus paràmetres cinètics, cas que aquests siguin coneguts (I.8.5), i finalment també s'ha aplicat el mètode de Bradford (I.8.4).

### III.2.6. Procediment general per al seguiment de les reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Es preparen una solució d'enzim i una altra de substrat en aigua desionitzada (ocasionalment el substrat es pot dissoldre en el tampó en el que es realitzarà la reacció enzimàtica, sobretot en el cas de ser un substrat de baixa solubilitat) i se'n determinen les concentracions (III.2.4 i III.2.5). S'addicionen a les diferents cubetes de quars les quantitats adients de 2 x tampó citrat/fosfat pH 7.2, solució de substrat, solució 10 mM de  $CaCl_2$  i aigua desionitzada, de manera que en afegir posteriorment l'enzim

s'assoleixin les condicions desitjades en un volum final d'un mL. Es treballa a una concentració de  $\text{CaCl}_2$  a la mescla de reacció de 0.1 mM. Per tal de definir una cinètica de Michaelis-Menten són necessàries com a mínim sis mesures de velocitat a sis concentracions de substrat diferents que compreguin la zona lineal inicial, la zona de saturació i la zona intermèdia. S'incuben les diferents cubetes a la temperatura a la que es realitza posteriorment la cinètica durant 5 minuts al mateix espectrofotòmetre, i es fa un zero d'absorbància a la longitud d'ona adient. S'addiciona l'enzim i s'homogeneïtza per inversió, es tornen les cubetes a l'espectrofotòmetre i es comença el seguiment de les cinètiques en continu a les condicions triades. L'adquisició de dades es perllonga durant un període de temps tal, que permeti posteriorment una bona determinació de la velocitat inicial de reacció (variació d'absorbància mínima 0.1 unitats d'absorbància). Abans de realitzar les cinètiques amb cada nou substrat és recomanable realitzar unes quantes cinètiques a concentració única de substrat i diferents concentracions d'enzim, per tal de determinar una concentració d'enzim adequada per a la caracterització posterior de la reacció.

Paral·lelament a la determinació de la cinètica de la reacció enzimàtica és important determinar la velocitat d'hidròlisi espontània del substrat a les mateixes condicions emprades en la reacció enzimàtica. Amb aquesta finalitat s'addicionen a diferents cubetes de quars les quantitats adients de 2 x tampó citrat/fosfat pH 7.2, solució de substrat, solució 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  i aigua desionitzada fins assolir un volum final d'un mL, i una concentració de substrat diferent a cada cubeta. La concentració de  $\text{CaCl}_2$  a la mescla de reacció és la mateixa que en la reacció enzimàtica, de 0.1 mM. S'homogeneïtza per inversió, s'incuben les diferents cubetes a la temperatura a la que es realitza posteriorment la cinètica durant 5 minuts al mateix espectrofotòmetre, i es fa un zero d'absorbància a la longitud d'ona adient. A continuació, s'inicia el seguiment de la hidròlisi del substrat en continu a les condicions triades. Donat que la hidròlisi espontània del substrat mostra una dependència lineal amb la concentració de substrat, no és necessari que es determini a les mateixes concentracions a les que es realitza la cinètica enzimàtica. N'hi ha prou amb determinar la velocitat d'hidròlisi a cinc concentracions de substrat diferents, i a ser possible, és recomanable que cobreixin el mateix marge de concentracions que es fa servir per tal de descriure la cinètica enzimàtica.

El tractament de dades posterior implica, tant en el cas de la cinètica enzimàtica com en el de la hidròlisi espontània del substrat, el traspàs de les dades obtingudes en l'espectrofotòmetre a un programa que permeti manipular-les. En aquest es determina la velocitat de reacció per ajust del pendent de la recta de variació d'absorbància al llarg del temps, a cada concentració de substrat. En el cas de les cinètiques d'hidròlisi espontània de substrat la velocitat d'hidròlisi s'ajusta a una línia recta. En el cas de les cinètiques en presència d'enzim, si bé no és el més freqüent, és possible que en els moments inicials s'observi un retardament o una fase d'acumulació de producte, en aquest cas, el valor de velocitat s'obté a partir de la zona lineal de la cinètica. Per tal de transformar el valor de velocitat obtingut (en  $\text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a unitats de velocitat de formació del producte d'hidròlisi ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), es divideix el valor de velocitat per la variació d'absortivitat determinada anteriorment per al producte en concret, a les condicions de reacció emprades. Finalment la divisió d'aquest valor per la concentració d'enzim emprada permet obtenir el valor de  $v_0/[E]_0$  en unitats de  $\text{s}^{-1}$ . És recomanable que, a una mateixa concentració de substrat, la velocitat espontània d'hidròlisi sigui com a mínim dos ordres de magnitud inferior a la velocitat d'hidròlisi enzimàtica, de manera que es

pugui considerar menyspreable. Si la velocitat d'hidròlisi del substrat és elevada, és aconsellable variar les condicions de reacció per tal de minimitzar-la. En tot cas, s'ha de determinar el seu valor, i ja que la velocitat que es determina en presència d'enzim, és un sumatori de la velocitat d'hidròlisi enzimàtica i la velocitat d'hidròlisi espontània, el valor de la velocitat d'hidròlisi espontània s'ha de substraure del valor de la velocitat d'hidròlisi obtingut en presència d'enzim. Per tal de determinar el valor de la velocitat d'hidròlisi espontània de substrat a una concentració concreta només s'ha de realitzar una interpolació a la recta de velocitat d'hidròlisi enfront de la concentració de substrat.

Finalment, s'ajusta a les dades de velocitat d'hidròlisi enzimàtica a diferents concentracions de substrat l'equació enzimàtica més adequada en cada cas. En el cas de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, aquesta sol ser l'equació de Michaelis-Menten, amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, equacions III.7 i III.8 respectivament, obtenint d'aquesta manera els paràmetres cinètics que descriuen la reacció.

$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]}{K_I}} \quad \text{Equació III.7.}$$

$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equació III.8.}$$

### III.2.7. Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH

#### Fonament

La determinació dels  $pK_a$  cinètics dels dos residus essencials implicats en catàlisi en una glicosidasa passa per la realització d'un perfil de la seva activitat catalítica en funció del pH del medi. A més, per tal de poder avaluar l'efecte provocat per la mutació d'un residu sobre aquests  $pK_a$  cinètics, és recomanable realitzar en el mateix experiment un perfil d'activitat enfront del pH tant per a l'enzim salvatge com per al mutant en estudi. En el cas de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* els  $pK_a$  cinètics obtinguts d'aquesta manera s'assignen al nucleòfil, el Glu134, i al residu que actua com a àcid general, el Glu138. És important assegurar que l'enzim en estudi és estable al llarg de tot el marge de pH estudiat a les condicions emprades en les reaccions. Per tal de verificar-ho s'incuba l'enzim a les condicions desitjades i a diferents intervals de temps (que cobreixin la totalitat de temps al què se segueix la reacció d'hidròlisi als diferents pH) s'avalua la seva activitat.

A partir dels paràmetres de  $k_{cat}$  i  $k_{cat}/K_M$  obtinguts en els ajusts de l'equació de Michaelis-Menten (amb inhibició acompetitiva per substrat en els casos en què és més adequada) als diferents pH, s'obtenen els  $pK_a$  cinètics establint la relació entre els paràmetres cinètics i el pH per regressió no-lineal, aplicant l'equació III.9.

$$Y = \frac{Y_{\text{lim}}}{1 + 10^{(pK_{a1} - pH)} + 10^{(pH - pK_{a2})}} \quad \text{Equació III.9.}$$

Y: paràmetre cinètic ( $k_{\text{cat}}$  o  $k_{\text{cat}}/K_M$ )

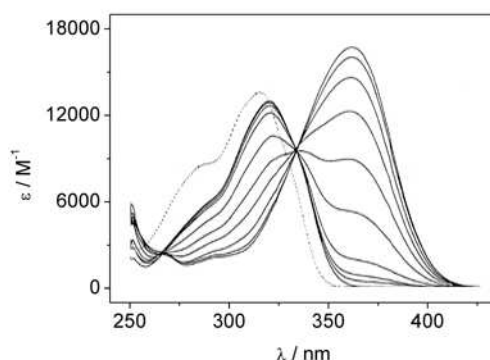
$Y_{\text{lim}}$ : constant, valor màxim del paràmetre cinètic

$pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ : valors dels  $pK_a$  cinètics generalment assignables als dos residus catalítics essencials.

### Procediment

Per tal de realitzar un perfil de pH d'una activitat enzimàtica és recomanable fer servir un tampó que cobreixi tot el marge de pH d'estudi. S'ha de tenir present que en variar el pH d'un tampó també varia la seva força iònica, per tal de mantenir-la constant i que l'única variable que canviï sigui el pH del tampó, s'afegeix una sal externa a una concentració tal, que permeti mantenir una força iònica constant. En l'elecció del tampó s'ha d'escollir per tant un tampó que cobreixi tot el marge de pH d'estudi i la força iònica del qual no sigui massa elevada a pH bàsic, de forma que la força iònica ajustada no hagi de ser molt gran. Les cinètiques amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es realitzen en tampó 11 mM fosfat, 11 mM citrat, amb 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , i una força iònica ajustada a 0.1 M per addició de KCl.

El perfil s'obté realitzant una cinètica completa (amb mesura d'hidròlisi espontània del substrat inclosa) a cada pH (III.2.6). Ara bé, s'ha de tenir present que l'absortivitat de l'aglicona varia en funció del seu estat de ionització, i que aquest és funció del pH. Per tant abans d'iniciar l'estudi enzimàtic s'ha d'escollir la longitud d'ona adient per al seguiment de la reacció i l'absortivitat de l'aglicona (III.2.3) als diferents pH. A mode d'exemple a la figura III.1 es mostren els espectres d'absorbància de la 4-metilumbel·liferona (línies contínues) i del substrat G4G3G-MU (línia puntejada) en un marge de pH des de 5 a 10.3 [223]. L'absorbància del substrat, amb un màxim d'absorbància a 316 nm, és independent del pH a diferència del que succeeix amb la 4-metilumbel·liferona, per a la que els pics a 320 nm i 362 nm corresponen als màxims d'absorbància en les seves formes no ionitzada i ionitzada, respectivament. A mesura que augmenta el pH, el pic a 320 nm va perdent intensitat a favor del pic a 362 nm.



**Figura III.1.** Espectres d'absorbància de la 4-metilumbel·liferona (línies contínues) i del substrat G4G3G-MU (línia puntejada) a diferents pH. Els espectres corresponen a un marge de pH des de 5.0 a 10.3, a 53 °C [223]. A mesura que augmenta el pH el pic a 362 nm, corresponent a la forma ionitzada de la 4-metilumbel·liferona, pren rellevància enfront del pic a 320 nm, corresponent a la forma no-ionitzada.

En base a la dependència observada a la figura III.1, en anteriors treballs a l'equip s'ha fixat que treballant amb el substrat G4G3G-MU, les reaccions d'hidròlisi s'han de seguir a una longitud d'ona de 355 nm per sota de pH 7.0 i a 365 nm a pH 7.0 o superiors.

### III.2.8. Determinació de la constant d'inhibició, $K_I$

Amb la finalitat d'obtenir unes gràfiques de Dixon ( $1/v_0$  enfront de  $[I]$ ) o bé de Lineweaver-Burk ( $1/v_0$  enfront de  $1/[S]$ ) representatives del comportament de l'inhibidor, se seleccionen una sèrie de concentracions de substrat de manera que la diferència entre els diferents valors  $1/[S]$  sigui constant. A continuació, per a cada concentració de substrat es realitzen diferents cinètiques a diferents concentracions d'inhibidor, de manera que l'increment en la concentració del mateix també sigui constant.

#### Procediment

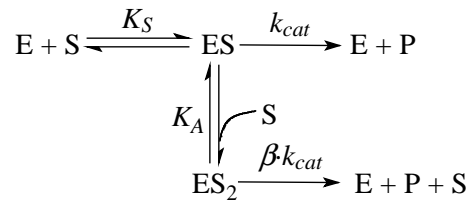
Es preparen una solució d'enzim, una altra de substrat i una tercera d'inhibidor en aigua desionitzada. Si la concentració requerida d'inhibidor o substrat és molt elevada, i la limitada solubilitat dels mateixos fa difícil l'obtenció d'una solució estoc en aigua de la concentració adient, es dissolen directament en el tampó en el que es realitzen les cinètiques. Es verifica la concentració de la solució d'enzim i de substrat (III.2.4 i III.2.5). S'addicionen a les diferents cubetes de quars les quantitats adients de 2 x tampó citrat/fosfat, solució de substrat, solució d'inhibidor, solució 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ , i aigua desionitzada, de manera que en afegir posteriorment l'enzim s'assoleixin les condicions desitjades en un volum final d'un mL. Es treballa a una concentració de  $\text{CaCl}_2$  a la mescla de reacció de 0.1 mM. S'incuben les diferents cubetes a la temperatura a la que es realitza posteriorment la cinètica durant 5 minuts al mateix espectrofotòmetre, i es fa un zero d'absorbància a la longitud d'ona adient. S'addiciona l'enzim i s'homogeneïtza per inversió, es tornen les cubetes a l'espectrofotòmetre i es comença el seguiment de les cinètiques en continu a les condicions triades. L'adquisició de dades es perllonga durant un període de temps tal, que permeti posteriorment una bona determinació de la velocitat de reacció (variació d'absorbància mínima 0.1 unitats d'absorbància). Paral·lelament a la determinació de la cinètica michaeliana és important determinar la velocitat d'hidròlisi del substrat (sense inhibidor) a les mateixes condicions emprades per a la cinètica enzimàtica.

El tractament de dades es realitza de la mateixa manera que en les cinètiques sense inhibidor (III.2.6). Finalment, i en base a les representacions gràfiques obtingudes, s'ajusta el model de Michaelis-Menten amb la inhibició corresponent, a través d'una regressió lineal multivariable, a les dades de velocitat d'hidròlisi enzimàtica a diferents concentracions de substrat i inhibidor. En el present treball s'ha emprat la corresponent aplicació del programa OriginPro. En el cas de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, l'inhibidor G4G3G presenta un tipus d'inhibició competitiva, de manera que s'ajusta l'equació III.10:

$$\frac{[E]_0}{v_0} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_M}{k_{cat}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{K_M}{k_{cat} \cdot K_I} \cdot \frac{[I]}{[S]} \quad \text{Equació III.10.}$$

que es pot escriure com  $Y = a_0 + a_1 \cdot X_1 + a_2 \cdot X_2$ , i d'on la  $K_I$  s'obté dividint la constant  $a_2$  per  $a_1$ .

En les cinètiques a pH 3.0 s'observa activació no essencial, d'acord amb el model que es mostra a continuació. L'ajust d'aquest model a les dades es realitza a través d'una regressió lineal multivariable, aplicant l'equació III.11:

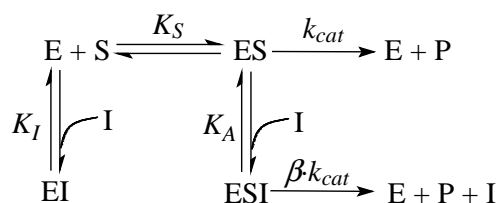


$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [S] + \frac{k_{cat} \cdot \beta}{K_M \cdot K_A} \cdot [S] \cdot [I] - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] - \frac{1}{K_M \cdot K_A} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] \cdot [I]$$

Equació III.11.

que es pot simplificar com  $Y = a_0 + a_1 \cdot X_1 + a_2 \cdot X_2 + a_3 \cdot X_3 + a_4 \cdot X_4$ , i d'on la  $K_A$  s'obté dividint la constant  $a_3$  per  $a_4$ .

Aquest darrer model és una simplificació del model d'inhibició competitiva + activació no essencial que es mostra a continuació. L'ajust a les dades al model complet es realitza a través d'una regressió lineal multivariable aplicant l'equació III.12.



$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [S] + \frac{k_{cat} \cdot \beta}{K_M \cdot K_A} \cdot [S] \cdot [I] - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] - \frac{1}{K_M \cdot K_A} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] \cdot [I] - \frac{1}{K_I} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [I]$$

Equació III.12.

que es pot escriure com  $Y = a_0 + a_1 \cdot X_1 + a_2 \cdot X_2 + a_3 \cdot X_3 + a_4 \cdot X_4 + a_5 \cdot X_5$ , i d'on la  $K_A$  s'obté dividint la constant  $a_3$  per  $a_4$  i la  $K_I$  és l'invers del paràmetre  $a_5$ .

### III.3. Reaccions d'hidròlisi del $\beta$ -glucà d'ordi catalitzades per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Per tal de determinar els paràmetres cinètics de la hidròlisi de  $\beta$ -glucà amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* se segueix la reacció en discontinu, fent servir el mètode d'assaig d'extrems reductors de Somogyi-Nelson [375, 376]. Durant la reacció d'hidròlisi del  $\beta$ -glucà es generen nous extrems reductors, que es valoren amb el reactiu de Somogyi per reducció del  $\text{Cu}^{2+}$  present al reactiu a  $\text{Cu}^+$ . Seguidament, en presència del reactiu de Nelson el  $\text{Cu}^+$  és reoxidat amb l'arsenomolibdat amònic generant les coloracions blavenques corresponents al blau de molibdè, que respon a barreges de  $\text{Mo}^{6+}/\text{Mo}^{5+}$ , l'absorbància del qual es mesura a 720 nm. S'han de prendre diferents alíquotes de reacció que descriguin la velocitat inicial d'hidròlisi, és a dir, en què la variació d'absorbància al llarg del temps sigui lineal, ja que s'hagi consumit menys d'un 10% del substrat.

#### Solucions necessàries

- *Solució 10 mM CaCl<sub>2</sub>*: es dissol  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.146 g, 1 mmol) en aigua Milli-Q (100 mL). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *2 x Tampó fosfat (60 mM) pH 7.2*: es dissol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.296 g, 10.8 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (1.504 g, 4.2 mmol) en aigua Milli-Q (200 mL), i s'ajusta el pH a 7.2 a la temperatura a la que es durà a terme la reacció enzimàtica (30 °C) amb una solució 0.1 M d'HCl. Es deixa refredar fins a temperatura ambient, s'enrassa a 250 mL amb aigua Milli-Q i es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$ . Es guarda a 4 °C.

- *Solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa*: es resuspèn una fracció liofilitzada d'enzim en el volum desitjat d'aigua Milli-Q a 0 °C. Es reparteix la solució en tubs d'Eppendorf per tal de centrifugar-la a 13500 rpm durant 2 minuts. El sobrenedant es transfereix a un altre tub i es repeteix aquesta etapa tantes vegades com sigui necessari per tal d'obtenir una solució d'enzim sense terbolesa. Es conserva a 4 °C.

- *Solució 13.3 g/L de  $\beta$ -glucà*: Es dissol  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat mitjana (1 g, Megazyme, 225 kDa; viscositat de la solució 1% p/v 21.1 cSt) en aigua Milli-Q (75 mL) a una temperatura de 60-70 °C, i amb ajut d'ultrasons. Es deixa refredar fins a temperatura ambient. La solució estoc de  $\beta$ -glucà es pot preparar també emprant el tampó de treball com a dissolvent. Aquesta mesura és interessant quan s'han de fer servir concentracions elevades d'aquest substrat en la reacció amb l'enzim.

- *Solució 10 mM de glucosa*: es dissol glucosa (180.2 mg, 1 mmol) en aigua Milli-Q (0.1 L). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- *Reactiu de Somogyi*: es mesclen les solucions A i B i es deixa reposar a les fosques durant 24 hores. Es filtra el reactiu a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a temperatura ambient protegit de la llum fins a un mes com a màxim, o fins que aparegui algun precipitat. S'ha de preparar el reactiu com a mínim 24 hores abans de la seva utilització.

Solució A: es dissolen tartrat sòdic potàssic tetrahidratat (3 g, 11 mmol),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidre (6 g, 57 mmol),  $\text{NaHCO}_3$  anhidre (4 g, 48 mmol) i  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidre (36 g, 253 mmol) en aigua desionitzada i desgasificada (200 mL).

Solució B: es dissolen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidre (9 g, 63 mmol) i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.28 g, 5.13 mmol) en aigua desionitzada i desgasificada (50 mL).

- *Reactiu de Nelson*: es mesclen les solucions C i D i s'agita a 37 °C durant 24 hores, preservant la mescla de la llum. Es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a temperatura ambient protegit de la llum fins a un mes com a màxim.

Solució C: es dissol  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (13.28 g, 10.75 mmol) en aigua desionitzada i desgasificada (225 mL), i s'afegeix  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrat (10.5 mL, 197 mmol).

Solució D: es dissol  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.5 g, 4.8 mmol) en aigua desionitzada i desgasificada (12.5 mL).

### Procediment

Es preparen una solució d'enzim i una altra de  $\beta$ -glucà en aigua desionitzada i es determina la concentració de la solució enzimàtica (III.2.5). Es realitza una cinètica de Michaelis-Menten completa treballant amb un marge tal de concentracions de  $\beta$ -glucà que permeti descriure tota la cinètica. Per a cada concentració de  $\beta$ -glucà es realitzen 4 reaccions enzimàtiques que s'aturen a diferents temps per tal d'avaluar-ne la concentració d'extrems reductors generats, i conseqüentment, la velocitat d'hidròlisi. Es preparen doncs, quatre tubs d'hemòlisi en què s'afegeix el tampó fosfat 2x (250 µL), el volum desitjat de la solució estoc de  $\beta$ -glucà, la solució 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  (5 µL) i el volum corresponent d'aigua Milli-Q, tenint en compte que quan posteriorment s'addicioni l'enzim, el volum total de la reacció sigui de 500 µL. Es preincuben 5 min a la temperatura de reacció (30 °C). S'afegeix l'enzim, i es deixa reaccionar a 30 °C durant diferents temps, passats els quals, es realitza l'assaig de Somogyi-Nelson. Les condicions a les que es realitza aquest assaig són suficients per tal d'aturar la reacció enzimàtica d'immediat. S'enretira el tub del bany a 30 °C, s'afegeix el reactiu de Somogyi (500 µL), s'agita breument i s'escalfa el tub de reacció tapat a 100 °C durant 10 minuts. Passats els 10 minuts, es deixen refredar les mostres tapades fins a temperatura ambient fora del bany, s'addiciona el reactiu de Nelson (500 µL), s'agita amb vòrtex i s'homogeneïtza per inversió. Es deixa reposar fins que s'aturi l'evolució de  $\text{CO}_2$ . La solució resultant se centrifuga a 13500 rpm durant 3 min i es procedeix a la lectura d'absorbància a 720 nm, realitzant dilucions de la mostra en cas de ser necessari, per tal de no saturar l'espectrofotòmetre. El zero d'absorbància es realitza per lectura de l'absorbància del blanc de  $\beta$ -glucà (concentració de glicòsid = 0) enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.2. El blanc de  $\beta$ -glucà es tracta com les altres mostres, afegint aigua Milli-Q en comptes de substrat. A cada concentració de  $\beta$ -glucà es realitza també un blanc d'enzim, en el que se segueix el mateix procediment que amb les mostres però afegint aigua Milli-Q, en comptes d'enzim. El blanc de  $\beta$ -glucà i els diferents blancs d'enzim, es mantenen a la temperatura de reacció (30 °C) durant el temps màxim que dura la cinètica (a les determinacions realitzades en la present tesi generalment 60 min). La lectura de l'absorbància dels diferents blancs d'enzim és una mesura de la quantitat d'extrems reductors presents a la mostra de reacció en què no es dona hidròlisi enzimàtica del substrat.

Es prepara una recta patró de glucosa de concentracions entre 1 i 5 mM, en tampó fosfat 30 mM pH 7.2, per dilució d'una solució estoc d'aquest sucre de concentració 10 mM. Els tubs d'hemòlisi amb les diferents dilucions (500 µL) es preincuben a 30 °C durant 5 minuts, i a continuació es realitza l'assaig de Somogyi-Nelson.

Una vegada obtinguts els valors d'absorbància a 720 nm de les mostres de reacció, aquests es representen enfront del temps de reacció (corregint l'efecte de la dilució), per



a cada concentració de  $\beta$ -glucà, per tal d'obtenir una recta de velocitat inicial de reacció en  $\mu\text{A}\cdot\text{min}^{-1}$ . Per interpolació del pendent obtingut en la recta patró de glucosa, s'expressa la velocitat de reacció en concentració equivalent de glucosa- $\text{min}^{-1}$ . Variant les unitats de temps i dividint per la concentració d'enzim, s'obtenen finalment els valors de  $v_0/[E]_0$ , en  $\text{s}^{-1}$ . A partir d'aquests valors a cada concentració de  $\beta$ -glucà, s'ajusta l'equació de Michaelis-Menten (equació III.8).

### **III.4. Estudi de mètodes per al seguiment de la reacció d'hidratació del glicol 56 per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis***

Per tal d'obtenir resultats reproduïbles i representatius de la cinètica d'hidratació enzimàtica del glicol G4G3G' (**56**) s'estudien diferents mètodes d'anàlisi de glicòsids no cromofòrics. Entre els mètodes descrits a la bibliografia que s'han aplicat al seguiment de la reacció d'hidratació de glicals, hi ha mètodes tan diverses com la utilització d'assaigs acoblats amb glucosa oxidasa [299, 300] o galactosa deshidrogenasa [298], determinació d'extrems reductors [312] o cromatografia [302, 303, 313]. La utilització d'assaigs acoblats es descarta en el cas de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa donada la configuració del producte d'hidratació, que no és un substrat directe per a un assaig acoblat. Així doncs s'analitzen els mètodes d'extrems reductors i el seguiment de la reacció per HPLC. Es podria pensar també en  $^1\text{H}$ -RMN, que és el mètode emprat per determinar el curs estereoquímic de la reacció, tot i així es considera que la sensibilitat d'aquest procediment, de l'ordre d'1 mM de 2-desoxitrisacàrid **88**, pot resultar insuficient per al seguiment de la cinètica de reacció.

#### **III.4.1. Avaluació de mètodes de determinació d'extrems reductors per al seguiment de la reacció d'hidratació de glicals**

Generalment els mètodes de determinació d'extrems reductors solen estar referits a rectes patrons de glucosa, sucre amb el que solen donar bons resultats dins dels marges de linealitat del mètode. Es tracta de mètodes colorimètrics, en què es mesura el canvi d'absorbància lligat al canvi en l'estat d'oxidació d'un cromòfor, en reaccionar amb el sucre. Abans de fer efectiva l'aplicació d'alguns d'aquests mètodes per al seguiment de la reacció d'hidratació de glicals, s'ha d'avaluar la idoneïtat dels mateixos en el cas de mesurar el poder reductor de 2-desoxisucres, que és el producte de la reacció d'interès. Amb aquest propòsit, i per tal de treballar també amb un compost de referència que asseguri la correcta aplicació del mètode, es realitzen una sèrie de determinacions assajant el poder reductor tant de la glucosa, com de la 2-desoxiglucosa. Ja que la finalitat de l'estudi és la d'avaluar una cinètica completa a diferents concentracions de glicol, el marge de concentracions de sucres assajat se centra en les concentracions més baixes per tal de definir el límit de detecció del mètode. Així doncs, prenent com a referència la constant d'inhibició del glicol G4G3G' per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa que és de 25.8 mM a 55 °C i pH 7.2, i considerant que en disminuir la temperatura generalment augmenta l'afinitat enzim-lligand, i que la velocitat inicial d'hidròlisi es mesura fins aproximadament un 10% de conversió del substrat, s'estudia el marge entre 0 i 1 mM de 2-desoxiglucosa.

A la bibliografia consultada s'observa la utilització d'un mètode de determinació d'extrems reductors per al seguiment de la hidratació d'un glicol, que es basa en la mesura d'absorbància a 690 nm del ferrocianur fèrric en medi bàsic format per reducció del ferricianur del reactiu per acció del sucre [522]. En el present treball s'assaja una adaptació del mateix, en què s'estudia directament la reducció del ferricianur en medi bàsic (desaparició del ferricianur) a 420 nm. Els altres dos mètodes assajats són dos dels mètodes d'anàlisi d'extrems reductors més emprats, i dels que es disposa de gran experiència al Laboratori de Bioquímica. El mètode de Somogyi-Nelson i el de l'àcid 3,5-dinitrosalicílic (DNS) [523], en què se segueix a una longitud d'ona de 530 nm o superior la reducció d'aquest àcid en presència de sucres reductors, en medi bàsic i amb calefacció. Aquest mètode va ser estudiat a la secció de Bioquímica, i la metòdica de treball emprada es basa en les conclusions obtingudes en aquest treball anterior [223].

#### III.4.1.1. Assaig d'extrems reductors de Somogyi-Nelson

##### *Solucions necessàries*

- *Reactiu de Somogyi*: veure III.3.
- *Reactiu de Nelson*: veure III.3.
- *Tampó fosfat 30 mM pH 7.0*: es dissol  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (648 mg, 5.4 mmol) i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (752 mg, 2.1 mmol) en aigua Milli-Q (200 mL), i s'ajusta el pH a 7.0 amb una solució 0.1 M d'HCl. S'enrassa a 250 mL amb aigua Milli-Q i es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$ . Es guarda a 4 °C.
- *Solució 10 mM de glucosa en tampó fosfat*: es dissol glucosa (180.2 mg, 1 mmol) en tampó fosfat 30 mM pH 7.0 (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.
- *Solució 10 mM de 2-desoxiglucosa en tampó fosfat*: es dissol 2-desoxiglucosa (164.2 mg, 1 mmol) en tampó fosfat 30 mM pH 7.0 (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

##### *Procediment*

Es prepara una recta patró de glucosa i una de 2-desoxiglucosa de concentracions entre 0 i 1 mM, en tampó fosfat 30 mM pH 7.0, per dilució d'una solució estoc d'aquests sucres de concentració 1 mM. Aquest estoc es prepara el mateix dia que es fa servir, per dilució d'una solució estoc 10 mM de glucosa o 2-desoxiglucosa, que es conserva a 4 °C. Els tubs d'assaig amb les diferents dilucions (500  $\mu\text{L}$ ) es preincuben en un bany d'aigua a 55 °C durant 5 minuts, i a continuació s'afegeix reactiu de Somogyi (500  $\mu\text{L}$ ), i s'escalfen tapats a 100 °C durant 10 minuts. Es deixen refredar tapats fins a temperatura ambient fora del bany i s'addiciona el reactiu de Nelson (500  $\mu\text{L}$ ), s'agita amb vòrtex i s'homogeneïtza per inversió. Es deixa reposar fins que s'aturi l'evolució de  $\text{CO}_2$ . S'afegeix aigua desionitzada i desgasificada (1.5 mL), es mescla bé i es determina l'absorbància a 720 nm. El zero d'absorbància es realitza per lectura de l'absorbància del blanc (concentració de sucre = 0) enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

### III.4.1.2. Assaig d'extrems reductors emprant àcid 3,5-dinitrosalicílic (DNS)

#### *Solucions necessàries*

- *Reactiu de DNS*: Sobre una suspensió d'àcid 3,5-dinitrosalicílic (1.68 g, 7.40 mmol) en aigua desionitzada (110 mL) s'addiciona una solució 2 M de NaOH (60 mL, 0.12 mol). S'agita fins a dissolució completa i s'addiciona una solució de tartrat sòdic potàssic tetrahidratat (50 g, 0.177 mol) en aigua desionitzada (125 mL). S'homogeneïtza, es filtra el reactiu a través d'un filtre de 0.45 µm, i es conserva a temperatura ambient protegit de la llum.
- *Tampó fosfat 30 mM pH 7.0*: veure III.4.1.1.
- *Solució 10 mM de glucosa en tampó fosfat*: veure III.4.1.1.
- *Solució 10 mM de 2-desoxiglucosa en tampó fosfat*: veure III.4.1.1.

#### *Procediment*

Es prepara una recta patró de glucosa i una de 2-desoxiglucosa de concentracions entre 0 i 1 mM, en tampó fosfat 30 mM pH 7.0, per dilució d'una solució estoc d'aquests sucres de concentració 1 mM. Aquest estoc es prepara el mateix dia que es fa servir, per dilució d'una solució estoc 10 mM de glucosa o 2-desoxiglucosa, que es conserva a 4 °C. Els tubs d'assaig amb les diferents dilucions (500 µL) es preincuben en un bany d'aigua a 55 °C durant 5 minuts, i a continuació s'afegeix reactiu de DNS (500 µL), i s'escalfen tapats a 100 °C durant 10 minuts. Es deixen refredar tapats fora del bany fins a temperatura ambient; si la mostra és molt concentrada s'afegeix aigua desionitzada, per tal de diluir-la, i s'homogeneïtza per inversió. Es determina l'absorbància a 530 nm. El zero d'absorbància es realitza per lectura de l'absorbància del blanc ([sucre] = 0) enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

### III.4.1.3. Assaig d'extrems reductors emprant ferricianur potàssic en medi bàsic

#### *Solucions necessàries*

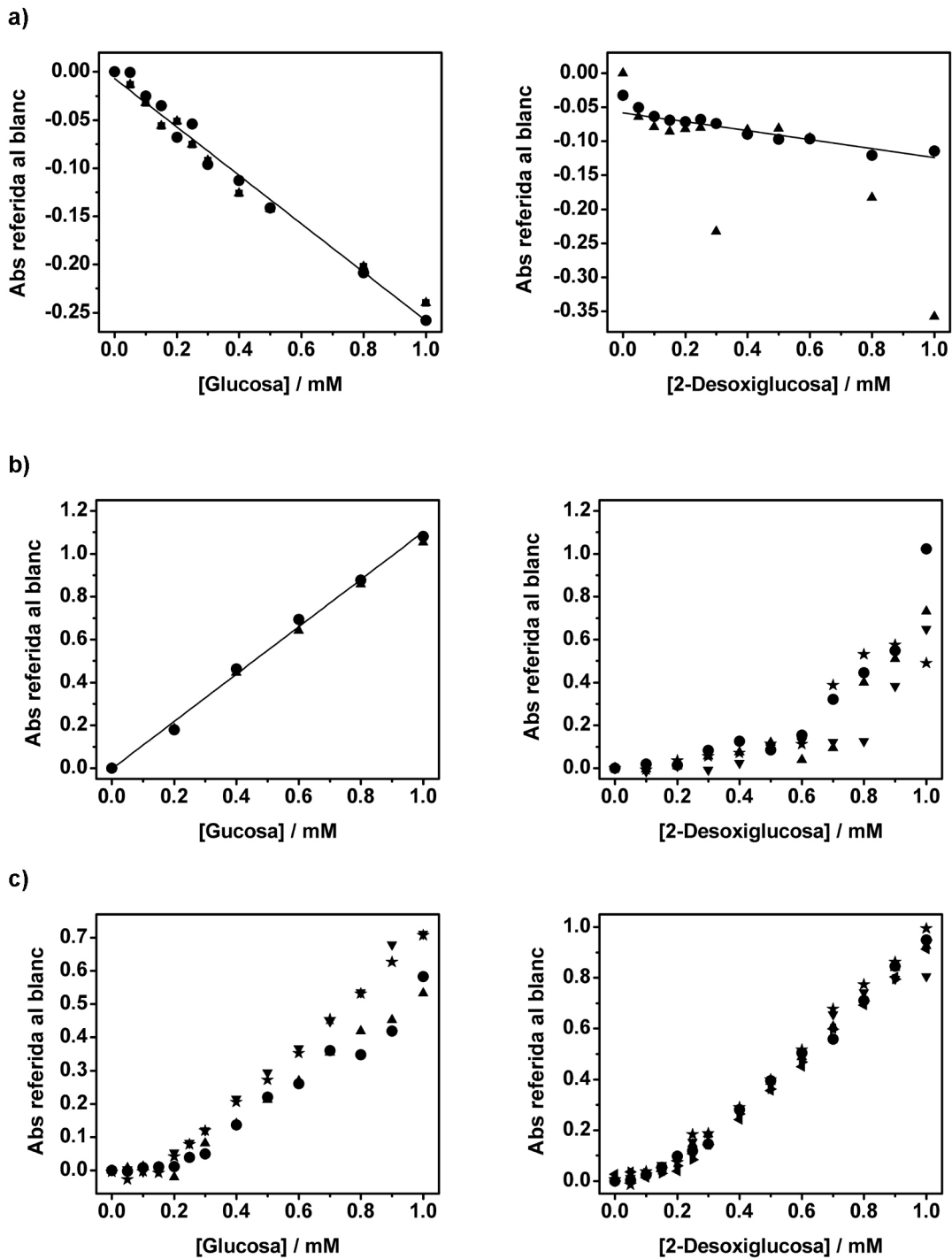
- *Reactiu oxidant*: Es dissol  $K_3Fe(CN)_6$  (150 mg, 0.46 mmol) i  $Na_2CO_3$  (10 g, 94 mmol) en aigua desionitzada (450 mL) i s'ajusta el pH a 11 amb una solució 1 M de NaOH. S'enrassa a 500 mL amb aigua desionitzada, es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm, i es conserva a temperatura ambient protegit de la llum.
- *Tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2*: es dissolen àcid cítric (0.635 g, 3.25 mmol) i  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (15.579 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es comprova que el pH és 7.2. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'enrassa a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C.
- *Solució 10 mM de glucosa en tampó citrat/fosfat*: es dissol glucosa (450.4 mg, 2.5 mmol) en tampó citrat/fosfat pH 7.2 (250 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C.
- *Solució 10 mM de 2-desoxiglucosa en tampó citrat/fosfat*: es dissol 2-desoxiglucosa (164.2 mg, 1 mmol) en tampó citrat/fosfat pH 7.2 (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C.

### *Procediment*

Es prepara una recta patró de glucosa i una de 2-desoxiglucosa de concentracions entre 0 i 1 mM, en tampó citrat/fosfat pH 7.2, per dilució d'una solució estoc d'aquests sucres de concentració 1 mM. Aquest estoc es prepara el mateix dia que es fa servir per dilució d'una solució estoc 10 mM de glucosa o 2-desoxiglucosa, que es conserva a 4 °C. Als tubs d'assaig amb les diferents dilucions (100 µL) s'afegeix reactiu oxidant (2 mL), i s'escalfen tapats a 100 °C en un bany d'aigua durant 7 minuts. Es deixen refredar tapats fora del bany fins a temperatura ambient, i es determina l'absorbància a 420 nm. El zero d'absorbància es realitza per lectura de l'absorbància del blanc (concentració de sucre = 0) enfront d'aigua desionitzada.

#### III.4.1.4. *Avaluació dels resultats dels mètodes de determinació d'extrems reductors*

A la figura III.2 es mostren els resultats obtinguts en l'aplicació d'aquests mètodes tant en el cas de la glucosa com en el cas de la 2-desoxiglucosa. Pel que fa a la glucosa es comprova que tant el mètode del ferricianur (a), com el mètode de Somogyi-Nelson (b), donen una resposta lineal enfront de la concentració de glucosa en el marge estudiat, amb pendents de  $-0.25$  i  $1.11$ , respectivament, mentre que el mètode de l'àcid 3,5-dinitrosalicílic (c) no mostra una resposta lineal fins a una concentració intermèdia del marge de concentracions estudiades. Aquests resultats concorden amb els descrits a la bibliografia en què s'arriba a la conclusió que el mètode del DNS és menys sensible que el mètode de Somogyi-Nelson [524]. En quant a la determinació de 2-desoxiglucosa es comprova que l'únic mètode que és lineal dins del marge de concentracions estudiades és el del ferricianur, però la baixa sensibilitat del mètode, amb un pendent de  $-0.07$ , i la gran dispersió dels resultats en algunes determinacions no el fan gaire recomanable. De fet, en l'aplicació d'aquesta mètode a la determinació de la concentració de 2-desoximaltosa [312] ja es dona una pista de la manca de repetibilitat del mètode, quan s'esmenta que les determinacions es realitzen per triplicat. El mètode de Somogyi-Nelson no mostra dependència amb la concentració de 2-desoxiglucosa fins concentracions bastant elevades dins del marge d'estudi, i inclús per a aquestes concentracions, i a diferència del que ocorre en el cas de la glucosa, els resultats no són gaire repetitius. El mètode del DNS mostra una resposta davant de la 2-desoxiglucosa molt similar a la que dona enfront de la glucosa, millorant la repetibilitat en el cas del primer. Aquesta repetibilitat en els resultats és la que decantaria la balança cap a la utilització d'aquest mètode, per al que s'ha determinat un límit de detecció de  $10\ \mu\text{M}$ , i un marge de linealitat que, acceptant una variació del 15% en el factor de resposta, se situaria a partir de  $0.3\ \text{mM}$ . Aquest resultat suposa una millora sobre la determinació per  $^1\text{H-RMN}$ , ara bé, donat que la resposta en el mètode de DNS és dependent del grau de polimerització del sucre [223], s'hauria de realitzar un estudi similar sobre el 2-desoxitrisacàrid **69**, resultant de la hidratació del glical G4G3G'.



**Figura III.2.** Rectes patrons de glucosa i desoxiglucosa en un marge de 0 a 1 mM de sucre fent servir els mètodes de determinació d'extremes reductors de (a) ferricianur potàssic, (b) Somogyi-Nelson i (c) àcid dinitrosalicílic. Els valors s'han determinat en alguns casos per duplicat i en altres per quadruplicat (indicats en els gràfics com a diferents tipus de punts), per tal de tenir una idea de la repetibilitat dels mètodes.

### III.4.2. Estudi de la reacció d'hidratació del glical 56 per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* per HPLC

Es realitza el seguiment de les reaccions d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en discontinu, per cromatografia líquida d'alta resolució en un cromatògraf HP1090, amb un detector d'índex de refracció Agilent 1100 Series, i amb el sistema d'adquisició de dades Agilent Chemstation. Les etapes seguides han estat, la determinació d'unes condicions cromatogràfiques idònies per tal de realitzar el seguiment, l'obtenció de la recta patró de glical G4G3G', la selecció d'un patró d'injecció que permeti corregir els possibles errors deguts a petites variacions en el volum d'injecció de mostra, i la comprovació que el patró d'injecció no interfereix en l'activitat enzimàtica de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

#### III.4.2.1. Solucions necessàries

- *Tampó citrat/fosfat (5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat) pH 5.0*: es dissolen àcid cítric (1.06 g, 5.5 mmol) i Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (1.97 g, 5.5 mmol) en aigua Milli-Q (900 mL) i s'ajusta el pH amb una solució 1 M d'HCl. S'enrassa a 1 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

- *2 x Tampó citrat/fosfat (13 mM citrat, 174 mM fosfat) pH 7.2*: es dissolen àcid cítric (624 mg, 3.25 mmol) i Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (15.58 g, 43.5 mmol) en aigua Milli-Q (200 mL) i es comprova que el pH és l'adiant. Si s'ha de corregir el pH es fa servir una solució d'àcid cítric per tal d'acidular i una solució 0.1 M de NaOH per tal de basificar. S'enrassa a 0.25 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

- *Solució 75 mM de G4G3G'*: es dissol G4G3G' (176.4 mg, 0.38 mmol) en aigua Milli-Q (5 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

- *Solució 10 mM CaCl<sub>2</sub>*: es dissol CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (147 g, 1 mmol) en aigua Milli-Q (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

- *Solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa*: es resuspèn una fracció liofilitzada d'enzim en el volum desitjat d'aigua Milli-Q a 0 °C. Es reparteix la solució en tubs d'Eppendorf per tal de centrifugar-la a 13500 rpm durant 2 minuts. El sobrenedant es transfereix a un altre tub i es repeteix aquesta etapa tantes vegades com sigui necessari per tal d'obtenir una solució d'enzim sense terbolesa. Es conserva a 4 °C.

- *Solució 14 mM de G4G3G-MU*: es dissol G4G3G-MU (92.8 mg, 0.14 mmol) en aigua Milli-Q (10 mL) en un bany amb control de temperatura a 40-50 °C. S'assegura la total dissolució aplicant ultrasons. La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

- *Solució 300 mM de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid*: es dissol G- $\alpha$ OMe (583 mg, 3 mmol) en aigua Milli-Q (10 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

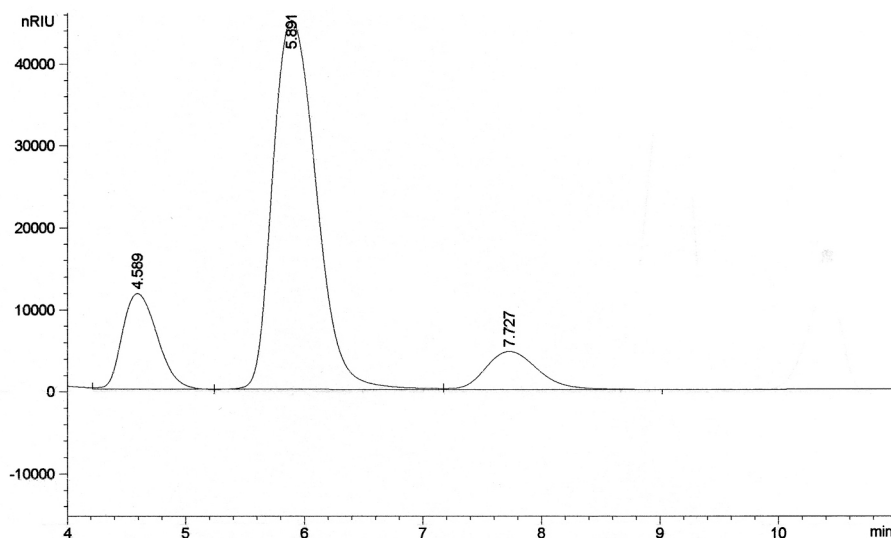
#### III.4.2.2. Avaluació del seguiment de la reacció d'hidratació de glicals per HPLC

Donat que en l'estudi de la reacció per <sup>1</sup>H-RMN s'ha observat que l'únic producte que es detecta en la reacció de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb el glical d'interès és el producte d'hidratació, es plantegen dues possibilitats. D'una banda, es pot realitzar el seguiment de la formació del 2-desoxiglicòsid **69**, amb la necessitat de límits de detecció baixos, però amb la seguretat d'estar avaluant la reacció objecte d'estudi sense majors

interferències. De l'altra, es pot determinar la velocitat de desaparició de glical, de manera que el mètode de seguiment de la cinètica no necessita un límit de detecció tan baix, ara bé, s'ha d'acceptar, que a les diferents condicions de reacció emprades, la desaparició del glical és directament proporcional a la formació del producte d'hidratació, sense que hi hagi altres reaccions significatives en competència.

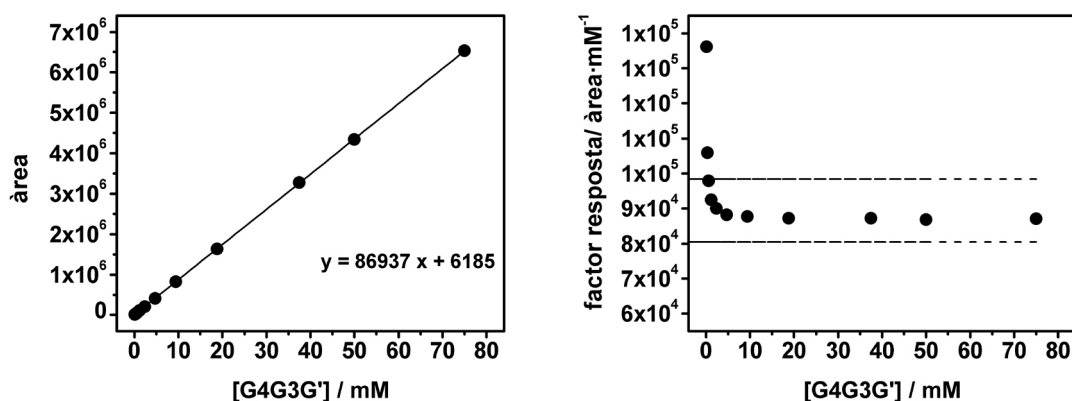
Un avantatge del seguiment de la desaparició del glical G4G3G', és que ja es disposa del producte d'interès, mentre que per a la validació del mètode amb el 2-desoxiglicòsid **69**, prèviament s'ha d'obtenir el producte amb la puresa necessària. S'ha realitzat una prova de síntesi en què el glical acetilat **42** es va transformar en la *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-D-glucopiranososa (**71**), però en la posterior desacetilació del producte de reacció emprant el mètode de Zemplén en comptes de rendir el 2-desoxitrisacàrid d'interès **69**, es va obtenir la cel·lobiosa. D'altra banda, en les diferents proves que s'han realitzat per tal de determinar les millors condicions per a l'etapa de seguiment de la reacció per HPLC, s'han aïllat els diferents compostos i s'ha comprovat que en condicions alcalines el 2-desoxiglicòsid **69** descompon amb relativa facilitat al llarg del temps, i en definitiva, l'obtenció d'una mostra de 2-desoxiglicòsid **69** pura a partir dels crús de reacció d'hidratació enzimàtica, inclús a pH neutres o acídics no ha estat possible. Per tal d'obtenir aquest compost amb la puresa requerida segurament s'hauria d'abordar la seva síntesi química, estudiant més a fons la reacció de desprotecció del producte **71**.

Així doncs, finalment s'ha decidit realitzar el seguiment de la cinètica de reacció a través de l'estudi de la desaparició del glical G4G3G' (**56**). Les condicions experimentals a les que s'ha realitzat el seguiment de la cinètica de reacció comporten la utilització d'una columna kromasil-NH<sub>2</sub> amb la temperatura regulada a 32 °C, fent servir com a eluent una barreja (70:30) d'acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 a un flux de 1 mL·min<sup>-1</sup> i emprant un detector d'índex de refracció amb la temperatura regulada a 35 °C. Es regula la temperatura tant del detector com de la columna, ja que s'ha comprovat que, d'aquesta manera, els resultats són més reproduïbles. A aquestes condicions el pic corresponent al glical apareix a un temps de retenció de 6.1 minuts i el pic corresponent al 2-desoxiglicòsid **69** a un temps de retenció de 7.7 minuts, sent la durada total del cromatograma de 10 minuts (figura III.3). El metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid emprat com a patró d'injecció en el seguiment de les cinètiques apareix a un temps de retenció de 4.6 minuts.



**Figura III.3.** Cromatograma obtingut en l'avaluació del progrés de la hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en el que es mostren els pics corresponents a la G- $\alpha$ OMe, el glical G4G3G' i el 2-desoxiglicòsid **69**.

Es comprova que el mètode és lineal en el marge de concentracions de 0.3 a 75 mM del glical G4G3G', amb un límit de detecció de 0.04 mM i un límit de quantificació de 0.3 mM, definint un marge de tolerància d'un 10% al voltant del factor de resposta (figura III.4). Les determinacions es realitzen per quintuplicat, obtenint un coeficient de variació inferior al 5% dins del marge de linealitat definit.



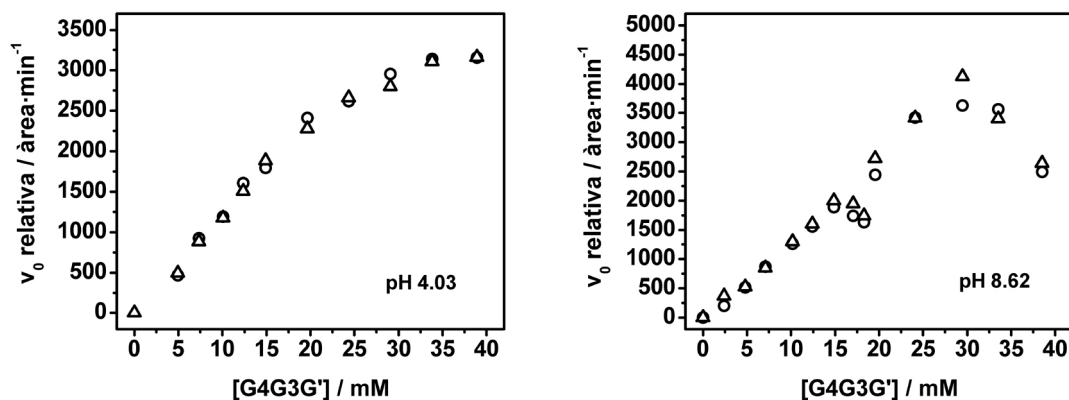
**Figura III.4.** Determinació del marge de linealitat i el límit de quantificació per a la determinació del glical G4G3G' per HPLC emprant una columna kromasil-NH<sub>2</sub> amb la temperatura regulada a 32 °C, fent servir com eluent una barreja (70:30) d'acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 i amb un detector d'índex de refracció amb la temperatura regulada a 35 °C.

Aquest mètode analític ha estat el que ha donat els millors resultats i els més robusts, de manera que s'ha escollit per al seguiment de les cinètiques d'hidratació del glical G4G3G'. Un altre avantatge d'aquest mètode és que permet realitzar les cinètiques amb petits volums de reacció, en el mateix vial d'injecció hermèticament tancat, evitant possibles errors introduïts per la concentració de la mescla de reacció al llarg de la



mateixa, i minimitzant d'aquesta manera la utilització tant d'enzim com de substrat. Per tal d'acabar de posar a punt el mètode s'ha buscat un patró d'injecció apropiat. És a dir, una substància que està present junt amb l'enzim i el substrat en la mescla de reacció, sense interferir en la mateixa, i que alhora permet corregir les petites variacions de volum que es poden donar en la injecció de la mostra, sense encavalcar-se amb cap dels pics d'interès. Dels tres sucres assajats, la maltosa (temps retenció ( $t_r$ ) = 7.9 min), la maltotriosa ( $t_r$  = 10.7 min), i el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid ( $t_r$  = 4.6 min), s'ha escollit aquest darrer, per aparèixer, com un pic ben definit i força separat dels dos pics dels productes que s'analitzen. Finalment, s'ha comprovat que no interfereix en les cinètiques de reacció de la 1,3,-1,4- $\beta$ -glucanasa, ja que concentracions creixents del mateix en un marge de 0 a 75 mM, no fan variar la cinètica d'hidròlisi del substrat G4G3G-MU.

En els resultats obtinguts durant la realització del perfil de pH de la reacció d'hidratació del glical **56**, es comprova que les àrees de formació de 2-desoxiglicòsid es corresponen amb les de desaparició de glical, i donada la similitud estructural entre els dos compostos el més probable és que el factor de resposta sigui molt similar. Això implica que, a l'igual que s'observa en la hidratació del glical G4G3G' per  $^1\text{H}$ -RMN, durant el temps de seguiment de les cinètiques de reacció amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, que és d'unes dues hores, no es detecta cap altre producte apart del 2-desoxiglicòsid **69**. Per tant, es verifica que el seguiment de la reacció podria realitzar-se tant per mesura de la formació del 2-desoxiglicòsid com per desaparició del glical G4G3G', i de fet les cinètiques que s'obtenen en els dos casos són comparables. A la figura III.5 es mostren dos exemples, als pH més extrems que s'han fet servir, en els que es representa la velocitat relativa (respecte del patró intern) de formació de 2-desoxiglicòsid **69** i desaparició del G4G3G' respecte de la concentració del mateix.



**Figura III.5.** Cinètiques d'hidratació del glical G4G3G' amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* als dos pH més extrems assajats. En els gràfics es representa la velocitat de reacció en front de la concentració del glical G4G3G'. En cercles es representen les velocitats fent servir com a referència la formació del 2-desoxiglicòsid **69**, mentre que amb un triangle es mostren els resultats de les cinètiques de desaparició del glical G4G3G'. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, amb 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , a 30 °C, [wt] = 1.86  $\mu\text{M}$ .

### III.4.2.3. Comprovació que el metil $\alpha$ -D-glucopiranosid no és un inhibidor ni activador de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis*

S'ha comprovat que el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid pot ser un bon patró intern d'injecció, ja que en les condicions emprades per a la determinació del glicol G4G3G' i del 2-desoxiglicòsid **69**, elueix a un temps de retenció suficientment diferent dels mateixos. Per tal de comprovar que no interfereix en l'activitat enzimàtica de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, s'estudia el seu efecte en la reacció d'hidròlisi enzimàtica del G4G3G-MU, que és una reacció altament coneguda.

#### Procediment

Se segueix el procediment detallat a l'apartat III.2.8. Es preparen una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, una altra de G4G3G-MU i una tercera de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid en aigua Milli-Q. Es verifica la concentració de la solució d'enzim i de substrat (III.2.4 i III.2.5). S'addicionen a les diferents cubetes de quars les quantitats adients de 2 x tampó citrat/fosfat pH 7.2, solució 14 mM de G4G3G-MU, solució 300 mM de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid, solució 10 mM de CaCl<sub>2</sub> i aigua Milli-Q, de manera que en afegir posteriorment l'enzim s'assoleixin les condicions desitjades en un volum final d'un mL. S'incuben les diferents cubetes a 55 °C durant 5 minuts al mateix espectrofotòmetre, i es fa un zero d'absorbància a 365 nm. S'addiciona l'enzim i s'homogeneïtza per inversió, es tornen les cubetes a l'espectrofotòmetre i es comença el seguiment de les cinètiques en continu a 365 nm. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 °C, [wt] = 1.37  $\mu$ M, substrat: G4G3G-MU, inhibidor: G- $\alpha$ OMe.

Els resultats obtinguts mostren que el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid no és un efector de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

### III.4.3. Cinètica de reacció d'hidratació del glicol G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* amb seguiment per HPLC

#### III.4.3.1. Solucions d'ús habitual

- Solució 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>: es dissol CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (36.76 mg, 0.25 mmol) en aigua Milli-Q (100 mL). La solució es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.
- Solució 0.1 M d'àcid cítric: es dissol àcid cítric (4.8 mg, 25 mmol) en aigua Milli-Q (250 mL), es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.
- Solució 0.25 M fosfat: es dissol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (8.95 g, 25 mmol) en aigua Milli-Q (100 mL), es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.
- 4 x Tampó citrat/fosfat (22 mM citrat, 22 mM fosfat): es mesclen una solució 0.1 M d'àcid cítric (11 mL, 1.1 mmol) i una solució 0.25 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.4 mL, 1.1 mmol). Es tempera la solució a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques (30 °C), s'ajusta el pH al valor desitjat amb una solució 1 M de NaOH, o amb una solució 1 M d'HCl, i s'enrassa a 50 mL amb aigua Milli-Q. Es filtra la solució a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C.

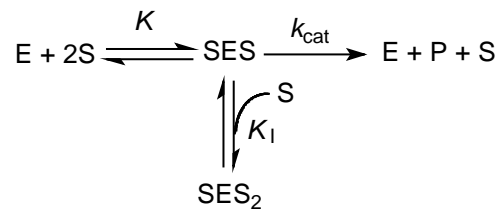
- *Solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa*: es resuspèn una fracció liofilitzada d'enzim en el volum desitjat d'aigua Milli-Q a 0 °C. Es reparteix la solució en tubs d'Eppendorf per tal de centrifugar-la a 13500 rpm durant 2 minuts. El sobrenedant es transfereix a un altre tub i es repeteix aquesta etapa tantes vegades com sigui necessari per tal d'obtenir una solució d'enzim sense terbolesa. Es conserva a 4 °C.

- *Solució 75 mM de glical G4G3G', 36 mM de G- $\alpha$ OMe*: Es dissol el glical G4G3G' (158.5 mg, 0.34 mmol) i el G- $\alpha$ OMe (31.5 mg, 0.16 mmol) en aigua Milli-Q (4.5 mL). Es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu$ m i es conserva a 4 °C. La idea és disposar d'una solució conjunta de substrat i patró d'injecció en què la concentració del darrer sigui inferior a la del substrat, però que permeti la seva utilització com a patró intern, inclús en reaccions a baixes concentracions de substrat.

### III.4.3.2. Procediment

Es preparen una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i una altra 75 mM de glical G4G3G' i 36 mM G- $\alpha$ OMe en aigua desionitzada. Es verifica la concentració de la solució d'enzim (III.2.5). Les reaccions d'hidratació de glical es realitzen en els mateixos vials que s'empren en la posterior determinació de la concentració de glical per HPLC. S'addicionen als diferents vials les quantitats adients de 4 x tampó citrat/fosfat del pH desitjat, solució de glical (i patró), solució 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub> i aigua desionitzada de manera que en afegir posteriorment l'enzim s'assoleixin les condicions desitjades en un volum final de 180  $\mu$ L. Les condicions de reacció són tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, al pH desitjat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C. S'incuben els diferents vials a 30 °C durant 5 minuts en un bany d'aigua. S'addiciona l'enzim i s'homogeneïtza per inversió, se segellen els vials i es tornen al bany a 30 °C. A diferents temps de reacció es determina el contingut de glical dels diferents vials per HPLC. Les condicions cromatogràfiques són: columna kromasil-NH<sub>2</sub>, eluent: barreja (70:30) d'acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 a un flux de 1 mL·min<sup>-1</sup>, la detecció es realitza amb un detector d'índex de refracció. Es regula la temperatura de la columna a 32 °C i la del detector d'índex de refracció a 35 °C. En aquestes condicions el pic del G- $\alpha$ OMe apareix a un temps de 4.5 minuts, el del glical G4G3G' als 6 minuts i el pic corresponent al 2-desoxiglicòsid **69** a un temps aproximat de 8 minuts, sent la durada total del cromatograma de 10 minuts. La cinètica de reacció s'avalua a partir de la integració manual de l'àrea del pic corresponent al glical als diferents temps de reacció, i normalització de la mateixa, a partir del valor de l'àrea del G- $\alpha$ OMe a cada temps de reacció, prenent com a valor de referència la mitjana de les diferents àrees del G- $\alpha$ OMe dins d'una mateixa reacció. Es pot realitzar el mateix a partir de la integració manual de l'àrea del pic corresponent al 2-desoxiglicòsid. És molt recomanable realitzar i analitzar una cinètica sencera el mateix dia.

Finalment, s'ajusta a les dades de velocitat d'hidratació enzimàtica a diferents concentracions de substrat l'equació de velocitat més adequada. En el cas de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, aquesta ha resultat ser l'equació III.13 que respon al model d'al·lostèric amb inhibició acompetitiva per substrat que es mostra a continuació.



$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S]^2}{K + [S]^2 + \frac{[S]^3}{K \cdot K_1}} \quad \text{Equació III.13.}$$

### III.5. Enzimologia de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb substrats cromofòrics en estat estacionari

#### III.5.1. Equipament emprat

Les mesures de les cinètiques de les reaccions en estat estacionari de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb substrats cromofòrics es realitzen en un espectrofotòmetre Cary 4E (Varian), amb làmpades de deuteri per a l'UV i de QI per al visible, i acoblat a un bany termostàtic. L'espectrofotòmetre està equipat amb el *Cary DOS System Software* de Varian que controla el funcionament de l'espectrofotòmetre, en permet realitzar les validacions i correccions adients i possibilita l'adquisició automàtica de dades. Aquest aparell està proveït d'un controlador de temperatura per efecte Peltier i un sistema multicubeta que permet treballar amb sis cubetes en paral·lel.

Per al seguiment de reaccions amb substrats cromofòrics, i determinació de la concentració de substrats o enzim per mesura de l'absorbància de la mostra, es treballa amb cubetes de quars d'1.5 mL de capacitat i 1 cm de camí òptic. Per a la determinació de la concentració d'enzim pel mètode de Bradford i per a les lectures d'absorbància en els assaigs d'extrems reductors es treballa amb cubetes de plàstic d'un o tres mL.

El tractament de dades, així com l'ajust de les equacions cinètiques posterior s'ha realitzat amb els programes de regressió no lineal Enzfitter 1.03, i OriginPro.

#### III.5.2. Solucions d'ús habitual

- 2 x *Tampó fosfat (100 mM) pH 6.5, I=0.3 M*: es dissol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (17.91 g, 50 mmol) en aigua Milli-Q (400 mL) i es tempera a la temperatura a la que es realitzaran les cinètiques amb ajuda d'un bany termostàtic. A la temperatura desitjada, s'ajusta el pH a 6.5 amb una solució 1 M de NaOH, i la força iònica a 0.3 M amb una solució 1 M de KCl. S'enrassa a 0.5 L, es filtra a través d'un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  i es conserva a 4 °C.

- 2 x *Tampó fosfat (100 mM) a diferents pH, I=0.3 M*: es dissol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (35.81 g, 100 mmol) en aigua Milli-Q (500 mL). Es pren una alíquota de 25 mL, s'afegeix aigua Milli-Q (15 mL) i es tempera a la temperatura a la que es realitzaran les

cinètiques (40 °C) amb ajuda d'un bany termostàtic. A la temperatura desitjada, s'ajusta el pH a 6.5 amb una solució 1 M de NaOH (o bé 0.1 M de NaOH), i la força iònica a 0.3 M amb una solució 1 M de KCl. S'enrassa a 50 mL, es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C. D'aquesta manera es preparen els tampons que es fan servir en el perfil d'activitat enfront del pH.

- *Solució de β-glucosidasa*: Com ja s'ha comentat a l'apartat d'expressió i purificació de la β-glucosidasa, aquest enzim no és gaire estable en les condicions emprades per a la liofilització, per tant, es conserva en solució a 4 °C. Com tampoc és molt estable en dissolució, s'ha d'expressar i purificar el més proper possible a la seva caracterització enzimàtica, i en tot cas, sempre s'ha de realitzar una avaluació de la concentració d'enzim actiu (I.8.5) abans de la realització de les reaccions d'interès.

- *Solució de substrats cromofòrics*: Es dissol el substrat en la quantitat adient d'aigua Milli-Q per tal d'obtenir la concentració desitjada. Es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm i es conserva a 4 °C. En cas de baixa solubilitat del substrat és recomanable dissoldre'l en el mateix tampó en el que es realitzarà la cinètica.

### III.5.3. Metodologia per a la selecció de les longituds d'ona de treball i determinació de les absortivitats corresponents

Veure apartat III.2.3.

### III.5.4. Metodologia per a la determinació de la concentració de la solució de substrat per espectrofotometria d'UV-vis

Veure apartat III.2.4.

### III.5.5. Metodologia per a la determinació de la concentració d'enzim

Donada la baixa estabilitat de la β-glucosidasa en solució aquosa, abans de fer servir la solució estoc d'enzim per tal de realitzar estudis enzimològics, s'ha de determinar la concentració de β-glucosidasa activa. Això implica que la primera vegada que s'expressa i purifica la proteïna salvatge o algun dels seus mutants, el primer que s'ha de fer és determinar la concentració de la solució proteica emprant el mètode de Bradford (I.8.4) i a continuació determinar els seus paràmetres cinètics a unes condicions concretes, que posteriorment es faran servir sempre que sigui necessari avaluar la concentració de β-glucosidasa activa (I.8.5). En el cas de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la β-glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 les condicions de l'assaig d'activitat són: tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15, 30 °C, substrat: 4'-nitrofenil β-D-glucopiranosid,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 5088 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . El model que millor s'ajusta és el de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació III.7), i els paràmetres cinètics en aquestes condicions són:

- enzim salvatge:  $k_{\text{cat}} = 8.1 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_{\text{M}} = 104 \pm 19 \text{ µM}$ ;  $K_{\text{I}} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$
- mutant C181A:  $k_{\text{cat}} = 10.1 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ ;  $K_{\text{M}} = 126 \pm 7 \text{ µM}$ ;  $K_{\text{I}} = 10 \pm 2 \text{ mM}$

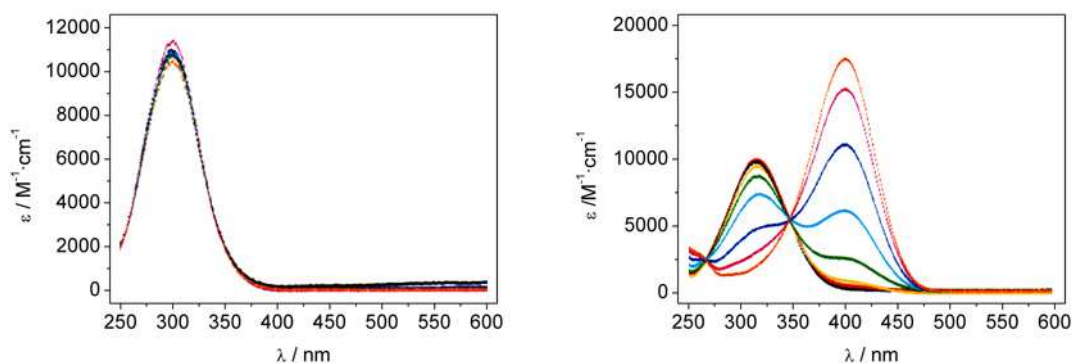
### III.5.6. Procediment general per al seguiment de les reaccions d'hidròlisi de substrats cromofòrics en presència de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

Veure apartat III.2.6. A les reaccions amb la  $\beta$ -glucanasa no s'afegeix  $\text{CaCl}_2$ .

### III.5.7. Perfil d'activitat enzimàtica enfront del pH per a la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

Veure apartat III.2.7. A les reaccions amb la  $\beta$ -glucanasa no s'afegeix  $\text{CaCl}_2$ .

En aquest cas el perfil de pH es realitza fent servir com a substrat el 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid en tampó 50 mM fosfat, i una força iònica ajustada a 0.15 M per addició de KCl, a 40 °C. A la figura III.6 es presenten els espectres del 4-nitrofenol i el 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid a cadascun dels pH. Es decideix realitzar el seguiment de les cinètiques a una  $\lambda$  de 378 nm per a pH inferiors a 6.0, i a 400 nm per a pH superiors o igual a 6.0.



**Figura III.6.** Espectres de l'absortivitat del substrat, el G-4NP (esquerra), i el producte de la reacció enzimàtica catalitzada per la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces*, el 4-nitrofenol (dreta), en funció del pH del medi: pH 8.0 (taronja), pH 7.5 (magenta), pH 7.0 (blau fosc), pH 6.5 (blau clar), pH 6.0 (verd), pH 5.5 (groc), pH 5.0 (vermell), pH 4.5 (negre).

### III.5.8. Perfil d'activitat enzimàtica enfront de la temperatura per a la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

La velocitat de les reaccions químiques va associada a la temperatura de reacció, de manera que un augment de temperatura comporta un augment en la freqüència de col·lisió entre els reactius, que es tradueix en un augment d'activitat. En el cas de les reaccions enzimàtiques apart d'aquest fenomen també s'ha de tenir present l'estabilitat tèrmica de l'enzim, que disminueix en augmentar la temperatura. De manera que el perfil d'activitat enfront de temperatura en una reacció enzimàtica presenta un màxim a la que s'ha anomenat temperatura òptima, que és aquella temperatura a la que la inactivació de l'enzim encara no és significativa i la velocitat de reacció és màxima. A temperatures superiors l'activitat enzimàtica decau bruscament.

Les reaccions es realitzen en tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, pH 6.5, a cadascuna de les temperatures de treball. En aquest cas també s'ha de determinar el valor de l'absortivitat del substrat cromofòric a cada temperatura (III.5.3).

Les reaccions es realitzen a punt únic seguint el procediment descrit a l'apartat III.5.6. És a dir, no es realitzen cinètiques senceres a cada temperatura per tal de determinar els paràmetres cinètics, sinó que totes les cinètiques es realitzen a una mateixa concentració de substrat. S'ha triat una concentració de substrat saturant, de manera que petites variacions de concentració no comportin canvis gaire importants en la velocitat de reacció. Així totes les reaccions s'han dut a terme en tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M, [G-4NP] = 588 µM, [wt] = 5.6 nM, a les diferents temperatures de treball (30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 i 80 °C).

A continuació als valors de la velocitat de reacció a les diferents temperatures s'ajusta l'equació d'Arrhenius (equació III.14), que prediu un comportament lineal del logaritme de la velocitat de reacció amb l'invers de la temperatura, per tant, la representació gràfica de la seva forma logarítmica (equació III.15), permet una interpretació senzilla dels efectes de la temperatura sobre la cinètica de la reacció.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Equació III.14

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

Equació III.15

## IV. Resultats d'enzimologia

Les dades primàries obtingudes en les diferents reaccions enzimàtiques així com les condicions de reacció utilitzades en els experiments realitzats queden recollides en el CD adjunt.

## Índex resultats enzimologia

### IV.1.- Cinètiques en estat preestacionari

IV.1.1.- Cinètiques d'unió del G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> fent servir la metodologia de flux interromput	3
IV.1.2.- Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-MU, G4G4G3G-MU i G4G4G4G3G-MU amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> fent servir la metodologia de flux interromput	8
IV.1.3.- Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> fent servir la metodologia de flux interromput	18
IV.1.4.- Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-MU, G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP amb els mutants W221A i M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> fent servir la metodologia de flux interromput	27

### IV.2.- Resultats d'hidròlisi de substrats cromofòrics catalitzada per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en estat estacionari

IV.2.1.- Anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i>	33
IV.2.2.- Anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> a diferents pH	52
IV.2.3.- Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> a pH 7.2 per a la hidròlisi del substrat G4G3G-MU	61
IV.2.4.- Determinació dels paràmetres cinètics del mutant Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> amb els substrats G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP	64
IV.2.5.- Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> amb els substrats G4G3G-MU, G4G4G3G-MU, G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP	65
IV.2.6.- Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH de l'enzim salvatge i el mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i>	73
IV.2.7. Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH de l'enzim salvatge i dels mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i>	94
IV.2.8.- Determinació de la constant d'inhibició, $K_I$ , de l'inhibidor 3-( <i>O</i> - $\beta$ -D-cel·lobiosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil per a l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i>	121
IV.2.9.- Determinació de l'estabilitat de l'enzim salvatge i el mutant Y152A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> a pH 3.0 i 30 °C	131



<b>IV.3. Resultats d'hidròlisi del <math>\beta</math>-glucà d'ordi catalitzada per la 1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> en estat estacionari</b>	132
<b>IV.4. Resultats de la reacció d'hidratació de glicals per part de la 1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i></b>	
IV.4.1. Estudi de mètodes per a la determinació quantitativa del 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	137
IV.4.2. Resultats de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> amb seguiment per HPLC	143
<b>IV.5. Resultats de l'enzimologia de la <math>\beta</math>-glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814 amb substrats cromofòrics en estat estacionari</b>	
IV.5.1. Perfil d'activitat enzimàtica enfront del pH per a la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	182
IV.5.2. Perfil d'activitat enzimàtica enfront de la temperatura per a la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	189
IV.5.3. Anàlisi de Hammett de la $\beta$ -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	190

## IV. RESULTATS D'ENZIMOLOGIA

### IV.1. Cinètiques en estat preestacionari

#### IV.1.1. Cinètiques d'unió del G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* fent servir la metodologia de flux interromput

Per tal d'estudiar la unió enzim-substrat es treballa amb un mutant inactiu de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, l'E134A, que no transforma el substrat, de manera que el senyal que s'obté respon únicament al procés d'unió del substrat.

Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C. Les reaccions es duen a terme a l'instrument de flux interromput DX17MV d'Applied Photophysics. Es treballa amb detector d'emissió de fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 350 nm amb una esclatxa de 2 mm, i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400). Se segueix el procediment indicat a l'apartat III.1.2. S'enregistren les cinètiques durant 0.5 segons. La mitjana de les traces a cada concentració de substrat s'ajusta a l'equació III.1, d'on s'obtenen els valors de  $k$  i  $\Delta F$ . Es realitzen tres experiments diferents a les mateixes condicions de treball. A les taules IV.1, IV.3 i IV.5 es presenten els valors de  $\Delta F$  expressats en concentració de substrat unit, considerant que el canvi de senyal obtingut respon únicament a la unió enzim-substrat, i que en el procés el substrat perd completament la seva emissió de fluorescència.

- *Experiment 1*: La concentració de la solució estoc de mutant E134A és de 21.6  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 10.8  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 11.8 mM. El valor del senyal del tampó és de -3.9821 V, i el corresponent a una solució del mutant E134A de 10.8  $\mu$ M en tampó és de -3.9574 V.

**Taula IV.1.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat, el senyal inicial obtingut referit a la lectura del tampó ( $F_0 - F_{\text{tampó}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat durant la reacció ( $|\Delta F|$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim després d'aplicar la correcció indicada a III.1.3 ( $|\Delta F|^*$ ); i els logaritmes de concentració de substrat i del paràmetre  $|\Delta F|^* / (|\Delta F|_{\text{max}}^* - |\Delta F|^*)$ , emprats en un gràfic de Hill per tal d'obtenir el coeficient de Hill. El valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^*$ , és l'obtingut en l'ajust d'una equació sigmoïdal de Hill a la dependència de  $|\Delta F|^*$  amb la [S]. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fofat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [E134A] = 10.8  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400). L'aplicació de l'equació sigmoïdal de Hill ( $y = V_{\text{max}} \cdot x^n / (K^n + x^n)$ ) a la dependència de la  $|\Delta F|^*$  amb la [S] rendeix un valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^* = 64 \pm 15$  mV i un valor de  $n = 1.2 \pm 0.2$ .

[S] / mM	$F_0 - F_{\text{tampó}} / \text{V}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$ \Delta F ^* / \text{mV}$	$\log [S]$	$\log \frac{ \Delta F ^*}{ \Delta F _{\text{max}}^* -  \Delta F ^*}$
0.05	0.1176	< 1	< 1	-1.34	-1.80
0.09	0.2100	< 2	< 2	-1.04	-1.49
0.18	0.3941	4.0	4.0	-0.74	-1.18
0.37	0.7669	6.9	6.8	-0.43	-0.92
0.74	1.5016	11.9	11.8	-0.13	-0.65
1.47	2.9524	22.7	22.8	0.17	-0.26
2.94	5.1848	35.3	40.2	0.47	0.23
3.93	6.2152	32.2	40.7	0.59	0.24
5.89	7.4920	22.2	35.0	0.77	0.08

\* Valor del canvi de senyal després d'aplicar la correcció esmentada a III.1.3. La recta patró de fluorescència del G4G3G-MU per a concentracions de substrat fins a 1.47 mM és:  $F_0 - F_{\text{tampó}} = 2.00 \cdot [\text{G4G3G-MU}] + 0.022$

**Taula IV.2.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la durada de la fase de retardament ( $\tau_{\text{retardament}}$ ), la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), i el canvi de senyal màxim obtingut ( $\Delta\text{Senyal}$ ) expressat com a concentració de substrat unit. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fofat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [E134A] = 10.8  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400), factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència: 2.00  $\text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ .

[S] / mM	$\tau_{\text{retardament}} / \text{ms}$	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Senyal} / \mu\text{M}$
0.05	33	$122 \pm 6$	< 0.5
0.09	33	$36 \pm 4$	< 1.0
0.18	33	$81 \pm 2$	2.0
0.37	33	$59 \pm 3$	3.4
0.74	30	$37 \pm 1$	5.9
1.47	33	$29.2 \pm 0.6$	11.4
2.94	27	$28.2 \pm 0.7$	20.1
3.93	29	$24 \pm 2$	20.4
5.89	29	$17.1 \pm 0.7$	17.5

- *Experiment 2*: La concentració de la solució estoc de mutant E134A és de 41.6  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 20.8  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 12.12 mM. El valor del senyal del tampó és de  $-3.9806\text{ V}$ , i el corresponent a una solució del mutant E134A de 20.8  $\mu\text{M}$  en tampó és de  $-3.9313\text{ V}$ .

**Taula IV.3.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat, el senyal inicial obtingut referit a la lectura del tampó ( $F_0 - F_{\text{tampó}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal mesurat durant la reacció ( $|\Delta F|$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim després d'aplicar la correcció indicada a III.1.3 ( $|\Delta F|^*$ ); i els logaritmes de concentració de substrat i del paràmetre  $|\Delta F|^* / (|\Delta F|_{\text{max}}^* - |\Delta F|^*)$ , emprats en un gràfic de Hill per tal d'obtenir el coeficient de Hill. El valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^*$ , és l'obtingut en l'ajust d'una equació sigmoïdal de Hill a la dependència de  $|\Delta F|^*$  amb la [S]. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fofat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [E134A] = 20.8  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud de tall de 400 nm (GG400). L'aplicació de l'equació sigmoïdal de Hill ( $y = V_{\text{max}} \cdot x^n / (k^n + x^n)$ ) a la dependència de la  $|\Delta F|^*$  amb la [S] rendeix un valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^* = 48 \pm 1\text{ mV}$  i un valor de  $n = 1.74 \pm 0.09$ .

[S] / mM	$F_0 - F_{\text{tampó}} / \text{V}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$ \Delta F ^* / \text{mV}$	$\log [S]$	$\log \frac{ \Delta F ^*}{ \Delta F _{\text{max}}^* -  \Delta F ^*}$
0.05	0.1784	1.0	0.7	-1.33	-1.83
0.10	0.2272	1.6	1.6	-1.02	-1.46
0.19	0.4137	2.7	2.6	-0.72	-1.24
0.38	0.7573	6.8	6.9	-0.42	-0.77
0.76	1.4948	18.9	18.9	-0.12	-0.19
1.51	2.9413	32.6	32.6	0.18	0.33
3.03	5.2385	36.9	41.4	0.48	0.8
4.04	6.3572	36.2	44.6	0.61	1.12
6.06	7.7198	63.7	96.8	0.78	----

\* Valor del canvi de senyal després d'aplicar la correcció esmentada a III.1.3. La recta patró de fluorescència del G4G3G-MU per a concentracions de substrat fins a 1.51 mM és:  $F_0 - F_{\text{tampó}} = 1.93 \cdot [\text{G4G3G-MU}] + 0.03$

**Taula IV.4.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la durada de la fase de retardament ( $\tau_{\text{retardament}}$ ), la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), i el canvi de senyal màxim obtingut ( $\Delta\text{Senyal}$ ) en concentració de substrat unit. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C,  $[\text{E134A}] = 20.8 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400), factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència  $1.93 \text{ mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ .

[S] / mM	$\tau_{\text{retardament}}$ / ms	$k_{\text{obs}}$ / s <sup>-1</sup>	$\Delta\text{Senyal}$ / $\mu\text{M}$
0.05	----	$279 \pm 21$ <sup>(1)</sup>	0.4
0.10	26	$171 \pm 13$ <sup>(1)</sup>	0.8
0.19	37	$69 \pm 5$	1.3
0.38	26	$28 \pm 1$	3.6
0.76	33	$26.3 \pm 0.6$	9.8
1.51	30	$23.6 \pm 0.4$	16.9
3.03	36	$25.6 \pm 0.8$	21.5
4.04	33	$22.4 \pm 0.5$	23.1
6.06	33	$16.9 \pm 0.5$	50.1

<sup>1</sup> En aquestes traces l'ajust comença a temps 0 i no després de la fase de retardament, ja que no és fàcil determinar quan s'acaba el mateix.

- *Experiment 3*: La concentració de la solució estoc de mutant E134A és de 47.4  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 23.7  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 12.84 mM. El valor del senyal del tampó és de  $-3.9810$  V, i el corresponent a una solució del mutant E134A de 23.7  $\mu\text{M}$  en tampó és de  $-3.9431$  V.

**Taula IV.5.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat, el senyal inicial obtingut referit a la lectura del tampó ( $F_0 - F_{\text{tampó}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat durant la reacció ( $|\Delta F|$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim després d'aplicar la correcció indicada a III.1.3 ( $|\Delta F|^*$ ); i els logaritmes de concentració de substrat i del paràmetre  $|\Delta F|^* / (|\Delta F|_{\text{max}}^* - |\Delta F|^*)$ , emprats en un gràfic de Hill per tal d'obtenir el coeficient de Hill. El valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^*$ , és l'obtingut en l'ajust d'una equació sigmoïdal de Hill a la dependència de  $|\Delta F|^*$  amb la [S]. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [E134A] = 23.7  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400). L'aplicació de l'equació sigmoïdal de Hill ( $y = V_{\text{max}} \cdot x^n / (k^n + x^n)$ ) a la dependència de la  $|\Delta F|^*$  amb la [S] rendeix un valor de  $|\Delta F|_{\text{max}}^* = 90 \pm 6$  mV i un valor de  $n = 1.29 \pm 0.09$ .

[S] / mM	$F_0 - F_{\text{tampó}} / \text{V}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$ \Delta F ^* / \text{mV}$	$\log [S]$	$\log \frac{ \Delta F ^*}{ \Delta F _{\text{max}}^* -  \Delta F ^*}$
0.05	0.1366	1.1	1.1	-1.30	-1.91
0.10	0.2378	2.1	2.1	-1.00	-1.62
0.20	0.4389	4.2	4.1	-0.70	-1.32
0.40	0.8404	7.8	7.6	-0.40	-0.92
0.81	1.6385	16.5	16.1	-0.10	-0.66
1.61	3.1606	35.2	35.4	0.20	-0.19
3.21	5.4448	44.6	51.6	0.51	0.13
4.28	6.4603	47.6	61.8	0.63	0.34
5.14	7.0561	38.1	54.3	0.72	0.18
6.42	7.6541	42.9	70.4	0.81	0.56

\* Valor del canvi de senyal després d'aplicar la correcció esmentada a III.1.3. La recta patró de fluorescència del G4G3G-MU per a concentracions de substrat fins a 1.61 mM és:  $F_0 - F_{\text{tampó}} = 1.95 \cdot [\text{G4G3G-MU}] + 0.04$

**Taula IV.6.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la durada de la fase de retardament ( $\tau_{\text{retardament}}$ ), la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), i el canvi de senyal màxim obtingut ( $\Delta\text{Senyal}$ ) en concentració de substrat unit. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [E134A] = 23.7  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400), factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència 1.95  $\text{mV}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ .

[S] / mM	$\tau_{\text{retardament}}$ / ms	$k_{\text{obs}}$ / $\text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Senyal}$ / $\mu\text{M}$
0.05	38	$138 \pm 13$	0.6
0.10	37	$80 \pm 10$	1.1
0.20	38	$28 \pm 2$	2.1
0.40	23	$21.8 \pm 0.7$	3.9
0.81	30	$28.4 \pm 0.6$	8.3
1.61	26	$17.5 \pm 0.5$	18.2
3.21	33	$17.9 \pm 0.6$	26.5
4.28	33	$29.4 \pm 0.9$	31.7
5.14	28	$31 \pm 2$	27.8
6.42	30	$9.7 \pm 0.3$	36.1

#### IV.1.2. Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-MU, G4G4G3G-MU i G4G4G4G3G-MU amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* fent servir la metodologia de flux interromput

S'estudia la formació de 4-metilumbel·liferona per hidròlisi enzimàtica dels substrats G4G3G-MU, G4G4G3G-MU i G4G4G4G3G-MU. En el cas del trisacàrid la cinètica s'estudia a tres pH diferents, 6.9, 7.2 i 7.8, en el cas dels substrats G4G4G3G-MU i G4G4G4G3G-MU només es realitza una cinètica a pH 7.2. També es realitzen experiments que avaluen l'efecte de la temperatura, la concentració d'enzim o el fet d'emprar un tampó no quelant, en les cinètiques en estat preestacionari. Les reaccions es duen a terme a l'instrument de flux interromput el Hi-Tech Scientific PQ/SF-53. Les cinètiques se segueixen en continu amb un detector d'emissió de fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 360 nm, longitud d'ona a la que, dels diferents components de la mescla de reacció, bàsicament només absorbeix la MU, amb una escletxa de 5 mm, i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH d'interès, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C. Es prepara d'una banda, una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, i de l'altra, un estoc de substrat, totes dues en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH desitjat, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , i se'n determina la concentració III.1.1. Les reaccions es realitzen seguint el procediment indicat a l'apartat III.1.2 i se segueixen durant 0.5 segons. La mitjana de les traces a cada concentració de substrat s'ajusta a l'equació III.2, d'on s'obtenen els valors de  $k_{\text{obs}}$ ,  $\Delta F$  i  $v_{\text{ss}}$ .

A les diferents cinètiques realitzades a pH 7.2 per tal d'expressar les dades de velocitat i  $\Delta F$  en funció de la concentració de MU formada, s'ha calculat el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència amb la [MU] a cada concentració de substrat seguint l'equació III.4, tal i com s'indica a l'apartat III.1.3. Aquesta equació, que s'ha deduït emprant el substrat G4G3G-MU, es fa extensiva a la resta de 4'-metilumbel·liferil glicòsids (equació IV.1)

$$\alpha_s = 13 \cdot \exp(-0.5 \cdot [\text{glicòsid} - \text{MU}]) + 9 \quad \text{Equació IV.1.}$$

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 47.3  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 23.7  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G3G-MU és de 17.42 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

No s'observa una fase d'acumulació de MU ni en cinètiques enregistrades a temps curts (0.5 s) i per tant amb major resolució per als primers mil·lisegons de reacció, ni a temps més llargs (20 s) que hauria permès detectar una fase d'acumulació més lenta. A totes les concentracions de substrat estudiades s'enregistren cinètiques de formació de MU lineals al llarg del temps.

**Taula IV.7.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda per a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[\text{E}]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència,  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C,  $[\text{wt}] = 23.7 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

$[\text{G3G-MU}] / \text{mM}$	$10^4 \cdot v_{ss} / \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	$\alpha_s / \text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	$10^3 \cdot (v_{ss}/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$
0.136	0.60	21.12	0.12
0.272	0.46	20.36	0.10
0.544	0.75	18.92	0.17
1.089	1.6	16.54	0.41
2.178	2.4	13.37	0.76
4.355	3.2	10.47	1.29
5.807	3.9	9.71	1.69
8.710	3.7	9.17	1.70

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 23.8  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 11.9  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 9.75 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).



**Taula IV.8.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV, i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 11.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$ \Delta F  / mV$	$\alpha_s / mV \cdot \mu M^{-1}$	$\Delta P / \mu M$
0.305	$57 \pm 3$	6.4	20.16	0.32
0.609	$59 \pm 2$	8.1	18.59	0.44
1.219	$63 \pm 3$	10.8	16.07	0.67
1.625	$62 \pm 2$	10.8	14.77	0.73
2.438	$60 \pm 3$	9.5	12.84	0.74
3.250	$58 \pm 2$	11.9	11.56	1.03
4.875	$60 \pm 4$	7.2	10.14	0.71

**Taula IV.9.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.3 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_s$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 11.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.305	0.0274	0.114	$k_{cat} = 0.49 \pm 0.05 s^{-1}$ $K_M = 1.0 \pm 0.2 mM$ $K_I = 6 \pm 1.5 mM$ $k_{cat}/K_M = 0.46 \pm 0.05 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.609	0.0401	0.181	
1.219	0.0441	0.231	
1.625	0.0455	0.259	
2.438	0.0419	0.274	
3.250	0.0367	0.267	
4.875	0.0286	0.237	

**Taula IV.10.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 11.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.305	1.65	$k_{cat} = 8 \pm 2 s^{-1}$ $K_M = 1.3 \pm 0.5 mM$ $K_I = 8 \pm 8 mM$ $k_{cat}/K_M = 6.5 \pm 0.4 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.609	2.37	
1.219	3.82	
1.625	4.11	
2.438	4.08	
3.250	5.39	
4.875	3.99	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G4G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 17.8  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 8.9  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G4G3G-MU és de 3.86 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

**Taula IV.11.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV, i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats,  $\alpha_S$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G3G-MU] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$ \Delta F  / mV$	$\alpha_S / mV \cdot \mu M^{-1}$	$\Delta P / \mu M$
0.030	17 $\pm$ 6	1	21.81	0.05
0.060	30 $\pm$ 3	2.8	21.62	0.13
0.121	33 $\pm$ 3	3.8	21.24	0.18
0.241	40 $\pm$ 3	4.5	20.52	0.22
0.483	37 $\pm$ 3	5.3	19.21	0.28
0.965	44 $\pm$ 3	6.9	17.02	0.41
1.287	50 $\pm$ 2	7.2	15.83	0.45
1.930	53 $\pm$ 4	6.9	13.95	0.49

**Taula IV.12.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_S$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G3G-MU] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{cat} = 0.39 \pm 0.03 s^{-1}$ $K_M = 0.49 \pm 0.06 mM$ $K_I = 2.5 \pm 0.5 mM$  $k_{cat}/K_M = 0.80 \pm 0.05 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.030	0.0046	0.024	
0.060	0.0078	0.040	
0.121	0.0147	0.078	
0.241	0.0226	0.124	
0.483	0.0315	0.184	
0.965	0.0311	0.206	
1.287	0.0288	0.204	
1.930	0.0244	0.197	

**Taula IV.13.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.030	0.12	
0.060	0.48	
0.121	0.74	$k_{cat}/K_M = 5.8 \pm 0.3 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.241	1.11	
0.483	1.32	
0.965	2.22	
1.287	2.74	
1.930	3.14	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G4G4G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 17.8  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 8.9  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G4G4G3G-MU és de 1.67 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

**Taula IV.14.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV, i la concentració de producte format que dóna lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats,  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G4G3G-MU] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$ \Delta F  / mV$	$\alpha_s / mV \cdot \mu M^{-1}$	$\Delta P / \mu M$
0.026	$43 \pm 13$	0.7	21.83	0.03
0.052	$45 \pm 7$	1.5	21.67	0.07
0.104	$39 \pm 4$	2.4	21.34	0.11
0.209	$36 \pm 3$	4.0	20.71	0.19
0.418	$48 \pm 3$	4.5	19.55	0.23
0.557	$45 \pm 2$	5.6	18.84	0.30
0.835	$41 \pm 2$	7.2	17.56	0.41

**Taula IV.15.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_s$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G4G3G-MU] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.026	0.0039	0.020	$k_{cat} = 0.50 \pm 0.09 s^{-1}$ $K_M = 0.6 \pm 0.1 mM$ $K_I = 1.4 \pm 0.6 mM$ $k_{cat}/K_M = 0.83 \pm 0.07 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.052	0.0084	0.044	
0.104	0.0141	0.074	
0.209	0.0222	0.120	
0.418	0.0323	0.186	
0.557	0.0341	0.203	
0.835	0.0339	0.217	

**Taula IV.16.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 8.9  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G4G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.026	0.17	$k_{cat} = 3.8 \pm 0.3 s^{-1}$ $K_M = 0.6 \pm 0.1 mM$ $k_{cat}/K_M = 6.1 \pm 0.3 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.052	0.39	
0.104	0.56	
0.209	0.90	
0.418	1.45	
0.557	1.76	
0.835	2.18	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-MU a pH 7.2 fent servir tampó MOPS

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 26.4  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 13.2  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 9.96 mM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Es treballa amb tampó 10 mM MOPS pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , a 30 °C, per tal d'avaluar la possible influència quelant del citrat, i determinar si la fase d'acumulació de producte observada fent servir el tampó citrat/fosfat pot ser una conseqüència de la quelació de l'ió  $Ca^{2+}$ , que s'ha comprovat que juga un paper estabilitzant de l'estructura proteica.

**Taula IV.17.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU en realitzar les cinètiques en tampó 10 mM MOPS pH 7.2. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV i la concentració de producte format que dóna lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats,  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 10 mM MOPS, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 13.2  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$\alpha_s / \text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	$\Delta P / \mu\text{M}$
0.078	$56 \pm 4$	1.6	21.50	0.07
0.156	$45 \pm 4$	2.6	21.02	0.12
0.311	$50 \pm 3$	6.2	20.13	0.31
0.623	$59 \pm 2$	8.3	18.52	0.45
1.245	$51 \pm 2$	13.6	15.98	0.85
2.490	$51 \pm 2$	13.5	12.74	1.06
4.980	$60 \pm 2$	13.3	10.08	1.32

**Taula IV.18.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_s$ ). Condicions de reacció: tampó 10 mM MOPS, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 13.2  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.078	0.0051	0.02	$k_{\text{cat}} = 0.41 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.6 \pm 0.4 \text{ mM}$ $K_I = 9 \pm 4 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.3 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.156	0.0108	0.04	
0.311	0.0190	0.07	
0.623	0.0269	0.11	
1.245	0.0339	0.16	
2.490	0.0368	0.22	
4.980	0.0287	0.22	

**Taula IV.19.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $\text{s}^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 10 mM MOPS, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 13.2  $\mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.078	0.32	$k_{\text{cat}} = 8.7 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.0 \pm 0.3 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 4 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.156	0.45	
0.311	1.24	
0.623	2.13	
1.245	3.46	
2.490	4.35	
4.980	6.31	

- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge de Bacillus licheniformis amb G4G3G-MU a pH 7.2 i diferents concentracions d'enzim

Les cinètiques es realitzen a una concentració única de G4G3G-MU de 2.12 mM i diferents concentracions de 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C. La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4-β-glucanasa és de 25.5 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Per tal d'expressar les dades de velocitat i ΔF en funció de la concentració de MU formada, es calcula el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència aplicant l'equació IV.1, que a aquesta concentració de substrat és α<sub>S</sub> = 13.50 mV·μM<sup>-1</sup>.

**Taula IV.20.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU a diferents concentracions d'enzim. A la taula s'indica a cada concentració d'enzim la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV, la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi (ΔP), i tant la velocitat en estat estacionari com el terme  $v_{ss}/[E]_0$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [G4G3G-MU] = 2.12 mM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455), α<sub>S</sub> = 13.50 mV·μM<sup>-1</sup>.

[wt] / μM	$k_{obs} / s^{-1}$	ΔF / mV	ΔP / μM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$
12.75	59 ± 8	2.9	0.21	0.0227	0.13
6.38	49 ± 7	2.5	0.19	0.0094	0.11
3.19	75 ± 17	2.0	0.15	0.0045	0.10
1.59	43 ± 16	1.8	0.13	0.0027	0.13
0.80	38 ± 6	1.1	0.08	0.0013	0.12

- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge de Bacillus licheniformis amb G4G3G-MU a pH 7.2 a diferents temperatures

Les cinètiques es realitzen a una concentració única de G4G3G-MU de 1.55 mM i a una concentració de 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* de 15.1 μM, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a diferents temperatures de reacció. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

**Taula IV.21.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU a diferents temperatures. A la taula s'indica a cada temperatura la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [G4G3G-MU] = 1.55 mM, [wt] = 15.1 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

Temperatura / °C	$k_{obs} / s^{-1}$
10.2	35 ± 11
20.1	33 ± 10
30.6	37 ± 5
40.1	37 ± 4
50.0	43 ± 3
59.6	26 ± 2

- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-MU a pH 6.9

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4-β-glucanasa és de 27.2 μM (concentració en la cinètica de 13.6 μM), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 9.73 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.9, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Per tal d'expressar les dades de velocitat i ΔF en funció de la concentració de MU formada, s'ha de calcular el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència a cada concentració de substrat seguint l'equació IV.2, determinada tal i com s'indica a l'apartat III.1.3.

$$\alpha_s = 7.3 \cdot \exp(-0.8 \cdot [G4G3G - MU]) + 12.5 \quad \text{Equació IV.2.}$$

**Taula IV.22.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi (ΔP). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats,  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.9, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 13.6 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$\alpha_s / \text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	$\Delta P / \mu\text{M}$
0.304	52 ± 3	6.4	18.22	0.35
0.608	60 ± 3	7.2	16.99	0.42
1.216	59 ± 2	8.9	15.26	0.58
1.622	85 ± 4	8.3	14.49	0.57
2.433	72 ± 7	9.2	13.54	0.68
3.243	77 ± 4	16.2	13.05	1.24
4.865	62 ± 2	18.5	12.65	1.46

**Taula IV.23.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_s$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.9, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 13.6 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.304	0.02915	0.12	$k_{\text{cat}} = 0.26 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.37 \pm 0.08 \text{ mM}$ $K_I = 6.4 \pm 1.7 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.7 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.608	0.03362	0.15	
1.216	0.03618	0.17	
1.622	0.03604	0.18	
2.433	0.03282	0.18	
3.243	0.02833	0.16	
4.865	0.02421	0.14	

- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-MU a pH 7.8

La concentració de la solució estoc de 1,3-1,4-β-glucanasa és de 27.2 μM (concentració en la cinètica de 13.6 μM), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 9.45 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Per tal d'expressar les dades de velocitat i ΔF en funció de la concentració de MU formada, s'ha de calcular el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència a cada concentració de substrat seguint l'equació IV.3, determinada tal i com s'indica a l'apartat III.1.3.

$$\alpha_s = 29 \cdot \exp(-0.5 \cdot [G4G3G - MU]) + 37 \quad \text{Equació IV.3.}$$

**Taula IV.24.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim mesurat ( $|\Delta F|$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi (ΔP). També s'indica el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats,  $\alpha_s$ . Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 13.6 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$ \Delta F  / mV$	$\alpha_s / mV \cdot \mu M^{-1}$	$\Delta P / \mu M$
0.295	60 ± 4	5.6	62.02	0.09
0.591	73 ± 4	6.4	58.58	0.11
1.181	87 ± 3	9.6	53.07	0.18
1.575	81 ± 3	10.4	50.19	0.21
2.363	91 ± 5	13.8	45.90	0.30
3.150	67 ± 3	12.3	43.00	0.29
4.725	69 ± 6	4.4	39.73	0.11

**Taula IV.25.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència ( $\alpha_s$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 13.6 μM. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.295	0.0325	0.039	$k_{cat} = 0.11 \pm 0.01 s^{-1}$ $K_M = 0.6 \pm 0.1 mM$ $K_I = 7 \pm 2 mM$ $k_{cat}/K_M = 0.18 \pm 0.05 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.591	0.04426	0.056	
1.181	0.04756	0.066	
1.575	0.04856	0.071	
2.363	0.04529	0.073	
3.150	0.04212	0.072	
4.725	0.03262	0.060	



### IV.1.3. Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* fent servir la metodologia de flux interromput

S'estudia la formació dels dinitrofenols corresponents per hidròlisi enzimàtica dels substrats G4G3G-2,4DNP i G4G3G-3,4DNP. Per a aquest darrer substrat s'avalua la influència del pH en la cinètica d'hidròlisi per a pH superiors al seu  $pK_a$ , de manera que s'obtingui un senyal que es pugui mesurar. Finalment, es realitza una altra cinètica amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa després de reduir-la amb DTT, per tal d'augmentar la mobilitat del llaç extern de l'enzim que es troba a sobre del centre actiu. Les reaccions es duen a terme a l'instrument de flux interromput el Hi-Tech Scientific PQ/SF-53 i se segueixen en continu determinant l'absorbància a 400 nm. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH d'interès, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C. Es prepara d'una banda, una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, i de l'altra, un estoc de substrat, totes dues en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH desitjat, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , i se'n determina la concentració III.1.1. Les reaccions es realitzen seguint el procediment indicat a l'apartat III.1.2 i se segueixen durant 0.5 segons. La mitjana de les traces a cada concentració de substrat s'ajusta a l'equació III.2, d'on s'obtenen els valors de  $k_{\text{obs}}$ ,  $\Delta F$  i  $v_{\text{ss}}$ .

#### - 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-2,4DNP a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 1.96  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 0.98  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-2,4DNP és de 4.79 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 2,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 6985 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Taula IV.26.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta\text{P}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 0.98  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 6985  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta\text{P} / \mu\text{M}$
0.038	$37 \pm 4$	5.0	0.72
0.075	---	7.3	1.05
0.150	$39 \pm 4$	7.6	1.09
0.300	$33 \pm 4$	35	5.01
0.600	$29 \pm 3$	54	7.73
1.200	$39 \pm 3$	130	18.61
1.600	$41 \pm 2$	182	26.06
2.400	$39 \pm 2$	218	31.21

**Taula IV.27.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 0.98  $\mu$ M, substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 6985  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.038	0.0807	11.79	$k_{cat} = 400 \pm 100 s^{-1}$ $K_M = 0.7 \pm 0.2 mM$ $K_I = 4 \pm 2 mM$ $k_{cat}/K_M = 500 \pm 80 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.075	0.1917	28.00	
0.150	0.4488	65.56	
0.300	0.8345	121.91	
0.600	1.235	180.42	
1.200	1.373	200.58	
1.600	1.415	206.71	
2.400	1.461	213.43	

**Taula IV.28.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 0.98  $\mu$ M, substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 6985  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.038	72.15	$k_{cat} = 3844 \pm 727 s^{-1}$ $K_M = 3 \pm 1 mM$ $k_{cat}/K_M = 1120 \pm 100 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.075	----	
0.150	176.71	
0.300	368.70	
0.600	495.41	
1.200	1060.60	
1.600	1427.11	
2.400	1597.59	

#### - 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-3,4DNP a pH 6.23

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 5.31  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 2.66  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 1.85 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.23, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Taula IV.29.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dóna lloc a aquest canvi ( $\Delta\text{P}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.23, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 2.66  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta\text{P} / \mu\text{M}$
0.029	$17 \pm 2$	1.0	0.19
0.058	$25 \pm 3$	2.4	0.45
0.116	$42 \pm 2$	4.1	0.76
0.231	$46 \pm 2$	6.9	1.28
0.308	$50 \pm 3$	7.7	1.43
0.463	$46 \pm 3$	9.8	1.82
0.617	$51 \pm 3$	11.7	2.17
0.925	$46 \pm 3$	16.5	3.06

**Taula IV.30.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.23, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 2.66  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 8.8 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.58 \pm 0.03 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 15 \pm 1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.029	0.0051	0.356	
0.058	0.0113	0.789	
0.116	0.0202	1.410	
0.231	0.0359	2.506	
0.308	0.0441	3.079	
0.463	0.0548	3.826	
0.617	0.0657	4.587	
0.925	0.0765	5.341	

**Taula IV.31.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[\text{E}]_0$  en  $\text{s}^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.23, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 2.66  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 114 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 130 \pm 28 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.029	1.63	
0.058	5.03	
0.116	13.47	
0.231	24.64	
0.308	29.93	
0.463	35.38	
0.617	46.14	
0.925	58.33	

- 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-3,4DNP a pH 6.76

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4-β-glucanasa és de 5.56 μM (concentració en la cinètica de 2.78 μM), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 2.03 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.76, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Taula IV.32.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta\text{P}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.76, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 2.78 μM, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta\text{P} / \mu\text{M}$
0.016	60 ± 15	0.8	0.15
0.032	60 ± 15	1.5	0.28
0.063	63 ± 17	3.0	0.56
0.127	63 ± 5	4.8	0.89
0.254	66 ± 3	7.1	1.32
0.338	63 ± 2	8.8	1.63
0.508	65 ± 2	10.0	1.86
0.677	65 ± 4	10.2	1.89
1.015	61 ± 7	9.8	1.82

**Taula IV.33.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en V·s<sup>-1</sup>, i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.76, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a 30 °C, [wt] = 2.78 μM, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.016	0.0048	0.321	
0.032	0.0084	0.561	
0.063	0.0153	1.022	
0.127	0.027	1.804	
0.254	0.0399	2.665	
0.338	0.0507	3.387	
0.508	0.0596	3.981	
0.677	0.0682	4.556	
1.015	0.0698	4.663	

**Taula IV.34.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 6.76, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 2.78  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4-DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.016	3.51	$k_{\text{cat}} = 139 \pm 28 s^{-1}$ $K_M = 0.7 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 0.7 \pm 0.3 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 199 \pm 94 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.032	6.56	
0.063	13.64	
0.127	21.86	
0.254	34.09	
0.338	40.19	
0.508	47.49	
0.677	48.70	
1.015	45.10	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-3,4DNP a pH 7.2

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 24.6  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 12.3  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 1.69 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Taula IV.35.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dóna lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 12.3  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / s^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta P / \mu\text{M}$
0.027	32 $\pm$ 6	2.5	0.46
0.053	50 $\pm$ 3	4.8	0.89
0.106	47 $\pm$ 2	9.0	1.67
0.212	55 $\pm$ 2	16.3	3.03
0.423	65 $\pm$ 2	19.6	3.64
0.565	64 $\pm$ 2	22.3	4.14
0.845	67 $\pm$ 2	24.0	4.46

**Taula IV.36.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 12.3  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.027	0.0153	0.231	$k_{cat} = 7.8 \pm 1.4 s^{-1}$ $K_M = 0.7 \pm 0.2 mM$ $K_I = 0.9 \pm 0.7 mM$ $k_{cat}/K_M = 11 \pm 0.5 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.053	0.0311	0.470	
0.106	0.0607	0.916	
0.212	0.1184	1.788	
0.423	0.1600	2.416	
0.565	0.1958	2.956	
0.845	0.1881	2.840	

**Taula IV.37.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 12.3  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.027	1.48	$k_{cat} = 43 \pm 3 s^{-1}$ $K_M = 0.43 \pm 0.07 mM$ $k_{cat}/K_M = 100 \pm 6 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.053	4.15	
0.106	7.34	
0.212	15.19	
0.423	21.76	
0.565	24.46	
0.845	27.75	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-3,4DNP a pH 7.8

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 23.4  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 11.7  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 1.80 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Taula IV.38.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dóna lloc a aquest canvi ( $\Delta\text{P}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 11.7  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta\text{P} / \mu\text{M}$
0.029	55 $\pm$ 10	1.6	0.30
0.057	46 $\pm$ 3	2.8	0.52
0.113	53 $\pm$ 10	4.7	0.87
0.225	44 $\pm$ 3	8.8	1.63
0.450	66 $\pm$ 2	13.9	2.58
0.600	50 $\pm$ 1	17.4	3.23
0.900	62 $\pm$ 2	14.3	2.66

**Taula IV.39.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.3 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0$  després de dividir per l'absortivitat obtinguda a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 11.7  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.029	0.0067	0.106	$k_{\text{cat}} = 3.7 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 4.1 \pm 0.9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.057	0.0132	0.210	
0.113	0.0238	0.378	
0.225	0.0482	0.765	
0.450	0.0752	1.194	
0.600	0.0922	1.463	

**Taula IV.40.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[\text{E}]_0$  en  $\text{s}^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.8, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C, [wt] = 11.7  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.029	1.53	$k_{\text{cat}} = 43 \pm 8 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 1.1 \pm 0.3 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 39 \pm 18 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.057	2.26	
0.113	4.35	
0.225	6.87	
0.450	15.79	
0.600	15.28	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G3G-3,4DNP a pH 8.25

La concentració de la solució estoc de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 22.8  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 11.4  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 3.00 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 8.25, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30  $^\circ\text{C}$ . El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Taula IV.41.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta\text{Abs}$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta\text{P}$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 8.25, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30  $^\circ\text{C}$ , [wt] = 11.4  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) =  $5385 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Abs} / \text{mV}$	$\Delta\text{P} / \mu\text{M}$
0.092	$53 \pm 8$	2.2	0.41
0.188	$56 \pm 5$	4.4	0.82
0.375	$71 \pm 3$	7.1	1.32
0.500	$69 \pm 5$	8.0	1.49
0.750	$68 \pm 2$	9.7	1.80
1.000	$85 \pm 5$	11.6	2.15

**Taula IV.42.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0$  després de dividir per l'absortivitat obtinguda a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 8.25, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30  $^\circ\text{C}$ , [wt] = 11.4  $\mu\text{M}$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) =  $5385 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[\text{E}]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 2.4 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 2.2 \pm 0.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.092	0.0117	0.191	
0.188	0.0231	0.376	
0.375	0.0353	0.575	
0.500	0.0466	0.759	
0.750	0.0581	0.946	
1.000	0.0708	1.153	



**Taula IV.43.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 8.25, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [wt] = 11.4  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.092	1.73	$k_{\text{cat}} = 51 \pm 13 s^{-1}$ $K_M = 2.4 \pm 0.8 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 21 \pm 12 \text{ mM}^{-1}\cdot s^{-1}$
0.188	3.66	
0.375	7.67	
0.500	8.46	
0.750	10.13	
1.000	15.29	

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* tractada amb DTT amb G4G3G-3,4-DNP a pH 7.2

La 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (42.9  $\mu$ M) es redueix en presència de DTT (2.15 mM) en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, durant 1 hora. Es realitza una dilució 1/10 de la solució resultant en el mateix tampó, i amb aquesta es realitza la cinètica de flux interromput amb el substrat G4G3G-3,4DNP. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, 108  $\mu$ M DTT, [wt<sub>reduït</sub>] = 2.15  $\mu$ M. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ .

**Taula IV.44.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, prèviament reduïda amb DTT, amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el valor del canvi d'absorbància mesurat ( $\Delta$ Abs) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta$ P). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, 108  $\mu$ M DTT, [wt<sub>reduït</sub>] = 2.15  $\mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{\text{obs}} / s^{-1}$	$\Delta$ Abs / mV	$\Delta$ P / $\mu$ M
0.103	36 $\pm$ 13	0.64	0.12
0.206	27 $\pm$ 13	1.7	0.32
0.413	29 $\pm$ 2	2.8	0.52
0.825	33 $\pm$ 3	4.0	0.74
1.100	25 $\pm$ 2	4.4	0.82
1.650	33 $\pm$ 3	4.7	0.87

**Taula IV.45.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, prèviament reduïda en presència de DTT, amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat del 3,4-dinitrofenol mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, 108  $\mu$ M DTT,  $[wt_{reduït}] = 2.15 \mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.103	0.0042	0.36	$k_{cat} = 9.8 \pm 0.7 s^{-1}$ $K_M = 2.6 \pm 0.3 mM$
0.206	0.0085	0.73	
0.413	0.0161	1.39	
0.825	0.0265	2.29	$k_{cat}/K_M = 3.8 \pm 0.7 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
1.100	0.0339	2.93	
1.650	0.0441	3.81	

**Taula IV.46.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per a la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, prèviament reduïda en presència de DTT, amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, 108  $\mu$ M DTT,  $[wt_{reduït}] = 2.15 \mu$ M, substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.103	2.38	$k_{cat} = 27 \pm 2 s^{-1}$ $K_M = 0.9 \pm 0.1 mM$
0.206	4.74	
0.413	8.36	
0.825	13.72	$k_{cat}/K_M = 30 \pm 6 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
1.100	12.45	
1.650	17.16	

#### IV.1.4. Cinètiques d'hidròlisi dels substrats G4G3G-MU, G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP amb els mutants W221A i M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* fent servir la metodologia de flux interromput

Es realitzen cinètiques de flux interromput amb el mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i els tres substrats G4G3G-MU, G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP. Per al mutant hiperactiu M58A només es realitzen cinètiques amb el G4G3G-MU. S'estudia la formació de les aglicones corresponents per hidròlisi enzimàtica dels substrats. Les reaccions es duen a terme a l'instrument de flux interromput el Hi-Tech Scientific PQ/SF-53, i se segueixen en continu determinant l'absorbància a 400 nm per als dinitrofenilglicòsids i per mesura d'emissió de fluorescència en el cas del G4G3G-MU ( $\lambda_{excitació} = 360$  nm; filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455)). Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. Es prepara d'una banda, una solució de 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, i de l'altra, un estoc de substrat, totes dues en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , i se'n determina la concentració III.1.1. Les reaccions es realitzen seguint el procediment indicat a l'apartat III.1.2 i se segueixen durant

Mètodes i materials: Biologia molecular

0.5 segons. La mitjana de les traces a cada concentració de substrat s'ajusta a l'equació III.2, d'on s'obtenen els valors de  $k_{obs}$ ,  $\Delta F$  i  $v_{ss}$ .

- Mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb G4G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 3.57  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 1.79  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 9.39 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Per tal d'expressar les dades de velocitat i  $\Delta F$  en funció de la concentració de MU formada, s'ha de calcular el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència a cada concentració de substrat seguint l'equació IV.1, determinada tal i com s'indica a l'apartat III.1.3.

$$\alpha_s = 13 \cdot \exp(-0.5 \cdot [G4G3G - MU]) + 9 \quad \text{Equació IV.1.}$$

**Taula IV.47.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim obtingut ( $|\Delta F|$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C,  $[W221A] = 1.79 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{obs} / \text{s}^{-1}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$\alpha_s / \text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	$\Delta P / \mu\text{M}$
0.073	$17 \pm 7$	0.77	21.53	0.04
0.147	$73 \pm 12$	1.22	21.08	0.06
0.293	$64 \pm 10$	1.95	20.23	0.10
0.587	$80 \pm 8$	2.36	18.69	0.13
1.174	$75 \pm 7$	2.55	16.23	0.16
2.348	$74 \pm 8$	2.45	13.02	0.19
4.695	$65 \pm 8$	1.96	10.24	0.19

**Taula IV.48.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C,  $[W221A] = 1.79 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{ss} / \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{cat} = 0.65 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.38 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{cat}/K_M = 1.7 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.073	0.0035	0.091	
0.147	0.0075	0.199	
0.293	0.0103	0.284	
0.587	0.0130	0.389	
1.174	0.0139	0.479	
2.348	0.0129	0.554	
4.695	0.0111	0.605	

**Taula IV.49.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per al mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C, [W221A] = 1.79  $\mu$ M. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.073	0.48	$k_{cat} = 13 \pm 3 s^{-1}$ $K_M = 0.7 \pm 0.2 mM$ $K_I = 8 \pm 5 mM$ $k_{cat}/K_M = 19 \pm 10 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.147	2.63	
0.293	3.86	
0.587	6.20	
1.174	7.19	
2.348	8.41	
4.695	7.50	

- Mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb G4G3G-2,4DNP a pH 7.2

La concentració de la solució estoc del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 3.57  $\mu$ M (concentració en la cinètica de 1.79  $\mu$ M), i la de la solució estoc de G4G3G-2,4DNP és de 2.52 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 2,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 6985 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Taula IV.50.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta Abs$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [W221A] = 1.79  $\mu$ M, substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 6985  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$\Delta Abs / mV$	$\Delta P / \mu M$
0.010	10 $\pm$ 2	2.7	0.39
0.020	22 $\pm$ 3	5.9	0.84
0.039	48 $\pm$ 4	9.9	1.42
0.079	63 $\pm$ 2	15.5	2.22
0.158	62 $\pm$ 3	24.3	3.48
0.315	69 $\pm$ 3	48.9	7.00
0.630	56 $\pm$ 2	59.1	8.46
1.260	54 $\pm$ 2	57.3	8.20

**Taula IV.51.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C,  $[W221A] = 1.79 \mu M$ , substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) =  $6985 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.010	0.0219	1.36	
0.020	0.0530	3.29	
0.039	0.1050	6.51	$k_{cat}/K_M = 208 \pm 51 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.079	0.1682	10.43	
0.158	0.2090	12.96	
0.315	0.2746	17.03	
0.630	0.2745	17.02	
1.260	0.2432	15.08	

**Taula IV.52.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per al mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-2,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C,  $[W221A] = 1.79 \mu M$ , substrat G4G3G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) =  $6985 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.010	4.10	
0.020	13.90	
0.039	44.21	$k_{cat}/K_M = 1053 \pm 685 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.079	88.06	
0.158	134.74	
0.315	287.94	
0.630	285.67	
1.260	270.20	

- Mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb G4G3G-3,4DNP a pH 7.2

La concentració de la solució estoc del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 17.8  $\mu M$  (concentració en la cinètica de 8.9  $\mu M$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-3,4DNP és de 2.09 mM. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C. El seguiment de la cinètica de reacció es realitza per espectrofotometria a 400 nm. Per tal d'expressar les dades de velocitat i la magnitud del canvi de senyal màxim mesurat, en funció de la concentració de 3,4-dinitrofenol format, es divideix el resultat per l'absortivitat mesurada en l'aparell de flux interromput, que en aquestes condicions experimentals és de  $\Delta\epsilon = 5385 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Taula IV.53.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{obs}$ ), el canvi de senyal màxim mesurat ( $\Delta Abs$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C, [W221A] = 8.9  $\mu M$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta \epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$k_{obs} / s^{-1}$	$\Delta Abs / mV$	$\Delta P / \mu M$
0.033	58 $\pm$ 2	6.9	1.28
0.065	56 $\pm$ 2	12.3	2.28
0.131	51 $\pm$ 2	18.8	3.49
0.261	59 $\pm$ 2	29.4	5.46
0.348	83 $\pm$ 3	43.0	7.99
0.523	59 $\pm$ 2	64.1	11.90
0.697	62 $\pm$ 2	72.0	13.37
1.045	64 $\pm$ 2	93.2	17.31

**Taula IV.54.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $V \cdot s^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{ss}/[E]_0$  després de dividir per l'absortivitat mesurada a l'aparell de flux interromput. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$  a 30 °C, [W221A] = 8.9  $\mu M$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta \epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_{ss} / V \cdot s^{-1}$	$(v_{ss}/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{cat} = 14.0 \pm 0.8 s^{-1}$ $K_M = 0.35 \pm 0.04 mM$  $k_{cat}/K_M = 40 \pm 7 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.033	0.0622	1.298	
0.065	0.1092	2.278	
0.131	0.1699	3.545	
0.261	0.2765	5.769	
0.348	0.3471	7.242	
0.523	0.4095	8.544	
0.697	0.4361	9.099	
1.045	0.4260	8.889	

**Taula IV.55.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per al mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-3,4DNP. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C, [W221A] = 8.9  $\mu M$ , substrat G4G3G-3,4DNP,  $\Delta \epsilon_{hidròlisi}$  (400 nm) = 5385  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{cat} = 279 \pm 65 s^{-1}$ $K_M = 1.1 \pm 0.4 mM$  $k_{cat}/K_M = 254 \pm 151 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
0.033	9.55	
0.065	16.54	
0.131	23.81	
0.261	42.18	
0.348	81.49	
0.523	87.27	
0.697	102.46	
1.045	134.96	

- Mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa amb G4G3G-MU a pH 7.2

La concentració de la solució estoc del mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa és de 4.5  $\mu\text{M}$  (concentració en la cinètica de 2.25  $\mu\text{M}$ ), i la de la solució estoc de G4G3G-MU és de 20.05 mM. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455). Per tal d'expressar les dades de velocitat i  $\Delta F$  en funció de la concentració de MU formada, s'ha de calcular el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència a cada concentració de substrat seguint l'equació IV.1, determinada tal i com s'indica a l'apartat III.1.3.

$$\alpha_s = 13 \cdot \exp(-0.5 \cdot [G4G3G - MU]) + 9 \quad \text{Equació IV.1.}$$

**Taula IV.56.** Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la constant de velocitat del canvi de senyal ( $k_{\text{obs}}$ ), el valor absolut del canvi de senyal màxim obtingut ( $|\Delta F|$ ) en mV i la concentració de producte format que dona lloc a aquest canvi ( $\Delta P$ ). També s'indica el factor de proporcionalitat emprat per tal de realitzar la conversió d'unitats. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C,  $[M58A] = 2.25 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$ \Delta F  / \text{mV}$	$\alpha_s / \text{mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	$\Delta P / \mu\text{M}$
0.157	$17 \pm 6$	0.4	21.02	0.02
0.313	$30 \pm 3$	1.5	20.12	0.07
0.627	$33 \pm 3$	2.5	18.50	0.14
1.253	$40 \pm 3$	3.7	15.95	0.23
2.506	$37 \pm 3$	5.8	12.71	0.46
5.013	$44 \pm 3$	4.6	10.06	0.46
6.547	$50 \pm 2$	4.2	9.49	0.44
10.025	$53 \pm 4$	3.8	9.09	0.42

**Taula IV.57.** Resultats de velocitat inicial de reacció en estat estacionari obtinguda en l'ajust de l'equació III.2 a les traces de les cinètiques del mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la velocitat d'estat estacionari en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ , i el paràmetre  $v_{\text{ss}}/[E]_0$  després de dividir pel factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C,  $[M58A] = 2.25 \mu\text{M}$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$v_{\text{ss}} / \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_{\text{ss}}/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 3.1 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 5.0 \pm 0.9 \text{ mM}$ $K_I = 14 \pm 5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.6 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.157	0.0058	0.12	
0.313	0.0080	0.18	
0.627	0.0144	0.35	
1.253	0.0207	0.58	
2.506	0.0287	1.00	
5.013	0.0298	1.32	
6.547	0.0294	1.38	
10.025	0.0289	1.41	

**Taula IV.58.** Resultats de velocitat inicial de formació ràpida de producte en estat preestacionari per al mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat el terme  $v_i/[E]_0$  en  $s^{-1}$ , on  $v_i$  s'ha obtingut aplicant l'equació III.3. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C,  $[M58A] = 2.25 \mu M$ . Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm (WG455).

[G4G3G-MU] / mM	$(v_i/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.157	0.25	$k_{cat} = 29 \pm 10 s^{-1}$ $K_M = 6 \pm 3 mM$ $K_I = 12 \pm 9 mM$
0.313	1.12	
0.627	2.40	
1.253	4.71	$k_{cat}/K_M = 5 \pm 4 mM^{-1} \cdot s^{-1}$
2.506	8.60	
5.013	10.55	
6.547	11.54	
10.025	11.96	

## IV.2. Resultats d'hidròlisi de substrats cromofòrics catalitzada per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en estat estacionari

### IV.2.1. Anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis*

S'estudien les reaccions d'hidròlisi de diferents substrats cromofòrics en presència de tres enzims diferents, l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les condicions de reacció són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C.

#### IV.2.1.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

Seguint el procediment descrit a l'apartat III.2.3 es determinen les longituds d'ona tant per a la determinació de les concentracions de les solucions dels diferents substrats en base a la seva absorbància, com per al seguiment de la cinètica de reacció, i les absortivitats corresponents. Les condicions a les que s'ha determinat la longitud d'ona, i variació d'absortivitat, per al seguiment de la reacció enzimàtica, són tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C. Per al substrat G4G3G-MU aquestes determinacions ja s'havien realitzat en altres treballs, i són: per a la determinació de la concentració de la solució de substrat,  $\epsilon_{316 \text{ nm}} = 13600 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , i per al seguiment de la seva hidròlisi a les condicions experimentals esmentades,  $\Delta\epsilon_{365 \text{ nm}} = 5140 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .



**Taula IV.59.** Longituds d'ona escollides per a la determinació de les concentracions de les solucions de substrat en base a la seva absorptivitat, i per al seguiment de la seva hidròlisi en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C, per als diferents substrats emprats en les anàlisis de Hammett.

Substrat	$\lambda$ determinació [S] / nm	$\lambda$ seguiment hidròlisi / nm
G4G3G-2,4DNP	282	400
G4G3G-2,3DNP	315	418
G4G3G-3,4DNP	293	400
G4G3G-3,5DNP	326	400
G4G3G-4NP	301	402
G4G3G-3NP	270	400 <sup>1</sup>
G4G3G-4Br	275	288
G4G3G-P	266	277

<sup>1</sup> Aquesta longitud d'ona no es correspon amb la  $\Delta\epsilon$  màxima.

**Taula IV.60.** Valors d'absortivitat dels diferents substrats emprats en les anàlisis de Hammett a la longitud d'ona escollida per tal de determinar la concentració de les seves solucions en base a la seva absorptivitat.

Substrat	$\lambda$ / nm	$\epsilon$ / $M^{-1}\cdot cm^{-1}$
G4G3G-2,4DNP	282	8601
G4G3G-2,3DNP	315	2168
G4G3G-3,4DNP	293	5564
G4G3G-3,5DNP	326	2246
G4G3G-4NP	301	8529
G4G3G-3NP	270	6522
G4G3G-4BrP	275	731
G4G3G-P	266	695

**Taula IV.61.** Valors d'absortivitat dels substrats cromofòrics emprats en les anàlisis de Hammett, i dels fenols alliberats en la seva hidròlisi, a les longituds d'ona triades per al seguiment de la hidròlisi dels substrats, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C. A la darrera columna s'indica per a cada substrat el valor de la  $\Delta\epsilon$  emprada en els càlculs que s'obté com a diferència entre l'absortivitat del fenol i la del substrat corresponent.

Substrat	$\lambda$ / nm	$\epsilon_{aglicona}$ / $M^{-1}\cdot cm^{-1}$	$\epsilon_{substrat}$ / $M^{-1}\cdot cm^{-1}$	$\Delta\epsilon$ / $M^{-1}\cdot cm^{-1}$
G4G3G-2,4DNP	400	9138	184	8954
G4G3G-2,3DNP	418	2447	88	2359
G4G3G-3,4DNP	400	9777	161	9616
G4G3G-3,5DNP	400	1695	24	1671
G4G3G-4NP	402	9889	22	9867
G4G3G-3NP	400	258	37	221
G4G3G-4BrP	288	1067	188	879
G4G3G-P	277	1134	116	1018

IV.2.1.2. Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la  $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* amb els substrats 16-22 i 28

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.6. A continuació es presenten per a cada enzim i substrat els resultats de velocitat inicial d'hidròlisi ( $v_0$ ) en unitats d'absorbància·s<sup>-1</sup>, i el valor del terme  $v_0/[E]_0$  després de dividir el resultat anterior per l'absortivitat i la concentració d'enzim, a cada concentració de substrat. En el cas dels substrats G4G3G-2,4DNP i G4G3G-2,3DNP es presenten els resultats de la velocitat inicial d'hidròlisi total obtinguda en presència d'enzim, i el de la velocitat d'hidròlisi espontània, tots dos en unitats d'absorbància·s<sup>-1</sup>, i a la darrera columna de la taula es presenta el terme  $v_0/[E]_0$  per a la velocitat d'hidròlisi enzimàtica, on aquesta s'ha obtingut com a diferència entre la velocitat d'hidròlisi total i la velocitat d'hidròlisi espontània. Per a la resta de substrats s'ha comprovat que en les condicions experimentals emprades la velocitat d'hidròlisi espontània dels substrats pot considerar-se com menyspreable enfront de la velocitat d'hidròlisi enzimàtica. En la llegenda de les taules s'indiquen les condicions experimentals concretes de cada experiment.

**Enzim salvatge**

- G4G3G-2,4DNP (28)

**Taula IV.62.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.67 nM, substrat G4G3G-2,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 8954 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^3 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.015	0.2852	2.8388	47.0877
0.031	0.5739	2.8625	95.2285
0.046	0.8502	2.8848	141.3016
0.061	1.0075	2.9071	167.5299
0.092	1.3795	2.9532	229.5584
0.153	1.0016	3.0439	166.5232
0.230	1.5778	3.1583	262.5935
0.230	1.9534	3.1583	325.2300
0.307	2.2131	3.2728	368.5195
0.489	2.6076	3.5433	434.2628
0.612	2.8364	3.7262	472.3879
0.765	2.9049	3.9536	483.7733

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 590 \pm 14 \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 0.18 \pm 0.01 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K_M = 3340 \pm 300 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$$

- G4G3G-2,3DNP (22)

**Taula IV.63.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 2.7 nM, substrat: G4G3G-2,3DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (418 nm) = 2359 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-2,3DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^7 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.101	1.2235	2.6334	19.3086
0.202	2.4389	2.7695	38.5286
0.302	3.0821	2.9056	48.6990
0.604	5.5924	3.3140	88.3942
0.806	6.8212	3.5863	107.8240
1.209	8.2220	4.1305	129.9697
1.511	9.2570	4.5389	146.3323
2.015	10.6642	5.2196	168.5771
2.552	11.3421	5.9453	179.2869
3.022	11.8893	6.5806	187.9311
3.022	11.7298	6.5806	185.4085
4.029	13.4206	7.9416	212.1279

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 272 \pm 6 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 1.28 \pm 0.07 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 211 \pm 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- G4G3G-3,4DNP (21)

**Taula IV.64.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 2.7 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 9616 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 14.2 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.44 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 32 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.073	0.5370	2.0838	
0.147	0.9285	3.6031	
0.257	1.3473	5.2295	
0.367	1.6441	6.3796	
0.496	1.9201	7.4506	
0.734	2.2721	8.8162	
0.991	2.5063	9.7249	
1.285	2.6482	10.2755	
1.506	2.8665	11.1228	
1.763	2.9432	11.4204	

- G4G3G-3,4DNP (21), (repetició)

**Taula IV.65.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 3.7 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 9616 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
0.054	0.8364	2.3498	$k_{\text{cat}} = 18.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.37 \pm 0.01 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 51 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.121	1.6414	4.6115	
0.188	2.1559	6.0569	
0.295	2.9579	8.3101	
0.429	3.5578	9.9955	
0.590	4.1617	11.6921	
0.777	4.4783	12.5816	
0.965	4.8920	13.7439	
1.152	5.0969	14.3195	
1.554	5.3470	15.0222	
1.822	5.4458	15.2998	

- G4G3G-3,5DNP (20)

**Taula IV.66.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 74 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1671 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
0.103	0.9852	0.8020	$k_{\text{cat}} = 4.4 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.46 \pm 0.03 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 10 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.205	1.6381	1.3336	
0.308	2.2238	1.8103	
0.410	2.4906	2.0276	
0.615	3.1144	2.5354	
0.820	3.5256	2.8701	
1.538	4.1378	3.3685	
3.076	4.7587	3.8740	
4.102	4.9281	4.0119	

Mètodes i materials: Biologia molecular

- G4G3G-3,5DNP (20), (repetició)

**Taula IV.67.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 93 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1671 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.058	0.8915	0.5771	$k_{\text{cat}} = 5.46 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.57 \pm 0.02 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 9.6 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.116	1.5567	1.0077	
0.218	2.3904	1.5474	
0.363	3.2181	2.0832	
0.580	4.2575	2.7561	
0.870	5.0658	3.2794	
1.305	5.8557	3.7907	
1.885	6.4305	4.1628	
2.456	6.8802	4.4539	
3.190	7.2110	4.6681	
3.915	7.2533	4.6955	
4.640	7.6264	4.9370	

- G4G3G-4NP (19)

**Taula IV.68.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 147 nM, substrat: G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 9867 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.090	1.3391	0.0923	$k_{\text{cat}} = 0.81 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.73 \pm 0.04 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 1.1 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.210	2.6221	0.1808	
0.450	4.3547	0.3002	
0.750	6.0022	0.4138	
0.989	6.8772	0.4741	
1.499	7.9145	0.5456	
1.949	8.7089	0.6004	
2.998	9.3375	0.6437	
3.987	9.8587	0.6743	
5.995	10.4856	0.7229	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.69.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 126 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5140 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.75 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.93 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 15 \pm 1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.80 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.260	1.0593	0.1635	
0.520	1.7101	0.2640	
0.781	2.1278	0.3285	
1.041	2.4645	0.3805	
1.561	2.8548	0.4407	
1.952	3.0264	0.4672	
3.903	3.2057	0.4949	
5.985	3.1343	0.4839	

- G4G3G-3NP (17)

**Taula IV.70.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 378 nM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 221 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.850 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.28 \pm 0.04 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.66 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.288	1.2643	0.1514	
0.576	2.2632	0.2710	
0.960	3.0617	0.3666	
1.960	4.2867	0.5132	
2.880	4.9466	0.5922	
3.840	5.2471	0.6282	
4.992	5.6816	0.6802	
6.528	5.9766	0.7155	

- G4G3G-P (16)

**Taula IV.71.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 290 nM, substrat: G4G3G-P.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (277 nm) = 1018 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.49 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 7.6 \pm 0.4 \text{ mM}$ $K_I = 55 \pm 7 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.065 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.659	1.2090	0.0404	
0.879	1.5452	0.0516	
1.099	1.8299	0.0611	
1.538	2.5174	0.0841	
2.197	3.2642	0.1090	
3.296	4.2677	0.1425	
4.394	5.2606	0.1757	
6.591	6.5377	0.2183	
8.788	7.2883	0.2434	
10.985	7.8016	0.2605	
15.379	8.2361	0.2751	
19.773	8.4853	0.2834	

- G4G3G-P (I6), (repetició)

**Taula IV.72.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 124 nM, substrat: G4G3G-P.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (277 \text{ nm}) = 1018 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.660	0.5653	0.0448	$k_{\text{cat}} = 0.427 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 6.2 \pm 0.3 \text{ mM}$
0.990	0.6706	0.0531	
1.540	1.0575	0.0838	
2.200	1.3817	0.1095	$k_{\text{cat}}/K_M = 0.069 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
3.300	1.9255	0.1525	
4.400	2.2633	0.1793	
5.500	2.5025	0.1982	
7.700	2.9725	0.2355	
9.900	3.3581	0.2660	
14.299	3.7325	0.2957	

- Recull dels resultats obtinguts amb l'enzim salvatge

**Taula IV.73.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents substrats cromofòrics. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$
G4G3G-2,4DNP	$590 \pm 14$	$0.18 \pm 0.01$	----	$3340 \pm 300$
G4G3G-2,3DNP	$272 \pm 6$	$1.28 \pm 0.07$	----	$211 \pm 15$
G4G3G-3,4DNP	$14.2 \pm 0.2$	$0.44 \pm 0.02$	----	$32 \pm 2$
G4G3G-3,4DNP	$18.7 \pm 0.2$	$0.37 \pm 0.01$	----	$51 \pm 2$
G4G3G-3,5DNP	$4.4 \pm 0.2$	$0.46 \pm 0.03$	----	$10 \pm 1$
G4G3G-3,5DNP	$5.46 \pm 0.04$	$0.57 \pm 0.02$	----	$9.6 \pm 0.4$
G4G3G-4NP	$0.81 \pm 0.02$	$0.73 \pm 0.04$	----	$1.1 \pm 0.1$
G4G3G-MU	$0.75 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.04$	$15 \pm 1$	$0.80 \pm 0.05$
G4G3G-3NP	$0.850 \pm 0.008$	$1.28 \pm 0.04$	----	$0.66 \pm 0.03$
G4G3G-P	$0.49 \pm 0.02$	$7.6 \pm 0.4$	$55 \pm 7$	$0.065 \pm 0.005$
G4G3G-P	$0.427 \pm 0.008$	$6.2 \pm 0.3$	$55 \pm 7$	$0.069 \pm 0.005$

## Mutant W221A

### - *G4G3G-2,4DNP* (28)

**Taula IV.74.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 5.0 nM, substrat: G4G3G-2,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 8954 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-2,4DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.031	0.8179	2.8621	1.7506
0.061	1.4583	2.9076	3.1699
0.092	1.9278	2.9534	4.2102
0.122	2.4617	2.9985	5.3935
0.153	3.0169	3.0440	6.6238
0.306	4.2338	3.2714	9.3177
0.459	5.2728	3.4987	11.6172
0.612	5.8124	3.7260	12.8090
0.765	6.0378	3.9534	13.3039
0.918	6.5941	4.1807	14.5327
1.224	6.6958	4.6354	14.7477

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 18.7 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.030 \pm 0.001 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 634 \pm 40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

### - *G4G3G-2,4DNP* (28), (repetició)

**Taula IV.75.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 5.3 nM, substrat: G4G3G-2,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 8954 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-2,4DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.002	0.4678	2.8194	0.9268
0.004	0.9102	2.8224	1.8593
0.009	1.8992	2.8298	3.9441
0.013	2.6417	2.8358	5.5093
0.017	3.3183	2.8417	6.9356
0.022	3.8247	2.8492	8.0030
0.030	4.4841	2.8611	9.3928
0.038	5.0167	2.8729	10.5154
0.048	5.5995	2.8878	11.7437
0.065	6.4648	2.9131	13.5673
0.073	7.2907	2.9250	15.3082
0.081	7.1370	2.9369	14.9839
0.086	6.5005	2.9443	13.6419
0.119	7.6095	2.9933	15.9788

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 21.2 \pm 0.8 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.037 \pm 0.004 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 573 \pm 84 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$



- G4G3G-2,3DNP (22)

**Taula IV.76.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 5.0 nM, substrat: G4G3G-2,3DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (418 nm) = 2359 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-2,3DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^7 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.050	2.8667	2.5654	2.3914
0.101	5.7961	2.6334	4.8565
0.151	7.5006	2.7015	6.2906
0.235	9.5795	2.8148	8.0395
0.302	11.6538	2.9056	9.7847
0.604	14.8148	3.3140	12.4420
0.806	18.3054	3.5861	15.3778
1.209	19.0144	4.1306	15.9700
1.410	19.6952	4.4029	16.5407
3.022	21.9710	6.5806	18.4380
4.029	23.3492	7.9417	19.5866

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 20.9 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.37 \pm 0.02 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 57 \pm 3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- G4G3G-2,3DNP (22), (repetició)

**Taula IV.77.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 11.9 nM, substrat: G4G3G-2,3DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (418 nm)= 2359 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-2,3DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^7 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.102	1.6076	2.6352	5.7149
0.204	2.5201	2.7730	8.9636
0.306	3.2133	2.9109	11.4314
0.408	3.5187	3.0487	12.5183
0.510	3.9457	3.1865	14.0383
0.638	4.4141	3.3595	15.7055
0.893	4.6557	3.7040	16.5646
1.148	5.0551	4.0486	17.9855
1.785	5.5961	4.9093	19.9088
2.678	5.7969	6.1159	20.6195
3.315	5.9184	6.9766	21.0491

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 23.1 \pm 0.2 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.32 \pm 0.01 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 72 \pm 3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- G4G3G-3,4DNP (21)

**Taula IV.78.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 5.0 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 9616 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 9.5 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.31 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 7 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 30 \pm 3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.037	4.4027	0.9092	
0.073	9.0709	1.8733	
0.110	11.7188	2.4201	
0.147	14.8042	3.0573	
0.220	18.2664	3.7723	
0.257	20.3763	4.2080	
0.367	24.5648	5.0730	
0.496	26.8765	5.5498	
0.734	30.0605	6.2079	
1.285	32.4708	6.7057	

- G4G3G-3,4DNP (21), (repetició)

**Taula IV.79.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 5.6 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 9616 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 9.37 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.196 \pm 0.006 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 48 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.027	6.8875	1.2900	
0.067	12.1216	2.2703	
0.121	18.9084	3.5415	
0.188	24.6461	4.6162	
0.295	30.2226	5.6606	
0.429	34.8175	6.5212	
0.590	36.9508	6.9208	
0.777	39.6835	7.4326	
0.965	41.5570	7.7835	
1.152	42.4621	7.9530	
1.340	44.1709	8.2731	

- G4G3G-3,5DNP (20)

**Taula IV.80.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 50 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1671 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.103	0.6233	0.7407	$k_{\text{cat}} = 4.71 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.63 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 7.5 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.205	0.9538	1.1334	
0.308	1.3532	1.6080	
0.410	1.5456	1.8366	
0.615	1.9496	2.3167	
0.820	2.2231	2.6417	
1.025	2.4531	2.9149	
1.538	2.7309	3.2451	
2.051	3.0212	3.5900	
3.076	3.2862	3.9049	
4.102	3.4886	4.1454	

- G4G3G-4NP (19)

**Taula IV.81.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 252 nM, substrat: G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 9867 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.090	2.6790	0.1078	$k_{\text{cat}} = 0.54 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.37 \pm 0.03 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.5 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.150	3.9949	0.1608	
0.210	4.8270	0.1943	
0.450	7.1683	0.2885	
0.750	8.7798	0.3534	
0.989	9.8028	0.3946	
1.499	10.9636	0.4413	
1.949	11.1785	0.4500	
2.998	11.5560	0.4652	
3.987	12.2699	0.4939	

- G4G3G-4NP (19), (repetició)

**Taula IV.82.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 168 nM, substrat: G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 9867 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.623 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.40 \pm 0.01 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.56 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.082	1.5095	0.0910	
0.136	2.6797	0.1616	
0.190	3.4542	0.2083	
0.408	5.1573	0.3110	
0.680	6.5326	0.3940	
0.898	7.2851	0.4394	
1.360	7.9315	0.4783	
1.768	8.5158	0.5136	
2.720	8.9160	0.5377	
3.618	9.3193	0.5620	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.83.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 504 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5140 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.56 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.83 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 13 \pm 1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.68 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.260	3.4812	0.1346	
0.520	5.5820	0.2158	
0.781	6.8994	0.2668	
1.041	7.6971	0.2976	
1.561	8.8833	0.3435	
1.952	9.1986	0.3557	
3.903	9.7400	0.3766	
5.985	9.0610	0.3504	

- G4G3G-3NP (17)

**Taula IV.84.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 1.51  $\mu\text{M}$ , substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 221 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.372 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.16 \pm 0.04 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.32 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.288	2.4129	0.0724	
0.576	4.2439	0.1273	
0.960	5.6757	0.1702	
1.920	7.6010	0.2279	
2.880	8.7643	0.2628	
3.858	9.4807	0.2843	
5.015	10.1273	0.3037	
6.528	10.6126	0.3182	

- G4G3G-4BrP (72)

**Taula IV.85.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 1.51 μM, substrat: G4G3G-4BrP. Δε<sub>hidròlisi</sub> (288 nm) = 879 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4BrP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.097	1.2611	0.0095	$k_{\text{cat}} = 0.056 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.46 \pm 0.03 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.13 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.194	2.2965	0.0173	
0.290	3.0483	0.0230	
0.387	3.6675	0.0276	
0.581	4.4015	0.0332	
0.774	5.0168	0.0378	
0.968	5.5300	0.0417	
1.226	5.8996	0.0444	
1.612	5.9632	0.0448	
1.999	6.2086	0.0468	
2.386	6.6957	0.0504	
2.773	6.9854	0.0526	

- G4G3G-P (16)

**Taula IV.86.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221A] = 2.01 μM, substrat: G4G3G-P. Δε<sub>hidròlisi</sub> (277 nm) = 1018 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.659	1.3112	0.0064	$k_{\text{cat}} = 0.042 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.6 \pm 0.5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.012 \pm 0.002 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.879	1.9196	0.0094	
1.538	2.4414	0.0119	
2.197	3.1558	0.0154	
3.296	4.1004	0.0200	
4.394	4.6864	0.0228	
6.591	5.5141	0.0269	
10.985	6.2318	0.0304	
15.379	6.6366	0.0324	

- Recull dels resultats obtinguts amb el mutant W221A

**Taula IV.87.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents substrats cromofòrics. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \text{mM}$	$K_{\text{I}} / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
G4G3G-2,4DNP	18.7 ± 0.3	0.030 ± 0.001	----	634 ± 40
G4G3G-2,4DNP	21.2 ± 0.8	0.037 ± 0.004	----	573 ± 84
G4G3G-2,3DNP	20.9 ± 0.3	0.37 ± 0.02	----	57 ± 3
G4G3G-2,3DNP	23.1 ± 0.2	0.32 ± 0.01	----	72 ± 3
G4G3G-3,4DNP	9.5 ± 0.4	0.31 ± 0.02	7 ± 2	30 ± 3
G4G3G-3,4DNP	9.37 ± 0.08	0.196 ± 0.006	----	48 ± 2
G4G3G-3,5DNP	4.71 ± 0.06	0.63 ± 0.02	----	7.5 ± 0.4
G4G3G-4NP	0.54 ± 0.02	0.37 ± 0.03	----	1.5 ± 0.2
G4G3G-4NP	0.623 ± 0.006	0.40 ± 0.01	----	1.56 ± 0.05
G4G3G-MU	0.56 ± 0.01	0.83 ± 0.04	13 ± 1	0.68 ± 0.05
G4G3G-3NP	0.372 ± 0.004	1.16 ± 0.04	----	0.32 ± 0.01
G4G3G-4BrP	0.056 ± 0.001	0.46 ± 0.03	----	0.13 ± 0.01
G4G3G-P	0.042 ± 0.003	3.6 ± 0.5	----	0.012 ± 0.002

**Mutant W221F**

- G4G3G-2,4DNP (28)

**Taula IV.88.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 4.73 nM, substrat: G4G3G-2,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 8954 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.031	0.6333	2.8622	1.4269
0.061	1.0907	2.9078	2.5051
0.092	1.5996	2.9534	3.7049
0.123	2.0755	2.9989	4.8268
0.153	2.5316	3.0445	5.9020
0.307	4.0275	3.2723	9.4265
0.307	3.9505	3.2723	9.2448
0.460	5.2027	3.5001	12.1942
0.613	5.4327	3.7279	12.7316
0.766	5.9538	3.9557	13.9558
0.920	5.9115	4.1835	13.8507
1.073	6.0011	4.4113	14.0567
1.226	6.2077	4.6391	14.5388

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 32 \pm 4 \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{M}} = 0.07 \pm 0.01 \text{ mM}$$

$$K_{\text{I}} = 0.11 \pm 0.06 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 470 \pm 140 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- G4G3G-2,3DNP (22)

**Taula IV.89.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 4.73 nM, substrat: G4G3G-2,3DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(418 \text{ nm}) = 2359 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-2,3DNP] / mM	Hidròlisi total $v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs}\cdot\text{s}^{-1}$	Hidròlisi espontània $v_0 \cdot 10^7 / \mu\text{Abs}\cdot\text{s}^{-1}$	Hidròlisi enzimàtica $(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.047	0.6466	2.5608	5.7677
0.094	1.1695	2.6243	10.4499
0.141	1.2750	2.6877	11.3942
0.235	1.9116	2.8147	17.0941
0.329	2.2398	2.9417	20.0322
0.470	2.6723	3.1321	23.9037
0.658	2.8654	3.3860	25.6307
1.315	3.3092	4.2748	29.5972
1.879	3.4339	5.0366	30.7071

Paràmetres cinètics:

$$k_{\text{cat}} = 35.1 \pm 0.8 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.25 \pm 0.02 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 143 \pm 12 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$$

- G4G3G-3,4DNP (21)

**Taula IV.90.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 4.73 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 9616 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 9.3 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.149 \pm 0.007 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 62 \pm 4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.037	8.4485	1.8562	
0.073	14.0712	3.0916	
0.110	17.8935	3.9314	
0.147	21.1717	4.6517	
0.257	27.1693	5.9694	
0.367	28.8449	6.3376	
0.551	32.5633	7.1546	
0.734	35.6798	7.8393	
1.102	37.4935	8.2378	

- G4G3G-3,5DNP (20)

**Taula IV.91.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 47 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1671 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 7.09 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.36 \pm 0.01 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 19.6 \pm 0.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.103	1.2097	1.5294	
0.205	2.1169	2.6762	
0.308	2.5740	3.2541	
0.410	2.9671	3.7510	
0.615	3.4958	4.4195	
0.820	3.7834	4.7831	
1.025	4.1794	5.2836	
1.538	4.5679	5.7748	
2.051	4.7965	6.0638	
3.076	5.0741	6.4147	
4.102	5.0906	6.4356	

- G4G3G-4NP (19)

**Taula IV.92.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 237 nM, substrat: G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 9867 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.62 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.25 \pm 0.01 \text{ mM}$ $K_I = 29 \pm 5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.5 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.090	3.7801	0.1619	
0.150	5.2171	0.2234	
0.210	6.4466	0.2761	
0.300	7.9184	0.3391	
0.450	9.3836	0.4018	
0.750	10.6383	0.4556	
0.989	11.0782	0.4744	
1.499	11.7123	0.5016	
1.949	12.0458	0.5159	
2.998	12.3030	0.5269	
3.987	11.9626	0.5123	



- G4G3G-4NP (19), (repetició)

**Taula IV.93.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 234 nM, substrat: G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 9867 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.675 \pm 0.009 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.27 \pm 0.01 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.5 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.054	2.6302	0.1139	
0.082	4.0975	0.1774	
0.136	5.1651	0.2236	
0.190	6.5278	0.2826	
0.272	7.7296	0.3347	
0.408	9.1811	0.3975	
0.680	10.7516	0.4655	
0.898	11.7531	0.5089	
1.360	12.6157	0.5462	
1.768	12.9958	0.5627	
2.176	13.8965	0.6017	
2.312	14.4014	0.6236	
2.584	14.6781	0.6355	
2.992	14.2101	0.6153	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.94.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 470 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5140 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.389 \pm 0.009 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.39 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 9.4 \pm 0.7 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.00 \pm 0.08 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.260	3.6849	0.1516	
0.520	5.3265	0.2191	
0.781	5.9223	0.2436	
1.041	6.4212	0.2642	
1.561	6.6952	0.2754	
1.952	6.7284	0.2768	
2.904	6.5350	0.2688	
3.903	6.1588	0.2534	
5.016	5.8127	0.2391	
5.985	5.6731	0.2334	

- *G4G3G-3NP (17)*

**Taula IV.95.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 1.42 μM, substrat: G4G3G-3NP. Δε<sub>hidròlisi</sub> (400 nm) = 221 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.590 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.84 \pm 0.03 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.70 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.288	4.3954	0.1402	
0.576	7.6684	0.2446	
0.960	9.8685	0.3148	
1.920	12.9465	0.4130	
2.880	14.5142	0.4630	
3.840	14.9019	0.4754	
4.992	15.7865	0.5036	
6.528	16.3902	0.5229	

- *G4G3G-P (16)*

**Taula IV.96.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [W221F] = 1.89 μM, substrat: G4G3G-P. Δε<sub>hidròlisi</sub> (277 nm) = 1018 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.070 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.9 \pm 0.5 \text{ mM}$ $K_I = 108 \pm 66 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.018 \pm 0.004 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.879	2.8305	0.0015	
1.538	3.7479	0.0019	
2.197	4.7069	0.0024	
3.296	6.0219	0.0031	
4.394	7.0066	0.0036	
6.591	8.1263	0.0042	
8.789	8.9291	0.0046	
10.985	9.3768	0.0049	
15.379	9.5550	0.0050	

- *Recull dels resultats obtinguts amb el mutant W221F*

**Taula IV.97.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions del mutant W221F de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents substrats cromofòrics. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
G4G3G-2,4DNP	32 ± 4	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.06	470 ± 140
G4G3G-2,3DNP	35.1 ± 0.8	0.25 ± 0.02	----	143 ± 12
G4G3G-3,4DNP	9.3 ± 0.2	0.149 ± 0.007	----	62 ± 4
G4G3G-3,5DNP	7.09 ± 0.06	0.36 ± 0.01	----	19.6 ± 0.8
G4G3G-4NP	0.62 ± 0.01	0.25 ± 0.01	29 ± 5	2.5 ± 0.2
G4G3G-4NP	0.675 ± 0.009	0.27 ± 0.01	----	2.5 ± 0.1
G4G3G-MU	0.389 ± 0.009	0.39 ± 0.02	9.4 ± 0.7	1.00 ± 0.08
G4G3G-3NP	0.590 ± 0.006	0.84 ± 0.03	----	0.70 ± 0.04
G4G3G-P	0.070 ± 0.005	3.9 ± 0.5	108 ± 66	0.018 ± 0.004

### IV.2.2. Anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* a diferents pH

Es realitzen reaccions d'hidròlisi en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb quatre substrats cromofòrics diferents a quatre pH diferents a 30 °C.

#### IV.2.2.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

Seguint el procediment descrit a l'apartat III.2.3 s'escullen les longituds d'ona per al seguiment de les diferents reaccions d'hidròlisi i es determinen les absortivitats corresponents dels diferents substrats cromofòrics i aglicones a cadascun dels pH de treball en tampó 11 mM citrat, 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, a 30 °C.

**Taula IV.98.** Es presenten als diferents pH de treball i per als diferents substrats cromofòrics emprats, els valors d'absortivitat dels substrats i de les aglicones alliberades en la seva hidròlisi, a les longituds d'ona triades per al seguiment de la hidròlisi dels substrats a 30 °C. A la darrera columna s'indica el valor de la  $\Delta\epsilon$  emprada en els càlculs, que s'obté com a diferència entre l'absortivitat del fenol i la del substrat corresponent. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	Substrat	$\lambda$ / nm	$\epsilon_{\text{aglicona}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{substrat}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
5.0	G4G3G-3,4DNP	400	5636	468	5168
	G4G3G-3,5DNP	390	278	61	217
	G4G3G-MU	355	545	43	501
	G4G3G-3NP	375	593	219	374
5.5	G4G3G-3,4DNP	400	8815	467	8348
	G4G3G-3,5DNP	380	615	81	534
	G4G3G-MU	355	1203	140	1063
	G4G3G-3NP	395	292	139	153
7.2	G4G3G-3,4DNP	400	9432	479	8953
	G4G3G-3,5DNP	400	1901	28	1873
	G4G3G-MU	365	5117	25	5092
	G4G3G-3NP	400	318	53	265
8.0	G4G3G-3,4DNP	400	13646	390	13255
	G4G3G-3,5DNP	400	1980	115	1865
	G4G3G-MU	365	11976	23.9	11952
	G4G3G-3NP	400	663	59	604

#### IV.2.2.2. Determinació dels paràmetres cinètics

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.6. La hidròlisi espontània dels substrats es determina només als pH més extrems, que són les condicions experimentals en què aquesta és superior. Donat que en aquestes condicions la velocitat d'hidròlisi espontània és inferior a l'1% de la velocitat d'hidròlisi enzimàtica, es considera menyspreable i es decideix que no és necessari determinar-la als pH intermitjos.

- Substrat: *G4G3G-3,4DNP (21)*, pH 5.0

**Taula IV.99.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 2.5 nM, substrat: *G4G3G-3,4DNP*.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 5168 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[ <i>G4G3G-3,4DNP</i> ] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 15.6 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.32 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 49 \pm 4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.023	1.4716	1.139	
0.046	3.0362	2.350	
0.091	4.9199	3.808	
0.200	8.3127	6.434	
0.400	11.6603	9.025	
0.500	12.7973	9.905	
0.700	14.3567	11.112	
0.900	16.0001	12.384	
1.200	15.9420	12.339	
1.500	17.4911	13.538	

- Substrat: *G4G3G-3,5DNP (20)*, pH 5.0

**Taula IV.100.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 485 nM, substrat: *G4G3G-3,5DNP*.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(390 \text{ nm}) = 217 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[ <i>G4G3G-3,5DNP</i> ] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 3.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.40 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 58 \pm 40 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 8.2 \pm 0.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.045	4.6242	0.439	
0.091	7.0621	0.671	
0.100	7.0351	0.669	
0.200	11.8482	1.126	
0.300	15.7802	1.500	
0.500	19.5235	1.856	
1.000	24.4910	2.328	
1.500	27.3181	2.597	
2.000	28.3576	2.695	
2.500	28.8892	2.746	
3.000	29.4100	2.796	

- Substrat: G4G3G-MU (18), pH 5.0

**Taula IV.101.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 485 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 501 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.092	3.6676	0.151	$k_{\text{cat}} = 1.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.2 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 11 \pm 5 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 1.4 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.500	12.1928	0.502	
0.750	15.5689	0.641	
0.994	18.3864	0.757	
1.499	20.9124	0.861	
2.004	23.5355	0.969	
2.494	24.9200	1.026	
3.000	24.7742	1.020	
3.504	24.4585	1.007	

- Substrat: G4G3G-3NP (17), pH 5.0

**Taula IV.102.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 1.43 μM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(375 \text{ nm}) = 374 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.200	7.3341	0.137	$k_{\text{cat}} = 0.98 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.1 \pm 0.1 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.800	22.6756	0.425	
1.300	28.1734	0.527	
1.800	30.8400	0.577	
2.100	35.0363	0.656	
3.200	38.1106	0.714	

- Substrat: G4G3G-3,4DNP (21), pH 5.5

**Taula IV.103.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 2.38 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 8348 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.044	5.2729	2.6584	$k_{\text{cat}} = 16.3 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.212 \pm 0.007 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 77 \pm 4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.087	9.1024	4.5891	
0.174	14.6363	7.3791	
0.264	17.3103	8.7272	
0.43	21.9492	11.066	
0.69	24.8689	12.538	
1.04	26.3922	13.306	
1.76	28.7109	14.475	

- Substrat: G4G3G-3,5DNP (20), pH 5.5

**Taula IV.104.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 101 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (380 nm) = 534 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.046	3.6497	0.6767	$k_{\text{cat}} = 3.27 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.204 \pm 0.008 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 16 \pm 0.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.093	5.4274	1.0063	
0.140	7.1285	1.3217	
0.186	8.1041	1.5026	
0.372	11.3132	2.0976	
0.744	13.4511	2.4940	
1.395	15.4472	2.8641	
1.860	16.0567	2.9771	
2.325	16.4418	3.0485	
2.790	16.1834	3.0006	

- Substrat: G4G3G-MU (18), pH 5.5

**Taula IV.105.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 200 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1063 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.1953	4.5922	0.2160	$k_{\text{cat}} = 1.2 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.95 \pm 0.09 \text{ mM}$ $K_I = 13 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.3 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.4014	7.6451	0.3596	
0.5967	9.4671	0.4453	
0.8029	11.0233	0.5185	
0.9982	13.0451	0.6136	
1.3996	13.2463	0.6701	
1.8011	15.4369	0.7261	
2.9946	16.6168	0.7816	
4.0036	16.5785	0.7798	
4.5027	16.4552	0.7740	

**Taula IV.106.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 49.6 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (355 nm)= 1063 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.1036	0.6902	0.1309	$k_{\text{cat}} = 1.03 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.70 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 17 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.5 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.2960	1.6709	0.3169	
0.5032	2.1770	0.4129	
0.7992	2.8060	0.5322	
0.9472	3.0696	0.5822	
3.0044	3.8479	0.7298	
5.0024	3.8458	0.7294	
5.9940	3.6818	0.6983	

Els valors dels paràmetres cinètics emprats en l'avaluació dels resultats responen a la mitjana dels valors obtinguts a les dues cinètiques:

$$k_{\text{cat}} = 1.11 \pm 0.01 \text{ s}^{-1} \quad K_{\text{M}} = 0.8 \pm 0.1 \text{ mM} \quad K_{\text{I}} = 15 \pm 2 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1.4 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- Substrat: G4G3G-3NP (17), pH 5.5

**Taula IV.107.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 1.28 μM, substrat: G4G3G-3NP. Δε<sub>hidròlisi</sub>(395 nm) = 153 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.85 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.92 \pm 0.04 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 0.92 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.202	3.0238	0.1541	
0.395	4.8840	0.2489	
0.597	6.5558	0.3341	
0.799	7.5075	0.3826	
1.000	8.7712	0.4470	
1.501	10.5901	0.5397	
2.002	11.7714	0.5999	
3.003	12.5249	0.6383	
4.004	13.5178	0.6889	

- Substrat: G4G3G-3,4DNP (21), pH 7.2

**Taula IV.108.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 2.38 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP. Δε<sub>hidròlisi</sub> (400 nm) = 8953 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 22 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 0.5 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_{\text{I}} = 6 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 44 \pm 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.044	4.2991	2.021	
0.087	7.4028	3.480	
0.175	13.0272	6.124	
0.260	14.9906	7.047	
0.435	20.8682	9.810	
0.610	24.9227	11.716	
1.218	29.8812	14.047	
1.393	29.5409	13.887	
1.567	29.1814	13.718	

- Substrat: G4G3G-3,5DNP (20), pH 7.2

**Taula IV.109.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 101 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1873 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.099	1.0295	0.5445	$k_{\text{cat}} = 2.87 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.45 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 6.4 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.198	1.6497	0.8725	
0.297	2.2199	1.1741	
0.495	2.8096	1.4860	
0.604	3.0318	1.6035	
1.000	3.7153	1.9650	
1.495	4.1543	2.1972	
1.742	4.1539	2.1970	
2.000	4.5544	2.4088	
2.495	4.5421	2.4023	

- Substrat: G4G3G-MU (18), pH 7.2

**Taula IV.110.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 49.6 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (365 nm)= 5092 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.200	3.2505	0.1287	$k_{\text{cat}} = 0.59 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.67 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 27 \pm 5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.88 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.400	5.4756	0.2168	
0.500	6.3899	0.2530	
0.800	7.9962	0.3166	
1.000	8.5897	0.3401	
2.000	10.4763	0.4148	
4.000	11.2820	0.4467	
5.000	11.2643	0.4460	

- Substrat: G4G3G-3NP (17), pH 7.2

**Taula IV.111.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 395 nM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (400 nm)= 265 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.319	1.0672	0.1019	$k_{\text{cat}} = 0.63 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.9 \pm 0.1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.33 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.627	1.6516	0.1577	
0.946	2.2548	0.2153	
1.254	2.5795	0.2463	
1.573	2.9408	0.2808	
2.519	3.7210	0.3553	
3.773	4.3483	0.4152	
4.412	4.7232	0.4510	



**Taula IV.112.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 140 nM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 265 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.250	2.7714	0.0747	$k_{\text{cat}} = 0.57 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.4 \pm 0.1 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.41 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.625	6.5519	0.1766	
1.263	10.6996	0.2884	
1.900	12.2207	0.3294	
2.525	13.7047	0.3694	
3.163	14.6842	0.3958	
3.788	15.5041	0.4179	

Els valors dels paràmetres cinètics emprats en l'avaluació dels resultats responen a la mitjana dels valors obtinguts a les dues cinètiques.

$$k_{\text{cat}} = 0.60 \pm 0.03 \text{ s}^{-1} \quad K_M = 1.65 \pm 0.06 \text{ mM} \quad k_{\text{cat}}/K_M = 0.36 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$$

- Substrat: G4G3G-3,4DNP (21), pH 8.0

**Taula IV.113.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 2.38 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 13255 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.047	1.2676	0.4025	$k_{\text{cat}} = 7.3 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.72 \pm 0.05 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 10 \pm 1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.093	2.1114	0.6704	
0.184	4.2970	1.3644	
0.278	6.8348	2.1702	
0.463	9.2693	2.9432	
0.742	11.8921	3.7760	
0.927	12.7566	4.0505	
1.391	15.2626	4.8462	
1.854	16.5368	5.2508	

- Substrat: G4G3G-3,5DNP (20), pH 8.0

**Taula IV.114.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 404 nM, substrat: G4G3G-3,5DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 1865 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3,5DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.198	0.9353	0.1242	$k_{\text{cat}} = 1.0 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.5 \pm 0.5 \text{ mM}$ $K_I = 9 \pm 7 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.7 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.396	1.5370	0.2041	
0.594	2.0799	0.2762	
1.000	2.6673	0.3542	
2.495	4.0642	0.5397	
3.000	4.0688	0.5403	
3.495	3.9844	0.5291	

- Substrat: G4G3G-MU (18), pH 8.0

**Taula IV.115.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 50 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 11952 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.100	1.5777	0.0264	$k_{\text{cat}} = 0.271 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.79 \pm 0.03 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.34 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.300	3.9979	0.0669	
0.500	6.2987	0.1054	
0.800	8.2290	0.1377	
1.500	11.1751	0.1870	
4.000	13.2548	0.2218	
5.000	13.7926	0.2308	
6.000	14.3723	0.2405	

- Substrat: G4G3G-3NP (17), pH 8.0

**Taula IV.116.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 606 nM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (400 nm)= 604 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.250	1.2042	0.0329	$k_{\text{cat}} = 0.48 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.5 \pm 0.2 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.14 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.490	2.1705	0.0593	
1.000	4.0629	0.1110	
1.500	5.2524	0.1435	
2.000	6.3688	0.1740	
2.500	7.0752	0.1933	
3.000	7.9940	0.2184	
3.500	8.8980	0.2431	
4.100	9.5532	0.2610	

Mètodes i materials: Biologia molecular

**Taula IV.117.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 395.2 nM, substrat: G4G3G-3NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 604 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-3NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.125	0.5395	0.0226	$k_{\text{cat}} = 0.31 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$
0.376	1.4537	0.0609	
0.570	1.9048	0.0798	$K_M = 1.7 \pm 0.1 \text{ mM}$
0.946	2.4634	0.1032	$k_{\text{cat}}/K_M = 0.18 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
3.146	4.6380	0.1943	
3.773	5.0819	0.2129	
4.412	5.4448	0.2281	

Els valors dels paràmetres cinètics emprats en l'avaluació dels resultats responen a la mitjana dels valors obtinguts a les dues cinètiques.

$$k_{\text{cat}} = 0.39 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 2.6 \pm 0.9 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K_M = 0.16 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

- Recull dels resultats obtinguts

**Taula IV.118.** Paràmetres cinètics de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat a les cinètiques realitzades amb una sèrie d'aril *O*- $\beta$ -D-trisacàrids, amb estructura bàsica G4G3G-X, a diferents pH. Les reaccions s'han dut a terme en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.05 M, a 30 °C i pH 5, 5.5, 7.2 i 8.0.

pH	Substrat	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_M / mM$	$(k_{cat}/K_M) / mM^{-1} \cdot s^{-1}$
5.0	G4G3G-3,4DNP	15.6 ± 0.3	0.32 ± 0.02	49 ± 4
	G4G3G-3,5DNP	3.3 ± 0.1	0.40 ± 0.03	8.2 ± 0.8
	G4G3G-MU	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.4
	G4G3G-3NP	0.98 ± 0.04	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
5.5	G4G3G-3,4DNP	16.3 ± 0.2	0.212 ± 0.007	77 ± 4
	G4G3G-3,5DNP	3.27 ± 0.03	0.204 ± 0.008	16.0 ± 0.6
	G4G3G-MU	1.20 ± 0.07	0.95 ± 0.09	1.3 ± 0.2
	G4G3G-MU	1.03 ± 0.04	0.70 ± 0.05	1.5 ± 0.2
	G4G3G-MU <sub>mitjana</sub>	1.11 ± 0.01	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	G4G3G-3NP	0.85 ± 0.01	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05
7.2	G4G3G-3,4DNP	22 ± 3	0.5 ± 0.1	44 ± 15
	G4G3G-3,5DNP	2.87 ± 0.04	0.45 ± 0.02	6.4 ± 0.4
	G4G3G-MU	0.59 ± 0.01	0.67 ± 0.03	0.88 ± 0.05
	G4G3G-3NP	0.63 ± 0.02	1.9 ± 0.1	0.33 ± 0.03
	G4G3G-3NP	0.57 ± 0.02	1.4 ± 0.1	0.41 ± 0.04
	G4G3G-3NP <sub>mitjana</sub>	0.60 ± 0.03	1.65 ± 0.06	0.36 ± 0.09
	G4G3G-3NP	0.39 ± 0.08	2.6 ± 0.9	0.16 ± 0.02
8.0	G4G3G-3,4DNP	7.3 ± 0.2	0.72 ± 0.05	10 ± 1
	G4G3G-3,5DNP	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.5	0.7 ± 0.4
	G4G3G-MU	0.271 ± 0.003	0.79 ± 0.03	0.34 ± 0.02
	G4G3G-3NP	0.48 ± 0.02	3.5 ± 0.2	0.14 ± 0.01
	G4G3G-3NP	0.31 ± 0.01	1.7 ± 0.1	0.18 ± 0.02
	G4G3G-3NP <sub>mitjana</sub>	0.39 ± 0.08	2.6 ± 0.9	0.16 ± 0.02

**IV.2.3. Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* a pH 7.2 per a la hidròlisi del substrat G4G3G-MU**

L'objectiu de l'experiment és la determinació dels paràmetres cinètics dels mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* per a la hidròlisi del substrat G4G3G-MU a pH 7.2 i 30 °C. Per tal de poder-los comparar amb els de l'enzim salvatge, en el mateix experiment es determinen els paràmetres d'aquest enzim en les mateixes condicions de reacció. El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.6.

- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge

**Taula IV.119.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 214.8 nM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.052	4.6902	0.0339	
0.052	5.0084	0.0362	
0.098	8.6055	0.0622	
0.098	7.9830	0.0577	
0.199	16.1181	0.1165	
0.199	14.7069	0.1063	
0.399	25.8304	0.1867	
0.399	26.1348	0.1889	
0.774	38.8218	0.2806	
1.009	43.3597	0.3134	
1.009	44.1483	0.3191	
1.525	49.7793	0.3598	
1.994	53.8469	0.3892	
3.027	54.9398	0.3971	
4.012	55.4102	0.4005	
4.012	59.0074	0.4265	
4.974	53.8469	0.3892	
6.007	50.8723	0.3677	

- mutant Y152A de la 1,3-1,4-β-glucanasa

**Taula IV.120.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 2.048 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.050	3.2497	0.0025	
0.100	2.5997	0.0020	
0.100	3.2497	0.0025	
0.100	6.2393	0.0048	
0.149	9.7489	0.0075	
0.199	11.8287	0.0091	
0.299	16.3782	0.0126	
0.398	19.8878	0.0153	
0.664	29.1168	0.0224	
0.982	34.9662	0.0269	
1.460	43.4253	0.0334	
2.204	49.3946	0.0380	
3.000	52.9042	0.0407	
3.982	56.5438	0.0435	
4.965	57.3237	0.0441	
7.009	60.9634	0.0469	
10.195	60.5734	0.0466	

*- mutant Y152F de la 1,3-1,4-β-glucanasa*

**Taula IV.121.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 834 nM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

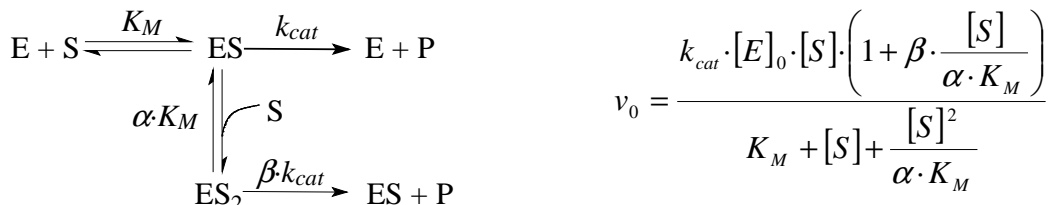
[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.024	1.6161	0.0301	$k_{\text{cat}} = 0.261 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.18 \pm 0.01 \text{ mM}$ $K_I = 4.0 \pm 0.3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.5 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.048	2.9853	0.0556	
0.084	4.0001	0.0745	
0.100	5.2994	0.0987	
0.124	5.8310	0.1086	
0.148	6.3518	0.1183	
0.200	7.4310	0.1384	
0.383	8.8324	0.1645	
0.575	9.8525	0.1835	
0.700	10.0029	0.1863	
1.006	9.7505	0.1816	
1.485	9.4659	0.1763	
1.964	8.6820	0.1617	
2.970	7.6350	0.1422	
4.456	6.6310	0.1235	
5.989	5.7665	0.1074	

*- mutant Y152F de la 1,3-1,4-β-glucanasa (repetició)*

**Taula IV.122.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 94 nM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	S'ajusta un model de cooperativitat negativa (equació IV.4).
0.0983	5.3242	0.0879	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.273 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.197 \pm 0.009 \text{ mM}$ $\beta = 0.173 \pm 0.009$ $\alpha = 16.7 \pm 0.9$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.39 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.1994	8.2377	0.1360	
0.2992	9.5884	0.1583	
0.3988	10.6726	0.1762	
0.5983	11.3692	0.1877	
0.7977	11.5146	0.1901	
1.1646	11.5025	0.1899	
1.9944	10.6605	0.1760	
3.4420	9.4552	0.1561	
5.9684	7.7168	0.1274	
9.9717	6.3418	0.1047	
17.1047	5.1243	0.0846	
23.7110	4.4944	0.0742	

A continuació es presenta el model de cooperativitat negativa i l'equació de velocitat associada:



Equació IV.4.

**Taula IV.123.** Resum dels paràmetres cinètics obtinguts amb l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat sintètic G4G3G-MU. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 6441 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Enzim	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{cat}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
Enzim salvatge	$0.63 \pm 0.01$	$0.92 \pm 0.03$	$11.0 \pm 0.7$	$0.68 \pm 0.03$
Y152A	$0.0563 \pm 0.0009$	$1.03 \pm 0.03$	$98 \pm 2$	$0.055 \pm 0.002$
Y152F	$0.261 \pm 0.007$	$0.18 \pm 0.01$	$4.0 \pm 0.3$	$1.5 \pm 0.1$
Y152F*	$0.273 \pm 0.006$	$0.197 \pm 0.009$	$\beta = 0.173 \pm 0.009$	$1.39 \pm 0.09$
			$\alpha = 16.7 \pm 0.9$	

\*: Paràmetres cinètics que s'obtenen per ajust de l'equació IV.4, aplicant un model de cooperativitat negativa. En la columna corresponent al valor de  $K_I$  es presenten els valors d' $\alpha$  i  $\beta$  corresponents a aquest ajust.

#### IV.2.4. Determinació dels paràmetres cinètics del mutant Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* amb els substrats G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.6. Es fan servir les absortivitats prèviament determinades a les anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (taula IV.61).

##### - G4G3G-3,4DNP (21)

**Taula IV.124.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 25 nM, substrat: G4G3G-3,4DNP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm}) = 9616 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-3,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^3 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics: $k_{cat} = 15.3 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.22 \pm 0.01 \text{ mM}$ $k_{cat}/K_M = 70 \pm 5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.0956	1.0268	4.254	
0.143	1.5080	6.248	
0.199	1.7421	7.218	
0.299	2.0984	8.694	
0.498	2.6996	11.185	
0.693	2.8971	12.003	
0.996	2.9473	12.211	
1.299	3.0812	12.766	
1.498	3.2410	13.428	
1.999	3.3388	13.833	

- *G4G3G-2,4DNP* (28)

**Taula IV.125.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 0.065 nM, substrat: G4G3G-2,4DNP.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}(400 \text{ nm})=8954 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-2,4DNP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.0235	1.9614	33.7	$k_{\text{cat}} = 250 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.10 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2500 \pm 600 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.052	4.5280	77.8	
0.080	6.3730	109.5	
0.099	8.2296	141.4	
0.216	10.9592	188.3	
0.296	11.4656	197.0	
0.447	11.2386	193.1	
0.597	12.6005	216.5	

**IV.2.5. Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G3G-MU, G4G4G3G-MU, G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP**

Per tal de determinar la influència de la interacció amb l'hidroxil a C2 de la glucopiranososa que ocupa el subseu -1, es realitzen cinètiques amb un substrat en què s'ha eliminat aquest hidroxil i es comparen a les mateixes condicions de reacció amb les del mateix substrat polihidroxilat .

Les concentracions de les diferents solucions estoc d'enzim es determinen mesurant la seva activitat hidrolítica sobre el substrat G4G3G-MU en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C (apartat I.8.6). Per als mutants es fan servir els valors dels paràmetres cinètics determinats en l'apartat IV.2.3.

**IV.2.5.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats**

Se seleccionen les longituds d'ona per a la determinació de la concentració de substrat en solució aquosa i per al seguiment de la hidròlisi del G4G4G3G-4NP i del G4G4G3(2dG)-4NP en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C (apartat III.2.3). Per a la determinació de la concentració del G4G4G3G-4NP s'ha escollit la  $\lambda = 301 \text{ nm}$  i s'ha obtingut una absortivitat de  $9451 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; per a la concentració del G4G4G3(2dG)-4NP s'ha escollit la  $\lambda = 303 \text{ nm}$  i s'ha obtingut una absortivitat de  $10368 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Per al seguiment de la hidròlisi dels dos substrats s'ha triat una  $\lambda = 402 \text{ nm}$  amb una  $\Delta\varepsilon = 12190 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Les longituds d'ona i absortivitats necessàries per a la determinació de la concentració dels substrats G4G3G-MU i G4G4G3G-MU per mesura de la seva absorbància són les mateixes determinades amb anterioritat ( $\lambda = 316 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), i per al seguiment de la seva hidròlisi en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C, són de  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $\Delta\varepsilon = 6554 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$



IV.2.5.2. Determinació dels paràmetres cinètics

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.6. Es comprova que la hidròlisi espontània dels diferents substrats és com a mínim dos ordres de magnitud inferior que la seva hidròlisi enzimàtica a les mateixes condicions de reacció a les que es realitza el seguiment de la hidròlisi enzimàtica: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 a 30 °C. En aquestes condicions per al G4G4G3(2dG)-4NP la velocitat d'hidròlisi espontània és de  $v = 3.78 \cdot 10^{-8} \cdot [S]$  en  $M \cdot s^{-1}$ , i la del G4G4G3G-4NP a concentracions de substrat de l'ordre de mM, se situa en el marge del soroll instrumental.

**- enzim salvatge****- G4G4G3(2dG)-4NP (68)**

**Taula IV.126.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C, [wt] = 24.2 nM, substrat: G4G4G3(2dG)-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(402 \text{ nm}) = 12190 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G4G3(2dG)-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot s^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 3.01 \pm 0.02 s^{-1}$ $K_M = 0.261 \pm 0.006 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 11.5 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$
0.033	9.6197	0.3258	
0.066	17.4738	0.5919	
0.132	29.0883	0.985	
0.198	37.6295	1.275	
0.331	51.2350	1.735	
0.662	64.2548	2.176	
1.323	74.1783	2.512	
1.985	78.1037	2.645	
2.646	80.0965	2.713	
3.308	82.4627	2.793	
3.969	83.4880	2.828	

**- G4G4G3G-4NP (24)**

**Taula IV.127.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 30 °C, [wt] = 24.2 nM, substrat: G4G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(402 \text{ nm}) = 12190 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

[G4G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot s^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.726 \pm 0.003 s^{-1}$ $K_M = 0.094 \pm 0.002 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 7.7 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$
0.009	1.8143	0.0615	
0.018	3.2522	0.1102	
0.053	7.9108	0.2679	
0.105	11.2788	0.3820	
0.175	13.6953	0.4639	
0.263	15.9633	0.5407	
0.438	17.9195	0.6069	
0.876	19.2785	0.6530	
1.752	20.4115	0.6914	
3.504	20.9065	0.7081	
5.256	20.8247	0.7053	

- G4G4G3G-MU (23)

**Taula IV.128.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 53.4 nM, substrat: G4G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6554 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.82 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.218 \pm 0.006 \text{ mM}$ $K_I = 11.1 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.8 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.030	3.3765	0.0965	
0.059	5.9385	0.1697	
0.089	8.2640	0.2361	
0.148	11.6708	0.3335	
0.221	14.1832	0.4053	
0.369	17.9657	0.5133	
0.738	21.3172	0.6091	
1.475	22.2190	0.6333	
2.213	22.1918	0.6341	
2.950	21.4007	0.6115	
3.688	20.3133	0.5804	
4.425	19.8660	0.5676	
5.605	18.8493	0.5386	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.129.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 53.4 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6554 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.48 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.83 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 16 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.58 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.096	1.6650	0.0476	
0.192	3.0413	0.0869	
0.288	4.1698	0.1191	
0.480	6.2172	0.1776	
0.672	7.3740	0.2107	
0.961	8.9015	0.2543	
1.441	10.0052	0.2859	
1.921	10.7633	0.3075	
2.882	11.3217	0.3235	
3.842	11.5740	0.3307	
4.803	11.3217	0.3249	
5.763	11.2037	0.3201	

**- mutant Y152A****- G4G4G3(2dG)-4NP (68)**

**Taula IV.130.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 188 nM, substrat: G4G4G3(2dG)-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3(2dG)-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.15 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.68 \pm 0.004 \text{ mM}$ $K_I = 33 \pm 11 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.69 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.066	2.3211	0.1013	
0.132	3.9061	0.1705	
0.198	5.9063	0.2577	
0.331	8.8238	0.3850	
0.662	13.0827	0.5709	
1.323	16.7012	0.7288	
1.985	18.6189	0.8124	
2.646	19.7650	0.8625	
3.308	20.2706	0.8845	
3.969	20.2069	0.8817	

**- G4G4G3G-4NP (24)**

**Taula IV.131.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 376 nM, substrat: G4G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (402 nm)= 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.0434 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.186 \pm 0.009 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.23 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.035	3.6310	0.0079	
0.070	5.9433	0.0130	
0.105	7.4330	0.0161	
0.175	9.7080	0.0212	
0.263	11.6163	0.0253	
0.438	13.4992	0.0295	
0.876	15.8133	0.0345	
1.314	17.1233	0.0374	
1.752	17.4463	0.0381	
2.628	18.6832	0.0408	
3.504	19.0203	0.0415	
4.380	19.5362	0.0426	
5.256	19.8562	0.0433	

- G4G4G3G-MU (23)

**Taula IV.132.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 343.5 nM, substrat: G4G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 6554 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.0792 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.253 \pm 0.005 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.313 \pm 0.08 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.037	2.2833	0.0101	
0.074	4.0520	0.0180	
0.148	6.8517	0.0304	
0.221	8.2540	0.0363	
0.369	10.4433	0.0464	
0.738	13.2837	0.0590	
1.475	15.1175	0.0672	
2.213	16.0592	0.0713	
2.950	16.7107	0.0742	
3.688	16.7597	0.0744	
4.425	16.8158	0.0747	
5.605	16.8993	0.0751	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.133.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 343.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 6554 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.0539 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.03 \pm 0.03 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.052 \pm 0.002 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.096	1.0333	0.0046	
0.192	1.8007	0.0080	
0.288	2.5235	0.0112	
0.480	3.8385	0.0171	
0.961	5.8083	0.0258	
1.441	7.0102	0.0311	
1.921	7.9987	0.0355	
2.882	8.9985	0.0399	
3.842	9.7800	0.0434	
4.802	10.0943	0.0448	
5.763	10.3900	0.0462	
7.684	10.5388	0.0468	
8.837	10.6342	0.0472	

**- mutant Y152F****- G4G4G3(2dG)-4NP (68)**

**Taula IV.134.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 43.2 nM, substrat: G4G4G3(2dG)-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3(2dG)-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.020	1.4423	0.2739	
0.040	2.6927	0.5113	
0.079	4.1562	0.7892	
0.132	5.2511	0.9972	
0.198	6.3428	1.2045	
0.331	7.0529	1.3396	
0.662	7.4366	1.4122	
0.992	7.3473	1.3952	
1.323	7.0529	1.3393	
1.985	6.6417	1.2522	
2.646	6.2231	1.1817	
3.308	6.0352	1.1461	
3.969	5.9727	1.1342	
4.631	5.9371	1.1274	

**- G4G4G3G-4NP (24)**

**Taula IV.135.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 86.4 nM, substrat: G4G4G3G-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$ (402 nm)= 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3G-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.002	1.7427	0.0166	
0.005	4.5692	0.0434	
0.009	6.2972	0.0598	
0.018	9.5345	0.0905	
0.035	12.5800	0.1194	
0.088	15.5077	0.1472	
0.175	16.7672	0.1592	
0.263	17.0997	0.1624	
0.438	17.2340	0.1636	
0.876	17.6442	0.1675	
1.314	17.7060	0.1681	
1.752	17.8670	0.1696	
2.628	17.7032	0.1681	

- G4G4G3G-MU (23)

**Taula IV.136.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 113.7 nM, substrat: G4G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 6554 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.293 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.031 \pm 0.002 \text{ mM}$ $K_I = 4.6 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 9.5 \pm 0.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.007	3.5427	0.0475	
0.015	6.7057	0.0900	
0.030	10.5242	0.1412	
0.052	13.9613	0.1874	
0.074	15.6002	0.2093	
0.148	17.4768	0.2345	
0.369	18.9778	0.2547	
0.738	18.2187	0.2423	
1.106	17.0363	0.2286	
1.475	15.9853	0.2145	
2.213	14.1273	0.1896	
2.950	12.9087	0.1732	
4.425	11.0335	0.1481	
5.900	9.6817	0.1299	
6.785	9.4438	0.1267	

- G4G3G-MU (18)

**Taula IV.137.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 113.7 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 6554 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.240 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.147 \pm 0.007 \text{ mM}$ $K_I = 5.2 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.6 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.010	0.8485	0.0114	
0.019	1.8037	0.0242	
0.048	4.4003	0.0591	
0.096	6.9748	0.0936	
0.192	9.9872	0.1340	
0.480	12.9853	0.1743	
0.961	13.3240	0.1788	
1.441	12.9762	0.1741	
1.921	12.2870	0.1649	
2.882	10.9332	0.1467	
3.842	9.7558	0.1309	
4.802	9.0242	0.1200	
5.763	8.4852	0.1139	
7.300	7.5153	0.1009	
8.837	6.9243	0.0929	

- Recull dels paràmetres cinètics obtinguts

**Taula IV.138.** Resum dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G4G3(2dG)-4NP, G4G4G3G-4NP, G4G4G3G-MU i G4G3G-MU. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C.

Enzim	Substrat	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_M / mM$	$K_I / mM$	$(k_{cat}/K_M) / s^{-1} \cdot mM^{-1}$
wt	G4G4G3(2dG)-4NP	$3.01 \pm 0.02$	$0.261 \pm 0.006$	----	$11.5 \pm 0.3$
wt	G4G4G3G-4NP	$0.726 \pm 0.003$	$0.094 \pm 0.002$	----	$7.7 \pm 0.2$
wt	G4G4G3G-MU	$0.82 \pm 0.01$	$0.218 \pm 0.006$	$11.1 \pm 0.6$	$3.8 \pm 0.1$
wt	G4G3G-MU	$0.48 \pm 0.01$	$0.83 \pm 0.04$	$16 \pm 2$	$0.58 \pm 0.04$
Y152A	G4G4G3(2dG)-4NP	$1.15 \pm 0.04$	$0.68 \pm 0.004$	$33 \pm 11$	$1.69 \pm 0.09$
Y152A	G4G4G3G-4NP	$0.0434 \pm 0.0005$	$0.186 \pm 0.009$	----	$0.23 \pm 0.01$
Y152A	G4G4G3G-MU	$0.0792 \pm 0.0004$	$0.253 \pm 0.005$	----	$0.313 \pm 0.08$
Y152A	G4G3G-MU	$0.0539 \pm 0.0005$	$1.03 \pm 0.03$	----	$0.052 \pm 0.002$
Y152F	G4G4G3(2dG)-4NP	$1.70 \pm 0.05$	$0.088 \pm 0.008$	$8 \pm 1$	$19 \pm 2$
Y152F	G4G4G3G-4NP	$0.1709 \pm 0.0005$	$0.0155 \pm 0.0003$	----	$11.0 \pm 0.2$
Y152F	G4G4G3G-MU	$0.293 \pm 0.005$	$0.031 \pm 0.002$	$4.6 \pm 0.2$	$9.5 \pm 0.8$
Y152F	G4G3G-MU	$0.240 \pm 0.004$	$0.147 \pm 0.007$	$5.2 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.1$

IV.2.5.3. Hidròlisi del G4G4G3(2dG)-4NP en presència de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* a diferents concentracions d'enzim

**Taula IV.139.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [substrat] = 0.2 mM, substrat: G4G4G3(2dG)-4NP.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (402 nm) = 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[wt] · 10 <sup>9</sup> / M	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot s^{-1}$	$v_0 \cdot 10^9 / M \cdot s^{-1}$
0.605	9.5805	7.8593
1.210	18.3505	15.0537
1.815	26.9438	22.1032
2.420	35.8130	29.3790
3.025	44.5948	36.5831

$$v = 11.863 \cdot [E] + 7 \cdot 10^{-10} \text{ en } M \cdot s^{-1}$$

La hidròlisi del G4G4G3(2dG)-4NP guarda una relació lineal amb la concentració d'enzim.

#### IV.2.5.4. Hidròlisi del G4G4G3(2dG)-4NP en presència de BSA

**Taula IV.140.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [BSA] = 0.6 μM, substrat: G4G4G3(2dG)-4NP. Δε<sub>hidròlisi</sub> (402 nm) = 12190 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G4G3(2dG)-4NP] / mM	$v_0 \cdot 10^7 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$v_0 \cdot 10^{12} / \text{M} \cdot \text{s}^{-1}$	$v = 3.78 \cdot 10^{-8} \cdot [S]$ en M·s <sup>-1</sup>
0.132	1.1970	9.8198	
0.331	2.4463	20.0684	
0.662	3.0590	25.0942	
0.992	5.6184	46.0898	
1.323	6.6607	54.6404	

La presència de BSA no fa variar la velocitat d'hidròlisi espontània del substrat.

#### IV.2.6. **Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH de l'enzim salvatge i el mutant W221A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *B. licheniformis***

Per tal de poder avaluar l'efecte provocat per la mutació a Ala del residu Trp221 de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*, sobre els pK<sub>a</sub> del Glu134 i Glu138, es realitza un perfil d'activitat enfront del pH per a l'enzim salvatge juntament amb el perfil d'activitat realitzat per al mutant W221A fent servir com a substrat el G4G3G-MU.

##### IV.2.6.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

A la figura III.1 es mostren els espectres d'absorbància de la 4-metilumbel·liferona (línies contínues) i del substrat G4G3G-MU (línia puntejada) en un marge de pH des de 5 a 10.3 {Malet, 1995 #661}. En anteriors treballs a l'equip s'ha fixat que treballant amb el substrat G4G3G-MU, les reaccions d'hidròlisi s'han de seguir a una longitud d'ona de 355 nm per sota de pH 7.0 i a 365 nm a pH 7.0 o superiors. Seguint el procediment descrit a l'apartat III.2.3 es determinen les absortivitats de substrat i aglicona a cadascun dels pH de treball en tampó 11 mM citrat, 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, a 30 °C.



**Taula IV.141.** Es presenten a cada pH l'absortivitat del substrat i de la 4-metilumbel·liferona a la longitud d'ona escollida per al seguiment de la reacció d'hidròlisi del G4G3G-MU, i la variació d'absortivitat emprada en la conversió d'unitats de la velocitat d'hidròlisi. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$\lambda$ / mM	$\epsilon_{\text{MU}} / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{G4G3GMU}} / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
3.68	355	833	65	768
4.00	355	796	65	731
4.50	355	809	65	744
4.75	355	825	65	760
5.00	355	850	65	785
5.25	355	867	65	802
5.49	355	968	65	903
5.75	355	1053	65	988
5.85	355	1127	65	1062
6.00	355	1171	65	1106
6.07	355	1378	65	1313
6.14	355	1403	65	1338
6.32	355	1269	65	1627
6.52	355	2211	65	2146
6.75	355	2786	65	2721
7.00	365	4221	7	4214
7.26	365	5534	7	5527
7.50	365	7785	7	7778
7.99	365	10132	7	10125
8.50	365	11534	7	11527
9.04	365	11934	7	11927

#### IV.2.6.2. *Determinació dels paràmetres cinètics*

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.7. Als diferents pH assajats s'ha comprovat que, en les condicions experimentals emprades per tal de realitzar el perfil d'activitat enfront del pH, la velocitat d'hidròlisi espontània del substrat G4G3G-MU és menyspreable respecte de la velocitat d'hidròlisi obtinguda en presència de qualsevol dels dos enzims.

**- Enzim salvatge**

- pH 3.68

**Taula IV.142.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 3.68, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 768 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.262 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.5 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.075 \pm 0.006 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.488	0.4924	0.0264	
0.976	1.0168	0.0545	
1.463	1.4262	0.0764	
1.951	1.6962	0.0989	
2.926	2.2187	0.1189	
3.902	2.6655	0.1428	
4.878	2.9002	0.1554	
5.853	3.0603	0.1640	
7.414	3.3108	0.1774	
9.170	3.5113	0.1881	

- pH 4.00

**Taula IV.143.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 850 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 731 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.38 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.6 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.15 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.086	0.7048	0.0113	
0.172	1.3770	0.0222	
0.344	2.5596	0.0412	
0.516	3.8101	0.0613	
0.774	5.0374	0.0811	
1.118	7.1436	0.1145	
1.548	9.0622	0.1459	
2.408	11.7036	0.1884	
3.010	12.6968	0.2043	
3.870	14.3561	0.2311	
5.160	14.8336	0.2387	
5.272	16.8299	0.2709	
6.708	16.7511	0.2696	
8.225	17.7783	0.2861	

- pH 4.50

**Taula IV.144.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 637.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 744 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.79 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.1 \pm 0.5 \text{ mM}$ $K_I = 21 \pm 7 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.26 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.105	1.1905	0.02510	
0.316	4.0102	0.08455	
0.527	5.9283	0.12499	
1.054	8.7402	0.18427	
1.581	12.7061	0.26789	
2.109	14.2925	0.30134	
3.164	17.9072	0.37755	
4.218	19.6435	0.41416	
6.327	20.9178	0.44103	
8.752	21.2036	0.44705	

- pH 4.75

**Taula IV.145.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.75, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 760 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.74 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.49 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 34 \pm 4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.50 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.195	1.5282	0.0828	
0.293	2.2090	0.1196	
0.390	2.7447	0.1486	
0.488	3.5285	0.1911	
0.976	5.3952	0.2921	
1.463	6.6443	0.3598	
1.951	7.6087	0.4120	
2.926	8.6348	0.4676	
3.902	9,1457	0.4952	
5.853	9.6163	0.5207	
7.414	9.7588	0.5284	
9.170	9.6085	0.5203	

- pH 5.00

**Taula IV.146.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 297.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 785 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.86 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.3 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 34 \pm 11 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.66 \pm 0.08 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.151	1.9167	0.0821	
0.302	3.4617	0.1482	
0.529	5.8333	0.2498	
0.756	7.4600	0.3194	
1.058	8.8183	0.3776	
1.512	10.7150	0.4588	
2.117	12.1700	0.5211	
3.175	13.0133	0.5572	
4.234	14.0950	0.6035	
5.645	14.0417	0.6067	
6.880	14.6317	0.6265	

- pH 5.25

**Taula IV.147.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.25, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 802 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.96 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.96 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 33 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.00 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.099	1.7883	0.0918	
0.198	3.0500	0.1565	
0.297	4.2600	0.2186	
0.495	6.4500	0.3310	
0.989	9.3282	0.4787	
1.978	12.0762	0.6197	
2.967	13.1658	0.6756	
3.956	13.6193	0.6988	
4.945	13.8792	0.7122	
5.934	14.0292	0.7199	
7.912	13.6975	0.7029	

- pH 5.49

**Taula IV.148.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.49, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30 °C, [wt] = 297.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm})= 903 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.076	1.1867	0.0442	$k_{\text{cat}} = 1.12 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 18 \pm 5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.0 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.151	2.8367	0.1056	
0.227	4.4533	0.1658	
0.378	7.4783	0.2784	
0.529	9.8817	0.3678	
0.756	11.6550	0.4338	
1.058	14.5917	0.5432	
1.512	17.0367	0.6342	
2.117	18.1867	0.6770	
3.175	18.5950	0.6922	
4.234	19.8650	0.7395	
5.645	19.5317	0.7337	
6.880	19.7900	0.7367	

- pH 6.00

**Taula IV.149.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30°C, [wt] = 212.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm})=1106 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.075	1.8000	0.0766	$k_{\text{cat}} = 1.4 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 7 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.3 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.149	3.6300	0.1545	
0.254	5.1100	0.2174	
0.373	8.4217	0.3583	
0.523	10.6983	0.4552	
1.000	14.0167	0.5964	
1.493	17.1167	0.7283	
2.001	16.7767	0.7138	
2.538	18.3800	0.7820	
2.986	18.5467	0.7891	
4.031	17.6650	0.7516	

- pH 6.52

**Taula IV.150.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.52, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1M, 30°C, [wt] = 212.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm})= 2146 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.026	1.5521	0.0340	$k_{\text{cat}} = 1.02 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 11 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.086	3.9800	0.0873	
0.172	7.1317	0.1564	
0.344	9.8000	0.2149	
0.430	16.4793	0.3614	
0.516	17.6667	0.3874	
0.774	21.6217	0.4741	
1.032	24.9033	0.5461	
2.064	28.4000	0.6228	
3.010	29.7617	0.6526	
4.042	28.5017	0.6250	
4.558	28.4200	0.6232	
4.902	28.8340	0.6323	
6.020	28.3250	0.6211	
7.998	25.7833	0.5654	

- pH 6.75

**Taula IV.151.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.75, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm})= 2721 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.099	7.2878	0.1102	$k_{\text{cat}} = 1.04 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.79 \pm 0.06 \text{ mM}$ $K_I = 10 \pm 1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.3 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.198	13.5172	0.2044	
0.297	18.0505	0.2730	
0.396	22.9952	0.3478	
0.495	26.9053	0.4069	
0.989	36.3807	0.5502	
1.978	45.3960	0.6866	
1.978	41.6993	0.6307	
2.967	44.1143	0.6672	
3.956	43.0885	0.6517	
5.934	40.7855	0.6168	
7.516	37.6405	0.5693	
9.297	34.7835	0.5261	

- pH 7.00

**Taula IV.152.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30°C, [wt] = 212.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})=4214 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.80 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 10 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.8 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.045	3.2600	0.0364	
0.075	4.9650	0.0554	
0.149	8.3550	0.0933	
0.209	12.3500	0.1379	
0.373	18.9000	0.2111	
0.523	26.6167	0.2972	
0.747	31.4300	0.3510	
1.000	35.2217	0.3933	
1.493	39.6800	0.4431	
1.493	39.2633	0.4385	
2.001	43.9383	0.4907	
2.538	42.3133	0.4725	
2.986	45.1667	0.5044	
4.031	44.3900	0.4957	

- pH 7.26

**Taula IV.153.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.26, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})= 5527 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.63 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.84 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 21 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.75 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.101	8.7707	0.0653	
0.202	15.8697	0.1182	
0.303	22.1690	0.1651	
0.404	26.9930	0.2010	
0.505	32.5555	0.2424	
1.011	44.7058	0.3329	
2.021	56.8098	0.4230	
3.032	60.0533	0.4471	
4.042	58.1772	0.4332	
6.064	60.0032	0.4468	
7.681	57.4348	0.4276	
9.500	54.7885	0.4079	

- pH 7.50

**Taula IV.154.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1M, 30°C, [wt] = 297.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})=7778 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.53 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.06 \pm 0.06 \text{ mM}$ $K_I = 21 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.50 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.094	9.2733	0.0401	
0.187	17.4950	0.0756	
0.281	24.3967	0.1054	
0.469	37.8683	0.1637	
0.750	50.3000	0.2174	
1.031	59.8367	0.2586	
1.499	68.8117	0.2974	
2.061	77.6383	0.3355	
2.998	79.7433	0.3446	
4.029	83.5750	0.3612	
5.997	84.1567	0.3637	
8.527	80.3233	0.3471	

- pH 7.50 (repetició)

**Taula IV.155.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30°C, [wt] = 212.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})=7778 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.48 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.9 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 33 \pm 19 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.5 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.076	5.4517	0.0330	
0.151	10.1433	0.0614	
0.302	19.4117	0.1174	
0.529	30.1017	0.1821	
0.756	36.4750	0.2207	
1.058	43.1283	0.2609	
2.117	50.5333	0.3057	
3.175	60.5933	0.3666	
3.175	60.7250	0.3674	
4.234	55.9217	0.3383	
5.594	58.4633	0.3537	
7.031	61.2750	0.3707	



- pH 7.99

**Taula IV.156.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.99, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1M, 30 °C, [wt] = 297.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 10125 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.151	1.1583	0.0385	$k_{\text{cat}} = 0.36 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.18 \pm 0.09 \text{ mM}$ $K_I = 42 \pm 14 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.31 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.378	2.3807	0.0790	
0.529	3.3533	0.1113	
0.756	4.2535	0.1412	
1.058	5.1617	0.1714	
1.588	5.9050	0.1960	
2.117	6.6817	0.2218	
3.175	7.3750	0.2448	
4.234	7.8082	0.2592	
5.594	7.8993	0.2622	
6.880	8.0900	0.2686	

- pH 8.50

**Taula IV.157.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 297.5 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 11527 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.094	5.8646	0.0171	$k_{\text{cat}} = 0.33 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.7 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 22 \pm 4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.19 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.281	16.5306	0.0482	
0.469	25.9800	0.0758	
0.750	33.7233	0.0983	
1.031	42.8383	0.1249	
1.499	49.6467	0.1448	
2.061	60.3900	0.1761	
2.998	67.9812	0.1982	
4.029	69.6300	0.2030	
5.997	72.7318	0.2121	
7.496	72.7194	0.2121	
8.527	70.6900	0.2061	

- pH 9.04

**Taula IV.158.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 9.04, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 243 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 11927 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.348 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.22 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 29 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.29 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.101	7.2967	0.0252	
0.202	13.5530	0.0468	
0.303	19.3625	0.0668	
0.505	29.9667	0.1034	
0.707	36.9005	0.1273	
1.011	44.8032	0.1546	
2.021	60.5460	0.2089	
3.032	67.1692	0.2318	
4.042	69.4698	0.2397	
6.064	70.3575	0.2428	
7.681	71.3077	0.2460	
9.500	69.2452	0.2389	

- Recull dels paràmetres obtinguts per a l'enzim salvatge

**Taula IV.159.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU a diferents pH. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
3.68	0.262 ± 0.007	3.5 ± 0.2	----	0.075 ± 0.006
4.00	0.38 ± 0.01	2.6 ± 0.2	----	0.15 ± 0.02
4.50	0.79 ± 0.08	3.1 ± 0.5	21 ± 7	0.26 ± 0.07
4.75	0.74 ± 0.01	1.49 ± 0.05	34 ± 4	0.50 ± 0.02
5.00	0.86 ± 0.04	1.3 ± 0.1	34 ± 11	0.66 ± 0.08
5.25	0.96 ± 0.01	0.96 ± 0.03	33 ± 3	1.00 ± 0.03
5.49	1.12 ± 0.09	1.1 ± 0.2	18 ± 5	1.0 ± 0.3
6.00	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2	7 ± 3	1.3 ± 0.4
6.52	1.02 ± 0.09	0.9 ± 0.1	11 ± 3	1.1 ± 0.2
6.75	1.04 ± 0.04	0.79 ± 0.06	10 ± 1	1.3 ± 0.2
7.00	0.80 ± 0.06	1.0 ± 0.1	10 ± 3	0.8 ± 0.1
7.26	0.63 ± 0.02	0.84 ± 0.05	21 ± 2	0.75 ± 0.07
7.50	0.53 ± 0.02	1.06 ± 0.06	21 ± 3	0.50 ± 0.05
7.50 (bis)	0.48 ± 0.04	0.9 ± 0.2	33 ± 19	0.5 ± 0.2
7.99	0.36 ± 0.02	1.18 ± 0.09	42 ± 14	0.31 ± 0.04
8.50	0.33 ± 0.02	1.7 ± 0.1	22 ± 4	0.19 ± 0.02
9.04	0.348 ± 0.007	1.22 ± 0.04	29 ± 3	0.29 ± 0.02

**- mutant W221A**- pH 3.68

**Taula IV.160.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 3.68, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 1.144 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 768 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.126 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.4 \pm 0.3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.037 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.192	0.5027	0.0057	
0.479	1.1682	0.0133	
0.958	2.1587	0.0246	
1.436	3.3077	0.0376	
1.915	4.1775	0.0475	
2.872	5.1118	0.0582	
3.830	5.9227	0.0674	
4.788	6.2968	0.0717	
6.702	7.7143	0.0878	
8.618	7.6310	0.0869	

- pH 4.00

**Taula IV.161.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 731 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.255 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.9 \pm 0.1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.13 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.194	0.9413	0.0227	
0.485	2.3325	0.0562	
0.970	3.5573	0.0857	
1.454	4.3362	0.1044	
1.939	5.4793	0.1320	
2.909	6.2987	0.1517	
3.878	7.1812	0.1730	
4.848	7.2308	0.1742	
5.817	8.0947	0.1950	
8.726	8.7453	0.2106	

- pH 4.50

**Taula IV.162.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 744 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.47 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.88 \pm 0.08 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.53 \pm 0.06 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.096	1.8693	0.0442	
0.192	3.2415	0.0767	
0.287	4.3087	0.1020	
0.383	4.6358	0.1097	
0.479	7.6993	0.1822	
0.958	11.1818	0.2646	
1.915	13.5330	0.3202	
2.873	15.4650	0.3660	
3.830	15.9020	0.3763	
4.788	17.0603	0.4037	
6.702	17.2153	0.4074	
8.618	17.4180	0.4122	

- pH 4.75

**Taula IV.163.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.75, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 760 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.69 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 28 \pm 8 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.8 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	3.0828	0.0709	
0.199	4.0698	0.0936	
0.298	7.3287	0.1686	
0.498	11.1607	0.2567	
0.995	16.3723	0.3766	
1.990	19.6422	0.4518	
2.985	21.6113	0.4971	
3.980	21.0590	0.4844	
4.975	22.3162	0.5134	
6.468	21.6405	0.4978	
9.353	21.2642	0.4892	

- pH 5.00

**Taula IV.164.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 785 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.048	1.1510	0.0516	$k_{\text{cat}} = 0.80 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.58 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 36 \pm 8 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 1.4 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.097	2.6798	0.1202	
0.194	3.4273	0.1986	
0.291	6.0462	0.2712	
0.485	7.8967	0.3542	
0.970	11.0845	0.4972	
1.939	13.2888	0.5961	
2.909	14.1275	0.6337	
3.878	14.1258	0.6336	
5.817	14.1020	0.6326	
7.756	13.1618	0.5904	
9.113	14.2055	0.6372	

- pH 5.25

**Taula IV.165.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.25, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 802 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.048	1.8645	0.0819	$k_{\text{cat}} = 0.85 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.45 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 44 \pm 7 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 1.9 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.095	3.2278	0.1417	
0.191	5.8822	0.2583	
0.286	7.6667	0.3366	
0.477	10.1803	0.4470	
0.954	12.6182	0.5540	
1.907	15.1532	0.6653	
3.337	16.3485	0.7178	
4.768	16.3702	0.7187	
6.198	15.8713	0.6968	
8.963	15.5162	0.6812	

- pH 5.49

**Taula IV.166.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.49, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 903 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.84 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.29 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 52 \pm 16 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.9 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.049	2.8650	0.1117	
0.097	5.2955	0.2065	
0.194	8.2658	0.3223	
0.291	11.0138	0.4295	
0.486	13.8590	0.5404	
0.971	16.8938	0.6588	
1.942	17.2085	0.6710	
3.398	18.6120	0.7258	
4.855	18.8170	0.7337	
6.797	18.8808	0.7362	
9.127	15.4540	0.6806	

- pH 5.75

**Taula IV.167.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.75, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 988 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.89 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.35 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 38 \pm 15 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.5 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.019	0.8825	0.0315	
0.048	2.6515	0.0945	
0.095	4.8300	0.1721	
0.191	9.4822	0.3379	
0.286	11.5050	0.4100	
0.381	11.2875	0.4023	
0.477	15.3242	0.5461	
0.954	18.9142	0.6741	
1.907	19.8987	0.7092	
3.337	20.9448	0.7465	
4.768	20.1892	0.7195	
7.628	19.2490	0.6860	
8.963	20.5310	0.7317	

- pH 5.85

**Taula IV.168.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.85, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 294 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1062 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.93 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.30 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 15 \pm 1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.1 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.027	2.3487	0.0752	
0.045	3.6913	0.1182	
0.090	6.3388	0.2030	
0.180	10.7153	0.3432	
0.270	13.8463	0.4435	
0.451	17.8555	0.5719	
0.902	20.5068	0.6568	
1.803	22.5518	0.7223	
3.606	21.9917	0.7044	
5.409	21.0568	0.6744	
8.474	18.2065	0.5831	

- pH 6.00

**Taula IV.169.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1106 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.05 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.38 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 16 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.8 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.029	2.6142	0.0826	
0.058	5.5187	0.1745	
0.097	7.1833	0.2271	
0.194	11.5072	0.3638	
0.291	12.7457	0.4029	
0.388	15.6322	0.4942	
0.485	19.9255	0.6299	
0.970	22.3400	0.7063	
1.939	25.1745	0.7959	
3.878	25.2517	0.7983	
5.817	23.6125	0.7465	
7.756	21.3735	0.6757	
9.113	20.3852	0.6445	

- pH 6.07

**Taula IV.170.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.07, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 294 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (355 \text{ nm}) = 1313 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.92 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.29 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 14 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.2 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.045	5.9407	0.1539	
0.090	7.8940	0.2045	
0.180	13.2107	0.3422	
0.270	16.7737	0.4345	
0.451	21.6208	0.5601	
0.902	24.3440	0.6306	
1.803	27.2448	0.7058	
2.704	27.4768	0.7118	
3.606	26.9065	0.6970	
4.508	26.2703	0.6805	
5.409	25.0892	0.6499	
6.311	24.5845	0.6369	
8.474	20.3183	0.5264	

- pH 6.14

**Taula IV.171.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.14, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (355 \text{ nm}) = 1338 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.87 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.34 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 20 \pm 4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.6 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.048	4.3863	0.1154	
0.096	7.8063	0.2054	
0.192	10.4612	0.2753	
0.289	16.0505	0.4224	
0.481	19.3367	0.5089	
0.962	23.5422	0.6195	
1.924	25.4335	0.6693	
2.886	25.7330	0.6772	
3.848	26.3713	0.6940	
4.810	25.4737	0.6704	
5.772	25.7440	0.6775	
6.734	23.4908	0.6182	
9.043	21.5472	0.5670	



- pH 6.32

**Taula IV.172.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.32, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 294 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (355 \text{ nm}) = 1627 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.92 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.34 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 12 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.7 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.047	5.6270	0.1176	
0.094	10.0862	0.2109	
0.189	15.8577	0.3315	
0.283	18.1318	0.3791	
0.472	25.9075	0.5426	
0.944	30.6718	0.6412	
1.887	33.2263	0.6946	
2.831	31.4320	0.6571	
3.774	31.5857	0.6603	
5.661	29.2588	0.6117	
7.548	25.9075	0.5416	

- pH 6.52

**Taula IV.173.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.52, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (355 \text{ nm}) = 2146 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.79 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.32 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 15 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 2.5 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.047	4.3422	0.0712	
0.093	10.4485	0.1714	
0.186	17.2788	0.2835	
0.280	22.9570	0.3767	
0.466	29.0005	0.4758	
0.932	32.2923	0.5299	
1.863	37.5772	0.6166	
2.795	36.0173	0.5910	
3.726	36.4005	0.5973	
4.658	35.5108	0.5827	
6.521	33.1840	0.5445	
8.756	28.9833	0.4756	

- pH 6.75

**Taula IV.174.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.75, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 294 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 2721 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.79 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.42 \pm 0.04 \text{ mM}$ $K_I = 12 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.9 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.047	6.8443	0.0856	
0.094	12.3677	0.1546	
0.189	17.6375	0.2205	
0.283	24.6725	0.3084	
0.472	33.3318	0.4167	
0.944	42.4093	0.5301	
1.887	44.9477	0.5619	
2.831	44.5965	0.5575	
3.774	45.3223	0.5666	
5.661	38.7197	0.4840	
7.548	38.6867	0.4836	

- pH 7.00

**Taula IV.175.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 4214 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.61 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.56 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 15 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.093	2.1628	0.0897	
0.186	3.4459	0.1430	
0.279	4.2303	0.1755	
0.372	5.9114	0.2452	
0.465	7.0467	0.2923	
0.929	9.0425	0.3751	
1.858	10.0728	0.4179	
2.787	10.5503	0.4377	
3.716	10.5046	0.4358	
4.645	10.4952	0.4354	
5.574	9.7557	0.4047	
5.574	10.3177	0.4280	
7.432	9.4349	0.3914	
8.733	9.0344	0.3748	

- pH 7.26

**Taula IV.176.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.26, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 294 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5560 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.094	0.9867	0.0604	$k_{\text{cat}} = 0.55 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.71 \pm 0.06 \text{ mM}$ $K_I = 11 \pm 2 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.77 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.189	1.7272	0.1057	
0.283	2.7165	0.1662	
0.472	3.5734	0.2144	
0.944	4.8330	0.2957	
1.887	5.7099	0.3493	
2.831	5.8177	0.3559	
3.774	5.8633	0.3687	
4.718	5.7603	0.3524	
5.661	5.5001	0.3365	
7.548	4.9373	0.3020	

- pH 7.50

**Taula IV.177.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 284 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 7778 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.047	6.0827	0.0275	$k_{\text{cat}} = 0.374 \pm 0.009 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.57 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 27 \pm 4 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 0.66 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.093	11.2515	0.0509	
0.186	19.3892	0.0878	
0.279	25.9342	0.1174	
0.466	38.6147	0.1748	
0.932	51.3188	0.2323	
1.863	59.2547	0.2683	
2.795	62.9808	0.2851	
3.726	63.2822	0.2865	
4.658	64.6483	0.2927	
6.148	62.7048	0.2839	
8.756	59.6137	0.2699	

- pH 7.99

**Taula IV.178.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.99, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 10125 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.29 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.67 \pm 0.06 \text{ mM}$ $K_I = 35 \pm 11 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.43 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.093	2.0975	0.0362	
0.186	3.1778	0.0549	
0.279	4.9172	0.0849	
0.465	6.7654	0.1168	
0.743	8.9518	0.1546	
0.929	9.8475	0.1700	
1.858	11.9945	0.2071	
2.787	12.8608	0.2221	
3.716	12.3914	0.2140	
5.574	13.1632	0.2273	
7.432	13.0730	0.2257	

- pH 8.50

**Taula IV.179.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [W221A] = 568 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 11527 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.125 \pm 0.009 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 25 \pm 9 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.14 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.093	9.8605	0.0150	
0.186	15.3730	0.0233	
0.466	15.3298	0.0386	
0.652	34.1300	0.0518	
0.932	40.9847	0.0622	
1.863	53.6845	0.0814	
2.795	54.5025	0.0827	
3.726	61.1467	0.0927	
5.030	58.6260	0.0889	
6.521	61.4133	0.0931	
8.756	55.2002	0.0837	

- Recull dels paràmetres obtinguts per al mutant W221A

**Taula IV.180.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions del mutant W221A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU a diferents pH. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_M / mM$	$K_I / mM$	$(k_{cat}/K_M) / s^{-1} \cdot mM^{-1}$
3.68	0.126 ± 0.006	3.4 ± 0.3	----	0.037 ± 0.005
4.00	0.255 ± 0.006	1.9 ± 0.1	----	0.13 ± 0.01
4.50	0.47 ± 0.01	0.88 ± 0.08	----	0.53 ± 0.06
4.75	0.69 ± 0.04	0.9 ± 0.1	28 ± 8	0.8 ± 0.1
5.00	0.80 ± 0.03	0.58 ± 0.05	36 ± 8	1.4 ± 0.2
5.25	0.85 ± 0.02	0.45 ± 0.02	44 ± 7	1.9 ± 0.1
5.49	0.84 ± 0.04	0.29 ± 0.03	52 ± 16	2.9 ± 0.4
5.75	0.89 ± 0.05	0.35 ± 0.05	38 ± 15	2.5 ± 0.5
5.85	0.93 ± 0.02	0.30 ± 0.02	15 ± 1	3.1 ± 0.3
6.00	1.05 ± 0.06	0.38 ± 0.04	16 ± 3	2.8 ± 0.4
6.07	0.92 ± 0.04	0.29 ± 0.03	14 ± 2	3.2 ± 0.5
6.14	0.87 ± 0.03	0.34 ± 0.03	20 ± 4	2.6 ± 0.3
6.32	0.92 ± 0.03	0.34 ± 0.03	12 ± 2	2.7 ± 0.3
6.52	0.79 ± 0.03	0.32 ± 0.03	15 ± 2	2.5 ± 0.3
6.75	0.79 ± 0.04	0.42 ± 0.04	12 ± 2	1.9 ± 0.3
7.00	0.61 ± 0.03	0.56 ± 0.05	15 ± 2	1.1 ± 0.2
7.26	0.55 ± 0.02	0.71 ± 0.06	11 ± 2	0.77 ± 0.09
7.50	0.374 ± 0.009	0.57 ± 0.03	27 ± 4	0.66 ± 0.05
7.99	0.29 ± 0.01	0.67 ± 0.06	35 ± 11	0.43 ± 0.05
8.50	0.125 ± 0.009	0.9 ± 0.1	25 ± 9	0.14 ± 0.03

#### IV.2.7. Perfils d'activitat hidrolítica enfront del pH de l'enzim salvatge i dels mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis*

En aquest experiment l'objectiu és determinar l'efecte provocat per la mutació de la tirosina 152 de la de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en els pK<sub>a</sub> del Glu134 i el Glu138. Donat que la determinació d'aquests pK<sub>a</sub> persegueix una finalitat comparativa respecte del seu valor en l'enzim salvatge, es realitza un perfil d'activitat enfront del pH per a l'enzim salvatge juntament amb els perfils d'activitat realitzats per als mutants Y221A i Y152F, fent servir com a substrat el G4G3G-MU.

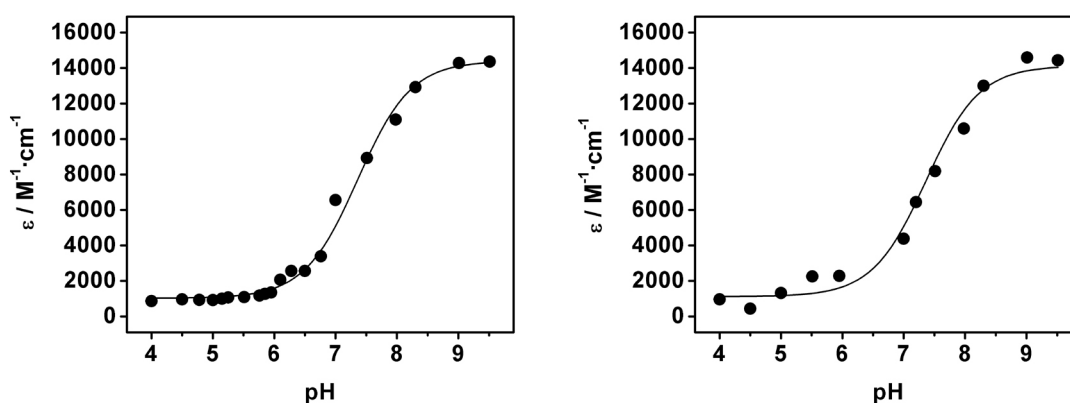
##### IV.2.7.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

En anteriors treballs a l'equip s'ha fixat que treballant amb el substrat G4G3G-MU, les reaccions d'hidròlisi s'han de seguir a una longitud d'ona de 355 nm per sota de pH 7.0 i a 365 nm a pH 7.0 o superiors {Malet, 1995 #661}. Seguint el procediment descrit a l'apartat III.2.3 es determinen les absortivitats de substrat i aglicona a cadascun dels pH de treball en tampó 11 mM citrat, 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, a 30 °C.

**Taula IV.181.** Es presenten a cada pH l'absortivitat del substrat i de la 4-metilumbel·liferona a la longitud d'ona escollida per al seguiment de la reacció d'hidròlisi del G4G3G-MU, i la variació d'absortivitat emprada en la conversió d'unitats de la velocitat d'hidròlisi. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$\lambda$ / nm	$\epsilon_{\text{MU}} / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{G4G3GMU}} / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
4.00	355	861	54	807
4.50	355	954	54	900
4.78	355	929	54	875
5.00	355	917	54	863
5.15	355	996	54	942
5.25	355	1066	54	1012
5.51	355	1086	54	1032
5.76	355	1168	54	1114
5.85	355	1265	54	1211
5.95	355	1343	54	1289
6.00	355	1588	54	1534
6.10	355	2066	54	2012
6.28	355	2565	54	2511
6.50	355	2565	54	2511
6.76	355	3391	54	3337
7.00	365	4377	1	4376
7.20	365	6442	1	6441
7.51	365	8188	1	8187
7.98	365	10594	1	10593
8.18	365	13795	1	13794
8.30	365	13000	1	12999
8.49	365	12374	1	12373
9.01	365	14591	1	14590
9.51	365	14435	1	14434

A la figura IV.1 es mostra la representació gràfica de les absortivitats obtingudes per a la 4-metilumbel·liferona a les dues longituds d'ona (355 i 365 nm). Es comprova que els valors obtinguts poden ajustar-se a l'equació IV.5, que defineix el comportament de l'absortivitat en funció del pH.



**Figura IV.1.** Perfils d'absortivitat de la 4-metilumbel·liferona en funció del pH a les longituds d'ona de 355 nm (esquerra) i 365 nm (dreta) en tampó 11 mM fosfat, 11 mM citrat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

$$\varepsilon_{\lambda}(pH) = \frac{\varepsilon_{\lambda,ArOH} + \varepsilon_{\lambda,ArO^-} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad \text{Equació IV.5.}$$

#### IV.2.7.2. Determinació dels paràmetres cinètics

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.7. Als diferents pH assajats s'ha comprovat que, en les condicions experimentals emprades per tal de realitzar el perfil d'activitat enfront del pH, la velocitat d'hidròlisi espontània del substrat G4G3G-MU és menyspreable respecte de la velocitat d'hidròlisi obtinguda en presència de qualsevol dels tres enzims.

#### - Enzim salvatge

##### - pH 4.00

**Taula IV.182.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 287 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 807 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.52 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.4 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.22 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.197	1.0010	0.0432	
0.699	2.8336	0.1223	
1.507	4.6662	0.2014	
2.959	6.3344	0.2734	
4.466	7.8334	0.3381	
5.973	8.6675	0.3741	

##### - pH 4.50

**Taula IV.183.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 1.44 μM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.63 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.5 \pm 0.3 \text{ mM}$ $K_I = 30 \pm 11 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.25 \pm 0.05 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.098	3.1622	0.0244	
0.199	6.3115	0.0487	
0.673	16.0834	0.1241	
1.024	22.5504	0.1740	
2.019	33.2683	0.2567	
2.956	37.9987	0.2932	
4.477	44.7768	0.3455	
5.999	49.3517	0.3808	
7.960	48.2501	0.3723	
10.213	47.9390	0.3699	

- pH 5.00

**Taula IV.184.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 1.03 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub>(355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.09 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.3 \pm 0.3 \text{ mM}$ $K_I = 11 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.5 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.101	3.8222	0.0430	
0.176	7.6445	0.0860	
0.297	12.3022	0.1384	
0.413	14.9600	0.1683	
0.689	21.7689	0.2449	
1.004	28.5867	0.3216	
1.477	36.4000	0.4095	
1.673	37.7245	0.4244	
1.988	42.3823	0.4768	
2.500	46.8712	0.5273	
2.953	46.2401	0.5202	
4.961	52.5156	0.5908	
7.009	49.3601	0.5553	

- pH 5.25

**Taula IV.185.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.25, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [wt] = 931 nM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub>(355 nm) = 942 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.01 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.17 \pm 0.06 \text{ mM}$ $K_I = 21 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.86 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	7.0050	0.0799	
0.149	11.1694	0.1274	
0.200	13.8346	0.1578	
0.295	19.1651	0.2186	
0.398	22.1635	0.2528	
0.664	32.5000	0.3707	
0.982	40.3379	0.4601	
1.460	47.3341	0.5399	
3.000	58.1703	0.6635	
3.956	61.3353	0.6996	
6.956	58.8366	0.6711	
9.000	57.5040	0.6559	



- pH 5.51

**Taula IV.186.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 726 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 1029 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.08 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.14 \pm 0.08 \text{ mM}$ $K_I = 16 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.099	0.76658	0.1026	
0.150	10.1688	0.1361	
0.199	10.8338	0.1450	
0.299	16.8334	0.2253	
0.397	20.5020	0.2744	
0.690	30.6633	0.4104	
0.983	36.1624	0.4840	
1.485	43.8357	0.5867	
2.991	51.3297	0.6870	
3.994	52.9958	0.7093	
5.981	50.6647	0.6781	
7.989	49.3348	0.6603	

- pH 6.00

**Taula IV.187.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 419 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 1223 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.27 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.93 \pm 0.08 \text{ mM}$ $K_I = 16 \pm 6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.4 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.058	3.6153	0.0705	
0.100	6.4972	0.1267	
0.147	9.4971	0.1852	
0.232	12.3996	0.2418	
0.707	26.9991	0.5265	
0.981	32.6656	0.6370	
1.985	40.9987	0.7995	
2.989	43.3319	0.8450	

- pH 6.50

**Taula IV.188.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 317 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm})= 2511 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.93 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.67 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 18 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 1.39 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.101	1.0165	0.1277	
0.147	1.3166	0.1654	
0.199	1.6334	0.2052	
0.297	2.3665	0.2973	
0.393	2.7326	0.3433	
0.701	3.6830	0.4627	
0.975	4.2991	0.5401	
1.488	4.8157	0.6050	
1.967	5.0330	0.6323	
2.993	5.4326	0.6825	
3.967	5.3992	0.6783	
5.985	5.1994	0.6532	
7.849	4.8659	0.6113	

- pH 7.00

**Taula IV.189.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 215 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})= 4376 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.91 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 10 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.9 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.050	4.4648	0.0475	
0.098	8.2717	0.0880	
0.150	11.9094	0.1267	
0.199	17.2953	0.1840	
0.397	25.6422	0.2728	
0.690	33.9139	0.3608	
0.983	38.8769	0.4136	
1.485	46.4813	0.4945	
2.991	53.5968	0.5702	
3.994	53.5968	0.5702	
7.988	43.5016	0.4628	

- pH 7.20

**Taula IV.190.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.20, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 215 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})= 6441 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.69 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 14 \pm 4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.7 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.050	5.2159	0.0377	
0.099	8.8407	0.0639	
0.150	11.1651	0.0807	
0.199	16.3395	0.1181	
0.397	25.4984	0.1843	
0.690	40.3436	0.2916	
0.983	44.8401	0.3241	
1.485	51.6747	0.3735	
2.991	62.6738	0.4530	
3.994	63.0058	0.4554	
5.981	59.8375	0.4325	

- pH 7.51

**Taula IV.191.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I= 0.1 M, 30 °C, [wt] = 215 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm})= 8187 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.66 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.4 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 17 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.47 \pm 0.06 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.094	8.4939	0.0483	
0.146	11.8352	0.0673	
0.198	16.0030	0.0910	
0.393	25.0068	0.1422	
0.667	33.6766	0.1915	
0.975	46.8482	0.2664	
1.488	56.5028	0.3213	
1.967	62.1830	0.3536	
2.993	70.3427	0.4000	
3.967	74.0181	0.4209	
5.985	71.8375	0.4085	
7.934	70.1844	0.3991	

- pH 7.98

**Taula IV.192.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30°C, [wt] = 317 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 10593 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.096	0.9167	0.0273	$k_{\text{cat}} = 0.60 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 9.7 \pm 0.8 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.30 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.147	1.3499	0.0402	
0.199	1.7159	0.0511	
0.374	3.1666	0.0943	
0.689	5.0504	0.1504	
0.965	6.2660	0.1866	
1.477	7.6663	0.2283	
1.988	9.0498	0.2695	
2.973	10.0639	0.2997	
3.997	10.5474	0.3141	
4.981	10.3661	0.3087	
6.970	9.9497	0.2963	
8.781	9.3654	0.2789	

- pH 8.18

**Taula IV.193.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.18, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I=0.1 M, 30°C, [wt] = 574 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(365 \text{ nm}) = 13794 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.197	3.3187	0.0419	$k_{\text{cat}} = 0.5 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.5 \pm 0.7 \text{ mM}$ $K_I = 5.2 \pm 0.3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.2 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0.484	6.7958	0.0858	
0.753	8.7997	0.1111	
1.453	13.7659	0.1738	
2.960	17.0450	0.2152	
3.982	16.9499	0.2140	

- Recull dels paràmetres obtinguts per a l'enzim salvatge

**Taula IV.194.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU, a diferents pH. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \text{mM}$	$K_{\text{I}} / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
4.00	0.52 ± 0.02	2.4 ± 0.2	----	0.22 ± 0.03
4.50	0.63 ± 0.06	2.5 ± 0.3	30 ± 11	0.25 ± 0.05
5.00	1.09 ± 0.09	2.3 ± 0.3	11 ± 3	0.5 ± 0.1
5.25	1.01 ± 0.03	1.17 ± 0.06	21 ± 2	0.86 ± 0.07
5.51	1.08 ± 0.04	1.14 ± 0.08	16 ± 2	1.0 ± 0.1
6.00	1.27 ± 0.08	0.93 ± 0.08	16 ± 6	1.4 ± 0.2
6.50	0.93 ± 0.02	0.67 ± 0.03	18 ± 2	1.39 ± 0.09
7.00	0.91 ± 0.05	1.0 ± 0.1	10 ± 2	0.9 ± 0.1
7.20	0.69 ± 0.05	1.0 ± 0.1	14 ± 4	0.7 ± 0.1
7.51	0.66 ± 0.04	1.4 ± 0.1	17 ± 3	0.47 ± 0.06
7.98	0.60 ± 0.02	2.0 ± 0.1	9.7 ± 0.8	0.30 ± 0.03
8.18	0.5 ± 0.1	2.5 ± 0.7	5.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1

**- mutant Y152A**- pH 4.00

**Taula IV.195.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 1.94  $\mu\text{M}$ , substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (355 \text{ nm}) = 807 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.199	0.50099	0.0032	
0.585	1.8317	0.0117	
0.974	2.8337	0.0181	
1.998	4.6654	0.0298	
4.029	7.6713	0.0490	
5.993	9.3465	0.0597	
7.990	10.3485	0.0661	
10.962	10.8495	0.0693	

- pH 4.50

**Taula IV.196.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.16 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 900 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.14 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 4.4 \pm 0.9 \text{ mM}$ $K_I = 40 \pm 30 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.032 \pm 0.007 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	0.6610	0.0034	
0.148	0.9914	0.0051	
0.199	1.3414	0.0069	
0.250	1.5163	0.0078	
0.692	2.9938	0.0154	
0.999	5.3460	0.0275	
1.999	8.6702	0.0446	
2.998	11.0030	0.0566	
4.996	13.6858	0.0704	
6.995	15.1826	0.0781	
9.032	16.3490	0.0841	

- pH 4.78

**Taula IV.197.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.78, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.78 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 875 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.174 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 3.0 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 60 \pm 20 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.058 \pm 0.004 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.296	3.6731	0.0151	
0.699	8.1732	0.0336	
0.995	10.5084	0.0432	
1.996	16.6870	0.0686	
3.453	22.1844	0.0912	
4.963	25.0304	0.1029	
6.474	26.6845	0.1097	
7.985	28.0224	0.1152	

- pH 5.00

**Taula IV.198.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 3.97 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.099	2.5011	0.0073	$k_{\text{cat}} = 0.17 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.6 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 44 \pm 8 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.065 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.148	3.3233	0.0097	
0.199	4.1799	0.0122	
0.250	4.8308	0.0141	
0.663	11.3404	0.0331	
0.983	15.8286	0.0462	
1.486	18.3297	0.0535	
1.989	25.1476	0.0734	
2.995	29.4988	0.0861	
4.001	33.4731	0.0977	
5.989	36.9677	0.1079	
8.001	38.8178	0.1133	
10.264	36.4881	0.1065	
11.472	38.9891	0.1138	

- pH 5.15

**Taula IV.199.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.15, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.78 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 1012 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.296	6.8365	0.0243	$k_{\text{cat}} = 0.16 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.0 \pm 0.2 \text{ mM}$ $K_I = 31 \pm 9 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.08 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.493	9.0028	0.0320	
0.986	14.0105	0.0498	
1.991	21.3534	0.0759	
2.960	25.8548	0.0919	
4.466	28.3587	0.1008	
5.973	29.8497	0.1061	
7.964	29.6809	0.1055	
9.955	29.6809	0.1055	

- pH 5.25

**Taula IV.200.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.25, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 1.94 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 942 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.14 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.28 \pm 0.04 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.11 \pm 0.01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.099	2.0102	0.0110	
0.149	2.9971	0.0164	
0.200	3.5088	0.0192	
0.250	4.3311	0.0237	
0.667	8.5161	0.0466	
0.981	10.6725	0.0584	
2.000	15.6798	0.0858	
2.981	17.5255	0.0959	
4.942	20.3581	0.1114	
6.982	21.3632	0.1169	
9.218	22.3684	0.1224	

- pH 5.51

**Taula IV.201.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.03 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 1029 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.13 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.06 \pm 0.09 \text{ mM}$ $K_I = 100 \pm 60 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.12 \pm 0.06 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.099	2.8200	0.0135	
0.148	3.4884	0.0167	
0.199	4.1569	0.0199	
0.250	5.1595	0.0247	
0.675	10.9666	0.0525	
1.003	13.9745	0.0669	
1.988	17.7972	0.0852	
2.973	19.9487	0.0955	
3.994	21.2856	0.1019	
4.997	22.9567	0.1099	
6.000	23.1238	0.1107	
8.498	22.9567	0.1099	



- pH 5.51 (repetició)

**Taula IV.202.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 1.94 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 1029 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.13 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.07 \pm 0.07 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.13 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.099	1.9963	0.0100	
0.150	3.1741	0.0159	
0.200	4.1722	0.0209	
0.251	4.8310	0.0242	
0.436	5.6694	0.0284	
0.706	11.0194	0.0552	
0.981	12.0175	0.0602	
2.000	16.3494	0.0819	
2.981	19.3637	0.0970	
4.981	21.5197	0.1078	
6.040	22.1984	0.1112	
6.982	22.3581	0.1120	
9.218	23.1167	0.1158	

- pH 6.00

**Taula IV.203.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 3.97 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 1223 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.13 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 100 \pm 80 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.13 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	8.0113	0.0165	
0.149	9.1765	0.0189	
0.200	10.6817	0.0220	
0.249	12.3325	0.0254	
0.685	25.8302	0.0532	
0.995	29.4717	0.0607	
1.481	37.2888	0.0768	
2.498	44.8145	0.0923	
2.985	44.8145	0.0923	
3.958	49.4756	0.1019	
4.975	49.2814	0.1015	
5.970	51.4663	0.1060	
7.960	51.1264	0.1053	

- pH 6.50

**Taula IV.204.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 0.97 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (355 nm) = 2511 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.11 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.94 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 27 \pm 3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.12 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	2.8254	0.0116	
0.149	3.8484	0.0158	
0.200	4.8470	0.0199	
0.249	5.8356	0.0240	
0.693	11.3502	0.0466	
0.984	13.8590	0.0569	
1.969	17.8535	0.0733	
2.990	19.3636	0.0795	
3.974	19.6802	0.0808	
6.016	19.8507	0.0815	

- pH 7.00

**Taula IV.205.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.03 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 4376 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.08 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.94 \pm 0.05 \text{ mM}$ $K_I = 120 \pm 50 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.09 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	6.5736	0.0074	
0.149	9.4163	0.0106	
0.200	11.9924	0.0135	
0.249	15.0127	0.0169	
0.249	18.8326	0.0212	
0.990	34.3783	0.0387	
1.955	45.7489	0.0515	
2.971	51.7007	0.0582	
3.986	52.8555	0.0595	
6.957	56.2312	0.0633	
8.988	58.2543	0.0656	

- pH 7.51

**Taula IV.206.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 1.94 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 8187 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.061 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.5 \pm 0.1 \text{ mM}$ $K_I = 200 \pm 300 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.041 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.099	6.5119	0.0041	
0.150	9.3708	0.0059	
0.199	12.2297	0.0077	
0.249	14.6122	0.0092	
0.695	31.1302	0.0196	
0.988	38.4363	0.0242	
1.976	52.2543	0.0329	
3.000	65.1194	0.0410	
4.976	74.8079	0.0471	
6.988	76.8727	0.0484	
7.866	78.1433	0.0492	

- pH 7.98

**Taula IV.207.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.16 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 10593 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.0413 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.55 \pm 0.02 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.0267 \pm 0.0005 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.100	5.7202	0.0025	
0.148	8.2371	0.0036	
0.199	10.9828	0.0048	
0.250	13.2709	0.0058	
0.694	29.2875	0.0128	
0.981	36.8382	0.0161	
1.997	52.6260	0.0230	
2.978	61.7784	0.0270	
4.975	71.8460	0.0314	
6.972	77.3374	0.0338	
8.233	79.8543	0.0349	

- pH 8.49

**Taula IV.208.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.49, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152A] = 2.60 μM, substrat: G4G3G-MU. Δε<sub>hidròlisi</sub> (365 nm) = 12373 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.100	0.7721	0.0024	$k_{\text{cat}} = 0.0417 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 1.83 \pm 0.05 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.0228 \pm 0.0008 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.148	1.0616	0.0033	
0.200	1.4155	0.0044	
0.252	1.6728	0.0052	
0.655	3.5387	0.0110	
0.957	4.5681	0.0142	
1.512	6.1766	0.0192	
1.965	6.7557	0.0210	
2.973	8.2033	0.0255	
3.981	9.2006	0.0286	
4.989	9.8440	0.0306	
6.954	10.6482	0.0331	

- Recull dels paràmetres obtinguts per al mutant Y152A

**Taula IV.209.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions del mutant Y152A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU a diferents pH. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
4.00	0.12 ± 0.02	6 ± 1	50 ± 10	0.020 ± 0.007
4.50	0.14 ± 0.02	4.4 ± 0.9	40 ± 30	0.032 ± 0.007
4.78	0.174 ± 0.006	3.0 ± 0.2	60 ± 20	0.058 ± 0.004
5.00	0.17 ± 0.06	2.6 ± 0.1	44 ± 8	0.065 ± 0.03
5.15	0.16 ± 0.01	2.0 ± 0.2	31 ± 9	0.08 ± 0.01
5.25	0.14 ± 0.01	1.28 ± 0.04	----	0.11 ± 0.01
5.51	0.13 ± 0.05	1.06 ± 0.09	100 ± 60	0.12 ± 0.06
5.51 (bis)	0.13 ± 0.04	1.07 ± 0.07	----	0.12 ± 0.05
6.00	0.13 ± 0.06	1.0 ± 0.1	100 ± 80	0.13 ± 0.07
6.50	0.11 ± 0.02	0.94 ± 0.03	27 ± 3	0.12 ± 0.03
7.00	0.08 ± 0.01	0.94 ± 0.05	120 ± 50	0.09 ± 0.02
7.51	0.061 ± 0.003	1.5 ± 0.1	200 ± 300	0.041 ± 0.005
7.98	0.0413 ± 0.0002	1.55 ± 0.02	----	0.0267 ± 0.0005
8.49	0.0417 ± 0.0004	1.83 ± 0.05	----	0.0228 ± 0.0008

**- mutant Y152F**- pH 4.00

**Taula IV.210.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 216 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 807 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.010	0.1325	0.0076	
0.020	0.1464	0.0084	
0.030	0.2005	0.0115	
0.037	0.2161	0.0124	
0.046	0.3329	0.0191	
0.093	0.6659	0.0382	
0.194	1.1662	0.0669	
0.398	1.7327	0.0994	
0.592	1.9994	0.1147	
0.694	2.3323	0.1338	
1.000	2.3323	0.1338	
1.203	2.4491	0.1405	
1.398	2.4160	0.1386	
1.796	2.3323	0.1338	

- pH 4.50

**Taula IV.211.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 900 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.013	0.1662	0.0063	
0.032	0.4010	0.0152	
0.049	0.6990	0.0265	
0.098	1.3321	0.0505	
0.196	2.0839	0.0790	
0.293	2.8331	0.1074	
0.399	3.3317	0.1263	
0.496	3.6667	0.1390	
0.699	4.0993	0.1554	
1.000	4.5003	0.1706	
1.128	4.5003	0.1706	
1.496	4.5003	0.1706	
1.767	4.4000	0.1668	

- pH 4.78

**Taula IV.212.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 4.78, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 216 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 875 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.009	0.9450	0.0050	
0.014	3.3264	0.0176	
0.020	4.0068	0.0212	
0.025	6.4638	0.0342	
0.030	5.9913	0.0317	
0.034	6.9930	0.0370	
0.040	9.1665	0.0485	
0.050	13.1544	0.0696	
0.070	14.8365	0.0785	
0.098	16.6698	0.0882	
0.196	26.9892	0.1428	
0.293	30.1644	0.1596	
0.391	35.8344	0.1896	
0.694	41.5044	0.2196	
0.996	39.9924	0.2116	
1.298	41.6556	0.2204	
1.601	41.6556	0.2204	
1.699	38.9907	0.2063	
2.090	36.6660	0.1940	

- pH 5.00

**Taula IV.213.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	0.7664	0.0303	
0.005	0.1669	0.0066	
0.010	0.3845	0.0152	
0.015	0.5008	0.0198	
0.049	1.5000	0.0593	
0.102	2.4991	0.0988	
0.149	3.1669	0.1252	
0.196	3.8321	0.1515	
0.298	4.6668	0.1845	
0.399	5.1651	0.2042	
0.501	5.3321	0.2108	
0.596	5.4990	0.2174	
0.697	5.8329	0.2306	

- pH 5.00 (repetició)

**Taula IV.214.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 216 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	0.2367	0.0127	
0.010	0.3504	0.0188	
0.015	0.4828	0.0259	$K_M = 0.19 \pm 0.02 \text{ mM}$
0.020	0.5499	0.0295	
0.025	0.6841	0.0367	$K_I = 6 \pm 2 \text{ mM}$
0.030	0.8332	0.0447	
0.039	0.9171	0.0492	$k_{\text{cat}}/K_M = 1.6 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.049	1.0998	0.0590	
0.071	1.5006	0.0805	
0.098	2.0002	0.1073	
0.150	2.3338	0.1252	
0.196	2.8334	0.1520	
0.300	3.8326	0.2056	
0.398	3.4989	0.1877	
0.595	4.1662	0.2235	
0.797	4.2501	0.2280	
0.993	4.3489	0.2333	
1.203	4.2333	0.2271	
1.496	4.3321	0.2324	

- pH 5.25

**Taula IV.215.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.25, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 217 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 942 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.010	0.5120	0.0250	
0.020	0.8335	0.0407	
0.039	1.4335	0.0700	$K_M = 0.15 \pm 0.01 \text{ mM}$
0.056	1.6670	0.0814	
0.060	2.0008	0.0977	$K_I = 5 \pm 1 \text{ mM}$
0.083	2.5660	0.1253	
0.111	3.0002	0.1465	$k_{\text{cat}}/K_M = 2.2 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.213	3.6678	0.1791	
0.324	4.5013	0.2198	
0.426	4.8331	0.2360	
0.759	5.0010	0.2442	
1.083	4.8331	0.2360	
1.296	5.0010	0.2442	
1.518	4.8331	0.2360	
1.731	4.6672	0.2279	

- pH 5.51

**Taula IV.216.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1029 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	0.3167	0.0105	
0.010	0.5007	0.0166	
0.015	0.8324	0.0276	
0.029	1.8307	0.0607	
0.049	3.1668	0.1050	
0.099	4.5481	0.1508	
0.148	5.0005	0.1658	
0.198	5.7002	0.1890	
0.296	6.8312	0.2265	
0.395	7.2655	0.2409	
0.593	7.1660	0.2376	
0.798	7.3319	0.2431	
0.996	7.2505	0.2404	
1.498	7.0001	0.2321	
1.934	6.4995	0.2155	

- pH 5.76

**Taula IV.217.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.76, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1114 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.006	0.3330	0.0102	
0.010	0.6987	0.0214	
0.015	1.3322	0.0408	
0.020	1.8317	0.0561	
0.029	2.5011	0.0766	
0.059	4.3328	0.1327	
0.098	5.4985	0.1684	
0.196	7.1670	0.2195	
0.293	8.3326	0.2552	
0.399	8.1661	0.2501	
0.594	8.8322	0.2705	
0.797	8.9987	0.2756	
1.000	8.8322	0.2705	
1.196	8.3326	0.2552	
1.496	8.1661	0.2501	



- pH 5.85

**Taula IV.218.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.85, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 217 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1213 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.030	1.6666	0.0632	
0.050	2.8348	0.1075	
0.068	3.4994	0.1327	
0.093	4.6676	0.1770	
0.144	5.5009	0.2086	
0.195	5.9993	0.2275	
0.297	6.5004	0.2465	
0.399	6.6665	0.2528	
0.695	6.8353	0.2592	
0.992	6.8353	0.2592	
1.196	6.8353	0.2592	
1.399	6.5004	0.2465	

- pH 5.95

**Taula IV.219.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 5.95, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 273 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1289 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.020	2.1669	0.0616	
0.050	4.1649	0.1184	
0.080	5.9977	0.1705	
0.103	6.8313	0.1942	
0.150	7.6650	0.2179	
0.196	8.4987	0.2416	
0.299	9.1671	0.2606	
0.454	9.8319	0.2795	
0.706	9.6666	0.2748	
0.991	9.8319	0.2795	
1.210	9.1671	0.2606	
1.362	8.9982	0.2558	

- pH 6.00

**Taula IV.220.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1223 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	0.7814	0.0218	$k_{\text{cat}} = 0.358 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.091 \pm 0.005 \text{ mM}$ $K_I = 4.4 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.9 \pm 0.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.010	1.2833	0.0358	
0.015	1.6669	0.0465	
0.029	3.2333	0.0902	
0.051	4.3338	0.1209	
0.099	6.6674	0.1860	
0.148	7.7643	0.2166	
0.198	8.7500	0.2441	
0.247	8.6640	0.2417	
0.296	9.3989	0.2622	
0.403	9.5494	0.2664	
0.494	9.9975	0.2789	
0.593	10.1660	0.2836	
0.798	9.6641	0.2696	
1.004	9.4992	0.2650	
1.498	9.1659	0.2557	

- pH 6.00 (repetició)

**Taula IV.221.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 216 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1223 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.001	0.4993	0.0189	$k_{\text{cat}} = 0.40 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.098 \pm 0.009 \text{ mM}$ $K_I = 2.8 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 4.1 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.002	0.4332	0.0164	
0.003	0.7000	0.0265	
0.005	0.5653	0.0214	
0.010	0.8321	0.0315	
0.016	1.2337	0.0467	
0.020	1.6669	0.0631	
0.030	2.5836	0.0978	
0.040	3.3338	0.1262	
0.053	3.8331	0.1451	
0.098	5.1671	0.1956	
0.150	5.9993	0.2271	
0.196	6.8314	0.2586	
0.293	7.4997	0.2839	
0.399	7.6662	0.2902	
0.594	7.8326	0.2965	
0.797	7.6662	0.2902	
0.993	7.4997	0.2839	
1.203	6.6650	0.2523	

- pH 6.10

**Taula IV.222.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.10, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 218 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1534 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.010	1.1659	0.0348	$k_{\text{cat}} = 0.39 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.12 \pm 0.01 \text{ mM}$ $K_I = 2.5 \pm 0.5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.3 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.015	1.3334	0.0398	
0.020	1.8326	0.0547	
0.025	2.0001	0.0597	
0.030	2.3318	0.0696	
0.035	2.6668	0.0796	
0.040	2.9985	0.0895	
0.050	4.0002	0.1194	
0.070	5.1661	0.1542	
0.098	5.9166	0.1766	
0.143	7.0824	0.2114	
0.196	8.1679	0.2438	
0.294	8.6671	0.2587	
0.393	8.9988	0.2686	
0.500	8.8346	0.2637	
0.598	8.9988	0.2686	
0.696	8.8346	0.2637	
0.794	8.4996	0.2537	
0.999	8.8346	0.2637	
1.294	8.4996	0.2537	

- pH 6.28

**Taula IV.223.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.28, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 2012 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.001	0.2477	0.0042	$k_{\text{cat}} = 0.37 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.12 \pm 0.01 \text{ mM}$ $K_I = 1.9 \pm 0.3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.1 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.003	0.3184	0.0054	
0.005	0.5013	0.0085	
0.010	1.3328	0.0226	
0.015	1.3976	0.0237	
0.030	4.1634	0.0706	
0.053	6.6638	0.1130	
0.098	9.6655	0.1639	
0.143	11.6646	0.1978	
0.196	13.1625	0.2232	
0.293	13.8289	0.2345	
0.399	14.1650	0.2402	
0.549	14.3301	0.2430	
0.699	14.3301	0.2430	
0.993	13.4986	0.2289	
1.203	12.9974	0.2204	

- pH 6.50

**Taula IV.224.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 6.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 2511 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	0.8317	0.0113	$k_{\text{cat}} = 0.37 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.12 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 2.4 \pm 0.8 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 3.1 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.010	1.5014	0.0204	
0.015	2.8335	0.0385	
0.029	6.1675	0.0838	
0.049	8.1620	0.1109	
0.099	11.4959	0.1562	
0.148	13.6670	0.1857	
0.198	15.8308	0.2151	
0.247	17.0010	0.2310	
0.296	18.1638	0.2468	
0.395	18.3331	0.2491	
0.593	18.8336	0.2559	
0.798	17.8327	0.2423	

- pH 7.00

**Taula IV.225.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.00, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 4376 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.005	1.3467	0.0105	
0.010	2.1933	0.0171	
0.014	3.0398	0.0237	
0.015	4.0787	0.0318	
0.020	4.9765	0.0388	
0.025	6.5798	0.0513	
0.025	5.6563	0.0441	
0.030	6.3361	0.0494	
0.035	7.9137	0.0617	
0.040	9.0552	0.0706	
0.050	9.9530	0.0776	
0.051	11.2998	0.0881	
0.070	15.6221	0.1218	
0.074	14.3395	0.1118	
0.095	16.3660	0.1276	
0.100	16.5200	0.1288	
0.149	19.9060	0.1552	
0.196	24.4593	0.1907	
0.297	26.8193	0.2091	

- pH 7.51

**Taula IV.226.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 293 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 8187 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.002	0.6719	0.0028	
0.005	1.5118	0.0063	
0.010	3.3355	0.0139	
0.015	4.8232	0.0201	
0.029	7.6548	0.0319	
0.049	12.5020	0.0521	
0.099	20.4927	0.0854	
0.148	26.9956	0.1125	
0.198	31.9868	0.1333	
0.247	34.9863	0.1458	
0.296	37.5059	0.1563	
0.494	43.5049	0.1813	
0.798	46.0005	0.1917	
1.202	48.3281	0.2014	
1.498	46.1685	0.1924	

- pH 7.98

**Taula IV.227.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 216 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 10593 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.0005	0.2059	0.0009	$k_{\text{cat}} = 0.247 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.25 \pm 0.01 \text{ mM}$ $K_I = 5.0 \pm 0.7 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.99 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.001	0.3661	0.0016	
0.003	0.7780	0.0034	
0.005	1.4186	0.0062	
0.010	2.1737	0.0095	
0.019	4.3245	0.0189	
0.025	5.1711	0.0226	
0.030	6.1550	0.0269	
0.049	9.1752	0.0401	
0.099	15.0099	0.0656	
0.150	21.6682	0.0947	
0.199	24.5054	0.1071	
0.300	29.8367	0.1304	
0.596	36.1747	0.1581	
0.800	38.0051	0.1661	
0.996	39.9958	0.1748	
1.299	38.8289	0.1697	
1.699	37.8221	0.1653	

- pH 7.98 (repetició)

**Taula IV.228.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 7.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 283 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 10593 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.033	7.3343	0.0245	$k_{\text{cat}} = 0.27 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.31 \pm 0.02 \text{ mM}$ $K_I = 4.2 \pm 0.8 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.87 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.057	12.3336	0.0412	
0.098	19.8175	0.0662	
0.204	32.1511	0.1074	
0.302	39.0064	0.1303	
0.497	46.1610	0.1542	
0.701	50.8310	0.1698	
0.995	53.1660	0.1776	
1.296	52.6571	0.1759	

- pH 8.30

**Taula IV.229.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat) pH 8.30, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C, [Y152F] = 283 nM, substrat: G4G3G-MU.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 13000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 0.25 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 0.41 \pm 0.03 \text{ mM}$ $K_I = 3.3 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.61 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.049	1.0323	0.0281	
0.098	1.8847	0.0513	
0.196	2.9831	0.0812	
0.400	4.3682	0.1189	
0.595	5.0147	0.1365	
0.897	5.5181	0.1502	
1.199	5.4336	0.1479	
1.598	5.3821	0.1465	

- Recull dels paràmetres obtinguts per al mutant Y152F

**Taula IV.230.** Resum dels paràmetres cinètics ajustats en les reaccions del mutant Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU, a diferents pH. Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (11 mM citrat, 11 mM fosfat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.1 M, 30 °C.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
4.00	0.27 ± 0.03	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.9	0.5 ± 0.1
4.50	0.31 ± 0.01	0.54 ± 0.02	3.1 ± 0.4	0.57 ± 0.04
4.78	0.31 ± 0.02	0.22 ± 0.03	5 ± 1	1.4 ± 0.3
5.00	0.294 ± 0.005	0.191 ± 0.009	----	1.5 ± 0.1
5.00 (bis)	0.31 ± 0.02	0.19 ± 0.02	6 ± 2	1.6 ± 0.3
5.25	0.33 ± 0.02	0.15 ± 0.01	5 ± 1	2.2 ± 0.3
5.51	0.33 ± 0.01	0.13 ± 0.01	4.2 ± 0.7	2.5 ± 0.3
5.76	0.36 ± 0.01	0.107 ± 0.008	4.3 ± 0.8	3.4 ± 0.4
5.85	0.36 ± 0.02	0.11 ± 0.01	3.7 ± 0.9	3.3 ± 0.5
5.95	0.37 ± 0.01	0.097 ± 0.007	3.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4
6.00	0.358 ± 0.008	0.091 ± 0.005	4.4 ± 0.6	3.9 ± 0.3
6.00 (bis)	0.40 ± 0.01	0.098 ± 0.009	2.8 ± 0.6	4.1 ± 0.5
6.10	0.39 ± 0.02	0.12 ± 0.01	2.5 ± 0.5	3.3 ± 0.4
6.28	0.37 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.9 ± 0.3	3.1 ± 0.4
6.50	0.37 ± 0.02	0.12 ± 0.02	2.4 ± 0.8	3.1 ± 0.5
7.00	0.33 ± 0.06	0.15 ± 0.04	4 ± 8	2 ± 1
7.51	0.274 ± 0.008	0.21 ± 0.01	5.5 ± 0.8	1.3 ± 0.1
7.98	0.247 ± 0.008	0.25 ± 0.01	5.0 ± 0.7	0.99 ± 0.07
7.98 (bis)	0.27 ± 0.01	0.31 ± 0.02	4.2 ± 0.8	0.87 ± 0.09
8.30	0.25 ± 0.01	0.41 ± 0.03	3.3 ± 0.6	0.61 ± 0.07

#### IV.2.8. Determinació de la constant d'inhibició, $K_I$ , de l'inhibidor 3-(*O*- $\beta$ -D-cel·lobiosil)- $\beta$ -D-glucopiranososa per a l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis*

Es realitzen diverses reaccions d'hidròlisi en presència de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a diferents concentracions de substrat i d'inhibidor, per tal de determinar el tipus d'inhibició que es dona i obtenir el valor de la constant d'inhibició,  $K_I$ . Es treballa a tres pH diferents per tal d'avaluar la influència del pH en la unió de l'inhibidor als diferents enzims. S'ha determinat el valor de la constant d'inhibició per als tres enzims a pH 7.2, i per a l'enzim salvatge i el mutant Y152A a pH 5.0 i 3.0. Aquests tres pH cobreixen el marge de pH en què se situa el  $pK_a$  assignat al residu que actua com a nucleòfil en la hidròlisi del substrat, de manera que a través de possibles canvis en el valor de la  $K_I$ , també es pot avaluar l'efecte que causa l'eliminació de la tirosina 152 en el  $pK_a$  del Glu134, i el seu efecte en la unió de glicòsids.

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.2.8. Totes les cinètiques s'han realitzat en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $I = 0.21$  mM i a 30 °C (a no ser que s'indiqui una altra temperatura). El substrat escollit per a realitzar les cinètiques ha estat el G4G3G-MU, i la seva hidròlisi se segueix per mesura d'absorbància a una longitud d'ona de 365 nm ( $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} = 6441 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a pH 7.2, i a 355 nm ( $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} = 863 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a pH 5.0 i ( $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} = 800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a pH 3.0.



**- Enzim salvatge**- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 30 °C

**Taula IV.231.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [wt] = 141 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.401	0.00	1.6669	0.1842	5.4289
0.401	0.99	1.3502	0.1492	6.7024
0.401	1.98	1.1430	0.1263	7.9177
0.401	3.99	0.8498	0.0939	10.6496
0.401	5.70	0.7185	0.0794	12.5945
0.495	0.00	1.8715	0.2068	4.8356
0.495	0.99	1.5837	0.1750	5.7143
0.495	1.98	1.3448	0.1486	6.7295
0.495	3.99	1.0117	0.1118	8.9445
0.495	5.70	0.8452	0.0934	10.7066
0.682	0.00	2.3665	0.2615	3.8241
0.682	1.98	1.6669	0.1842	5.4289
0.682	3.00	1.5004	0.1658	6.0314
0.682	3.99	1.3004	0.1437	6.9589
0.682	5.70	1.1167	0.1234	8.1037
0.956	0.00	2.7665	0.3057	3.2712
0.956	0.99	2.4162	0.2670	3.7453
0.956	1.98	2.1004	0.2321	4.3085
0.956	3.99	1.6669	0.1842	5.4289
0.956	5.70	1.5746	0.1740	5.7471
0.956	5.70	1.4253	0.1575	6.3492
1.957	0.00	3.5004	0.3868	2.5853
1.957	0.99	2.7837	0.3076	3.2510
1.957	1.98	2.3665	0.2615	3.8241
2.008	0.99	3.1999	0.3536	2.8281
2.008	3.99	2.1665	0.2394	4.1771
2.008	5.70	2.1167	0.2339	4.2753

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.5 \pm 0.1$	$0.70 \pm 0.05$	$2.7 \pm 0.4$

- inhibidor: G4G3G, pH 5.0, T = 30 °C

**Taula IV.232.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [wt] = 148 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.101	0.00	1.3378	0.1046	9.5602
0.101	2.00	1.0833	0.0847	11.8064
0.101	4.00	0.9337	0.0730	13.6986
0.101	6.00	0.7994	0.0625	16.0000
0.141	0.00	1.7726	0.1386	7.2150
0.141	2.00	1.4171	0.1108	9.0253
0.141	4.00	1.1664	0.0912	10.9649
0.141	6.00	1.0782	0.0843	11.8624
0.141	6.00	1.3161	0.1029	9.7182
0.248	0.00	2.5835	0.2020	4.9505
0.248	2.00	2.1666	0.1694	5.9032
0.248	4.00	1.8660	0.1459	6.8540
0.248	6.00	1.6166	0.1264	7.9114
0.995	0.00	6.1659	0.4821	2.0743
0.995	2.00	4.9995	0.3909	2.5582
0.995	4.00	5.3064	0.4149	2.4102
0.995	6.00	4.4994	0.3518	2.8425

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.64 \pm 0.06$	$0.53 \pm 0.07$	$7.4 \pm 0.6$

Mètodes i materials: Biologia molecular

- inhibidor: G4G3G, pH 3.0, T = 30 °C

**Taula IV.233.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 3.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [wt] = 510 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 800 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.660	0	0.4814	0.0118	84.7458
0.660	10	0.5263	0.0129	77.5194
0.660	20	0.5753	0.0141	70.9220
0.660	30	0.6528	0.0160	62.5000
0.925	0	0.7099	0.0174	57.4713
0.925	10	0.7670	0.0188	53.1915
0.925	20	0.8813	0.0216	46.2963
0.925	30	0.9017	0.0221	45.2489
1.850	0	1.2485	0.0306	32.6797
1.850	10	1.4566	0.0357	28.0112
1.850	20	1.5178	0.0372	26.8817
1.850	24.25	2.0686	0.0507	19.7239

Model d'activació no essencial:

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$\beta$	$K_M / \text{mM}$	$K_A / \text{mM}$
$0.2 \pm 0.1$	$0.9 \pm 1$	$11 \pm 1$	$70 \pm 30$

Model d'activació no essencial amb inhibició competitiva:

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$\beta$	$K_M / \text{mM}$	$K_A / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.2 \pm 0.2$	$0.7 \pm 2$	$11 \pm 1$	$34 \pm 100$	$200 \pm 400$

- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 20 °C

**Taula IV.234.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 20 °C, [wt] = 470 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.3969	0.000	2.8718	0.0948	10.5485
0.3969	1.016	2.0871	0.0689	14.5138
0.3969	2.032	1.6812	0.0555	18.0180
0.3969	3.047	1.4056	0.0464	21.5517
0.6616	0.000	3.6502	0.1205	8.2988
0.6616	1.016	2.8656	0.0946	10.5708
0.6616	2.032	2.3022	0.0760	13.1579
0.6616	3.047	1.9872	0.0656	15.2439
1.7680	0.000	4.8770	0.1610	6.2112
1.7680	1.016	4.0228	0.1328	7.5301
1.7680	2.032	3.6229	0.1196	8.3612
1.7680	3.047	3.3109	0.1093	9.1491
<hr/> <hr/>				
$K_I / \text{mM}$				
$1.4 \pm 0.1$				

- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 45 °C

**Taula IV.235.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 45 °C, [wt] = 75.43 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5440 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.800	0.000	2.7204	0.6630	1.5084
0.800	1.999	2.2647	0.5519	1.8119
0.800	3.999	1.9908	0.4852	2.0612
0.800	5.507	1.8443	0.4495	2.2249
0.996	0.000	3.0838	0.7515	1.3306
0.996	1.999	2.6537	0.6467	1.5463
0.996	3.999	2.3816	0.5804	1.7230
0.996	5.507	2.1486	0.5236	1.9098
1.334	0.000	3.7155	0.9055	1.1044
1.334	1.999	3.1297	0.7627	1.3111
1.334	3.999	2.8512	0.6948	1.4392
1.334	5.507	2.5627	0.6245	1.6012
1.992	0.000	4.5032	1.0974	0.9112
1.992	1.999	3.9388	0.9599	1.0418
1.992	3.999	3.5848	0.8736	1.1447
1.992	5.507	3.0817	0.7510	1.3315
<hr/> <hr/>				
$K_I / \text{mM}$				
$6.5 \pm 0.9$				

- inhibidor: G4G4G3G, pH 3.0, T = 30 °C

**Taula IV.236.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 3.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [wt] = 267 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G4G3G.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}(355 \text{ nm}) = 800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G4G3G-MU] / mM	[G4G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^6 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.553	0	1.2180	0.0057	175.4386
0.553	0	1.2180	0.0057	175.4386
0.553	0	1.0898	0.0051	196.0784
0.553	25	1.0684	0.0050	200.0000
0.553	50	1.3034	0.0061	163.9344
0.553	130	1.7522	0.0082	121.9512
0.822	0	1.5599	0.0073	136.9863
0.822	75	2.7565	0.0129	77.5194
0.822	150	3.4402	0.0161	62.1118
1.661	0	3.0770	0.0144	69.4444
1.661	25	3.0984	0.0145	68.9655
1.661	50	3.2907	0.0154	64.9351
1.661	150	13.6580	0.0686	14.5773

**- Mutant Y152A**

*- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 30°C*

**Taula IV.237.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [Y152A] = 148 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.246	0.00	1.1646	0.0122	81.9672
0.246	0.10	0.7255	0.0076	131.5789
0.246	0.20	0.5155	0.0054	185.1852
0.246	0.30	0.4009	0.0042	238.0952
0.246	0.60	0.2577	0.0027	370.3704
0.246	0.90	0.1814	0.0019	526.3158
0.311	0.00	1.2505	0.0131	76.3359
0.311	0.10	0.8591	0.0090	111.1111
0.311	0.20	0.6109	0.0064	156.2500
0.311	0.30	0.4868	0.0051	196.0784
0.311	0.60	0.3055	0.0032	312.5000
0.311	0.90	0.2196	0.0023	434.7826
0.505	0.00	1.7468	0.0183	54.6448
0.505	0.10	1.1646	0.0122	81.9672
0.505	0.20	0.8877	0.0093	107.5269
0.505	0.30	0.7350	0.0077	129.8701
0.505	0.60	0.4391	0.0046	217.3913
0.505	0.90	0.3341	0.0035	285.7243
0.661	0.00	2.0141	0.0211	47.3934
0.661	0.10	1.4414	0.0151	66.2252
0.661	0.20	1.0691	0.0112	89.2857
0.661	0.30	0.8877	0.0093	107.5269
0.661	0.60	0.5823	0.0061	163.9344
0.661	0.90	0.4296	0.0045	222.2222
0.972	0.00	2.4437	0.0256	39.0625
0.972	0.10	1.8996	0.0199	50.2513
0.972	0.20	1.4414	0.0151	66.2252
0.972	0.30	1.2218	0.0128	78.1250
0.972	0.60	0.8877	0.0093	107.5269
0.972	0.90	0.6396	0.0067	149.2537
1.999	0.00	3.3600	0.0352	28.4091
1.999	0.10	2.7014	0.0283	35.3357
1.999	0.20	2.2623	0.0237	42.1941
1.999	0.30	2.0046	0.0210	47.6190
1.999	0.60	1.4605	0.0153	65.3595
1.999	0.90	1.1646	0.0122	81.9672

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.042 \pm 0.004$	$0.66 \pm 0.09$	$0.125 \pm 0.009$

Mètodes i materials: Biologia molecular

*- inhibidor: G4G3G, pH 5.0, T = 30 °C*

**Taula IV.238.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 5.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [Y152A] = 650 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 863 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.250	0.00	1.3689	0.0244	40.9836
0.250	0.72	0.6508	0.0116	86.2069
0.250	1.40	0.4320	0.0077	129.8701
0.333	0.00	1.6663	0.0297	33.6700
0.333	0.72	0.8640	0.0154	64.9351
0.333	1.40	0.5498	0.0098	102.0408
0.333	2.12	0.4152	0.0074	135.1351
0.500	0.00	2.1656	0.0386	25.9067
0.500	0.72	1.3353	0.0238	42.0168
0.500	1.00	0.9986	0.0178	56.1798
0.500	1.40	0.8359	0.0149	67.1141
0.500	2.12	0.6171	0.0110	90.9091
1.000	0.00	3.6692	0.0654	15.2905
1.000	0.72	2.1656	0.0386	25.9067
1.000	1.40	1.6663	0.0297	33.6700
1.000	2.12	1.1670	0.0208	48.0769

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.21 \pm 0.06$	$1.9 \pm 0.2$	$0.57 \pm 0.04$

*- inhibidor: G4G3G, pH 3.0, T = 30 °C*

**Taula IV.239.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 3.0, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [Y152A] = 613 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 800 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.596	0.00	1.1581	0.0236	42.3729
0.596	9.96	0.9864	0.0201	49.7512
0.596	19.98	0.7557	0.0154	64.9351
0.994	0.00	1.9629	0.0400	25.0000
0.994	9.96	1.5605	0.0318	31.4465
0.994	19.98	1.2955	0.0264	37.8788
1.988	0.00	3.6460	0.0743	13.4589
1.988	9.96	2.9051	0.0592	16.8919
1.988	19.98	2.7186	0.0554	18.0505

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$2 \pm 4$	$41 \pm 2$	$37 \pm 3$

- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 20 °C

**Taula IV.240.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 20 °C, [Y152A] = 470 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.2468	0.000	1.2723	0.0042	237.9
0.2468	0.046	0.8482	0.0028	362.7
0.2468	0.133	0.5150	0.0017	584.5
0.2468	0.267	0.3332	0.0011	952.4
0.3319	0.000	1.6964	0.0056	179.9
0.3319	0.046	1.1208	0.0037	268.8
0.3319	0.133	0.6361	0.0021	469.5
0.3319	0.267	0.3938	0.0013	775.2
0.5021	0.000	2.0902	0.0069	145.1
0.5021	0.046	1.4843	0.0049	202.8
0.5021	0.133	0.9693	0.0032	311.5
0.5021	0.267	0.6058	0.0020	505.1
<hr/> <hr/>				
$K_I / \text{mM}$				
$0.06 \pm 0.01$				

- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 45 °C

**Taula IV.241.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 45 °C, [Y152A] = 632 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5440 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.569	0.000	2.0222	0.0588	17.0017
0.569	0.508	1.1372	0.0331	30.2329
0.569	1.000	0.8033	0.0234	42.7995
0.569	1.508	0.6248	0.0182	55.0269
0.664	0.000	2.2120	0.0643	15.5429
0.664	0.508	1.3153	0.0383	26.1391
0.664	1.000	0.9332	0.0271	36.8418
0.664	1.508	0.7113	0.0207	48.3352
0.797	0.000	2.5275	0.0735	13.6027
0.797	0.508	1.5363	0.0447	22.3790
0.797	1.000	1.1229	0.0327	30.6179
0.797	1.508	0.8676	0.0252	39.6275
1.005	0.000	2.9761	0.0866	11.5523
1.005	0.508	1.7432	0.0507	19.7228
1.005	1.000	1.2866	0.0374	26.7222
1.005	1.508	1.0352	0.0301	33.2117
<hr/> <hr/>				
$K_I / \text{mM}$				
$0.4 \pm 0.1$				



**- Mutant Y152F**- inhibidor: G4G3G, pH 7.2, T = 30 °C

**Taula IV.242.** Condicions de reacció: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, I = 0.21 M, 30 °C, [Y152F] = 158 nM, substrat: G4G3G-MU, inhibidor G4G3G.  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 6441 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G4G3G-MU] / mM	[G4G3G] / mM	$v_0 \cdot 10^5 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	$([E]_0/v_0) / \text{s}$
0.050	0.00	6.4114	0.0632	15.8228
0.050	1.50	4.2709	0.0421	23.7530
0.050	3.00	3.2970	0.0325	30.7692
0.050	4.50	2.7289	0.0269	37.1747
0.050	6.00	2.3130	0.0228	43.8596
0.066	0.00	7.1621	0.0706	14.1643
0.066	1.50	5.1636	0.0509	19.6464
0.066	3.00	4.0781	0.0402	24.8756
0.066	4.50	3.4694	0.0342	29.2398
0.066	6.00	2.7492	0.0271	36.9004
0.079	0.00	8.8359	0.0871	11.4811
0.079	1.50	6.0157	0.0593	16.8634
0.082	3.00	5.0013	0.0493	20.2840
0.082	4.50	4.1694	0.0411	24.3309
0.082	6.00	3.4999	0.0345	28.9855
0.095	0.00	9.4852	0.0935	10.6952
0.095	2.00	6.6447	0.0655	15.2672
0.095	4.12	4.9201	0.0485	20.6186
0.095	6.00	4.0781	0.0402	24.8756
0.137	0.00	11.6155	0.1145	8.7336
0.137	1.50	8.9982	0.0887	11.2740
0.137	3.00	7.3345	0.0723	13.8313
0.137	4.50	6.2795	0.0619	16.1551
0.137	6.00	5.4984	0.0542	18.4502
0.205	0.00	13.6647	0.1347	7.4239
0.205	1.50	11.6663	0.1150	8.6957
0.205	3.00	10.1649	0.1002	9.9800
0.205	4.50	8.8359	0.0871	11.4811
0.205	6.00	7.6693	0.0756	13.2275
0.397	0.00	15.9270	0.1570	6.3694
0.397	0.50	15.3285	0.1511	6.6181
0.397	1.00	14.8009	0.1459	6.8540
0.397	3.00	12.5184	0.1234	8.1037
0.397	4.12	11.6663	0.1150	8.6957
0.397	6.00	10.1953	0.1005	9.9502

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mM}$	$K_I / \text{mM}$
$0.28 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.01$	$2.86 \pm 0.08$

- Recull dels valors de les  $K_I$  de l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F emprant el G4G3G com a inhibidor

**Taula IV.243.** Resum dels resultats dels estudis d'inhibició amb la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* emprant com a substrat el G4G3G-MU i com a inhibidor el G4G3G. Per a cada enzim s'indica el valor de la  $K_I$  en funció de les diferents temperatures i pH emprats. Les reaccions es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , I = 0.21 M.

Enzim	Temperatura / °C	pH	$K_I$ / mM
Enzim salvatge	30	7.2	$2.7 \pm 0.4$
Enzim salvatge	30	5.0	$7.4 \pm 0.6$
Enzim salvatge	20	7.2	$1.4 \pm 0.1$
Y152A	30	7.2	$0.125 \pm 0.009$
Y152A	30	5.0	$0.57 \pm 0.04$
Y152A	30	3.0	$37 \pm 3$
Y152A	20	7.2	$0.06 \pm 0.01$
Y152F	30	7.2	$2.86 \pm 0.08$

En els estudis d'inhibició de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge a pH 3.0 i 30 °C amb el glicòsid G4G3G no s'observa inhibició sinó activació. El valor de la  $K_A$  obtingut ajustant un model d'activació no essencial a les dades és de  $70 \pm 30$  mM.

#### **IV.2.9. Determinació de l'estabilitat de l'enzim salvatge i el mutant Y152A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* a pH 3.0 i 30 °C**

Si bé als pH de treball als que s'ha realitzat el perfil de pH s'ha comprovat l'estabilitat de l'enzim durant el temps que es perllonguen les cinètiques; es desconeix a priori, l'estabilitat de l'enzim salvatge i del mutant Y152A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a pH 3.0. Donada la baixa activitat de l'enzim i també el baix valor de l'absortivitat de la 4-metilumbel·liferona a aquest pH, es decideix realitzar un assaig enzimàtic en discontinu a una única concentració de substrat. Per a la determinació de l'estabilitat dels dos enzims a pH 3.0 es prepara una solució dels mateixos en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 3.0 i es conserva a 30 °C durant el temps dessitjat, tenint present que el temps ha de cobrir la durada de les cinètiques d'inhibició que es pretenen estudiar. A diferents temps es prenen alíquotes de la solució d'enzim i se'n determina l'activitat enfront del substrat G4G3G-MU a pH 7.1, en què tant l'activitat enzimàtica, com l'absortivitat de la 4-metilumbel·liferona permeten fer una estimació de la mateixa en una cinètica de 10 minuts. Donat que les alíquotes d'enzim de les que es determina l'activitat són de baix volum (20  $\mu\text{L}$ ), treballant amb un estoc de tampó citrat/fosfat 2x de pH 7.2, n'hi ha prou perquè el pH final de l'assaig d'activitat sigui de 7.1.

Mètodes i materials: Biologia molecular

- 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa salvatge

**Taula IV.244.** Condicions d'incubació: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 3.0, I = 0.21 M, [wt] = 6.667  $\mu$ M, 30 °C. Condicions de determinació d'activitat: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.1, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, [wt] = 133.5 nM, 30 °C, [G4G3G-MU] = 0.46 mM,  $\lambda$  = 365 nm.

Temps incubació / min	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$
0	2.28
20	2.28
35	2.28
50	2.25

- mutant Y152A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa

**Taula IV.245.** Condicions d'incubació: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 3.0, I = 0.21 M, [Y152A] = 15.335  $\mu$ M, 30 °C. Condicions de determinació d'activitat: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat pH 7.1, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, [Y152A] = 306.7 nM, 30 °C, [G4G3G-MU] = 0.46 mM,  $\lambda$  = 365 nm.

Temps incubació / min	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$
0	2.25
30	2.21
45	2.27
60	2.21

### IV.3. Resultats d'hidròlisi del $\beta$ -glucà d'ordi catalitzada per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en estat estacionari

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.3 que es basa en el mètode de Somogyi-Nelson per tal de determinar l'increment d'extrems reductors generats per l'acció enzimàtica. Totes les cinètiques s'han realitzat en tampó 30 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, a 30 °C. A les taules es presenten per a cada concentració de  $\beta$ -glucà, l'absorbància de la mostra a diferents temps de reacció, la dilució que s'ha hagut de fer per tal de determinar l'absorbància (D), la relació absorbància/dilució, i la relació  $v_0/[E]_0$ ; finalment a la darrera filera de la taula s'indiquen el valors dels paràmetres cinètics ajustats.

*- 1,3-1,4-β-glucanasa salvatge*

**Taula IV.246.** Condicions de la reacció enzimàtica: tampó 30 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 82.8 pM, substrat: β-glucà d'ordi. Determinació de l'avenç de la reacció emprant el mètode d'anàlisi d'extrems reductors de Somogyi-Nelson.

[β-glucà] / mg·mL <sup>-1</sup>	Temps / min	Absorbància / uAbs	D	(Absorbància/D) / uAbs	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
0.19	15	0.1119	1.0000	0.1119	54.3
	30	0.1280	1.0000	0.1280	
	45	0.1782	1.0000	0.1782	
	60	0.1724	0.7143	0.2414	
0.41	15	0.0976	1.0000	0.0976	368.9
	30	0.2658	0.5000	0.5316	
	45	0.1968	0.2857	0.6888	
	60	0.2226	0.1667	1.3356	
0.58	15	0.1066	1.0000	0.1066	519.1
	30	0.3083	0.7143	0.4316	
	45	0.2490	0.2308	1.0790	
	60	0.2845	0.1667	1.7070	
0.80	15	0.1170	1.0000	0.1170	592.0
	30	0.2977	0.7143	0.4168	
	45	0.2091	0.2308	0.9061	
	60	0.2695	0.1330	2.0263	
1.02	15	0.1012	1.0000	0.1012	610.6
	30	0.4679	0.7143	0.6550	
	45	0.1717	0.2308	0.7440	
	60	0.1809	0.0900	2.0100	
2.01	15	0.1339	1.0000	0.1339	717.8
	30	0.2178	0.2857	0.7623	
	45	0.1973	0.1667	1.1838	
	60	0.2277	0.0909	2.5047	
2.99	15	0.1208	1.0000	0.1208	752.1
	30	0.2208	0.2857	0.7728	
	45	0.2223	0.1667	1.3338	
	60	0.2331	0.0909	2.5641	
4.00	15	0.1227	1.0000	0.1227	770.7
	30	0.2587	0.2857	0.9055	
	45	0.2436	0.1667	1.4616	
	60	0.2293	0.0909	2.5223	
4.99	15	0.1764	1.0000	0.1764	750.7
	30	0.2409	0.2308	1.0439	
	60	0.2324	0.0909	2.5564	
	15	0.1749	1.0000	0.1749	
5.63	30	0.2131	0.2308	0.9234	768.6
	45	0.1637	0.1304	1.2658	
	60	0.2371	0.0909	2.6081	
	15	0.1749	1.0000	0.1749	

$k_{cat} / s^{-1}$	$K_M / mg \cdot mL^{-1}$
$880 \pm 50$	$0.5 \pm 0.1$

- mutant Y152F

**Taula IV.247.** Condicions de la reacció enzimàtica: tampó 30 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152F] = 3.2 nM, substrat:  $\beta$ -glucà d'ordi. Determinació de l'avenç de la reacció emprant el mètode d'anàlisi d'extrems reductors de Somogyi-Nelson.

$[\beta\text{-glucà}] / \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Temps / min	Absorbància / uAbs	D	(Absorbància/D) / uAbs	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
0.08	15	0.1632	0.3333	0.4896	55.9
	30	0.1131	0.3333	0.3393	
	45	0.1044	0.3333	0.3132	
	60	0.2690	0.3333	0.8071	
0.16	15	0.3159	0.3333	0.9477	86.8
	30	0.1843	0.1667	1.1058	
	45	0.1688	0.1667	1.0128	
	60	0.1990	0.0909	2.1892	
0.24	15	0.1913	0.3333	0.5739	126.6
	45	0.3056	0.1667	1.8336	
	60	0.1920	0.0909	2.1120	
	15	0.1890	0.3333	0.5670	
0.32	30	0.2560	0.1667	1.5360	210.8
	45	0.1915	0.0909	2.1067	
	60	0.3015	0.0909	3.3168	
	15	0.1894	0.3333	0.5682	
0.40	30	0.2811	0.1667	1.6867	230.5
	45	0.2919	0.0909	3.2112	
	60	0.2141	0.0654	3.2727	
	15	0.1974	0.3333	0.5923	
0.50	30	0.3796	0.1667	2.2776	251.0
	45	0.2138	0.0741	2.8865	
	60	0.1853	0.0476	3.8912	
	15	0.3060	0.3333	0.9180	
0.60	30	0.1972	0.0909	2.1694	279.6
	45	0.2304	0.0741	3.1093	
	60	0.2144	0.0476	4.5042	
	15	0.2329	0.2308	1.0092	
0.90	30	0.2534	0.0909	2.7877	323.0
	45	0.2691	0.0476	3.6329	
	60	0.2490	0.0291	5.2311	
	15	0.2476	0.2308	1.0728	
1.20	30	0.2798	0.0909	3.0781	343.8
	45	0.2003	0.0476	4.2080	
	60	0.1682	0.0291	5.7801	
	15	0.3551	0.2308	1.5386	
2.00	30	0.2867	0.0909	3.1540	380.0
	45	0.1871	0.0476	3.9307	
	60	0.1837	0.0291	6.3127	
	15	0.2387	0.1667	1.4322	
3.00	30	0.2434	0.0741	3.2848	388.6
	45	0.2003	0.0476	4.2080	
	60	0.1904	0.0291	6.5430	

$[\beta\text{-glucà}] / \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Temps / min	Absorbància / uAbs	D	(Absorbància/D) / uAbs	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
4.00	15	0.2324	0.1667	1.3944	428.4
	30	0.1825	0.0741	2.4629	
	45	0.2417	0.0476	5.0777	
	60	0.1928	0.0291	6.6254	
4.99	15	0.1765	0.1667	1.0590	422.0
	30	0.1932	0.0741	2.6073	
	45	0.2169	0.0476	4.5567	
	60	0.1831	0.0291	6.2921	
5.62	15	0.1985	0.1667	1.1910	422.0
	30	0.2346	0.0741	3.1660	
	45	0.2137	0.0476	4.4895	
	60	0.1947	0.0291	6.6970	

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
$470 \pm 10$	$0.47 \pm 0.04$

- mutant Y152A

**Taula IV.248.** Condicions de la reacció enzimàtica: tampó 30 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [Y152A] = 25.11 nM, substrat: β-glucà d'ordi. Determinació de l'avenç de la reacció emprant el mètode d'anàlisi d'extrems reductors de Somogyi-Nelson.

[β-glucà] / mg·mL <sup>-1</sup>	Temps / min	Absorbància / uAbs	D	(Absorbància/D) / uAbs	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
0.20	15	0.1053	0.3333	0.3159	18.4
	30	0.2380	0.2000	1.1900	
	45	0.1719	0.1667	1.0314	
	60	0.3027	0.1304	2.3207	
0.30	15	0.1866	0.3333	0.5598	23.6
	30	0.3482	0.1667	2.0892	
	45	0.3455	0.1667	2.0731	
0.40	30	0.2157	0.1525	1.4141	28.8
	45	0.2549	0.1304	1.9542	
	60	0.2948	0.0909	3.2428	
0.60	15	0.1575	0.3333	0.4725	37.1
	30	0.2916	0.1525	1.9121	
	45	0.2772	0.0909	3.0495	
	60	0.1917	0.0476	4.0265	
1.20	15	0.2010	0.2857	0.7035	46.8
	30	0.2707	0.1304	2.0759	
	45	0.3344	0.0909	3.6788	
2.00	15	0.3301	0.2857	1.1554	50.5
	30	0.2972	0.1071	2.7739	
	45	0.1620	0.0476	3.4019	
	60	0.1835	0.0291	6.3058	
3.00	15	0.2609	0.2307	1.1309	51.3
	30	0.2432	0.0909	2.6755	
	45	0.1671	0.0476	3.5105	
4.00	60	0.1832	0.0291	6.2955	52.3
	15	0.1825	0.2000	0.9125	
	30	0.1693	0.0654	2.5887	
4.99	45	0.1618	0.0476	3.3992	54.7
	60	0.1800	0.0291	6.1856	
	15	0.3697	0.2000	1.8485	
5.63	30	0.1405	0.0654	2.1483	53.3
	45	0.1608	0.0476	3.3782	
	15	0.1789	0.2000	0.8945	
5.63	30	0.1424	0.0654	2.1774	53.3
	45	0.2013	0.0476	4.2290	
	60	0.1527	0.0291	5.2474	

$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
59 ± 1	0.39 ± 0.03

- Recull dels resultats obtinguts amb l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F

**Taula IV.249.** Resum dels paràmetres cinètics obtinguts en la hidròlisi del  $\beta$ -glucà d'ordi amb l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de la reacció enzimàtica: tampó 30 mM fosfat pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, substrat:  $\beta$ -glucà d'ordi. Determinació de l'avenç de la reacció emprant el mètode d'anàlisi d'extrems reductors de Somogyi-Nelson.

Enzim	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_M / mg \cdot mL^{-1}$	$(k_{cat}/K_M) / s^{-1} \cdot mg^{-1} \cdot mL$
Enzim salvatge	$880 \pm 50$	$0.5 \pm 0.1$	$1760 \pm 451$
Y152A	$59 \pm 1$	$0.39 \pm 0.03$	$151 \pm 14$
Y152F	$470 \pm 10$	$0.47 \pm 0.04$	$1000 \pm 106$

#### IV.4. Resultats de la reacció d'hidratació de glicals per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

##### IV.4.1. Estudi de mètodes per a la determinació quantitativa del 2-desoxiglicòsid 69

###### IV.4.1.1. Assaig d'extrems reductors de Somogyi-Nelson

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.4.1.1.

**Taula IV.250.** Valors d'absorbància a 720 nm corresponents a dues rectes patró de glucosa en realitzar un assaig d'extrems reductors pel mètode de Somogyi-Nelson. La lectura d'absorbància es realitza prenent com a zero el valor del blanc (tampó fosfat 30 mM pH 7.0) sotmés al mateix procés que la resta de mostres. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

[glucosa] / mM	Abs 720 nm / uAbs	[glucosa] / mM	Abs 720 nm / uAbs
0.0	0.000	0	0.000
0.2	0.179	0.2	0.184
0.4	0.463	0.4	0.446
0.6	0.695	0.6	0.640
0.8	0.877	0.8	0.857
1.0	1.082	1.0	1.052



**Taula IV.251.** Valors d'absorbància a 720 nm (en uAbs) corresponents a una recta patró de 2-desoxiglucosa en realitzar un assaig d'extremes reductors pel mètode de Somogyi-Nelson. L'assaig es realitza per quadruplicat sobre la mateixa recta patró. La lectura d'absorbància es realitza prenent com a zero el valor del blanc (tampó fosfat 30 mM pH 7.0) sotmés al mateix procés que la resta de mostres. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 720 nm	Abs 720 nm	Abs 720 nm	Abs 720 nm
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.1	0.019	-0.005	-0.014	-0.007
0.2	0.014	0.008	0.010	0.035
0.3	0.084	0.054	-0.008	0.054
0.4	0.125	0.074	0.024	0.070
0.5	0.085	0.119	0.103	0.114
0.6	0.155	0.038	0.126	0.111
0.7	0.322	0.093	0.122	0.387
0.8	0.446	0.399	0.125	0.531
0.9	0.549	0.510	0.383	0.575
1.0	1.023	0.732	0.650	0.490

#### IV.4.1.2. *Assaig d'extremes reductors emprant àcid 3,5-dinitrosalicílic (DNS)*

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.4.1.2.

**Taules IV.252 i IV.253.** Valors d'absorbància a 530 nm corresponents a dues rectes patró de glucosa en realitzar dos assaigs d'extremes reductors emprant DNS, per a cadascuna d'elles. La lectura d'absorbància es realitza prenent com a zero el valor del blanc (tampó fosfat 30 mM pH 7.0) sotmés al mateix procés que la resta de mostres. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

[glucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.00	0.000	0.000
0.05	-0.002	0.007
0.10	0.008	0.011
0.15	0.010	0.010
0.20	0.011	-0.021
0.25	0.039	0.039
0.30	0.049	0.082
0.40	0.137	0.140
0.50	0.220	0.212
0.60	0.260	0.268
0.70	0.360	0.355
0.80	0.348	0.419
0.90	0.419	0.452
1.00	0.583	0.532

[glucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.00	0.000	0.000
0.05	0.004	0.005
0.10	-0.004	-0.003
0.15	0.000	-0.008
0.20	0.054	0.041
0.25	0.083	0.078
0.30	0.121	0.119
0.40	0.216	0.205
0.50	0.295	0.272
0.60	0.367	0.352
0.70	0.449	0.454
0.80	0.536	0.531
0.90	0.579	0.626
1.00	0.711	0.707

**Taules IV.254, IV.255 i IV.256.** Valors d'absorbància a 530 nm corresponents a tres rectes patró de 2-desoxiglucosa en realitzar dos assaigs d'extremes reductors emprant DNS, per a cadascuna d'elles. La lectura d'absorbància es realitza prenent com a zero el valor del blanc (tampó fosfat 30 mM pH 7.0) sotmés al mateix procés que la resta de mostres. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.00	0.000	0.000
0.05	0.003	0.001
0.10	0.024	0.030
0.15	0.054	0.048
0.20	0.097	0.092
0.25	0.119	0.146
0.30	0.145	0.185
0.40	0.281	0.285
0.50	0.395	0.390
0.60	0.504	0.488
0.70	0.559	0.608
0.80	0.711	0.723
0.90	0.845	0.840
1.00	0.950	0.925

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.00	0.000	0.000
0.05	0.012	-0.016
0.10	0.029	0.037
0.15	0.063	0.045
0.20	0.084	0.073
0.25	0.154	0.183
0.30	0.182	0.187
0.40	0.265	0.290
0.50	0.389	0.400
0.60	0.505	0.516
0.70	0.656	0.677
0.80	0.743	0.774
0.90	0.796	0.862
1.00	0.806	0.994

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.00	0.000	0.000
0.05	0.035	0.035
0.10	0.013	0.031
0.15	0.039	0.029
0.20	0.039	0.060
0.25	0.108	0.084
0.30	0.143	0.144
0.40	0.241	0.264
0.50	0.356	0.362
0.60	0.450	0.469
0.70	0.599	0.597
0.80	0.692	0.709
0.90	0.803	0.795
1.00	0.913	0.948

**Taula IV.257.** Valors d'absorbància a 530 nm corresponents a un blanc de 2-desoxiglucosa (0 mM) i a una concentració de 2-desoxiglucosa de 0.5 mM, en realitzar sis assaigs d'extrems reductors emprant DNS, en cada cas, per duplicat. La lectura d'absorbància es realitza prenent com a zero el valor del blanc (tampó fosfat 30 mM pH 7.0) sotmés al mateix procés que la resta de mostres. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront de tampó fosfat 30 mM pH 7.0.

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 530 nm / uAbs	Abs 530 nm / uAbs
0.0	0.007	-0.005
0.0	0.018	-0.005
0.0	-0.004	0.003
0.0	-0.002	-0.004
0.0	0.001	-0.002
0.0	-0.015	0.005
0.5	0.327	0.291
0.5	0.345	0.261
0.5	0.290	0.341
0.5	0.300	0.335
0.5	0.360	0.352
0.5	0.376	0.338

#### IV.4.1.3. *Assaig d'extrems reductors emprant ferricianur potàssic en medi bàsic*

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.4.1.3.

**Taula IV.258.** Valors d'absorbància a 420 nm corresponents a una recta patró de glucosa en realitzar dos assaigs d'extrems reductors emprant una solució bàsica de  $K_3Fe(CN)_6$  com a reactiu oxidant. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront d'aigua desionitzada.

[glucosa] / mM	Abs 420 nm / uAbs	Abs 420 nm / uAbs
0.00	0.6378	0.6964
0.05	0.6831	0.6959
0.10	0.6641	0.6714
0.15	0.6405	0.6614
0.20	0.6452	0.6283
0.25	0.6212	0.6425
0.30	0.6043	0.6005
0.40	0.5702	0.5835
0.50	0.5541	0.5553
0.60	0.4805	0.4878
0.80	0.4941	0.4877
1.00	0.4564	0.4382

**Taula IV.259.** Valors d'absorbància a 420 nm corresponents a una recta patró de 2-desoxiglucosa en realitzar dos assaigs d'extrems reductors emprant una solució bàsica de  $K_3Fe(CN)_6$  com a reactiu oxidant. Totes les determinacions d'absorbància es realitzen enfront d'aigua desionitzada.

[2-desoxiglucosa] / mM	Abs 420 nm / uAbs	Abs 420 nm / uAbs
0.00	0.7209	0.7538
0.05	0.7031	0.6897
0.10	0.6904	0.6747
0.15	0.6849	0.6681
0.20	0.6826	0.6716
0.25	0.6858	0.6733
0.30	0.6796	0.5211
0.40	0.6638	0.6705
0.50	0.6567	0.6725
0.60	0.6574	0.6582
0.80	0.6331	0.5709
1.00	0.6395	0.3962

#### IV.4.1.4. *HPLC*

El procediment emprat és el descrit a l'apartat III.4.2.

- *Recta patró de glical per HPLC*

Es prepara una solució 75 mM del glical G4G3G' (**56**) en aigua Milli-Q, i a partir d'aquesta, es realitza un banc de dilucions que cobreixen el marge de concentracions entre 0 i 75 mM en

aigua Milli-Q. Es realitzen injeccions de mostra de 20 µL en una columna kromasil-NH<sub>2</sub>, emprant com eluent la barreja (70:30) d'acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 a un flux de 1 mL·min<sup>-1</sup>, i la detecció es realitza amb un detector d'índex de refracció. La temperatura de la columna es regula a 32 °C i la del detector, a 35 °C.

**Taula IV.260.** Valors d'àrea corresponent al glicol G4G3G' (**56**) obtinguts en analitzar sis vegades diferents una mateixa recta patró de glicol per HPLC, amb detecció per índex de refracció. Condicions de l'assaig: columna kromasil-NH<sub>2</sub>, eluent acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 (70:30), flux 1 mL·min<sup>-1</sup>. La temperatura de la columna es regula a 32 °C i la del detector a 35 °C.

[G4G3G'] / mM	Àrea glicol	Àrea glicol	Àrea glicol	Àrea glicol	Àrea glicol	Àrea glicol
75.00	6522240	6533900	6537160	6517930	6545530	6539200
50.00	4338520	4337950	4341470	4338400	4343580	4340830
37.50	3271660	3276100	3276410	3266200	3267960	3271420
18.75	1633390	1630950	1630230	1632370	1633700	1647480
9.38	822296	820469	820263	820285	823782	825251
4.69	412458	413768	412489	414463	415317	413870
2.34	211597	210017	209242	211421	211599	213312
1.17	108588	106253	107319	109233	108431	109373
0.59	57423	55905	56672	58953	57871	57471
0.29	30823	29451	29527	33699	31691	30877
0.15	19486	19911	18867	21302	20707	19387

**Taula IV.261.** Valors de les mitjanes de les àrees corresponents al pic del glicol G4G3G' (**56**) derivades dels resultats presentats a la taula IV.260 i factor de resposta corresponent. Condicions de l'assaig: columna kromasil-NH<sub>2</sub>, eluent acetonitril/tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat pH 5.0 (70:30), flux 1 mL·min<sup>-1</sup>. La temperatura de la columna es regula a 32 °C i la del detector a 35 °C.

[G4G3G'] / mM	Mitjana de les àrees del G4G3G'	Factor de resposta
75.00	6532660	87102
50.00	4340125	86803
37.50	3271625	87243
18.75	1634687	87183
9.38	822058	87686
4.69	413728	88252
2.34	211198	90102
1.17	108200	92478
0.59	57382	97922
0.29	31011	105841
0.15	19943	136133

La recta patró de glicol obtinguda és:

$$\text{Àrea} = 86937 \cdot [\text{G4G3G}'] + 6185$$

- Comprovació que el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid no és un inhibidor ni activador de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis*

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.4.2.3.

**Taula IV.262.** Resultats de les cinètiques de la reacció d'hidròlisi del G4G3G-MU per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en presència del metil  $\alpha$ -D-glucopiranosid (G- $\alpha$ OMe). A la taula s'indica a les diferents concentracions dels dos glicòsids, la velocitat inicial d'hidròlisi del substrat, i els paràmetres  $1/[G4G3G-MU]$  i  $1/v_0$  que es fan servir per tal de representar el gràfic de Lineweaver-Burk. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 °C, [wt] = 1.37  $\mu$ M, substrat: G4G3G-MU, inhibidor: G- $\alpha$ OMe,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (365 nm) = 5076 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G- $\alpha$ OMe] / mM	[G4G3G-MU] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(1/[S]) / \text{mM}^{-1}$	$(1/v_0) / \text{s} \cdot \text{uAbs}^{-1}$
0	0.495	5.2333	2.020	1910.8
0	0.679	6.7833	1.473	1474.2
0	1.075	9.5333	0.930	1049.0
0	2.505	16.5833	0.399	603.0
25	0.495	5.0833	2.020	1967.2
25	0.679	6.5667	1.473	1522.8
25	1.075	9.0500	0.930	1105.0
25	2.505	15.2667	0.399	655.0
50	0.495	4.9833	2.020	2006.7
50	0.679	6.3333	1.473	1578.9
50	1.075	8.9000	0.930	1123.6
50	2.505	14.6500	0.399	682.6
75	0.495	4.9333	2.020	2027.0
75	0.679	6.1667	1.473	1621.6
75	1.075	8.9167	0.930	1121.5
75	2.505	15.0667	0.399	663.7

$K_I > 1540$  mM

#### IV.4.2. Resultats de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* amb seguiment per HPLC

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.4.3.

##### IV.4.2.1. Determinació de la linealitat de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Es realitzen sis cinètiques diferents a una única concentració de glical G4G3G' de 25 mM (12 mM G- $\alpha$ OMe) en tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C i diferents concentracions de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A diferents intervals de temps entre els 10 minuts i les dues hores de reacció, i entre les 2 hores i les 8 hores en el cas de la menor concentració enzimàtica, es determina l'àrea del pic de glical present a la mostra, es normalitza el seu valor i es determina la velocitat de reacció en  $\mu$ M·s<sup>-1</sup>

interpolant la concentració de glical a la recta patró de G4G3G', i fent la corresponent correcció de les unitats de temps.

**Taula IV.263.** Resultats de les cinètiques de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a diferents concentracions d'enzim. A la taula s'indica a les diferents concentracions d'enzim i a diferents temps de reacció, les àrees dels pics corresponents al glical i al G- $\alpha$ OMe, així com l'àrea corresponent al glical després de la seva normalització. Finalment, s'indica a cada concentració d'enzim el valor de la velocitat inicial d'hidratació del glical G4G3G', interpolant la concentració de glical a la recta patró de G4G3G', i fent la corresponent correcció de les unitats de temps. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [G4G3G'] = 25 mM, [G- $\alpha$ OMe] = 12 mM. Àrea de glical normalitzada = àrea de glical / (mitjana àrea G- $\alpha$ OMe / àrea G- $\alpha$ OMe).

[wt] / $\mu$ M	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	$v_0$ / $\mu$ M·s <sup>-1</sup>
0.38	120	2286510	316904	2123676	0.2478
	198	2081420	300846	2036377	
	245	1974230	296203	1961784	
	291	1891740	294977	1887627	
	385	1772470	294210	1773227	
	432	1715690	292735	1725071	
	447	1700280	293553	1704813	
	Mitjana de les àrees de G- $\alpha$ OMe : 294336				
0.76	80	2159950	309660	2072788	0.4619
	127	1963480	297188	1963321	
	142	1906560	299407	1892277	
	158	1863670	290100	1909051	
	173	1826390	292456	1855791	
	205	1748320	294173	1766096	
	Mitjana de les àrees de G- $\alpha$ OMe : 297164				
1.14	80	1914070	296732	1916677	0.6826
	93	1859820	299306	1846337	
	105	1811130	293580	1833068	
	118	1763720	299979	1747006	
	130	1708790	294427	1724513	
	Mitjana de les àrees de G- $\alpha$ OMe : 297136				
1.53	20	2196660	311114	2128611	0.9080
	67	1908870	301407	1909308	
	113	1672000	303823	1659085	
	129	1579250	298294	1596097	
	Mitjana de les àrees de G- $\alpha$ OMe : 301476				
1.91	15	2098650	294244	2126398	1.1205
	46	1929080	300008	1917033	
	77	1748180	301391	1729291	
	93	1663180	296700	1671221	
	Mitjana de les àrees de G- $\alpha$ OMe : 298134				
$v_0 = 0.585 \cdot [E] + 0.013$					

Es comprova que la reacció d'hidratació del glical G4G3G' segueix una dependència lineal de la concentració d'enzim.

IV.4.2.2. Determinació de la velocitat de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' en presència de l'enzim salvatge i els mutants E134A, E138A i D136A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de B. licheniformis

Seguint el procediment descrit a l'apartat III.4.3 es realitzen quatre cinètiques diferents a una única concentració de glical G4G3G' de 28 mM (13.4 mM G-αOMe) en tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C i una única concentració dels diferents enzims: [wt] = 1.53 μM, [E134A] = 17.7 μM, [E138A] = 15.39 μM, [D136A] = 13.9 μM. La concentració de la solució estoc d'enzim salvatge es determina per mesura de la seva activitat enzimàtica enfront del substrat G4G3G-MU (apartat I.8.6), mentre que la concentració dels estocs dels diferents mutants es determina per mesura de la seva absorbància a 280 nm (apartat I.8.3). A diferents intervals de temps es determina l'àrea del pic de glical present a la mostra, es normalitza el seu valor i es determina la velocitat de reacció en μM·s<sup>-1</sup> interpolant la concentració de glical a la recta patró de G4G3G', i fent la corresponent correcció de les unitats de temps.

**Taula IV.264.** Resultats de les cinètiques de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A la taula s'indica a diferents temps de reacció les àrees dels pics corresponents al glical, el factor de normalització i l'àrea corresponent al glical després de la seva normalització. Finalment, s'indica el valor de la velocitat inicial d'hidratació del glical G4G3G', interpolant la concentració de glical a la recta patró de G4G3G', i fent la corresponent correcció de les unitats de temps. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 1.53 μM, [G4G3G'] = 28 mM, [G-αOMe] = 13.4 mM. Factor de normalització = mitjana àrea G-αOMe/ àrea G-αOMe.

[wt] / μM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Factor de normalització	Àrea G4G3G' normalitzada	v <sub>0</sub> / μM·s <sup>-1</sup>
1.53	30	2374230	1.2367	2340823	0.81 ± 0.06
	61	2243910	0.9957	2233630	
	92	2118510	1.0031	2122951	
	108	2046200	1.0319	2015263	
v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> = 0.53 ± 0.04 s <sup>-1</sup>					



**Taula IV.265.** Resultats de les cinètiques de la reacció d'hidratació del glicol G4G3G' per part del mutant E138A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A la taula s'indica a diferents temps de reacció les àrees dels pics corresponents al glicol, el factor de normalització i l'àrea corresponent al glicol després de la seva normalització. Finalment, s'indica el valor de la velocitat inicial d'hidratació del glicol G4G3G', interpolant la concentració de glicol a la recta patró de G4G3G', i fent la corresponent correcció de les unitats de temps. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [E138A] = 15.39  $\mu$ M, [G4G3G'] = 28 mM, [G- $\alpha$ OMe] = 13.4 mM. Factor de normalització = mitjana àrea G- $\alpha$ OMe/ àrea G- $\alpha$ OMe.

[E138A] / $\mu$ M	Temps / min	Àrea G4G3G'	Factor de normalització	Àrea G4G3G' normalitzada	$v_0$ / $\mu$ M·s <sup>-1</sup>
15.39	330	2455210	1.0298	2384112	0.027 $\pm$ 0.001
	1320	2279270	1.0204	2233686	
	1530	2198500	0.9922	2215888	
	1710	2167040	0.9854	2199137	
	1974	2125090	0.9893	2148010	
$v_0/[E]_0 = 1.74 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$					

L'activitat del mutant E138A és un 0.32% respecte de l'activitat de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa. A les reaccions en presència dels mutants E134A i D136A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa no s'observa formació del 2-desoxiglicòsid **69** ni tan sols després de 50 hores de reacció.

#### IV.4.2.3. Determinació de la velocitat d'hidratació espontània del glicol G4G3G' a diferents pH

Seguint el procediment descrit a l'apartat III.4.3 es realitza una cinètica a cadascun dels pH als que s'ha seguit la cinètica d'hidratació del glicol G4G3G' en presència de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les cinètiques es realitzen a una única concentració del glicol G4G3G' de 12.3 mM (6 mM G- $\alpha$ OMe), en tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, al pH dessitjat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C i en absència d'enzim. Es realitza una única determinació del grau de conversió del glicol passades 24 hores de reacció. Donada la baixa velocitat de la reacció es decideix avaluar el grau de conversió a partir del pic de 2-desoxiglicòsid **69** format. Es comprova que en cap cas el grau de conversió supera el 2%, de manera que es considera menyspreable enfront de la hidratació en presència d'enzim, en què la reacció més lenta mesurada és d'aproximadament un 10% de conversió a les 4 hores de reacció.

#### IV.4.2.4. Determinació de la velocitat d'hidratació del glicol G4G3G' en presència de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *B. licheniformis* a diferents pH

Per tal de definir el perfil d'activitat enfront del pH per a la reacció d'hidratació del glicol G4G3G' es realitzen una sèrie de cinètiques amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents concentracions del glicol **56** a 30 °C i diferents pH, en tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, seguint el procediment descrit a l'apartat III.4.3. A continuació es presenten les taules corresponents als diferents pH estudiats, en què s'indica a cada concentració de glicol i a diferents temps de reacció, la integració manual de les àrees dels pics de glicol **56**, patró intern i 2-desoxiglicòsid **69**. A cada concentració de glicol s'indica també la mitjana de les àrees del patró d'injecció, amb la que es normalitzen les

àrees dels pics del glical i del 2-desoxiglicòsid. A continuació s'indica a cada concentració de glical emprada, primer, la velocitat de desaparició de glical G4G3G' i, a continuació, la velocitat de formació de 2-desoxiglicòsid **69**, en unitats d'àrea·min<sup>-1</sup>, obtingudes a partir dels valors normalitzats de les àrees dels pics del glical **56** i el 2-desoxiglicòsid **69**. A la darrera columna s'expressa el terme  $v_0/[E]_0$  en s<sup>-1</sup>, corresponent a la desaparició del glical G4G3G' després interpolar la concentració de glical a la recta patró de G4G3G', i realitzar el canvi d'unitats de temps. Tant a la columna corresponent a l'àrea del pic del patró d'injecció com a les de les àrees normalitzades dels pics del glical **56** i del 2-desoxiglicòsid **69**, s'indica en cursiva aquells valors que no s'han tingut en compte en l'obtenció del valor de la mitjana de les àrees del patró intern, i en el càlcul de les velocitats de reacció. Finalment, a la darrera fila de la taula s'indica el valor dels paràmetres cinètics obtinguts per ajust de l'equació III.13 a les dades de  $v_0$  enfront de la [G4G3G'].

Mètodes i materials: Biologia molecular  
- pH 4.03

**Taula IV.266.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 4.03, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 1.53 µM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
4.95	12	423309	14696	80025	421318	14627	493 ± 34	0.062 ± 0.004
	37	409695	28707	78689	414693	29058		
	62	396894	41696	80510	392647	41249		
	87	381662	47719	79050	384552	48081		
	113	376506	62675	80585	372132	61947		
	138	358572	75051	79033	361365	75635		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				79649				
7.35	10	650135	13288	123944	630072	12878	884 ± 63	0.111 ± 0.008
	36	598731	37521	118451	607163	38049		
	60	576540	60706	119249	580747	61149		
	85	558474	82011	117658	570156	83727		
	111	542998	107204	121294	537739	106166		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				120119				
10.09	12	871873	17646	173457	856294	17331	1173 ± 41	0.147 ± 0.005
	37	832775	52542	169217	838389	52897		
	62	802015	84011	170819	799849	83784		
	87	768705	114333	169523	772490	114896		
	113	737573	140950	169373	741861	141769		
	138	709940	167923	169757	712452	168517		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				170358				
10.13	12	872390	18580	173730	855887	18229	1175 ± 45	0.147 ± 0.006
	37	833422	54064	169286	839121	54434		
	62	802381	84579	170863	800411	84372		
	87	768597	117134	169360	773514	117883		
	113	737320	146973	169676	740655	147638		
	138	709890	173472	169746	712807	174185		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				170444				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
12.36	12	1053940	25222	213672	1038901	24862	$1506 \pm 75$	$0.189 \pm 0.009$
	37	1014670	71516	210233	1016552	71648		
	63	972422	123879	212352	964504	122870		
	88	924807	154470	210776	924136	154358	$1606 \pm 74$	
	101	901682	170034	208087	912671	172106		
	114	882671	187580	208618	891154	189383		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				210623			
14.90	18	1266020	38157	252896	1271330	38317	$1884 \pm 88$	$0.236 \pm 0.011$
	43	1215090	86740	254203	1213913	86656	$1793 \pm 30$	
	68	1167010	131488	253980	1166903	131476		
	119	1082090	220922	254748	1078729	220236		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				253957			
19.65	20	1678740	38277	344584	1654608	37726	$2279 \pm 48$	$0.286 \pm 0.006$
	58	1577310	143284	338729	1581508	143665		
	83	1515160	201658	340057	1513260	201405		
	108	1455720	260848	338982	1458505	261347	$2408 \pm 60$	
	133	1393260	316928	336935	1404406	319463		
	158	1337880	369962	338496	1342364	371202		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				339631			
24.34	40	2006770	121503	424960	1997206	120924	$2660 \pm 47$	$0.333 \pm 0.006$
	66	1932020	198545	422502	1933999	198748		
	91	1859930	261874	423416	1857816	261576		
	116	1794860	323639	422193	1798014	324208	$2620 \pm 49$	
	154	1690040	421342	421603	1695379	422673		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				422935				
29.09	6	2519020	18771	513154	2494517	18588	$2800 \pm 45$	$0.351 \pm 0.006$
	31	2432650	93439	510092	2423448	93085		
	182	1987070	550413	505988	1995609	552778		
	195	1966810	570203	507010	1971281	571499	$2956 \pm 40$	
	207	1932720	601342	505184	1944115	604887		
	226	1864390	671810	507547	1866651	672625		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				508163			

Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
33.86	18	2832960	140909	596732	2805458	139541	3110 ± 43	0.390 ± 0.005
	68	2641580	310279	589940	2646053	310804		
	93	2561690	382765	590359	2564207	383141		
	119	2483120	457227	589804	2487898	458107		
	144	2402140	536152	587860	2414722	538960		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				590939				
38.90	100	3119850	356435	696266	3063419	349988	3160 ± 63	0.396 ± 0.008
	113	3008410	387247	682791	3012293	387747		
	138	2915410	461855	679061	2935207	464991		
	163	2849500	546759	680997	2860694	548907		
	189	2759680	611882	679246	2777663	615869		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				683672				
$k_{cat} = 0.445 \pm 0.008 s^{-1}$			$K = 199 \pm 11 mM^2$		$k_{cat}/K = 0.0022 \pm 0.0002 mM^{-2} \cdot s^{-1}$			

- pH 4.49

**Taula IV.267.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 4.49, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 1.53 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
2.75	12	232793	12228	43387	233429	12261	563 ± 18	0.071 ± 0.002
	37	222179	28770	43877	220297	28527		
	50	210045	34047	43216	211453	34275		
	62	204002	40191	43422	204394	40268		
	75	198746	43706	43311	199638	43902		
	87	192148	52854	43819	190770	52475		
Mitjana àrees G-αOMe :				43505				
4.90	10	434795	15752	83056	424623	15383	1184 ± 47	0.148 ± 0.006
	23	400659	29946	79690	407813	30481		
	35	385620	43301	80199	390012	43794		
	48	371663	54358	80705	373540	54633		
	60	359897	66376	80541	362454	66848		
	85	340711	91939	82486	335040	90408		
Mitjana àrees G-αOMe :				81113				
7.23	25	608504	40738	124398	600640	40212	1733 ± 125	0.217 ± 0.016
	38	566526	67918	121935	570500	68394		
	50	539245	88601	122656	539836	88698		
	63	521857	113101	123127	520430	112792		
	75	503427	131126	122320	505363	131630		
	100	466492	169492	122306	468339	170163		
Mitjana àrees G-αOMe :				122790				
10.28	12	872178	38449	176687	865590	38159	2560 ± 94	0.321 ± 0.012
	25	825597	74115	174741	828486	74375		
	37	793849	103217	175279	794181	103260		
	50	763079	130710	175125	764070	130880		
	62	736056	160134	174930	737833	160521		
Mitjana àrees G-αOMe :				175352				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
12.55	12	1060420	37958	215501	1061649	38002	2867 ± 130	0.359 ± 0.016
	25	1022320	75186	215357	1024189	75324		
	37	981852	110734	216178	979911	110515		
	50	970045	162257	242020	864755	144645		
	75	881754	218933	215967	880871	218714		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				215751				
14.96	180	890642	424312	261486	882402	420386	3076 ± 64	0.385 ± 0.008
	192	844468	460009	259715	842360	458861		
	205	804392	503405	260064	801308	501475		
	217	763238	542745	256944	769544	547229		
	229	724170	576755	257125	729639	581111		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				259067				
15.02	20	1235460	82169	260434	1229918	81801	3013 ± 62	0.378 ± 0.008
	45	1145470	173729	258872	1147213	173993		
	58	1105250	202695	259014	1106325	202892		
	70	1068750	237161	258868	1070392	237525		
	95	996757	312862	258815	998493	313407		
	108	965136	345794	259592	963923	345360		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				259266				
17.34	60	1247070	267451	301309	1244839	266973	3276 ± 145	0.410 ± 0.018
	72	1202330	312007	301886	1197885	310854		
	85	1163520	352798	301586	1160372	351843		
	97	1118870	390302	299974	1121839	391338		
	109	1085060	430590	299095	1091137	433001		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				300770				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
19.81	20	1622260	107634	345211	1620292	107503	3738 $\pm$ 38	0.468 $\pm$ 0.005
	32	1586980	157687	347822	1573156	156313		
	45	1525720	205907	344262	1528070	206224	3619 $\pm$ 111	
	57	1474360	246300	343241	1481023	247413		
	70	1427010	287074	343425	1432691	288217		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				344792				
24.45	53	1910990	236812	430658	1895857	234937	3856 $\pm$ 92	0.483 $\pm$ 0.012
	78	1790870	344785	427927	1788027	344238		
	90	1739860	391267	427266	1739785	391250	3794 $\pm$ 28	
	103	1686980	437833	425416	1694243	439718		
	115	1635000	482343	424971	1643759	484927		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				427248				
28.29	25	2368960	96956	500115	2357324	96480	3821 $\pm$ 76	0.479 $\pm$ 0.010
	63	2219240	263162	501584	2201872	261102		
	88	2113740	355418	496773	2117508	356052	3869 $\pm$ 111	
	138	1911570	547612	494766	1922746	550814		
	151	1874930	578036	495055	1884791	581076		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				497659				
39.36	10	3478530	35413	709538	3401407	34627	4034 $\pm$ 73	0.505 $\pm$ 0.009
	73	3145630	290117	694693	3141617	289747		
	136	2870940	541789	692277	2877284	542986	3955 $\pm$ 51	
	148	2818420	577917	687029	2846225	583618		
	161	2763110	619766	685497	2796605	627279		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				693807				
		$k_{\text{cat}} = 0.53 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$		$K = 70 \pm 6 \text{ mM}^2$		$k_{\text{cat}}/K = 0.0076 \pm 0.0008 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		



Mètodes i materials: Biologia molecular  
 - *pH 4.99*

**Taula IV.268.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 4.99, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.61 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
2.81	29	254492	14045	46653	237467	13106	470 ± 48	0.15 ± 0.02
	41	234433	20201	44403	229833	19805		
	54	224782	26786	42909	228044	27175		
	67	219662	30358	43472	219962	30399		
	79	211829	34373	43342	212754	34523		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				43532				
4.90	18	403923	14656	72869	426778	15486	763 ± 54	0.24 ± 0.02
	43	390514	41779	77538	387761	41484		
	56	378481	52787	76902	378920	52848		
	68	369839	61107	77582	367026	60642		
	81	354733	69274	75944	359626	70230		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				76992				
6.76	13	856771	19426	152670	603624	13686	1203 ± 12	0.378 ± 0.004
	26	565925	34501	109053	558183	34029		
	38	540849	48976	106952	543930	49255		
	51	526040	61372	107060	528503	61659		
	64	513698	76293	107662	513217	76221		
	76	495131	90610	106999	497732	91086		
	101	470911	115783	107641	470562	115697		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				107561				
9.69	35	821280	49039	157457	810274	48382	1627 ± 122	0.51 ± 0.04
	47	767469	79699	154327	772541	80225		
	60	746452	100115	155529	745579	99998		
	72	727663	119820	155011	729240	120080		
	85	708534	139980	155079	709758	140222		
	110	669127	174570	154679	672017	175324		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				155347				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
11.61	32	959102	63181	185718	960269	63261	1645 ± 45	0.52 ± 0.01
	45	928094	83488	185532	930155	83676		
	82	865323	151117	186588	862336	150601		
	95	844820	167069	185921	844925	167096		
	120	804467	212377	186003	804212	212318		
	133	784665	228925	185944	784665	228934		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				185951				
14.64	17	1303630	29107	244024	1255490	28032	2005 ± 54	0.63 ± 0.02
	56	1164220	113425	234692	1165811	113580		
	69	1141460	134778	234562	1143654	135037		
	107	1069290	204683	235238	1068266	204487		
	144	1001060	280317	235559	998739	279667		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				235013				
19.31	10	1739770	12506	323154	1673395	12028	2173 ± 88	0.68 ± 0.03
	22	1636180	43520	309700	1642125	43678		
	35	1605970	70112	309966	1610422	70306		
	47	1586560	99127	312102	1580069	98722		
	60	1562670	122320	311048	1561551	122232		
	85	1510900	173479	311310	1508547	173209		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				310825				
19.29	10	1696100	14352	314551	1679011	14207	2234 ± 66	0.70 ± 0.02
	35	1604840	71361	309928	1612368	71696		
	60	1550560	125024	309957	1557688	125599		
	85	1495340	180561	311280	1495829	180620		
	111	1443680	234866	311193	1444556	235008		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				311382				
23.91	6	2093500	8948	388949	2083766	8906	2050 ± 70	0.64 ± 0.02
	43	1990730	86470	386501	1994024	86613		
	56	1970480	110805	386108	1975750	111101		
	94	1895240	185114	385872	1901471	185723		
	119	1852580	232109	388273	1847177	231432		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				387141				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
30.91	26	2750570	35068	517482	2665054	33978	1991 ± 57	0.63 ± 0.02
	64	2564400	115955	498844	2577505	116548		
	77	2538840	135158	498425	2553960	135963		
	102	2490220	183583	497434	2510041	185044	1926 ± 39	
	127	2444760	232166	499171	2455644	233200		
	140	2415550	252342	497004	2436883	254571		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				501393				
40.25	21	3655900	26677	686022	3478275	25380	1902 ± 205	0.60 ± 0.06
	46	3429020	80870	655954	3411963	80467		
	71	3378020	128513	654474	3368817	128163		
	96	3278960	175370	641878	3334197	178324	1942 ± 54	
	122	3161200	211832	625127	3300588	221172		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				652691				
$k_{cat} = 0.9 \pm 0.1 s^{-1}$		$K = 65 \pm 14 mM^2$		$K_1 = 1.2 \pm 0.8 mM$		$k_{cat}/K = 0.014 \pm 0.004 mM^{-2} \cdot s^{-1}$		

-pH 5.51

**Taula IV.269.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 5.51, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- <i>α</i> OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
2.24	1	192798	3495	34337	199214	3611	648 ± 2	0.180 ± 0.001
	13	192413	13352	37537	181864	12620		
	25	184742	22136	35658	183817	22025		
	38	172528	30426	36368	168313	29682		
	50	167988	35817	35555	167631	35741		
Mitjana àrees G- <i>α</i> OMe :				35479				
3.61	5	239377	5380	44224	310976	6989	1022 ± 49	0.28 ± 0.01
	17	301571	23037	58663	295341	22561		
	30	290879	38595	58359	286357	37995		
	41	270626	49348	57051	272527	49695		
	54	252201	57134	55733	259978	58896		
Mitjana àrees G- <i>α</i> OMe :				57451				
4.74	11	433368	13607	79798	408130	12814	1327 ± 70	0.37 ± 0.02
	23	385579	38953	76748	377555	38143		
	36	362240	55882	75054	362706	55954		
	49	343209	74797	74551	345970	75398		
	61	322962	85757	74250	326881	86798		
Mitjana àrees G- <i>α</i> OMe :				75151				
6.96	3	689173	6062	124794	613518	5397	2011 ± 76	0.56 ± 0.02
	16	584232	35031	113161	573563	34392		
	29	549116	62690	111236	548417	62610		
	41	518165	88360	110560	520670	88787		
	54	490767	108774	109421	498273	110438		
Mitjana àrees G- <i>α</i> OMe :				111095				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
8.66	6	1581120	8511	286766	784852	4225	2441 ± 33	0.68 ± 0.01
	31	742161	75028	150374	702548	71023		
	44	655594	104229	140662	663451	105478		
	56	624641	128993	138893	640178	132202		
	69	598293	151442	139462	610673	154576		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				142348				
13.28	4	2118190	6062	381904	1190191	3406	2920 ± 104	0.81 ± 0.03
	29	1130330	75499	224292	1081427	72233		
	54	1001270	145308	212683	1010240	146610		
	63	960474	169479	210804	977716	172521		
	76	928217	200492	210574	945912	204314		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				214588				
17.21	9	2550650	12916	467141	1559208	7895	2670 ± 167	0.74 ± 0.05
	34	1504920	88893	296345	1450164	85659		
	61	1362650	169288	323317	1203530	149520		
	86	1286970	232074	284045	1293846	233314		
	99	1253590	256384	281939	1269701	259679		
124	1188410	312102	279921	1212361	318392			
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				285563				
22.69	5	2510780	7716	460892	2007345	6169	2325 ± 81	0.65 ± 0.02
	30	1930630	68833	371311	1915904	68308		
	55	1839080	130034	367665	1843151	130322		
	80	1778030	185660	366975	1785316	186421		
	131	1659620	301424	367191	1665441	302481		
168	1596620	387854	369252	1593277	387042			
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				368479				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
26.20	20	3456170	18303	639873	2294348	12150	2295 ± 62	0.64 ± 0.02
	72	2121660	172406	427909	2106116	171143		
	110	2023050	261585	427052	2012259	260190		
	135	1956740	321488	424339	1958746	321818		
	147	1922110	339673	421244	1938217	342519		
	173	1864110	394174	423326	1870486	395522		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				424774			
27.89	54	2324750	112757	452885	2328737	112950	2080 ± 62	0.58 ± 0.02
	129	2154140	273190	453049	2157054	273560		
	167	2087220	342216	454560	2083096	341540		
	192	2040820	387044	453697	2040662	387014		
	217	1989230	441510	454118	1987232	441066		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				453662				
31.45	55	3361340	75807	636845	2694457	60767	2058 ± 64	0.57 ± 0.02
	92	2706330	193768	543134	2543702	182124		
	181	2443640	396719	529785	2354670	382275		
	206	2356660	430156	518366	2320881	423625		
	218	2286830	449061	509330	2292066	450089		
	231	2220780	446261	498982	2272025	456559		
	306	2037640	602222	496018	2097116	619800		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				510496				
36.55	16	3640610	17502	681178	3186562	15319	1949 ± 38	0.54 ± 0.01
	41	3148010	77518	603871	3108142	76537		
	91	2995170	178746	595596	2998324	178934		
	116	2946310	222814	593731	2958677	223749		
	192	2796050	368202	594367	2804782	369352		
	242	2703000	467173	593551	2715169	469276		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				596223			

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
40.79	30	3386740	416948	716438	3151186	387949	1914 ± 210	0.53 ± 0.06
	43	3224500	442563	686320	3131891	429852		
	55	3137120	458828	671873	3112539	455233		
	68	3042280	470795	659017	3077325	476218	1831 ± 66	
	80	2961440	485570	649224	3040740	498572		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				666609				
$k_{cat} = 1.5 \pm 0.2 s^{-1}$		$K = 58 \pm 13 mM^2$		$K_I = 0.4 \pm 0.2 mM$		$k_{cat}/K = 0.026 \pm 0.009 mM^{-2} \cdot s^{-1}$		

-pH 5.98

**Taula IV.270.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 5.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
1.80	5	572437	5417	95624	167929	1589	616 ± 162	0.17 ± 0.05
	17	163539	12310	31771	144398	10869		
	30	138939	33044	27956	139416	33157		
	42	132668	32245	27348	136087	33076		
	55	123102	29221	28853	119686	28410		
Mitjana àrees G-αOMe :				28052				
2.82	4	749534	6605	130690	256691	2262	1036 ± 78	0.29 ± 0.02
	16	261148	18968	49137	237871	17278		
	29	223909	29413	45396	220757	28999		
	41	205993	39340	44052	209291	39969		
	54	198487	48974	44823	198194	48901		
Mitjana àrees G-αOMe :				44757				
3.29	13	1301020	2621	226087	304452	613	1118 ± 101	0.31 ± 0.03
	26	350820	19883	67273	275904	15637		
	38	266344	33820	54904	256656	32590		
	51	244159	45583	53588	241057	45004		
	63	228866	58032	51411	235526	59721		
76	211787	66132	51725	216625	67643			
Mitjana àrees G-αOMe :				52907				
4.95	5	1892280	6853	335219	450673	1632	1775 ± 205	0.49 ± 0.06
	17	476067	34227	93207	407778	29318		
	30	383439	53344	80589	379861	52846		
	42	358321	73610	80711	354443	72813		
	55	334688	91550	78212	341645	93453		
Mitjana àrees G-αOMe :				79837				



## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
8.62	10	1568450	18010	284797	763117	8763	2600 ± 181	0.72 ± 0.05
	23	745946	54395	146692	704623	51381		
	35	656086	84102	136224	667364	85548		
	48	622432	111224	136439	632134	112958		
	60	592863	140346	134908	608937	144151		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				138566				
11.05	3	1729600	6727	308279	997918	3881	2741 ± 193	0.76 ± 0.05
	28	921335	77960	184628	887591	75104		
	40	842881	111996	178288	840886	111731		
	53	802500	143569	175798	811940	145258		
	78	725140	205427	172750	746615	211511		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				177866				
14.19	4	1813570	9700	330407	1246423	6667	3094 ± 64	0.86 ± 0.02
	16	1250110	48064	237636	1194583	45929		
	29	1169080	85536	230478	1151848	84275		
	41	1097640	121946	223616	1114647	123835		
	54	1027280	148373	216593	1077022	155557		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				227081				
16.88	7	1955580	16910	358966	1477156	12773	2797 ± 70	0.78 ± 0.02
	32	1425230	97378	281940	1370668	93650		
	58	1316750	175136	276616	1290714	171673		
	83	1214920	246481	268460	1227078	248948		
	108	1098160	303072	257570	1156044	319047		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				271147				
17.86	2	1650150	6563	304303	1584782	6303	2712 ± 109	0.75 ± 0.03
	27	1484050	72972	288583	1502900	73898		
	40	1457350	97216	288064	1478520	98628		
	53	1429080	124394	288044	1449940	126210		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				292249				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
18.28	19	1722820	44663	325542	1565205	40577	2371 $\pm$ 83	0.66 $\pm$ 0.02
	44	1507310	110958	300034	1485835	109377		
	69	1417040	172706	295630	1417660	172782		
	95	1354230	230389	294235	1361245	231583	2439 $\pm$ 63	
	120	1292290	285493	293138	1303846	288046		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				295759				
26.28	8	3495490	9571	643216	2349608	6434	2520 $\pm$ 79	0.70 $\pm$ 0.02
	33	2335220	76278	448759	2249878	73490		
	58	2176270	142163	431890	2178632	142317		
	83	2095480	199285	427719	2118211	201447	2589 $\pm$ 35	
	109	2004950	260983	421067	2058717	267982		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				432359				
34.39	45	3225490	70063	612799	2944230	63953	2325 $\pm$ 171	0.65 $\pm$ 0.05
	95	2832380	195153	566429	2797050	192719		
	120	2747480	245468	557696	2755695	246202		
	133	2715600	264128	557292	2725694	265110	2200 $\pm$ 125	
	158	2665300	309573	556037	2681245	311425		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				559364				
40.77	21	4454000	28259	837337	3590041	22778	1878 $\pm$ 133	0.52 $\pm$ 0.04
	46	3665250	88390	701706	3525315	85016		
	97	3420800	178555	669376	3449110	180033	2009 $\pm$ 77	
	122	3285250	220690	653665	3392054	227865		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				674916				
$k_{\text{cat}} = 1.2 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$		$K = 27 \pm 6 \text{ mM}^2$		$K_I = 1.4 \pm 0.7 \text{ mM}$		$k_{\text{cat}}/K = 0.04 \pm 0.01 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		

Mètodes i materials: Biologia molecular  
 - *pH 6.50*

**Taula IV.271.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 µM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
1.79	1	580510	4200	100508	162717	1177	429 ± 53	0.12 ± 0.01
	26	151315	13974	28277	150756	13922		
	39	145998	15543	28623	143699	15298		
	51	139466	18161	27617	142269	18526		
	Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :			28172				
3.69	21	340230	10153	57637	335056	9999	623 ± 44	0.17 ± 0.01
	33	301446	23839	57409	298043	23569		
	46	290602	30536	57076	288997	30367		
	58	279648	40653	56192	282481	41065		
	71	271552	44650	55490	277770	45672		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :			56761					
4.03	4	893053	8203	154979	356550	3275	1018 ± 56	0.28 ± 0.02
	17	362687	26540	69160	324482	23744		
	29	306617	39016	62628	302931	38547		
	42	287995	50655	61680	288904	50815		
	54	274816	63188	61317	277317	63763		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :			61875					
6.17	7	1261290	7134	222862	535638	3030	1355 ± 155	0.38 ± 0.04
	20	585664	22213	109822	504722	19143		
	32	491180	31950	95990	484294	31502		
	45	470525	42883	94620	470644	42893		
	57	459712	51408	93322	466223	52136		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :			94644					

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
9.74	4	1211450	12603	219924	873277	9085	2224 $\pm$ 132	0.62 $\pm$ 0.04
	12	884440	46142	168649	831388	43374		
	29	804681	76301	161688	788978	74812		
	41	749350	103619	156082	761116	105246		
	54	688672	122670	147712	739121	131656		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				158533				
13.52	4	1673130	10688	306590	1189331	7598	2489 $\pm$ 63	0.69 $\pm$ 0.02
	16	1205430	40284	229328	1145555	38283		
	29	1120780	67730	219828	1111139	67147		
	42	1075380	95021	217953	1075301	95014		
	55	1041980	124260	216030	1051178	125357		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				220785				
17.81	18	2198230	29918	406408	1559869	21230	2372 $\pm$ 97	0.66 $\pm$ 0.03
	43	1466150	108527	292762	1444245	106906		
	68	1373680	170537	288057	1375258	170733		
	93	1311460	227542	286623	1319536	228943		
	119	1252720	281293	286110	1262694	283533		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				288388				
22.02	22	2590840	32005	484471	1922568	23750	2389 $\pm$ 157	0.66 $\pm$ 0.04
	34	1896950	75603	367885	1853756	73882		
	47	1819160	102396	357403	1829875	102999		
	60	1788270	125858	356840	1801641	126799		
	72	1763850	152898	358131	1770633	153486		
	148	1593750	328574	357282	1603681	330621		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				359508				
27.08	7	2659870	5949	492396	2376968	5316	2304 $\pm$ 60	0.64 $\pm$ 0.02
	32	2312230	63830	442429	2299666	63483		
	57	2230100	118847	438672	2236978	119214		
	82	2177470	171848	439541	2179868	172037		
	107	2123960	222053	439458	2126700	222339		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				440025				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
37.37	143	3132810	238276	630245	3018866	229610	2113 $\pm$ 241	0.59 $\pm$ 0.07
	155	3110130	266598	628238	3006585	257722		
	168	2994170	282742	607855	2991546	282494	1824 $\pm$ 95	
	181	2871520	295387	590713	2952259	303692		
	193	2779730	306863	579560	2912885	321562		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				607322				
$k_{\text{cat}} = 1.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$		$K = 52 \pm 13 \text{ mM}^2$		$K_1 = 0.9 \pm 0.6 \text{ mM}$		$k_{\text{cat}}/K = 0.021 \pm 0.007 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		

-pH 6.98

**Taula IV.272.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
2.40	20	206577	5449	41814	208611	5502	495 ± 37	0.14 ± 0.01
	58	189488	25580	42453	188470	25443		
	70	185337	30664	42443	184388	30507		
	83	179618	34764	42221	179638	34768		
	95	175540	40894	42196	175661	40922		
Mitjana àrees G-αOMe :				42225				
3.56	20	278723	30464	59173	288621	31546	737 ± 25	0.205 ± 0.007
	33	271872	43828	61511	270824	43659		
	45	263233	52612	61291	263163	52598		
	58	255363	62820	61794	253217	62292		
	70	248982	71499	62603	243697	69981		
Mitjana àrees G-αOMe :				61274				
4.89	25	323735	19053	68451	406905	23947	1041 ± 13	0.289 ± 0.004
	38	377531	44683	84575	384055	45455		
	50	372480	60657	86094	372228	60616		
	63	360268	73959	86561	358085	73511		
	75	349269	87299	86915	345738	86416		
Mitjana àrees G-αOMe :				86036				
7.25	65	580788	102924	134760	539326	95576	1343 ± 123	0.37 ± 0.03
	78	520120	112168	127311	511248	110255		
	90	497688	125809	125089	497889	125860		
	103	480697	141185	124575	482875	141825		
	115	463867	157108	123583	469709	159087		
Mitjana àrees G-αOMe :				127064				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
9.12	30	787590	45002	164119	<i>762113</i>	<i>43546</i>	1782 ± 149	0.50 ± 0.04
	43	712757	80403	157424	719032	81111		
	55	688166	103539	156779	697081	104880		
	68	665291	123271	158736	665601	123328		
	93	623167	164988	156896	630769	167001		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				158791				
10.28	25	854442	36409	175597	866285	36914	1961 ± 64	0.54 ± 0.02
	63	792031	116824	179672	784796	115757		
	88	738510	160088	178882	734996	159326		
	100	715164	179235	175808	724206	181501		
	113	692480	202690	178218	691753	202477		
126	671694	221956	180008	664316	<i>219518</i>			
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				178031				
12.62	75	1003570	117348	219163	<i>1004744</i>	<i>117485</i>	2052 ± 414	0.6 ± 0.1
	88	935616	165629	219681	934502	165432		
	100	900747	194881	218694	903735	195527		
	113	877557	223588	222427	865691	220565		
	125	853596	245093	217132	862588	247675		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				219419				
13.88	30	1239790	23183	248722	<i>1198998</i>	<i>22421</i>	1985 ± 116	0.55 ± 0.03
	55	1112820	91539	241059	1110417	91341		
	68	1075210	120103	237527	1088842	121626		
	80	1057920	143492	236824	<i>1074513</i>	145743		
	93	1027290	173741	238560	1035809	175182		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				243508				
14.96	65	1196150	121094	261204	1188166	<i>120286</i>	1882 ± 88	0.52 ± 0.02
	78	1165540	136915	260590	1160489	136322		
	90	1138060	163526	258028	1144379	<i>164434</i>		
	103	1118020	188011	259919	1116048	187679		
	115	1095960	208763	257562	<i>1104039</i>	210302		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				259461				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
17.51	80	1467850	102650	311402	1409948	98601	2183 ± 216	0.61 ± 0.06
	93	1363870	152875	298860	1365048	153007		
	105	1333390	186243	296848	1343587	187667		
	118	1304320	209060	297686	1310595	210066		
	130	1283830	236174	290795	1320576	242934		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				299118				
19.70	40	1733150	74284	355639	1651207	70772	2129 ± 43	0.59 ± 0.01
	53	1630760	101655	338845	1630661	101649		
	115	1485640	227136	338876	1485414	227101		
	178	1357230	355375	338591	1358166	355620		
	191	1335660	380075	338986	1335024	379894		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				338825				
24.65	75	2028720	128237	427176	2027845	128182	2025 ± 22	0.563 ± 0.006
	88	2001560	146889	427716	1998171	146640		
	150	1872200	273789	426400	1874798	274169		
	163	1849470	296083	427294	1848162	295874		
	176	1828840	320411	426373	1831494	320876		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				426992				
29.55	30	2636420	37968	526160	2578400	37133	1949 ± 5	0.537 ± 0.001
	80	2443550	139251	514807	2442476	139190		
	93	2414290	163281	513854	2417705	163512		
	206	2177950	389268	509930	2197814	392818		
	219	2145070	402536	508153	2172204	407628		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				514581				
34.31	180	2819840	187948	600341	2800888	186685	1828 ± 95	0.51 ± 0.03
	193	2770360	218512	596356	2770129	218494		
	205	2740290	241631	595079	2745941	242129		
	218	2718120	265815	594369	2726979	266681		
	230	2696630	287144	595386	2700798	287588		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				596306				



$$k_{\text{cat}} = 0.76 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$$

$$K = 37 \pm 8 \text{ mM}^2$$

$$K_1 = 2.2 \pm 1.4 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K = 0.021 \pm 0.007 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

---

-pH 7.50

**Taula IV.273.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 7.50, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
2.48	20	208134	6891	46140	217989	7217	270 ± 34	0.075 ± 0.009
	58	243214	23004	59475	197618	18691		
	95	199732	28698	50447	191331	27491		
	133	184617	38420	48268	184834	38465		
	171	177865	47933	48445	177425	47814		
Mitjana àrees G-αOMe :				48325				
4.88	11	439176	8969	93111	427523	8731	656 ± 46	0.18 ± 0.01
	23	407198	15680	89054	414455	15960		
	61	381445	43711	90351	382668	43851		
	73	373347	51456	90356	374525	51618		
	111	352558	73309	91505	349230	72617		
	149	336295	99054	91939	331547	97655		
Mitjana àrees G-αOMe :				91053				
7.30	20	623764	23077	135330	618886	22897	999 ± 51	0.28 ± 0.01
	70	563602	75536	134568	562361	75369		
	109	527217	113793	135175	523694	113032		
	146	489332	147673	133104	493624	148968		
	159	480924	157519	133181	484862	158809		
Mitjana àrees G-αOMe :				134272				
10.15	15	867611	18602	183348	869917	18652	1381 ± 52	0.38 ± 0.01
	65	797358	93403	183983	796718	93328		
	90	760643	128445	184771	756791	127795		
	115	727846	160021	183881	727666	159981		
	140	696414	191495	183194	698852	192165		
Mitjana àrees G-αOMe :				183835				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
12.54	60	1000110	94990	226895	1002057	95174	1480 ± 20	0.411 ± 0.006
	73	980565	114767	226710	983276	115084		
	85	961605	132085	226513	965102	132565		
	98	945454	151035	227499	944780	150927		
	110	935907	167116	229067	928838	165854		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				227337				
14.82	7	1300500	8845	264805	1307018	8889	1610 ± 65	0.45 ± 0.02
	57	1195330	97726	267724	1188223	97145		
	132	1065920	228301	267313	1061212	227293		
	151	1024300	262175	264194	1031815	264098		
	170	1011670	279102	266625	1009800	278586		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				266132				
17.23	80	1397110	111821	312787	1389461	111209	1632 ± 52	0.45 ± 0.01
	168	1235610	269072	311528	1233812	268680		
	206	1175540	328797	310469	1177833	329438		
	218	1158070	342548	309984	1162144	343753		
	231	1142950	360300	310605	1144678	360845		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				311075				
19.50	120	1612990	165594	362639	1548708	158995	1797 ± 179	0.50 ± 0.05
	133	1474710	247247	351364	1461375	245011		
	145	1432070	268781	350107	1424216	267307		
	158	1404720	294519	348214	1404610	294496		
	170	1380400	313064	345904	1389510	315130		
	183	1355170	333043	345345	1366322	335784		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				348187				
19.55	28	1784600	52085	370656	1683954	49148	1816 ± 92	0.50 ± 0.03
	53	1636870	100692	352846	1622518	99809		
	103	1510360	186119	350912	1505368	185504		
	141	1437110	249309	348508	1442241	250199		
	166	1394200	289818	348888	1397653	290536		
	242	1266470	416097	347607	1274286	418665		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				349752				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0 / \text{àrea} \cdot \text{min}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
21.74	190	1851890	306873	435774	1650183	273448	1779 $\pm$ 180	0.49 $\pm$ 0.05
	203	1582820	364199	399393	1538896	354092		
	215	1500190	385111	387893	1501801	385525		
	228	1467960	406403	385976	1476835	408860		
	240	1443910	423670	383030	1463813	429510		
	253	1420330	445251	385256	1431588	448780		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				388310				
24.34	7	2214470	4711	458273	2117521	4505	1756 $\pm$ 34	0.488 $\pm$ 0.009
	132	1893570	236962	440004	1885849	235996		
	234	1711920	418764	440659	1702406	416437		
	309	1573140	545959	436128	1580650	548565		
	334	1538240	572749	436049	1545863	575587		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				438210				
29.09	40	2481060	63326	519322	2492643	63621	1766 $\pm$ 50	0.49 $\pm$ 0.01
	90	2376450	149401	522696	2372133	149130		
	254	2086490	441738	520937	2089732	442424		
	266	2076840	453191	520634	2081278	454159		
	279	2056950	471899	522316	2054707	471384		
	329	1985020	562180	524574	1974321	559150		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				521747				
33.58	50	3151310	29212	656749	2924005	27105	1660 $\pm$ 177	0.46 $\pm$ 0.05
	163	2883130	178285	630752	2785428	172243		
	428	2374150	601424	609677	2372984	601129		
	453	2186190	734682	600060	2220136	746090		
	478	2032760	859428	597021	2074832	877216		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				609378				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
38.95	100	3304500	122219	707329	3267649	120856	1570 ± 21	0.436 ± 0.002
	201	3113460	288672	701066	3106243	288003		
	453	2687340	700816	696990	2696790	703280		
	478	2663360	714539	696787	2673505	717261	1571 ± 34	
	503	2627590	748745	697117	2636350	751241		
	516	2611170	767603	697357	2618973	769897		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				699441				
$k_{\text{cat}} = 0.67 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$		$K = 67 \pm 9 \text{ mM}^2$		$K_I = 1.3 \pm 0.5 \text{ mM}$		$k_{\text{cat}}/K = 0.010 \pm 0.002 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		

-pH 8.02

**Taula IV.274.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 8.02, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 0.69 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
3.72	6	1077510	7673	188775	342088	2436	227 ± 24	0.063 ± 0.007
	56	348927	21061	67592	309386	18675		
	106	300328	30577	60621	296917	30230		
	157	283694	39439	60201	282428	39263		
	207	271668	51398	58975	276077	52232		
Mitjana àrees G-αOMe :				59932				
5.50	14	595700	5244	107776	492757	4338	366 ± 98	0.10 ± 0.03
	64	481592	33685	93308	460138	32184		
	114	438270	50841	90220	433076	50238		
	165	416754	64390	87817	423088	65369		
	217	396274	79077	85260	414360	82686		
Mitjana àrees G-αOMe :				89151				
6.64	23	822861	22916	150034	577789	16091	561 ± 48	0.16 ± 0.01
	73	557974	49975	109860	535065	47923		
	126	508033	73312	104174	513766	74139		
	148	493648	96425	103646	501761	98010		
	186	475079	109874	103718	482552	111602		
Mitjana àrees G-αOMe :				105350				
9.03	17	1267480	17981	231841	809149	11479	654 ± 9	0.182 ± 0.003
	67	772453	53993	153570	744464	52037		
	118	705934	87110	147200	709797	87587		
	168	666694	115442	145449	678412	117471		
	219	635221	151029	145803	644817	153310		
Mitjana àrees G-αOMe :				148006				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
11.08	20	1580200	21969	291881	975488	13562	885 ± 66	0.25 ± 0.01
	70	923557	82006	187403	887979	78847		
	117	838571	119098	179767	840515	119374	951 ± 56	
	171	791585	158410	178656	798354	159765		
	210	747243	196156	174909	769778	202071		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				180184				
13.37	53	1839420	39547	338535	1173918	25239	1223 ± 29	0.340 ± 0.008
	66	1169710	79045	233531	1082166	73129		
	78	1079430	95193	218275	1068442	94223	1250 ± 51	
	91	1053480	109460	216198	1052773	109387		
	103	1025470	124127	213686	1036829	125502		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				216053				
13.87	30	1461610	32301	276229	1174012	25945	1245 ± 32	0.346 ± 0.009
	80	1126860	102281	224604	1113173	101039		
	130	1051990	162572	221046	1055940	163182	1341 ± 34	
	155	1020250	194287	222753	1016233	193522		
	168	990177	212044	219101	1002718	214730		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				221876				
17.80	7	2294630	5736	420133	1576842	3942	1416 ± 27	0.393 ± 0.008
	32	1562270	39815	297178	1517755	38680		
	83	1429030	104673	286556	1439773	105460	1331 ± 4	
	133	1354380	170038	284725	1373337	172418		
	183	1291990	236680	286382	1302494	238604		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				288710				
18.43	60	1834800	74273	349672	1567675	63459	1470 ± 108	0.41 ± 0.03
	73	1527180	114697	305827	1491910	112048		
	85	1465060	132610	298038	1468629	132933	1484 ± 59	
	98	1441410	149239	296457	1452627	150400		
	110	1417070	165335	294734	1436446	167596		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				298764				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
22.32	23	2508420	26786	467763	1959937	20929	1570 ± 206	0.44 ± 0.06
	78	1863900	95079	375206	1815602	92615		
	104	1784740	138741	366782	1778422	138250	1561 ± 89	
	154	1712110	222229	361206	1732385	224861		
	205	1626270	309546	358740	1656840	315365		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				365484				
26.50	18	3037130	12987	562987	2348061	10040	1569 ± 53	0.44 ± 0.01
	43	2325750	64475	445533	2272100	62988		
	94	2171820	132815	431489	2190778	133974	1474 ± 50	
	144	2091180	203085	432361	2105180	204445		
	194	2020530	272925	431639	2037459	275212		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				435256				
31.86	48	2791000	65471	530544	2729418	64026	1557 ± 67	0.43 ± 0.02
	98	2647630	146932	522618	2628479	145869		
	149	2561610	212403	519018	2560720	212329	1462 ± 25	
	199	2478680	286786	518872	2478516	286767		
	251	2391110	361483	514843	2409663	364288		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				518838				
36.02	23	3900360	29528	729759	3151746	23861	1355 ± 66	0.38 ± 0.02
	78	3068440	104967	602936	3001044	102661		
	104	2962680	164113	591315	2954553	163663	1662 ± 22	
	154	2869680	241693	584022	2897545	244040		
	205	2780000	321300	580499	2824030	326389		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				589693				
41.03	15	3775090	23618	707095	3569806	22333	1301 ± 77	0.36 ± 0.02
	66	3510930	97566	674558	3480150	96711		
	116	3408670	158467	669302	3405320	158311	1319 ± 31	
	167	3331310	218723	667825	3335397	218991		
	218	3255260	292984	662892	3283508	295526		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				668644				



$$k_{\text{cat}} = 1.4 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$$

$$K = 436 \pm 178 \text{ mM}^2$$

$$K_I = 0.03 \pm 0.03 \text{ mM}$$

$$k_{\text{cat}}/K = 0.003 \pm 0.002 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$$

---

-pH 8.62

**Taula IV.275.** Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 8.62, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, [wt] = 1.53 μM, substrat: G4G3G'.

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G-αOMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	v <sub>0</sub> / àrea·min <sup>-1</sup>	(v <sub>0</sub> /[E] <sub>0</sub> ) / s <sup>-1</sup>
2.38	60	155740	11076	37146	204111	14516	367 ± 22	0.046 ± 0.003
	73	204555	12570	46931	212192	13039		
	85	208668	15155	48878	207836	15094		
	98	204763	19695	49406	201767	19407		
	110	201999	20758	52626	186862	19203		
	123	197253	23039	49517	193929	22650		
Mitjana àrees G-αOMe :				48683				
4.78	20	419148	12660	89450	418381	12637	524 ± 23	0.066 ± 0.03
	45	403507	16192	88251	408242	16382		
	83	387482	29836	88658	390229	30047		
	121	369174	46867	88450	372663	47310		
	159	349687	69134	90435	345247	68256		
	184	338492	82825	90474	334047	81737		
Mitjana àrees G-αOMe :				89286				
7.11	60	535073	19238	115437	619523	22275	849 ± 49	0.106 ± 0.06
	73	590794	35947	130444	605343	36833		
	85	591775	47322	134019	590174	47194		
	110	570634	70465	134740	566045	69898		
	148	544850	100053	135126	538924	98965		
	173	524071	123850	133953	522911	123576		
Mitjana àrees G-αOMe :				133656				
10.15	30	845474	13412	176887	879379	13950	1301 ± 34	0.163 ± 0.04
	55	849367	39645	184746	845848	39480		
	80	818868	67696	184911	814747	67356		
	118	773605	117493	184481	771506	117174		
	156	719127	172345	183503	720998	172793		
	194	680713	222741	189355	661392	216419		
Mitjana àrees G-αOMe :				183981				

## Mètodes i materials: Biologia molecular

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
12.42	40	1031740	61908	225183	1029792	61791	1600 ± 50	0.200 ± 0.006
	78	969682	115072	224293	971691	115310		
	115	907509	176024	225939	902765	175104		
	141	865471	215592	222989	872336	217302		
	166	830391	256679	225385	828080	255965		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				224758				
14.89	20	1300270	21048	272191	<i>1281944</i>	<i>20751</i>	1997 ± 45	0.250 ± 0.006
	58	1232060	72078	267552	1235757	72294		
	95	1161430	131482	266660	1168812	132318		
	134	1086760	209244	268894	1084581	208824		
	171	1005210	282969	266477	1012293	284963		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				268355				
17.08	40	1482280	51549	314229	1456242	50644	1947 ± 37	0.244 ± 0.005
	78	1368040	118873	306292	1378836	119811		
	128	1277420	198717	305733	1289855	200651		
	153	1230220	248788	308198	1232261	249201		
	178	1188370	293115	309094	1186891	292750		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				308709				
18.28	90	1482860	125386	331597	1472656	<i>124523</i>	1738 ± 90	0.22 ± 0.01
	115	1420640	175274	329402	1420266	175228		
	128	1397470	198546	328395	1401386	199102		
	140	1378790	217136	328941	1380358	217383		
	153	1358910	236557	328241	1363357	237331		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				329315				
19.56	30	1705000	31593	348216	1691574	31344	2723 ± 206	0.34 ± 0.03
	94	1543850	158491	340903	<i>1564551</i>	160616		
	120	1457360	239311	340000	1480823	243164		
	145	1387130	305981	348311	1375832	303489		
	170	1326320	375397	349940	1309393	370606		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				345474				

[G4G3G'] / mM	Temps / min	Àrea G4G3G'	Àrea 2-desoxiglicòsid <b>69</b>	Àrea G- $\alpha$ OMe	Àrea G4G3G' normalitzada	Àrea <b>69</b> normalitzada	$v_0$ / àrea·min <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
24.12	130	1904790	214421	435677	1889403	212689	3415 ± 237	0.43 ± 0.03
	156	1825830	282212	433361	1820760	281428		
	168	1770340	329316	432487	1768992	329065	3423 ± 203	
	180	1718510	376900	428096	1734815	380476		
	193	1667850	423509	431167	1671682	424482		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				432158				
29.50	35	2520200	63819	520412	2515800	63708	4124 ± 175	0.52 ± 0.02
	125	2290100	266027	515623	2307335	268029		
	150	2188320	349542	512729	2217233	354160	3627 ± 43	
	175	2108820	452702	525101	2086340	447876		
	200	1997000	541793	522138	1986924	539059		
225	1909430	626941	521018	1903880	625119			
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				519504				
33.52	120	2588320	352417	606186	2564938	349233	3397 ± 58	0.426 ± 0.007
	133	2527810	396798	602903	2518615	395355		
	145	2475230	440843	600933	2474311	440679	3559 ± 56	
	158	2425860	486973	599740	2429783	487760		
	170	2376530	529587	596959	2391462	532915		
183	2338540	567648	597538	2350953	570661			
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				600710				
38.54	180	2992720	395929	696491	2967407	392580	2640 ± 127	0.33 ± 0.02
	193	2909540	449948	690298	2910813	450145		
	205	2863020	482239	688789	2870548	483507	2490 ± 48	
	218	2836470	512531	688790	2843924	513878		
	243	2768020	574025	688632	2775931	575665		
Mitjana àrees G- $\alpha$ OMe :				690600				
$k_{cat} = 0.9 \pm 0.6 s^{-1}$		$K = 472 \pm 397 mM^2$		$K_I = 0.1 \pm 0.3 mM$		$k_{cat}/K = 0.002 \pm 0.003 mM^{-2} \cdot s^{-1}$		

Mètodes i materials: Biologia molecular

- Recull dels paràmetres obtinguts en el perfil de pH per a la hidratació del glicol G4G3G'

**Taula IV.276.** Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust de l'equació III.13 a les reaccions d'hidratació del glicol G4G3G' catalitzades per la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, substrat: G4G3G'.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K / \text{mM}^2$	$K_I / \text{mM}$	$k_{\text{cat}}/K / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-2}$
4.03	$0.445 \pm 0.008$	$199 \pm 11$	-----	$0.0022 \pm 0.0002$
4.49	$0.53 \pm 0.01$	$70 \pm 6$	-----	$0.0076 \pm 0.0008$
4.99	$0.9 \pm 0.1$	$65 \pm 14$	$1.2 \pm 0.8$	$0.014 \pm 0.004$
5.51	$1.5 \pm 0.2$	$58 \pm 13$	$0.4 \pm 0.2$	$0.026 \pm 0.009$
5.98	$1.2 \pm 0.1$	$27 \pm 6$	$1.4 \pm 0.7$	$0.04 \pm 0.01$
6.50	$1.1 \pm 0.1$	$52 \pm 13$	$0.9 \pm 0.6$	$0.021 \pm 0.007$
6.98	$0.76 \pm 0.08$	$37 \pm 8$	$2.2 \pm 1.4$	$0.021 \pm 0.007$
7.50	$0.67 \pm 0.04$	$67 \pm 9$	$1.3 \pm 0.5$	$0.010 \pm 0.002$
8.02	$1.4 \pm 0.5$	$436 \pm 178$	$0.03 \pm 0.03$	$0.003 \pm 0.002$
8.63	$0.9 \pm 0.6$	$472 \pm 397$	$0.1 \pm 0.3$	$0.002 \pm 0.003$

## IV.5. Resultats de l'enzimologia de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb substrats cromofòrics en estat estacionari

### IV.5.1. Perfil d'activitat enzimàtica enfront del pH per a la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

En aquest experiment l'objectiu és determinar els  $pK_a$  cinètics de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 fent servir com a substrat el G-4NP.

#### IV.5.1.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

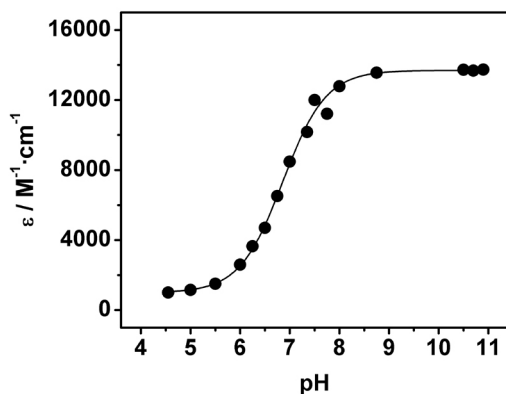
Es realitzen els espectres del 4-nitrofenol i el 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid a 40 °C en tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M a cadascun dels pH (figura III.6). Es decideix realitzar el seguiment de les cinètiques a una  $\lambda$  de 378 nm per a pH inferiors a 6.0, i a 400 nm per a pH superiors o igual a 6.0. Una vegada escollida la longitud d'ona de treball es determina a cada pH l'absortivitat de les dues espècies per tal de poder definir la variació d'absortivitat que s'empra posteriorment en la determinació dels paràmetres cinètics seguint el procediment descrit a l'apartat III.5.3.

**Taula IV.277.** Valors d'absortivitat del 4-nitrofenol i del 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid, a les longituds d'ona triades per al seguiment de la hidròlisi dels substrats, a cadascun dels pH de treball; també s'indica valor de la  $\Delta\epsilon$ , obtinguda com a diferència entre els valors de les  $\epsilon$  de l'aglicona i del substrat, i emprada en els càlculs de la velocitat inicial de reacció. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C.

pH	$\lambda$ / nm	$\epsilon_{4\text{-nitrofenol}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{substrat}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
4.55	378	1004	263	741
5.00	378	1149	229	920
5.50	378	1508	235	1273
6.00	400	2173	23	2150
6.25	400	3144	11	3233
6.50	400	4661	15	4646
6.75	400	6429	19	6410
7.00	400	8551	38	8513
7.50	400	14807	24	14783
8.00	400	16599	24	16475

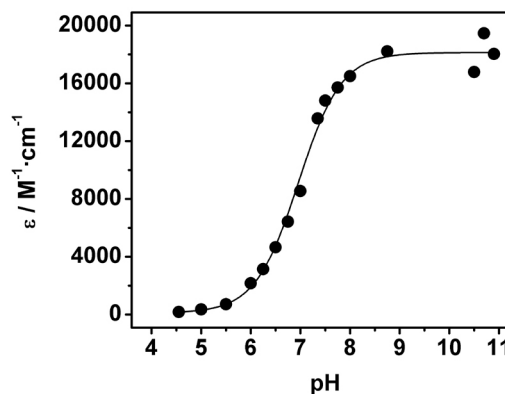
Les absortivitats del 4-nitrofenol determinades a cadascuna de les longituds d'ones a cada pH defineixen una corba de valoració que es descriu amb l'equació IV.5. (figura IV.2). Per diferència entre aquestes absortivitats i les del substrat s'obté la  $\Delta\epsilon$  que es fa servir per al seguiment de la reacció enzimàtica.

$$\epsilon_{\lambda}(pH) = \frac{\epsilon_{\lambda,ArOH} + \epsilon_{\lambda,ArO^{-}} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad \text{Equació IV.5.}$$



Valors d'ajust de l'equació IV.5:

$$\begin{aligned} \epsilon_{\lambda,4\text{-nitrofenol}} &= 992 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{\lambda,4\text{-nitrofenòxid}} &= 13695 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \\ pK_a &= 6.86 \end{aligned}$$



Valors d'ajust de l'equació IV.5:

$$\begin{aligned} \epsilon_{\lambda,4\text{-nitrofenol}} &= 114 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{\lambda,4\text{-nitrofenòxid}} &= 18131 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \\ pK_a &= 6.96 \end{aligned}$$

**Figura IV.2.** Perfils d'absortivitat del 4-nitrofenol en funció del pH a les longituds d'ona de 378 nm (esquerra) i 400 nm (dreta) en tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C. S'adjunten els valors d'ajust de l'equació IV.5 a cada longitud d'ona.

IV.5.1.2. Determinació dels paràmetres cinètics

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.5.7. S'ha determinat la velocitat d'hidròlisi espontània del 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid a les diferents condicions de reacció i s'ha comprovat que aquesta és inferior a la velocitat d'hidròlisi en presència d'enzim en més de dos ordres de magnitud; de manera que s'ha considerat menyspreable en el moment de realitzar el càlcul dels paràmetres cinètics de la  $\beta$ -glucosidasa.

- pH 4.55

**Taula IV.278.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (378 \text{ nm}) = 741 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 14 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 210 \pm 46 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 1.5 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 66 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
28.5	0.5568	1.3417	
28.5	0.9271	2.2343	
57.0	1.2411	2.9909	
85.5	1.5160	3.6533	
85.5	1.7738	4.2745	
285.0	3.0298	7.3013	
342.0	3.1154	7.5076	
513.0	3.3441	8.0588	
833.0	3.3705	8.2247	
1140.0	2.9055	7.0020	

- pH 5.00

**Taula IV.279.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (378 \text{ nm}) = 920 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 10.7 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 85 \pm 8 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 2.8 \pm 0.5 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 126 \pm 17 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
28.5	1.2551	2.4361	
57.0	2.3227	4.5084	
85.5	2.6984	5.2376	
142.5	3.3501	6.5025	
256.5	3.8044	7.3843	
342.0	3.9760	7.1774	
513.0	4.1468	8.0489	
833.0	3.9105	7.5903	
1140.0	3.6807	7.1442	

- pH 5.50

**Taula IV.280.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (378 \text{ nm}) = 1273 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
28.5	1.8240	2.5587	$k_{\text{cat}} = 11.8 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 88 \pm 13 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 1.7 \pm 0.4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 134 \pm 29 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
57.0	3.3721	4.6601	
85.5	4.1433	5.8121	
142.5	4.9455	6.9374	
342.0	5.7638	8.0853	
427.5	5.8653	8.2276	
513.0	5.4933	7.7085	
833.0	5.0092	7.0267	
1140.0	4.9740	6.9774	

- pH 6.00

**Taula IV.281.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 2150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
17.1	0.2286	1.8987	$k_{\text{cat}} = 17.7 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 146 \pm 13 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 0.87 \pm 0.09 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 121 \pm 17 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
34.2	0.3870	3.2142	
57.0	0.5822	4.8357	
85.5	0.7669	6.3699	
114.0	0.8597	7.1407	
142.5	0.9980	8.2891	
171.0	1.0424	8.6576	
228.0	1.0920	9.0699	
285.0	1.1762	9.7689	
285.0	1.1623	9.6533	
427.5	1.1510	9.5595	
570.0	1.1235	9.3314	
855.0	0.9466	7.8634	
1140.0	0.9086	7.5469	



- pH 6.25

**Taula IV.282.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 3233 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
17.1	0.3446	1.9034	
34.2	0.6174	3.0959	
57.0	0.9122	5.0382	
85.5	1.3609	7.5171	
114.0	1.5519	8.5715	
142.5	1.7158	9.4773	
171.0	1.9226	10.6193	
228.0	1.9432	10.7328	
285.0	1.9454	10.7452	
342.0	2.0646	11.4073	
427.5	2.0808	11.4932	
570.0	1.9534	10.7892	
855.0	1.7070	9.4285	
1140.0	1.5903	8.7840	

- pH 6.50

**Taula IV.283.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 4646 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
17.1	0.4258	1.6367	
34.2	0.7831	3.0097	
57.0	1.2830	4.9312	
114.0	1.9293	7.4154	
171.0	2.3762	9.1329	
228.0	2.5358	9.7466	
285.0	2.8603	10.9936	
342.0	2.6780	10.2932	
427.5	2.6584	10.2175	
570.0	2.7364	10.5176	
855.0	2.2700	8.7239	
1140.0	1.9792	7.6071	

- pH 6.75

**Taula IV.284.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 6410 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
17.1	0.5924	1.6502	$k_{\text{cat}} = 20 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 147 \pm 19 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 0.9 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 136 \pm 24 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
34.2	1.1113	3.9589	
57.0	1.9223	5.3553	
114.0	2.9373	8.1827	
228.0	3.7478	10.4406	
285.0	3.9916	11.1198	
342.0	3.8388	10.6942	
427.5	4.0492	11.2804	
570.0	3.6890	10.2769	
855.0	3.2947	9.1785	
1140.0	3.1358	8.7357	

- pH 7.00

**Taula IV.285.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 8513 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
17.1	0.7406	1.5535	$k_{\text{cat}} = 15.0 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 129 \pm 16 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 1.4 \pm 0.2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 116 \pm 21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
34.2	1.4155	2.9692	
57.0	2.0889	4.3817	
114.0	3.4184	7.1706	
171.0	3.9679	8.3231	
228.0	4.1174	8.6367	
285.0	4.1969	8.8036	
342.0	4.2873	8.9931	
427.5	4.5489	9.5420	
570.0	4.3478	9.1200	
855.0	4.2061	8.8229	
1140.0	3.6790	7.7171	

- pH 7.50

**Taula IV.286.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 14783 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
28.5	1.0097	1.2197	
57.0	1.8818	2.2731	
85.5	2.4866	3.0037	
142.5	3.2184	3.8877	
256.5	3.7143	4.4865	
342.0	3.7348	4.5115	
342.0	4.3758	5.2858	
427.0	4.2949	5.1881	
570.0	4.3499	5.2544	
855.0	4.2390	5.1205	
1140.0	3.5719	4.3147	

- pH 8.00

**Taula IV.287.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.  
 $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}} (400 \text{ nm}) = 16475 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
28.5	0.6578	0.7130	
57.0	1.2357	1.3394	
85.5	1.5849	1.7178	
142.5	1.9933	2.1605	
256.5	2.6029	2.8212	
342.0	2.9455	3.1926	
513.0	3.3673	3.6498	
855.0	3.2588	3.5322	
1140.0	3.0508	3.3068	

- Recull dels resultats del perfil de pH

**Taula IV.288.** Resum dels paràmetres cinètics de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 en la hidròlisi del 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid a diferents pH. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, 40 °C, [wt] = 5.6 nM.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \mu\text{M}$	$K_{\text{I}} / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
4.55	14 ± 2	210 ± 46	1.5 ± 0.6	66 ± 2
5.00	10.7 ± 0.4	85 ± 8	2.8 ± 0.5	126 ± 17
5.50	11.8 ± 0.8	88 ± 13	1.7 ± 0.4	134 ± 29
6.00	17.7 ± 0.9	146 ± 13	0.87 ± 0.09	121 ± 17
6.25	23 ± 2	174 ± 27	0.8 ± 0.1	132 ± 32
6.50	23 ± 2	218 ± 34	0.6 ± 0.1	106 ± 26
6.75	20 ± 1	147 ± 19	0.9 ± 0.2	136 ± 24
7.00	15.0 ± 0.9	129 ± 16	1.4 ± 0.2	116 ± 21
7.50	8.1 ± 0.9	149 ± 34	1.7 ± 0.6	54 ± 18
8.00	5.6 ± 0.6	199 ± 36	2.4 ± 0.9	28 ± 8

**IV.5.2. Perfil d'activitat enzimàtica enfront de la temperatura per a la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814**

IV.5.2.1. Determinació de longituds d'ona i absortivitats

Es realitzen els espectres del 4-nitrofenol i el 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid en tampó 50 mM fosfat, I = 0.15 M, pH 6.5, a cadascuna de les temperatures de treball. Donat que el pH de treball és superior a 6.0, les cinètiques se segueixen a 400 nm, determinant la variació d'absortivitat corresponent (apartat III.5.3) a cada temperatura.

**Taula IV.289.** Valors d'absortivitat del 4-nitrofenol i del 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid a 400 nm a les diferents temperatures de treball; també s'indica a cada temperatura la  $\Delta\epsilon$ , obtinguda com a diferència de les absortivitats anteriors, que s'utilitza en el càlcul de la velocitat inicial de reacció. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M.

Temperatura / °C	$\epsilon_{4\text{-nitrofenol}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{substrat}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
30	4825	21	4804
40	5150	20	5130
45	5264	21	5243
50	5486	22	5464
55	5744	25	5719
60	6030	26	6004
70	6778	31	6747
80	7208	33	7175

IV.5.2.2. Determinació dels paràmetres cinètics

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.5.8. S'ha determinat la velocitat d'hidròlisi espontània del 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid a la mateixa concentració de substrat a la que es realitzen les cinètiques en presència d'enzim. Les condicions de

Mètodes i materials: Biologia molecular

reacció són tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M, [G-4NP] = 588  $\mu$ M, a les diferents temperatures de treball (30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 i 80  $^{\circ}$ C). S'ha comprovat que la hidròlisi espontània és inferior a la velocitat d'hidròlisi en presència d'enzim en més de dos ordres de magnitud; de manera que s'ha considerat menyspreable en el càlcul de les velocitats enzimàtiques a les diferents temperatures.

Es comprova que les cinètiques realitzades en presència d'enzim a 50  $^{\circ}$ C o temperatures superiors deixen de ser lineals abans dels 10 minuts de reacció. En aquests casos, en l'ajust de la velocitat de reacció només es considera la zona lineal de la cinètica. A la taula IV.290 es recullen els resultats obtinguts.

**Taula IV.290.** Valors de la velocitat inicial d'hidròlisi en presència d'enzim, i del terme  $v_0/[E]_0$ , a les diferents temperatures de reacció indicades. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M, [G-pNP] = 588  $\mu$ M, [wt] = 5.6 nM.

Temperatura / $^{\circ}$ C	$v_0 \cdot 10^4 / \mu\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$
30	0.9777	3.6343
40	2.0893	7.2725
45	3.0542	10.402
50	3.8307	12.519
55	4.9769	15.540
60	5.6379	16.768
70	0.9666	2.4053
80	0.7521	1.8719

### IV.5.3. Anàlisi de Hammett de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

#### IV.5.3.1. Determinació de la concentració de les solucions de substrat per espectrofotometria d'UV-vis

Se segueix l'apartat III.5.4. Després de realitzar l'escombrat d'absorbàncies entre 250 i 600 nm, per a cada substrat s'han escollit les longituds d'ona que es presenten en la taula IV.291.

**Taula IV.291.** Resum de les longituds d'ona i absortivitats emprades per a la determinació espectrofotomètrica de la concentració dels diferents substrats. La determinació de l'absortivitat dels substrats s'ha realitzat en aigua Milli-Q, a 30  $^{\circ}$ C.

Substrat	$\lambda$ determinació [S] / nm	$\epsilon$ determinació [S] / $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
G-P	266	289
G-4BrP	275	1428
G-3NP	270	6914
G-MU	316	14546
G-2NP	263	4316
G-4NP	301	8236
G-3,5DNP	327	2377
G-3,4DNP	290	6132
G-2,3DNP	263	7110
G-2,4DNP	280	17248

#### IV.5.3.2. Determinació de longituds d'ona i absortivitats per al seguiment de la reacció

Per a cada substrat emprat s'enregistren els espectres d'absorbància tant de l'aglicona com del substrat en un marge de longituds d'ona d'entre 250 i 600 nm. Les condicions de l'assaig són també 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C. S'escull la longitud d'ona a la que se segueixen les cinètiques, aplicant els criteris ja esmentats a l'apartat III.5.3, i es determina la variació d'absortivitat corresponent.

**Taula IV.292.** Valors d'absortivitat dels diferents substrats i aglicones, i  $\Delta\epsilon$  emprada en el càlcul de la velocitat inicial d'hidròlisi, a les diferents longituds d'ona triades per al seguiment de la reacció. Condicions de reacció: també 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C.

Aglicona	$\lambda$ / nm	$\epsilon_{\text{aglicona}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{substrat}} / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon / \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
2,4DNP	400	2201	23	2178
2,3DNP	420	2477	2	2475
3,4DNP	400	9038	85	8953
3,5DNP	400	887	13	874
4NP	400	5107	19	5088
2NP	379	1706	247	1459
MU	355	2069	83	1986
3NP	385	299	75	224
4Br	288	1234	325	909
P	270	1611	197	1414

#### IV.5.3.3. Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge de la $\beta$ -glucosidasa

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.5.6. Donat que la disponibilitat de substrats és suficient, per a cada substrat es realitzen dues cinètiques diferents. Les condicions de reacció són també 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, i la concentració d'enzim addient en cada cas. S'ha determinat la velocitat d'hidròlisi espontània del 2',4'-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid, que és el substrat més activat de tots els que s'han emprat, a les mateixes condicions de reacció a les que es realitzen les anàlisis de Hammett. S'ha comprovat que la hidròlisi espontània és inferior a la velocitat d'hidròlisi en presència d'enzim en més de dos ordres de magnitud; de manera que s'ha considerat menyspreable en el càlcul dels paràmetres cinètics tant per a aquest substrat com per a la resta de substrats estudiats. Els paràmetres cinètics s'han obtingut per ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació III.7).

- G-2,4DNP (41)

**Taula IV.293.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 8.15 nM, substrat: G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 2178 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
1.0	0.4459	2.5122	$k_{\text{cat}} = 28 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 9.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 0.18 \pm 0.02 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 2828 \pm 358 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
2.0	0.8172	4.6036	
4.0	1.3180	7.4248	
6.0	1.8792	10.5864	
9.9	2.4411	13.7521	
11.9	2.6732	14.4814	
19.9	3.1423	17.7026	
39.7	3.2617	18.3753	
79.4	3.1393	17.6857	
119.1	2.8492	16.0514	

**Taula IV.294.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 6.35 nM, substrat: G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 2178 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
1.2	0.5872	4.2460	$k_{\text{cat}} = 33 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 6.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 0.33 \pm 0.05 \text{ mM}$ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 5435 \pm 593 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
2.3	1.2083	8.7363	
4.6	1.9663	14.2170	
7.0	2.4910	18.0113	
11.6	2.9728	21.4947	
13.9	3.1626	22.8672	
23.2	3.4133	24.6798	
34.8	3.5148	25.4135	
69.6	3.4557	24.9862	
116.0	3.3047	23.8945	
139.2	3.1577	22.8461	

- *G-2,3DNP* (40)

**Taula IV.295.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 12.5 nM, substrat: G-2,3DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (420 nm) = 2475 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,3DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 12.7 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 18 \pm 2 \mu\text{M}$ $K_I = 2 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 707 \pm 134 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
2.8	0.4471	1.4453	
5.5	0.6208	2.0286	
7.7	1.3137	4.2462	
8.3	1.1752	3.7985	
11.1	1.5144	4.8950	
16.6	1.9847	6.4151	
22.1	2.2881	7.3958	
33.2	2.5454	8.2275	
44.2	2.7226	8.8002	
66.4	2.9632	9.5779	
88.5	3.1501	10.1820	
110.6	3.1354	10.1345	
13.38	3.3327	10.7725	
165.9	3.3312	10.7674	
193.6	3.3424	10.8037	

**Taula IV.296.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 12.7 nM, substrat: G-2,3DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (420 nm) = 2475 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,3DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 10.6 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 12 \pm 2 \mu\text{M}$ $K_I = 2 \pm 1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 862 \pm 200 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
1.5	0.1445	0.4624	
1.9	0.5952	1.9041	
4.8	0.6739	2.1558	
7.7	1.3771	4.4051	
9.6	1.3796	4.4131	
11.6	1.7501	5.5982	
19.3	2.1570	6.8999	
48.1	2.6053	8.3340	
96.3	2.7345	8.7475	
192.5	2.8768	9.2087	
288.8	2.7628	8.8379	
385.0	2.7608	8.8314	



- G-3,4DNP (39)

**Taula IV.297.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 4.2 nM, substrat: G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 8953 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
3.5	0.5396	1.4435	$k_{\text{cat}} = 21 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 77 \pm 10 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 2.2 \pm 0.6 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 277 \pm 53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
8.6	0.9782	2.6170	
17.3	1.4002	3.7461	
25.9	1.6624	4.4475	
34.5	1.8735	5.0121	
45.6	2.9278	7.8327	
51.8	3.3694	9.0143	
69.0	3.8249	10.2328	
86.3	4.4680	11.9532	
136.8	5.0833	13.5995	
172.5	4.4325	14.5932	
182.4	5.2390	14.0694	
228.0	5.4260	14.5163	
342.0	5.6244	15.0470	
456.0	5.6373	15.0815	
517.5	5.6489	15.1125	
690.0	5.5506	14.8497	
1140.0	4.6483	14.0657	

**Taula IV.298.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 4.25 nM, substrat: G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 8953 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
6.0	0.6427	1.6892	$k_{\text{cat}} = 15.1 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 50 \pm 4 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 4.2 \pm 0.7 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 302 \pm 32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
12.0	1.2104	3.1811	
18.0	1.4856	3.9043	
23.9	1.9103	5.0204	
59.8	3.1075	8.1667	
119.5	3.8669	10.1625	
179.8	4.2838	11.2582	
239.0	4.4968	11.8179	
358.5	4.8020	12.6201	
478.0	4.6376	12.1881	
597.5	4.7882	12.5839	
717.0	4.8619	12.7177	
956.0	4.3803	11.5118	
1171.0	4.2543	11.1808	

- *G-3,5DNP (38)*

**Taula IV.299.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 16.7 nM, substrat G-3,5DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 874 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,5DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
11.9	0.4407	3.0192	
23.8	0.8260	5.6575	
35.7	1.1754	8.0531	
47.6	1.4386	9.8562	
59.6	1.7011	11.6550	
104.4	2.1005	14.3908	
139.2	2.4018	16.4554	
278.4	2.6461	18.1291	
417.7	2.7804	19.0493	
556.9	2.8780	19.7181	
870.1	2.8891	19.7943	
1044.2	2.7995	19.1804	
1218.2	2.9014	19.8782	
1392.2	2.8381	19.4444	
1740.3	2.8468	19.5040	

**Taula IV.300.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 17 nM, substrat G-3,5DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 874 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,5DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
14.3	0.5216	3.5105	
43.0	1.2358	8.3173	
57.3	1.5768	10.6122	
71.6	1.7549	11.8112	
143.2	2.0152	13.5629	
286.4	2.1858	14.7111	
429.6	2.3057	15.5182	
895.0	2.4014	16.1620	
1253.0	2.3829	16.0378	
1790.0	2.2375	15.0593	

- G-4NP (73)

**Taula IV.301.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 8.35 nM, substrat G-4NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5088 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
2.1	0.5964	0.1404	$k_{\text{cat}} = 9.4 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 116 \pm 11 \mu\text{M}$ $K_I = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 81 \pm 12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
4.2	1.0617	0.2499	
6.3	1.5175	0.3572	
8.5	2.1953	0.5167	
16.9	4.3981	1.0352	
25.4	7.1282	1.6778	
33.8	7.6495	1.8005	
42.3	12.0461	2.6000	
67.6	15.1506	3.5661	
84.5	16.6269	3.9136	
169.0	21.2446	5.0005	
338.0	23.7304	5.5853	
507.0	22.1302	5.2090	
676.0	18.1558	4.8727	
845.0	19.7962	4.6596	
1268.0	16.4527	3.8726	
1690.0	14.6707	3.4232	

**Taula IV.302.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 8.5 nM, substrat G-4NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5088 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
4.1	0.9988	0.2309	$k_{\text{cat}} = 6.9 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 91 \pm 8 \mu\text{M}$ $K_I = 1.3 \pm 0.1 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 76 \pm 11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
16.4	4.0822	0.9439	
32.7	7.7799	1.8035	
65.4	12.3024	2.8446	
163.5	18.2993	4.2313	
327.0	19.7540	4.5676	
490.5	18.7630	4.3385	
817.5	16.8561	3.8975	
1226.3	15.1467	3.5023	
1635.0	13.4132	3.1015	

- G-2NP (74)

**Taula IV.303.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 25 nM, substrat G-2NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (379 nm) = 1459 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
2.4	1.8748	0.5069	
3.6	2.4290	0.6568	
4.8	4.5776	1.2377	
7.1	6.9835	1.8883	
9.5	9.3558	2.5298	
10.7	9.8134	2.6535	
11.9	12.7865	3.4554	
13.1	13.5070	3.6522	
14.3	10.8136	2.9239	
28.6	15.5317	4.1997	
42.8	17.7932	4.8112	
71.4	17.8548	4.8278	
142.5	9.8508	3.7413	
238.0	10.6913	2.8909	
380.8	9.4879	2.5655	
476.0	8.4835	2.2939	
714.0	7.1420	1.9312	
952.0	6.0516	1.6363	

**Taula IV.304.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 25.5 nM, substrat G-2NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (379 nm) = 1459 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
2.3	0.2036	0.0547	
9.4	3.7264	1.0016	
14.0	13.5858	3.6517	
42.1	15.7491	4.2331	
70.2	16.3684	4.3996	
140.4	12.6259	3.3937	
351.0	8.1831	2.1995	
702.0	6.2858	1.6895	
936.0	5.9085	1.5881	
936.0	5.9750	1.6060	

- G-MU (75)

**Taula IV.305.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 8.35 nM, substrat G-MU,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1986 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-MU] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.9	0.0720	0.0434	
1.9	0.8186	0.4936	
2.8	1.9082	1.1507	
7.8	2.3907	1.4416	
9.4	2.9910	1.8036	
12.5	3.6199	2.1829	
15.7	4.7321	2.8536	
31.3	7.4724	4.5060	
78.3	12.2731	7.4010	
156.6	15.0483	9.0745	
234.9	16.8067	10.1348	
313.2	17.7199	10.6855	
469.8	17.4978	10.5516	
626.4	18.1095	10.9205	
783.0	17.8312	10.7526	
939.6	16.7249	10.0855	
1252.9	16.2446	9.7959	

**Taula IV.306.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 8.5 nM, substrat G-MU,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1986 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-MU] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^5 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
1.9	0.2347	0.1390	
16.1	3.9570	2.3440	
32.2	6.1522	3.6445	
80.5	10.4953	6.2172	
161.0	12.5746	7.4490	
241.5	12.9271	7.6578	
322.0	13.8197	8.1865	
483.0	14.1934	8.4079	
805.0	14.1489	8.3816	
1288.0	12.9909	7.6956	

- *G-3NP (37)*

**Taula IV.307.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 66.8 nM, substrat G-3NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (385 nm) = 224 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 15 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 234 \pm 52 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 1.2 \pm 0.4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 64 \pm 22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
15.6	0.1384	0.9249	
31.3	0.1852	1.2378	
46.9	0.2520	1.6843	
62.6	0.4251	2.8406	
93.8	0.6966	4.6554	
93.8	0.7002	4.6793	
156.3	0.9261	6.1893	
187.7	1.0411	6.9593	
312.8	1.1290	7.5452	
469.1	1.2040	8.0461	
625.5	1.1976	8.0034	
625.5	1.1727	7.8372	
928.3	1.1518	7.6972	
1251.0	1.0705	7.1541	
1563.8	0.9737	6.5076	

**Taula IV.308.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 68 nM, substrat G-3NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (385 nm) = 224 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 16 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ $K_{\text{M}} = 251 \pm 51 \mu\text{M}$ $K_{\text{I}} = 1.1 \pm 0.3 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 64 \pm 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
31.7	0.1944	1.2762	
63.4	0.4494	2.9504	
95.1	0.7213	4.7355	
95.1	0.7194	4.7232	
190.2	0.9602	6.3036	
475.5	1.2511	8.2134	
634.0	1.2306	8.0792	
951.0	1.1693	7.6767	
1268.0	1.0386	6.8181	
1585.0	0.9351	6.1387	

- G-4BrP (36)

**Taula IV.309.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 200 nM, substrat G-4BrP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (288 nm) = 909 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4BrP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 3.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 461 \pm 31 \mu\text{M}$ $K_I = 29 \pm 11 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 7.2 \pm 0.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
64.7	0.8449	0.4647	
129.4	1.3465	0.7407	
258.8	2.1231	1.1678	
388.2	2.5968	1.4284	
517.6	3.1765	1.7473	
647.0	3.4964	1.9232	
970.5	3.9469	2.1710	
1294.0	4.3133	2.3726	
1617.5	4.4912	2.4704	
1941.0	4.6130	2.5374	
2264.5	4.6468	2.5560	
2588.0	4.7106	2.5911	
3170.3	4.7852	2.6321	

**Taula IV.310.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 200 nM, substrat G-4BrP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (288 nm) = 909 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4BrP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 3.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 472 \pm 33 \mu\text{M}$ $K_I = 27 \pm 10 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 7.1 \pm 0.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
64.7	0.7364	0.4051	
129.4	1.2564	0.6911	
258.8	2.1218	1.1671	
388.2	2.8225	1.5525	
517.6	3.1766	1.7473	
647.0	3.3900	1.8647	
970.5	3.9108	2.1511	
1294.0	4.3549	2.3955	
1941.0	4.5801	2.5193	
2264.5	4.7517	2.6139	
2588.0	4.7393	2.6069	
3170.3	4.7754	2.6267	

- G-P (76)

**Taula IV.311.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 668 nM, substrat G-P,  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (270 nm) = 1414 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) \cdot 10^1 / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.041	0.0773	0.082	$k_{\text{cat}} = 0.70 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.1 \pm 0.3 \text{ mM}$ $K_I = 11 \pm 2 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.34 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.082	0.2898	0.307	
0.164	0.6103	0.646	
0.245	0.7542	0.789	
0.614	1.5600	1.652	
0.818	1.7049	1.805	
1.018	2.1196	2.244	
1.227	2.2350	2.366	
1.636	2.7304	2.891	
2.045	2.9657	3.140	
2.863	3.1281	3.434	
3.270	3.2437	3.625	
3.480	3.4240	3.678	
3.480	3.4156	3.616	
4.640	3.4739	3.933	
5.800	3.7151	3.782	
6.960	3.5731	3.733	
9.280	3.5263	3.206	

**Taula IV.312.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [wt] = 680 nM, substrat G-P,  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (270 nm) = 1414 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) \cdot 10^1 / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
0.097	0.2411	0.2507	$k_{\text{cat}} = 0.6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.6 \pm 0.8 \text{ mM}$ $K_I = 21 \pm 13 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.2 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.291	0.6850	0.7124	
0.486	1.0233	1.0643	
0.971	1.6344	1.6998	
1.699	2.1966	2.2845	
2.428	2.5674	2.6701	
3.480	3.3214	3.4543	
6.960	3.5527	3.6948	
9.280	3.4313	3.5686	



- Recull dels resultats de l'enzim salvatge de la  $\beta$ -glucosidasa amb diferents substrats cromofòrics

**Taula IV.313.** Resum dels paràmetres cinètics obtinguts en les anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C.

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \mu\text{M}$	$K_{\text{I}} / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
G-2,4DNP	28 ± 1	9.8 ± 0.8	0.18 ± 0.02	2828 ± 358
G-2,4DNP	33 ± 1	6.1 ± 0.5	0.33 ± 0.05	5435 ± 593
G-2,3DNP	12.7 ± 0.8	18 ± 2	2 ± 2	707 ± 134
G-2,3DNP	10.6 ± 0.7	12 ± 2	2 ± 1	862 ± 200
G-3,4DNP	21 ± 1	77 ± 10	2.2 ± 0.6	277 ± 53
G-3,4DNP	15.1 ± 0.4	50 ± 4	4.2 ± 0.7	302 ± 32
G-3,5DNP	23.0 ± 0.6	63 ± 4	10 ± 3	363 ± 34
G-3,5DNP	18.0 ± 0.8	45 ± 6	12 ± 5	399 ± 70
G-4NP	9.4 ± 0.5	116 ± 11	1.0 ± 0.1	81 ± 12
G-4NP	6.9 ± 0.3	91 ± 8	1.3 ± 0.1	76 ± 11
G-2NP	8 ± 1	20 ± 4	0.18 ± 0.05	497 ± 136
G-2NP	8 ± 3	25 ± 17	0.18 ± 0.11	300 ± 300
G-MU	13.4 ± 0.4	61 ± 4	4.1 ± 0.7	220 ± 21
G-MU	10.0 ± 0.3	54 ± 5	5 ± 1	187 ± 23
G-3NP	15 ± 2	234 ± 52	1.2 ± 0.4	64 ± 22
G-3NP	16 ± 2	251 ± 51	1.1 ± 0.3	64 ± 21
G-4Br	3.3 ± 0.1	461 ± 31	29 ± 11	7.2 ± 0.7
G-4Br	3.3 ± 0.1	472 ± 33	27 ± 10	7.1 ± 0.7
G-P	0.70 ± 0.06	2070 ± 280	11 ± 2	0.34 ± 0.07
G-P	0.6 ± 0.1	2610 ± 750	21 ± 13	0.2 ± 0.1

IV.5.3.4. Determinació dels paràmetres cinètics del mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa

Se segueix el procediment descrit a l'apartat III.5.6. Per a cada substrat es realitza una cinètica completa per tal de poder determinar els paràmetres cinètics. Les condicions de reacció són tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, i la concentració d'enzim addient en cada cas. S'ha determinat la velocitat d'hidròlisi espontània del 2',4'-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid, que és el substrat més activat de tots els que s'han emprat, a les mateixes condicions de reacció a les que es realitzen les anàlisis de Hammett. S'ha comprovat que la hidròlisi espontània és inferior a la velocitat d'hidròlisi en presència d'enzim en més de dos ordres de magnitud; de manera que s'ha considerat menyspreable en el càlcul dels paràmetres cinètics tant per a aquest substrat com per a la resta de substrats estudiats. Es presenten els paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten (equació III.8). Només en el cas del 2'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid i el 4'-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopirànòsid l'ajust és millor emprant l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació III.7).

- G-2,4DNP (41)

**Taula IV.314.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 2.5 nM, substrat: G-2,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 2178 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
0.9	0.0818	1.5401	$k_{\text{cat}} = 47.9 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$
1.0	0.2027	3.8140	
1.5	0.3703	6.9674	$K_{\text{M}} = 9.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$
2.0	0.4131	7.7738	
4.0	0.6618	12.4523	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 5322 \pm 433 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
6.0	1.0631	20.0043	
11.9	1.4732	27.7219	
19.9	1.8458	34.7333	
39.7	2.0389	38.3658	
59.6	2.2302	41.9657	
71.4	2.3096	43.4601	
119.1	2.3564	44.3410	
198.5	2.3726	44.6460	

- G-2,3-DNP (40)

**Taula IV.315.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 5 nM, substrat G-2,3DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (420 nm) = 2475 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2,3DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
1.9	0.3355	2.6681	$k_{\text{cat}} = 26.8 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$
4.6	0.7547	6.0028	
9.3	1.2936	10.2890	$K_{\text{M}} = 12 \pm 1 \mu\text{M}$
13.9	1.9851	15.7883	
18.6	2.2202	17.6586	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 2233 \pm 228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
37.1	2.7052	21.5156	
74.2	2.8781	22.8911	
92.8	2.9498	23.4617	
111.4	3.1090	24.7277	
129.9	3.1664	25.1839	
185.6	3.0686	24.4061	
232.0	3.2909	26.1747	
278.4	3.1553	25.0955	
371.2	3.1614	25.1440	

- G-3,4DNP (39)

**Taula IV.316.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 3 nM, substrat G-3,4DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 8953 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,4DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 15.2 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 34 \pm 1 \mu\text{M}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 447 \pm 16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
6.0	0.6262	2.3315	
12.0	1.0696	3.9823	
17.9	1.4331	5.3355	
23.9	1.6214	6.0369	
59.8	2.5464	9.4807	
119.5	3.1623	11.7736	
179.3	3.5004	13.0326	
239.0	3.5515	13.2227	
358.5	3.6604	13.6282	
478.0	3.7795	14.0717	
597.5	3.8945	14.4997	

- G-3,5DNP (38)

**Taula IV.317.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 12 nM, substrat G-3,5DNP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 874 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3,5DNP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 18.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 59 \pm 3 \mu\text{M}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 320 \pm 20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
23.3	0.4842	4.6168	
46.6	0.8476	8.0816	
69.9	1.0925	10.4170	
77.7	1.2000	11.4428	
194.3	1.4974	14.2775	
388.5	1.7330	16.5238	
582.8	1.8451	17.5926	
777.0	1.8402	17.5454	
1165.5	1.8643	17.7757	
1554.0	1.8991	18.1071	
1554.0	1.8944	18.0624	

- G-4NP (73)

**Taula IV.318.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 8 nM, substrat G-4NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (400 nm) = 5088 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
32.7	0.8398	2.0632	
65.4	1.3692	3.3638	
81.8	1.6407	4.0309	
163.5	2.3338	5.7336	
327.0	2.8313	6.9559	
490.5	2.9916	7.5923	
654.0	3.2491	7.9824	
817.5	3.3837	8.3128	
1226.3	3.3824	8.3097	
1635.0	3.0911	7.9483	
2043.8	3.2382	7.9554	

- G-2NP (74)

**Taula IV.319.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 16 nM, substrat G-2NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (379 nm) = 1459 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-2NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4$ / uAbs·s <sup>-1</sup>	$(v_0/[E]_0)$ / s <sup>-1</sup>	Paràmetres cinètics:
2.3	0.2674	1.1454	
4.7	0.4447	1.9052	
11.7	1.0090	4.3222	
23.4	1.5255	6.5350	
35.1	1.9469	8.3401	
46.8	2.1001	8.9962	
70.2	2.2561	9.6647	
140.4	2.4298	10.4008	
140.4	2.4365	10.4373	
234.0	2.5126	10.7633	
234.0	2.5336	10.8534	
351.0	2.3354	10.0041	
468.0	2.2005	9.4265	

- G-MU (75)

**Taula IV.320.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 12 nM, substrat G-MU,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (355 nm) = 1986 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-MU] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
16.2	0.3474	1.4577	
32.4	0.5902	2.4766	
81.0	1.1411	4.7882	
162.0	1.6073	6.7443	
243.0	1.8230	7.6493	
324.0	1.9885	8.3439	
486.0	2.0498	8.6002	
648.0	2.1657	9.0872	
810.0	2.2432	9.4124	
972.0	2.2950	9.6300	
1134.0	2.3059	9.6758	
1296.0	2.3342	9.7945	
1587.6	2.3216	9.7416	

- G-3NP (37)

**Taula IV.321.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 48 nM, substrat G-3NP,  $\Delta\epsilon_{\text{hidròlisi}}$  (385 nm) = 224 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-3NP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:
34.5	0.2537	2.3597	
69.0	0.4837	4.4986	
103.5	0.7291	6.7814	
138.0	0.8112	7.5447	
172.5	0.9274	8.6250	
345.0	1.2238	11.3818	
345.0	1.2443	11.5730	
690.0	1.3448	12.5074	
1035.0	1.3850	12.8813	
1380.0	1.4328	12.3261	
1725.0	1.4838	12.8000	
2070.0	1.4865	13.8253	

- G-4BrP (36)

**Taula IV.322.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 56 nM, substrat: G-4BrP,  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (288 nm) = 909 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-4BrP] / $\mu\text{M}$	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 10.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 411 \pm 12 \mu\text{M}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 25 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
97.1	0.8192	1.6092	
129.4	1.0524	2.0675	
258.8	1.6408	3.2232	
388.2	2.0135	3.9555	
517.6	2.5856	5.0794	
647.0	2.6998	5.3038	
647.0	2.7309	5.3648	
970.5	3.2127	6.3114	
1294.0	3.5538	6.9813	
1617.5	3.7942	7.4536	
1941.0	3.8243	7.5127	
2264.5	3.8274	7.5188	
2588.0	3.9455	7.7505	
3170.3	3.7889	7.4432	

- G-P (76)

**Taula IV.323.** Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C, [C181A] = 240 nM, substrat: G-P,  $\Delta\varepsilon_{\text{hidròlisi}}$  (270 nm) = 1414 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

[G-P] / mM	$v_0 \cdot 10^4 / \text{uAbs} \cdot \text{s}^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / \text{s}^{-1}$	Paràmetres cinètics:  $k_{\text{cat}} = 1.30 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 2.8 \pm 0.4 \text{ mM}$  $k_{\text{cat}}/K_M = 0.48 \pm 0.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
0.2	0.2323	0.0685	
0.3	0.5281	0.1556	
0.7	0.8927	0.2631	
1.4	1.4414	0.4247	
2.1	1.9170	0.5649	
2.8	2.1682	0.6389	
3.5	2.4415	0.7195	
5.2	2.8647	0.8441	
6.9	3.4477	1.0159	
6.9	2.9169	0.8595	
8.7	3.2782	0.9660	

- Recull dels resultats del mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa amb diferents substrats cromofòrics

**Taula IV.324.** Resum dels paràmetres cinètics obtinguts en les anàlisis de Hammett del mutant C181A de la  $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, I = 0.15 M, 30 °C.

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \mu\text{M}$	$K_{\text{I}} / \text{mM}$	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
G-2,4DNP	$47.9 \pm 0.7$	$9.0 \pm 0.6$	----	$5322 \pm 433$
G-2,3DNP	$26.8 \pm 0.5$	$12 \pm 1$	----	$2233 \pm 228$
G-3,4DNP	$15.2 \pm 0.1$	$34 \pm 1$	----	$447 \pm 16$
G-3,5DNP	$18.9 \pm 0.2$	$59 \pm 3$	----	$320 \pm 20$
G-4NP	$10.1 \pm 0.2$	$126 \pm 7$	$10 \pm 2$	$80 \pm 6$
G-2NP	$14.0 \pm 0.5$	$25 \pm 2$	$1.1 \pm 0.2$	$560 \pm 65$
G-MU	$10.49 \pm 0.08$	$95 \pm 3$	----	$110 \pm 4$
G-3NP	$14.9 \pm 0.3$	$131 \pm 10$	----	$114 \pm 11$
G-4Br	$10.3 \pm 0.1$	$411 \pm 12$	----	$25 \pm 1$
G-P	$1.30 \pm 0.07$	$2800 \pm 400$	----	$0.48 \pm 0.09$