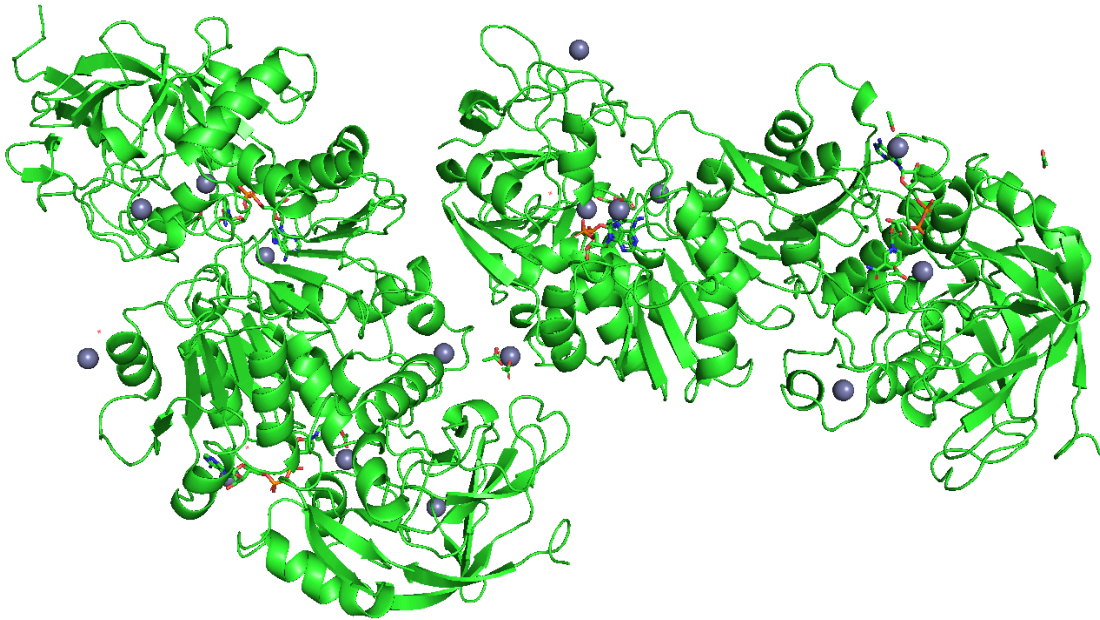


# Treball de recerca

## ENZIMS A LA CARTA

La mutació d'enzims per millorar les seves capacitats



Bernat Monje Mèlich

Ana Isabel Ruiz Raigón

2.2. BATX

Cornellà de Llobregat, 31/10/2024

Institut Francesc Macià





# Abstract

La creciente demanda de productos en la industria y la necesidad de trabajar sin perjudicar el medio ambiente es un problema a la alza. El uso de los productos químicos convencionales hace las reacciones industriales poco eficientes y muy contaminantes. Una alternativa pueden ser las enzimas, biocatalizadores que trabajan más rápidamente y contaminando menos que los agentes químicos convencionales. Gracias a la capacidad de mutar proteínas desarrollada en los últimos tiempos, podemos hacer que las enzimas trabajen para nosotros, haciendo los procesos industriales más eficientes.

El actual estudio busca desarrollar una enzima que mejore su capacidad catalizadora respecto a un sustrato alternativo, para demostrar el posible uso en la industria.

Como resultado del trabajo, se ha desarrollado un modelo digital de una enzima, que reduce sustancialmente la energía necesaria para catalizar un sustrato diferente al natural de esa enzima.

Dicho modelo se desarrolló mediante el programa "PyMOL", que tiene la capacidad de mostrar y modificar todo tipo de proteínas y, además, usando herramientas alternativas para calcular y comparar las energías.

Después de observar los resultados, se concluye que la implantación de la mutación de enzimas en la industria es viable gracias a su capacidad de catalizar el sustrato que se desee.

---

The growing demand for industrial products and the need to work without affecting the environment is a growing problem. The use of conventional chemical products makes industrial reactions inefficient and very polluting. An alternative can be enzymes, biocatalysts that work more quickly and pollute less than conventional chemical agents. Thanks to the ability to mutate proteins developed in recent times, we can make enzymes work for us, making industrial processes more efficient.

The current study aims to develop an enzyme that improves its catalytic capacity with respect to an alternative substrate, to demonstrate its possible use in industry.

As a result of the work, a digital model of an enzyme has been developed, which substantially reduces the energy needed to catalyze a substrate other than the natural one of this enzyme.

This model was developed using the “PyMOL” program, which has the capacity to show and modify all types of proteins and, in addition, using alternative tools to calculate and compare energies.

After observing the results, it is concluded that the implementation of enzyme mutation in the industry is viable thanks to its ability to catalyze the wanted substrate.

---

# Agraïments

Abans de començar, m'agradaria agrair a totes les persones que m'han ajudat, inspirat i recolzat en tot moment.

Primer de tot, vull donar les gràcies a la meva tutora del Treball de recerca, l'Anabel Ruiz, que sempre m'ha ajudat i ha tingut paciència amb mi en tots els moments del treball. A més a més, m'ha donat l'autonomia que necessitava i l'ajuda i el suport en altres moments, fent que em sentís molt a gust durant aquests mesos.

Per altra banda, també vull agrair a la meva tutora de la Universitat de Barcelona, la Marina Corbella Morato, que m'ha ajudat i m'ha ensenyat el funcionament del programa informàtic. Cal afegir que sempre s'ha mostrat disposada a ajudar-me, cosa que ha fet que em sentís molt segur en tot moment.

Finalment, fer una menció especial a la meva família, que m'ha ajudat i donat suport en tot moment.

# Índex

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓ</b>                                                 | <b>6</b>  |
| <b>2. MARC TEÒRIC</b>                                                 | <b>8</b>  |
| 2.1. Enzims                                                           | 8         |
| 2.1.1. Història dels enzims                                           | 8         |
| 2.1.2. Què fa especials els enzims?                                   | 10        |
| 2.1.3. Parts d'un enzim                                               | 11        |
| 2.1.4. Estructura proteica dels enzims                                | 12        |
| 2.1.5. Funcionament                                                   | 16        |
| 2.1.6. Centre actiu de l'enzim                                        | 17        |
| 2.1.7. Dinàmica enzimàtica                                            | 18        |
| 2.1.8. Classificació d'enzims                                         | 20        |
| 2.2. Unions                                                           | 22        |
| 2.2.1. Enllaços químics                                               | 22        |
| 2.2.1.1. Enllaç iònic                                                 | 23        |
| 2.2.1.2. Enllaç covalent                                              | 23        |
| 2.2.1.2.1. Enllaç $\pi$                                               | 24        |
| 2.2.1.3. Enllaç metàl·lic                                             | 24        |
| 2.3. Interaccions intermoleculars                                     | 24        |
| 2.3.1. Energia d'unió                                                 | 29        |
| 2.4. Reacció química que treballaré                                   | 29        |
| 2.4.1. Compostos bàsics de la reacció                                 | 29        |
| 2.4.1.1. Alcohols                                                     | 29        |
| 2.4.1.2. Aldehids                                                     | 30        |
| 2.4.1.3. Àcids carboxílics                                            | 30        |
| 2.4.2. Metabolisme dels alcohols                                      | 31        |
| 2.5. Lligands                                                         | 31        |
| 2.5.1. Etanol                                                         | 32        |
| 2.5.2. Alcohol 4-aminofenèl·lic                                       | 33        |
| 2.6. Enzim                                                            | 34        |
| 2.6.1. Alcohol deshidrogenasa                                         | 35        |
| 2.6.1.1. Enzim 1AGN                                                   | 35        |
| 2.7. Reaccions entre l'enzim i els substrats                          | 36        |
| 2.7.1. Procés general                                                 | 36        |
| 2.8. Indústria                                                        | 40        |
| 2.8.1. Problemes mediambientals                                       | 41        |
| <b>3. ÀREA D'ESTUDI</b>                                               | <b>42</b> |
| 3.1. Programes informàtics usats pel desenvolupament del marc aplicat | 42        |
| 3.1.1. pyMOL                                                          | 42        |
| 3.1.2. gVim                                                           | 45        |
| 3.2. Webs necessàries pel desenvolupament del marc aplicat            | 45        |

|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| 3.2.1. Protein Data Bank                      | 45         |
| 3.2.2. DIY-molecules: build your own molecule | 46         |
| 3.2.3. De .pdb a .pqr                         | 47         |
| 3.2.4. APBS                                   | 48         |
| <b>4. MARC APLICAT</b>                        | <b>49</b>  |
| 4.1. Termodinàmica                            | 49         |
| 4.1.1. Sistemes termodinàmics                 | 49         |
| 4.1.2. Entalpia i entropia                    | 50         |
| 4.1.2.1. Entalpia                             | 50         |
| 4.1.2.2. Entropia                             | 50         |
| 4.1.3. L'energia lliure de Gibbs              | 50         |
| 4.1.4. Cicle termodinàmic                     | 51         |
| 4.2. Procés general de les mutacions          | 52         |
| 4.2.1. Preparació de l'enzim i el lligand     | 52         |
| 4.2.2. Mutació i càlcul a la web              | 61         |
| 4.3. Estudi                                   | 68         |
| 4.3.1. Pregunta del marc aplicat              | 68         |
| 4.3.2. Hipòtesi de l'optimització de l'enzim  | 68         |
| 4.3.3. Mutació de l'enzim                     | 68         |
| 4.3.3.1. Mutació 1                            | 68         |
| 4.3.3.2. Mutació 2                            | 73         |
| 4.3.3.3. Mutació 3                            | 76         |
| 4.3.3.4. Mutació 4                            | 80         |
| 4.3.3.5. Mutació 5                            | 83         |
| 4.3.3.6. Mutació 6                            | 91         |
| 4.3.3.7. Mutació 7                            | 95         |
| 4.3.4. Resultats                              | 101        |
| 4.3.5. Discussió                              | 109        |
| 4.3.6. Conclusions del marc aplicat           | 112        |
| <b>5. CONCLUSIONS GENERALS DEL TREBALL</b>    | <b>113</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b>                        | <b>116</b> |
| <b>7. ANNEXOS</b>                             | <b>121</b> |
| 7.1. Annex I. Tipus d'aminoàcids              | 121        |

# 1. INTRODUCCIÓ

Des de ben petit, he sigut una persona molt curiosa i fascinada pel funcionament del cos humà. Sempre he volgut saber com funciona realment cada òrgan i cada sistema que empra el nostre cos perquè sigui una màquina tan perfecta. Després de molts anys aprenent sobre el tema, cada dia sé una mica més d'aquest mecanisme tan complex que som nosaltres.

Quan va arribar el moment de decidir el tema del meu treball de recerca vaig dubtar molt, ja que no sabia exactament de què fer-ho. Malgrat això, sempre vaig tenir clar que el volia fer d'alguna cosa relacionada amb l'ésser humà.

Per sort, el programa forces de la Universitat de Barcelona em va donar l'oportunitat de ser tutoritzat per un professor de la universitat. Concretament, jo vaig escollir el treball de recerca d'"Enzims a la carta", que es basa en la modificació d'enzims gràcies a un programa d'ordinador. Aquest tema em va permetre treballar en els enzims que són molt importants al cos humà i, per altra banda, utilitzar un programa informàtic per fer-ho, que m'agrada molt.

Abans de començar el treball m'he preguntat: Són els enzims una alternativa verda a la síntesi d'aldehids a la indústria?

La meva hipòtesi és que sí que és possible implantar l'ús d'enzims a la síntesi d'aldehids en la indústria, ja que com que ara se sap mutar proteïnes, tenim la capacitat d'adaptar qualsevol enzim a qualsevol substrat. D'aquesta manera, es podria emprar l'enzim mutat en la indústria per reduir despeses econòmiques i reduir l'impacte ambiental en el planeta.

Per altra banda, m'he proposat altres objectius més específics com són:

- Comprendre quin és el funcionament dels enzims en el cos humà i perquè són tan importants per a la nostra vida.
- Saber quin és l'ús actual d'enzims en la indústria química per obtenir aldehids a partir d'alcohols.
- Aprendre a usar un programa de mutació de proteïnes i poder obtenir dades de la seva eficàcia respecte a l'energia d'unió.

Aquest serà un treball de recerca d'investigació, tot i que aquesta investigació no la faré a través d'experiments, sinó que ho faré amb l'ajuda d'un programa informàtic que em permetrà comparar els meus resultats.

Per intentar complir el meu objectiu, el primer que faré és fer un marc teòric on realitzaré una cerca bibliogràfica i documental sobre el tema per a adquirir coneixements sobre els enzims i el seu ús a la indústria.

Un cop hagi acabat el marc teòric em disposaré a fer el marc aplicat, en el que amb tot el que hagi après fins al moment intentaré mutar un enzim per reduir l'energia d'unió amb el substrat i així mostrar com seria un procés de modificació d'un enzim perquè ens catalitzi un compost químic per la indústria. Per fer-ho, primer, calcularé l'energia d'unió de la proteïna sense cap mutació sobre els dos lligands que escolliré. Més tard, per veure que es pot millorar l'energia d'unió d'enzims, mutaré una proteïna i faré el càlcul amb dos lligands diferents. Un cop hagi fet les mutacions, compararé les dades obtingudes amb els que no tenen mutacions i veuré si s'ha reduït l'energia d'unió respecte als inicials, d'aquesta forma intentaré demostrar que es podria implantar l'ús d'enzims a la indústria.

Per fer tot el marc aplicat empraré en moltes ocasions el programa PyMOL per fer mutacions i diverses webs per tractar els arxius, totes aquestes fonts estan detallades a l'[àrea d'estudi](#). Per altra banda, els resultats que extraure els mostraré en forma de taula i també en format gràfic, perquè sigui més visual.

## 2. MARC TEÒRIC

### 2.1. Enzims

Abans de tot, faré una definició bàsica dels enzims per situar-nos. Els enzims són proteïnes que tenen la capacitat d'accelerar reaccions químiques sense gastar-se

#### 2.1.1. Història dels enzims

Avui en dia els enzims són unes estructures molt importants que fan funcions vitals en el nostre cos i també tenen funcionalitat en la nostra societat. A més a més, amb les eines tecnològiques que tenim actualment sabem perfectament com funcionen, si més no, abans no era així, aquesta és la història de com es van descobrir els enzims:

Des de l'antiguitat, a l'època dels grecs, ja coneixien algunes substàncies que podien descompondre matèria, però no sabien el funcionament ni a què es devia. Una de les primeres aproximacions al món dels enzims va ser Louis Pasteur el 1815, on va estudiar la fermentació de l'alcohol i va observar que era provocada per uns microorganismes, però creia que era un procés que es portava a terme gràcies a una força vital que contenia la cèl·lula.

El primer descobriment formal d'un enzim va arribar el 1833 de la mà de Anselme Payen que era un químic francès. Ell va trobar una substància que era capaç de catalitzar la transformació del midó en sucre, aquesta substància que anys més tard rebria el nom d'enzim, el va anomenar "diastasa" (avui coneguda com a amilasa).

A partir d'aquesta troballa, el 1857 Pasteur va proposar que la fermentació dels sucres en alcohols era un procés que només el podien portar a terme cèl·lules vives, en un concepte que va anomenar vitalisme.

Cap al 1878, el fisiòleg Wilhelm Kühne va determinar el nom "enzim", que s'ha quedat fins a l'actualitat. Aquesta paraula ve del grec, i significa "en llevat".

Aquesta teoria va ser acceptada durant molts anys, fins que el 1897 el químic alemany Eduard Buchner va desmentir-la. Això ho va fer amb un experiment en el qual va demostrar que extractes cel·lulars sense la presència de cèl·lules vives



podien fer la fermentació. Això va demostrar que aquesta reacció es podia realitzar sense organismes vius. Aquest va ser un pas fonamental per entendre que els enzims i no les cèl·lules completes eren les responsables de les reaccions químiques.

En els anys 1900-1910 Emil Fischer va proposar una teoria molt important, que és la “clau-pany”, explicant com els enzims reaccionen amb els substrats, indicant que cadascuna té una especificitat.

Cap al 1926 James B. Sumner va cristal·litzar la ureasa, que és un enzim, demostrant que era naturalesa proteica, el que demostrava que els enzims eren proteïnes funcionals i no altres substàncies més simples com es creia. Aquest descobriment li va donar el premi Nobel l'any 1946.

Durant els anys del 1931 al 1950, es van anar aïllant i buscant les característiques de cada enzim que es trobava. A més a més, van començar a aprendre com eren les seves estructures i els mecanismes d'acció.

El 1965 es va fer una de les primeres estructures tridimensionals, en aquest cas de l'enzim lisozim, i va ser fet per David Phillips. Aquest treball va ser fonamental per entendre com els enzims catalitzen les reaccions.

Als anys 1980s amb l'arribada de l'enginyeria genètica es van començar a modificar enzims, formant bacteris i llevats modificats genèticament, que va fer que creixés molt la indústria farmacèutica, entre d'altres.

En l'actualitat els enzims són estudiats curosament perquè facin el que nosaltres volem, aprofitant-los per l'àmbit de la medicina o de la indústria. A més a més, aquest sector de la modificació d'enzims segur que continuarà creixent i creant enzims per a tota mena de necessitats que tingui l'ésser humà.

En resum, d'ençà que es van descobrir els enzims s'han anat estudiant a fons amb el mètode científic, provant cada cop coses noves i cada vegada més innovadores, fent que sigui un dels sectors amb més potencial en un futur.

### 2.1.2. Què fa especials els enzims?

Els enzims són biocatalitzadors que compleixen uns requisits que els fan fonamentals per la vida, són els següents:

Una característica molt important dels enzims és que acceleren les reaccions químiques. Això és vital, ja que sense enzims perquè es donés una reacció química seria necessària molta energia i que col·lidissin amb l'orientació adequada perquè es produís la formació o destrucció dels enllaços necessaris. Com és d'esperar, això és completament a l'atzar i, per tant, les probabilitats de què això es produeixi de la forma adequada són baixes. En canvi, amb els enzims, no són necessaris tants factors, ja que es fa la reacció molt més ràpida i es necessita molta menys energia.

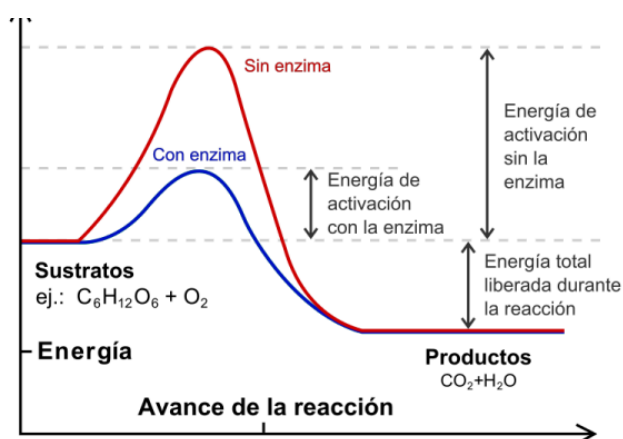


Figura 1. Despesa d'energia per passar de reactiu a producte amb enzim i sense. [Font](#)

Un altre aspecte important dels enzims és que no es consumeixen durant la reacció, és a dir, que quan acaba la reacció es pot tornar a utilitzar igual que al principi. Això és molt important, perquè permet que els enzims puguin ser utilitzats de forma infinita.

També és molt representatiu dels enzims la seva especificitat, és a dir, que cada enzim és especialitzat a catalitzar un únic substrat. Per saber com fer aquestes "parelles", cada enzim té un lloc actiu format per uns aminoàcids específics. Aquest lloc té una forma que fa que només encaixin un substrat determinat, és a dir, que hi ha un motlle per a cada substrat de manera que només es portaran a terme una reacció determina en cada enzim. Un cop el substrat ha encaixat a la perfecció amb l'enzim, es pot portar a terme la reacció química.

### 2.1.3. Parts d'un enzim

Un enzim està format per diferents parts que totes juntes fan que l'enzim faci el seu funcionament habitual. Hi ha dos tipus d'enzims, que es diferencien en la seva estructura, aquests són els enzims simples i els conjugats.

Els enzims simples tenen una estructura bàsica d'estructura proteica i no requereix cap activador per funcionar. Aquestes són les seves parts:

- Lloc actiu: Com ja he mencionat anteriorment, el lloc o centre actiu és el lloc on arriba el substrat per ser transformat en altres. A més a més, té una forma tridimensional específica que fa que només s'acoblí el seu substrat.
- Apoenzim: L'apoenzim és aquesta part més gran de l'enzim i completament de naturalesa proteica.

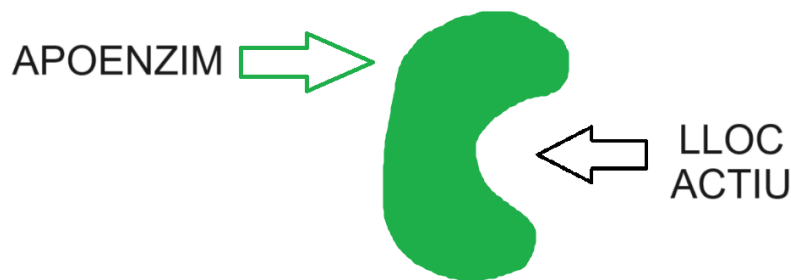


Figura 2. Enzim simple. Font pròpia.

Per altra banda, hi ha els enzims conjugats o holoenzims, que tenen una part proteica com els simples amb el centre actiu i l'apoenzim. Però, a més a més, tenen uns reguladors que fan que s'activi o s'inhibeix la seva funció, que no són de naturalesa proteica, que sense ells no podrien funcionar.

- Reguladors
  - Cofactors (activen el funcionament normal de l'enzim):
    - Ions metàl·lics: Aquests tenen la funció que quan s'enganxen a l'enzim fer-lo funcionar, ja que si no està present l'enzim no funciona i és inútil. Aquests cofactors solen ser ions metàl·lics com el zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) o el magnesi ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

- **Coenzims:** Aquests coenzims també tenen la funció d'activar els enzims perquè facin la seva funció amb normalitat, però aquests, en canvi, són molècules orgàniques com les vitamines. Els més importants són l'ATP, el  $\text{NAD}^+$  i el  $\text{NADP}^+$ .
- **Inhibidors** (frenen el funcionament normal de l'enzim):
  - **Competitius:** El que fa aquesta molècula és anul·lar el funcionament de l'enzim. Ho fa "competint" contra els substrats per situar-se al lloc actiu abans que ells, però aquest, en comptes de transformar-se, no ho fa, i es queda en el lloc actiu, bloquejant la catàlisi d'altres substrats i, llavors aquell enzim queda inhibït.
  - **No competitius:** Per altra banda, el que fa aquesta molècula és "enganxar-se" en una part de l'enzim, fent que el lloc actiu canviï de forma i que cap substrat pugui ser catalitzat.

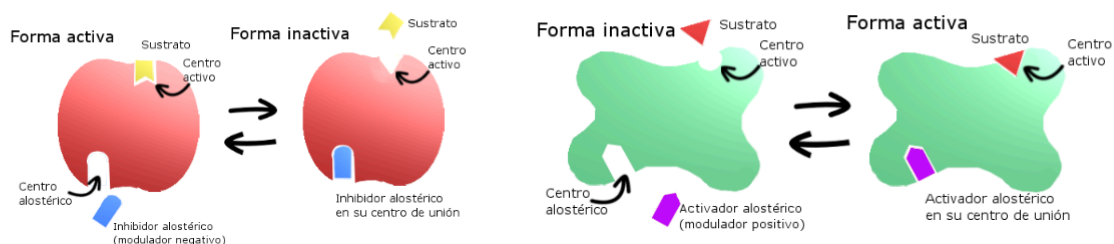


Figura 3. Enzim conjugat. [Font](#)

#### 2.1.4. Estructura proteica dels enzims

Els enzims com que són proteïnes, estan conformats per aminoàcids. Els aminoàcids es poden distribuir de diferents modes formant el que es coneix com a les estructures de les proteïnes que hi ha: l'estructura primària, secundària, terciària i quaternària. Totes elles van de menys a més complexitat.

**Estructura primària:**

L'estructura primària és la seqüència d'aminoàcids de la proteïna, formant una cadena amb tots ells. Aquestes cadenes poden tenir tota mena d'aminoàcids, però sempre tenen un inicial que és el grup Amino lliure ( $\text{NH}_2$ ) anomenat *N*-inicial i un final, que és el grup carboxil lliure ( $\text{COOH}$ ) anomenat *C*-terminal.

**Estructura secundària:**

L'estructura secundària és la disposició en l'espai de la primària, és a dir, que es formen una sèrie d'enllaços que fa que formi diferents formes.

- En forma  $\alpha$ -hèlix: Aquesta es produeix quan es formen gran quantitat d'enllaços d'hidrogen entre els H i els O, cosa que fa que es formi una cadena en forma d'hèlix.
- En forma de conformació- $\beta$ : En aquesta no es produeixen tants enllaços d'hidrogen, fet que dona que tingui forma de làmina plegada.

**Estructura terciària:**

L'estructura terciària és la unió dels dos tipus d'estructures secundàries mitjançant diferents tipus d'enllaços com els disulfur, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals, etc.

**Estructura quaternària:**

La quaternària està constituïda per dues o més cadenes polipeptídiques d'estructura terciària unides amb enllaços febles.

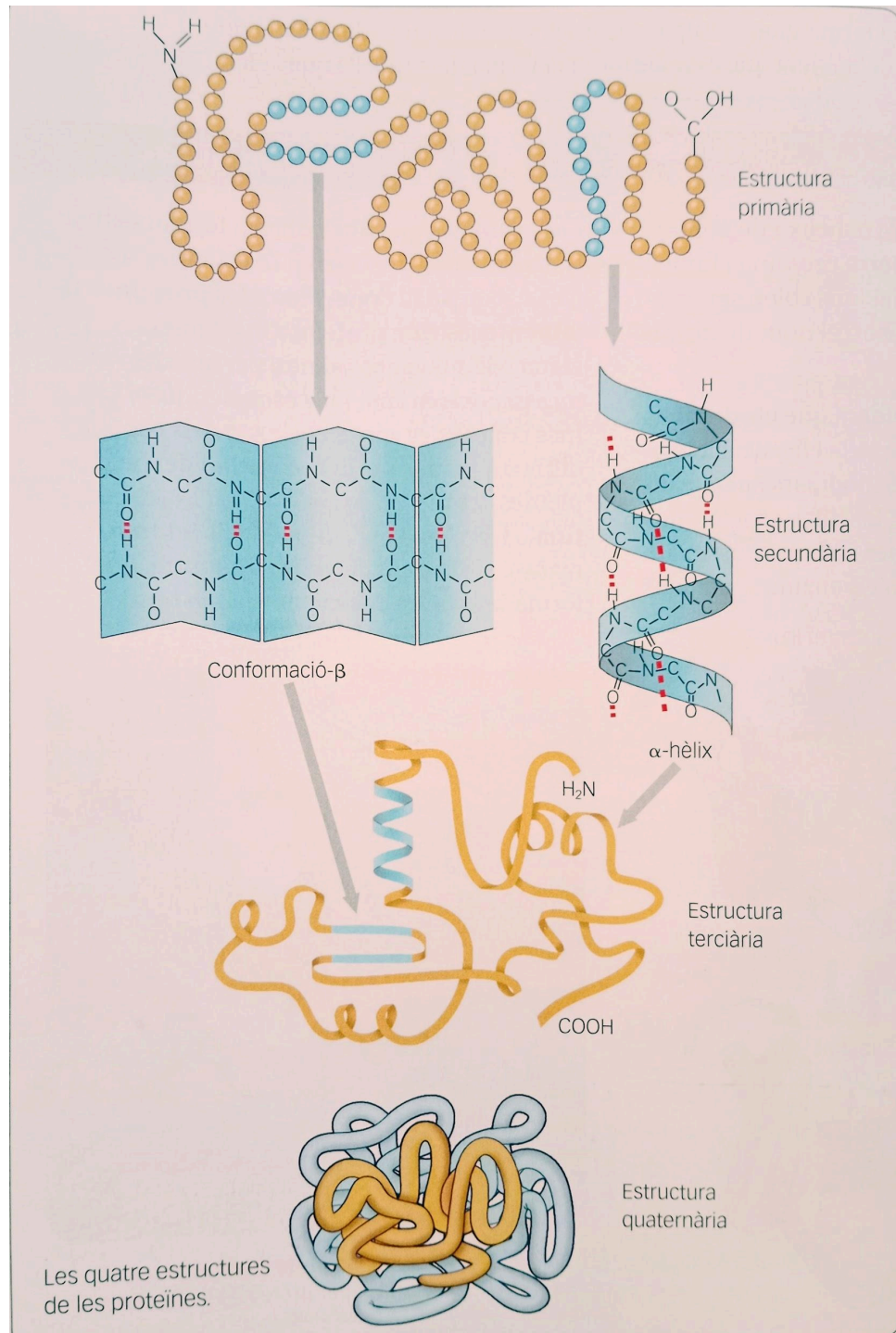


Figura 4. Estructures de les proteïnes. Font: Llibre de biologia 1r de batxillerat grup promotor Santillana

## Estructura proteica dels enzims

Els enzims són proteïnes d'estructura terciària, per tant, estan formats per combinacions d'estructures secundàries en forma d'hèlix i de làmina plegada. El fet que fa que en conjunt un enzim estiguin formats per aminoàcids.

Un enzim pot tenir subunitats anomenats dominis estructurals. Aquests dominis també estan formats per combinacions d'estructures secundàries, és a dir, d'una estructura terciària. Aquestes combinacions solen ser estables, compactes i d'aspecte globular, per aquest fet, a vegades es diu que tenen estructura globular.

Els dominis són com peces, i si s'ajunten diferents dominis, es forma un enzim determinat, per aquest motiu, hi ha dominis que estan repetits en diferents enzims o proteïnes, ja que fan una funció que pot ser vàlida en diversos processos.

Aquests dominis en molts casos són molt útils per portar a terme les reaccions químiques. Com que els dominis funcionen com a peces, quan arriba un substrat, els dos dominis poden apropar-se i deixar fix aquell substrat i que es pugui catalitzar la reacció química, sinó, potser, no es podria fer.

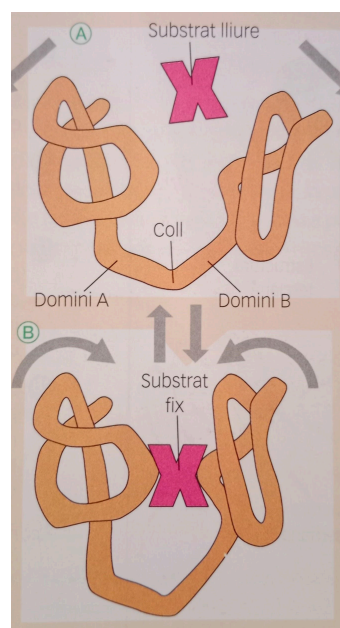


Figura 5. Els dominis d'un enzim fixen un substrat. Font: Llibre de biologia 1r de batxillerat grup promotor Santillana

### 2.1.5. Funcionament

El funcionament dels enzims comença quan un substrat arriba al centre actiu de l'enzim. Pot haver-hi molts tipus de reaccions: d'un sol substrat, de dos substrats, per unir des de substrats, per separar-los...

El més senzill és el d'un sol substrat (S). En aquest procés l'enzim (E) fixa el substrat a la seva superfície mitjançant una sèrie d'enllaços febles, formant el complex enzim-substrat (ES). Aquests enllaços febles provoquen vibracions que fa que es debilitin alguns enllaços interns del substrat. Un cop en aquesta situació passa a l'estat de transició anomenat complex activat i un cop finalitzada la transformació, queda el complex enzim-producte (EP). Una vegada ha passat això s'allibera el producte i l'enzim per tornar a usar-se.

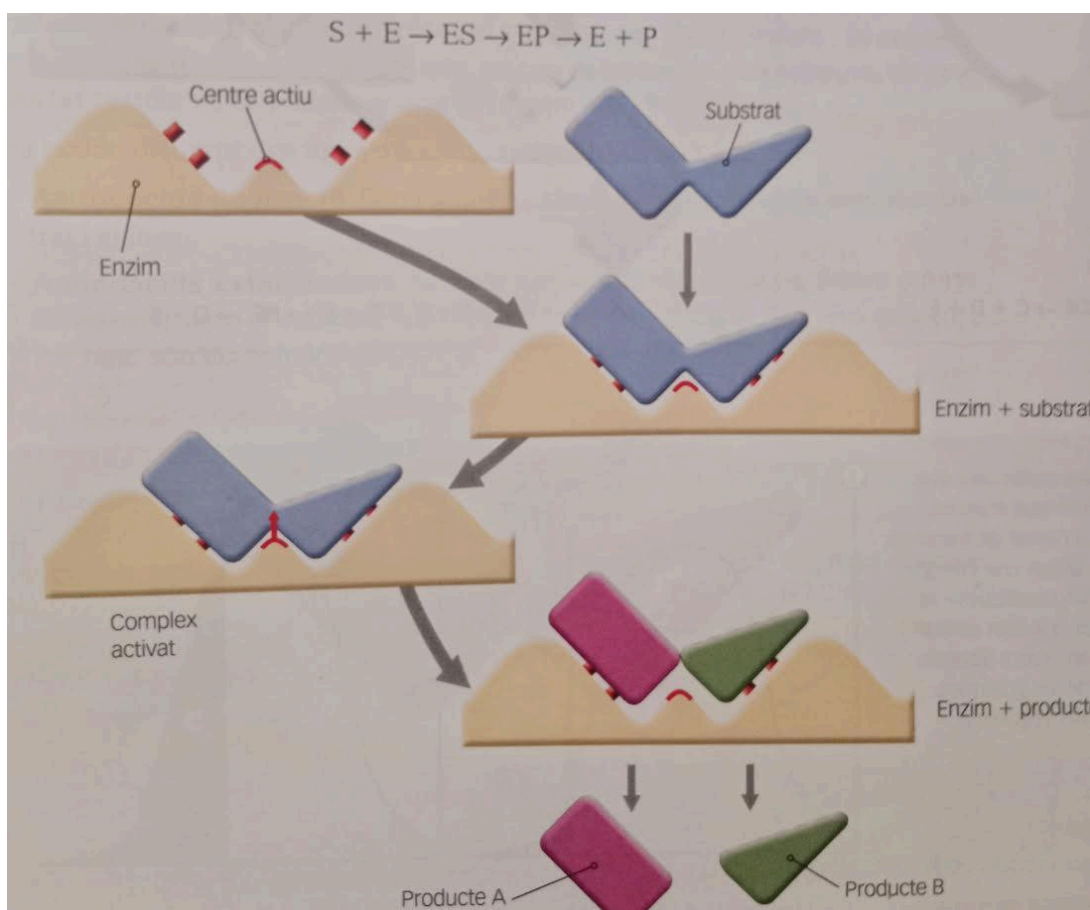


Figura 6. Activitat enzimàtica en reaccions d'un sol substrat. Font: Llibre de biologia 2n de batxillerat grup promotor Santillana



### 2.1.6. Centre actiu de l'enzim

El que passa al centre actiu de l'enzim és la interacció més important que es porta a terme en tota l'estructura, ja que és el punt on es trenquen o es formen enllaços. El centre actiu té una forma tridimensional amb forma de cavitat perquè el substrat hi encaixi bé, tot format per aminoàcids.

Quan un substrat arriba al centre actiu, s'uneix a través dels radicals d'alguns aminoàcids formant enllaços febles per fixar-lo, aquests aminoàcids s'anomenen aminoàcids de fixació. Un cop està unit, uns determinats aminoàcids anomenats aminoàcids catalitzadors formen enllaços forts (covalents) i trenquen els enllaços que s'han de trencar.

En aquest cas a la figura 6 podem veure el centre actiu de l'enzim amb aminoàcids de fixació que són el a, b, c i d i que formen ponts d'hidrogen per fixar el substrat. Per altra banda, l'aminoàcid catalitzador està situat al mig per formar un enllaç covalent i trencar l'enllaç del substrat.

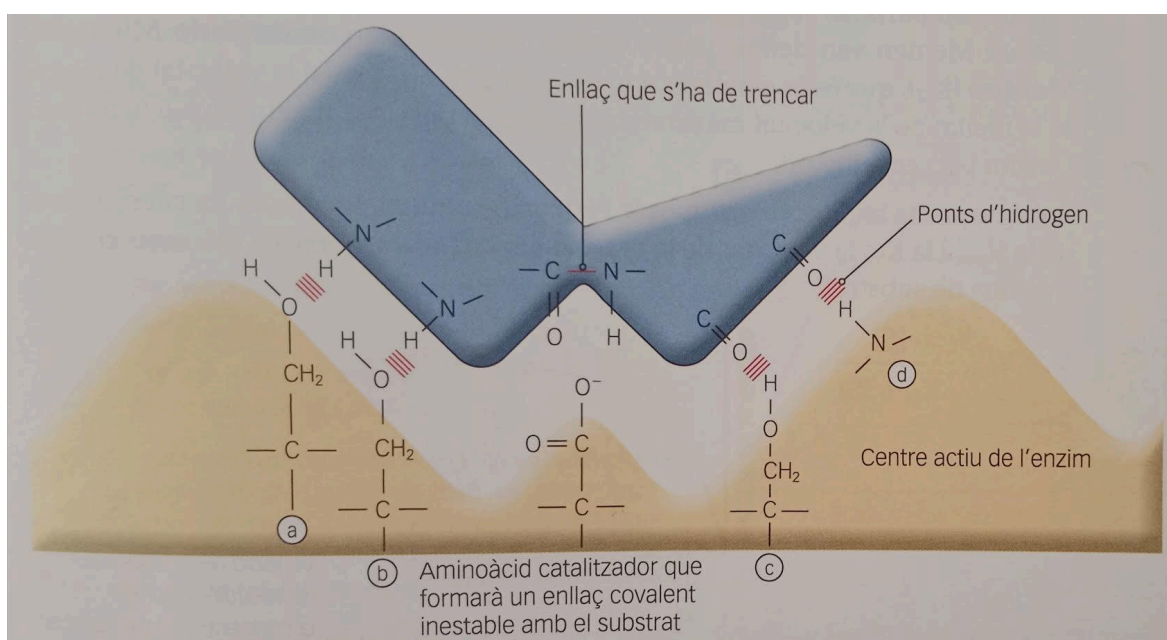


Figura 7. Activitat enzimàtica en reaccions d'un sol substrat. Font: Llibre de biologia 2n de batxillerat grup promotor Santillana

### 2.1.7. Dinàmica enzimàtica

La dinàmica enzimàtica estudia la velocitat amb què es produeixen les reaccions químiques dels enzims.

#### Temperatura

La temperatura és un factor fonamental, habitualment la temperatura fa que l'enzim funcioni a millor rendiment. Quan aquesta temperatura augmenta arriba a uns graus que és la temperatura òptima de l'enzim, és la temperatura en la qual és més eficient, sol variar entre els diferents enzims. A partir d'aquí, si la temperatura augmenta, l'enzim disminuirà l'eficiència fins que ja no pugui treballar, que és quan es desnatura i perd la seva estructura terciària i deixa de funcionar, però si es redueix, la temperatura tampoc podrà funcionar. Els enzims presents al cos humà, tenen la temperatura òptima als 37 °C, la temperatura corporal humana.

A la figura 8 podem observar que ens compara l'activitat d'un enzim segons la temperatura a la qual treballa. La temperatura òptima, és a dir, de màxima activitat és a 40 °C, per tant, aquest és un enzim que està en ambients d'uns 40 °C. Per altra banda, veiem que a temperatura més elevada té una activitat del 0%, que vol dir que l'enzim s'ha desnatura, no pot tornar a ser usat.

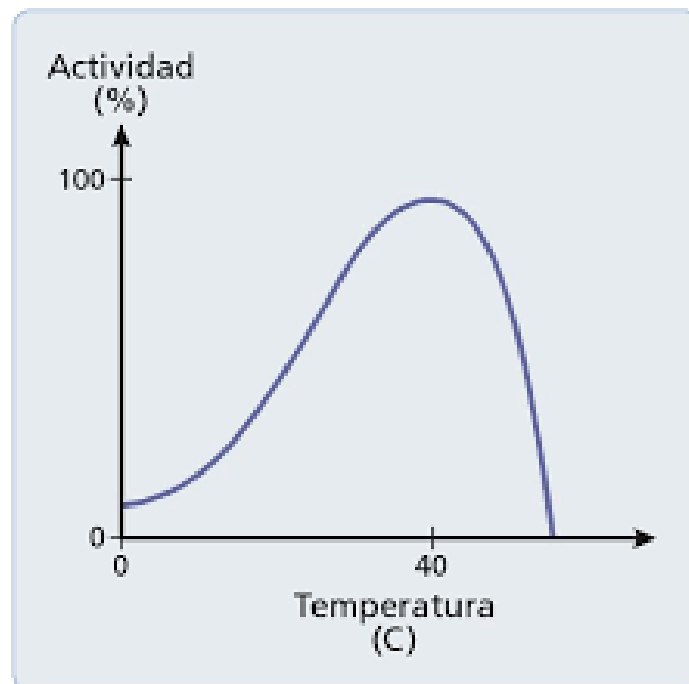


Figura 8. Gràfic de l'activitat enzimàtica segons la temperatura. [Font](#)

## pH

Com en la temperatura, hi ha un pH òptim per al funcionament de cada enzim, per tant, varia en els diferents enzims. El pH habitualment va de la mà amb el pH que té la cèl·lula en la qual està, com a resultat, dependrà del tipus de cèl·lula i on està localitzada.

A la figura 9 veiem que es representen tres enzims que tenen pH òptims diferents i que alguns enzims funcionen millor en algunes condicions que altres no, per tant, podem observar la gran varietat d'enzims que existeixen i els diferents medis de pH en els que poden treballar.

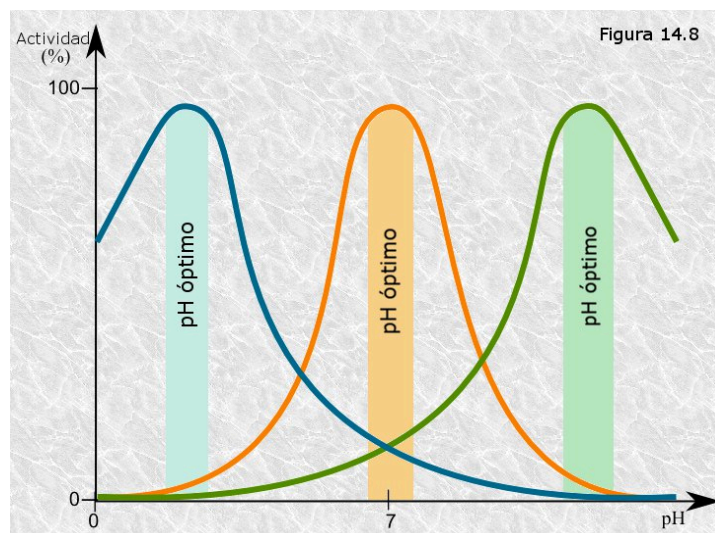


Figura 9. Gràfic de l'activitat enzimàtica segons el pH. [Font](#)

## Concentració del substrat

Aquest factor no fa que l'enzim funcioni millor o pitjor, sinó que el porta al seu màxim rendiment, és a dir a la saturació. Aquest factor es produeix quan totes les molècules que són les capaces de catalitzar substrats de l'enzim estan ocupades al mateix moment, llavors es diu que l'enzim està saturat, aquell és el punt que ens indica que l'enzim no podrà portar a terme més reaccions en menys temps, ha arribat al seu màxim.

A la figura 10 podem veure com l'enzim arriba a la saturació. Primer veiem que una variable és la velocitat de la reacció que porta a terme un enzim, i l'altre variable és la concentració de substrat que hi ha al medi. La funció va augmentant a gran velocitat fins que arriba un punt que la reacció ja no va més de pressa perquè ha arribat al punt de saturació on l'enzim treballa al seu màxim rendiment.

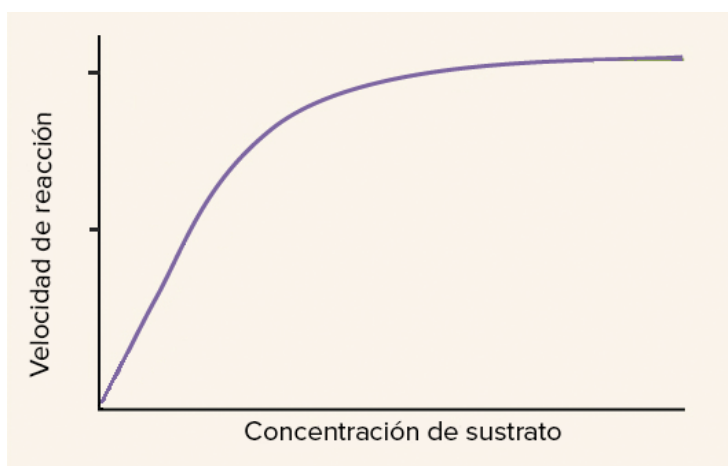


Figura 10. Gràfic de la concentració de substrat depenent de la velocitat. [Font](#)

### 2.1.8. Classificació d'enzims

Hi ha diferents tipus d'enzims, que es poden diferenciar principalment per la forma en la qual modifiquen el substrat, és a dir, el tipus de reacció que porten a terme. Hi ha un total de sis tipus, que són aquests:

#### 1. Oxidoreductases

Aquests són els enzims que catalitzen les reaccions d'oxidació i reducció, o també conegudes com a reaccions redox, en les que una molècula perd electrons i l'altre els guanya.

Una oxidoreductasa que serà molt important és l'alcohol deshidrogenasa.



Figura 11. Reacció dels enzims oxidoreductases. [Font](#)

## Reaccions Redox

Les reaccions d'oxidació-reducció o redox són molt importants, ja que serveixen per a una gran quantitat de reaccions químiques, com per portar a terme el metabolisme del cos o quan una poma es posa fosca.

Aquesta és una reacció de transferència en la qual es transfereix electrons de la molècula reductora a l'oxidant.

Quan parlem que una substància s'oxida vol dir que perd electrons, és a dir, que cedeix els seus electrons a l'altre. Per altra banda, la substància que es redueix vol dir que guanya electrons de l'altra substància.



Figura 12. Exemple de reacció Redox. [Font](#)

## 2. Transferases

Aquests enzims en catalitzar transfereixen un grup funcional com els del carboni d'un substrat a un altre. Com veiem a la Figura 13, el radical (grup funcional) canvia de substrat que és la característica principal dels enzims.



Figura 13. Reacció dels enzims transferases. [Font](#)

## 3. Hidrolases

Aquests enzims hidrolitzen substrats que contenen enllaços formats per carboni i nitrogen (èters, èsters, enllaços peptídics...). El procés d'hidròlisi consisteix a afegir una aigua per a trencar l'enllaç com els que he mencionat anteriorment. Tots els enzims digestius solen ser enzims hidrolases.



Figura 14. Reacció dels enzims hidrolases a acetilcolina esterasa. [Font](#)

#### 4. Lisasses

Una liasa és un enzim que produeix separacions de compostos orgànics amb un mecanisme, que no és el d'hidròlisi i no és el d'oxidació, i que amb aquesta activitat genera un doble enllaç.

#### 5. Isomerases

Aquest tipus d'enzims catalitza uns substrats formats isòmers. Els isòmers són molècules que atòmicament tenen la mateixa composició, però tenen geometries moleculars diferents, donant lloc a característiques diferents.

#### 6. Ligases

Les ligases o sintetases són un tipus d'enzims que serveixen per unir dues molècules. No obstant això, aquestes unions en la gran majoria de casos necessiten ATP per a poder unir-les. A aquest grup pertanyen la major part de les polimerases<sup>1</sup>.

## 2.2. Unions

### 2.2.1. Enllaços químics

Un enllaç és quan dos àtoms s'uneixen entre ells per formar molècules o cristalls, això ho fan perquè els dos àtoms surten beneficiats, ja que d'aquesta manera obtenen configuració de gas noble, que els hi aporta molta estabilitat.

A la figura 15 veiem com es veu la creació d'un enllaç pel que fa a l'energia. Primer tenim uns reactius, que tenen una energia determinada, aquesta sempre ha de ser superior a l'energia dels productes. El moment en el qual es passa de reactiu a producte passa per la fase de complex activat que és el moment en què es trenca o es crea l'enllaç, per aquest motiu es necessita una gran quantitat d'energia, un cop s'ha fet l'enllaç perd energia fins a arribar al producte que té menys energia que el reactiu, perquè ha gastat molta en la transformació.

---

<sup>1</sup> Les polimerases són un tipus d'enzim que situat a les cèl·lules que té la funció de transcriure i replicar els àcids nucleics en el procés de la divisió cel·lular.

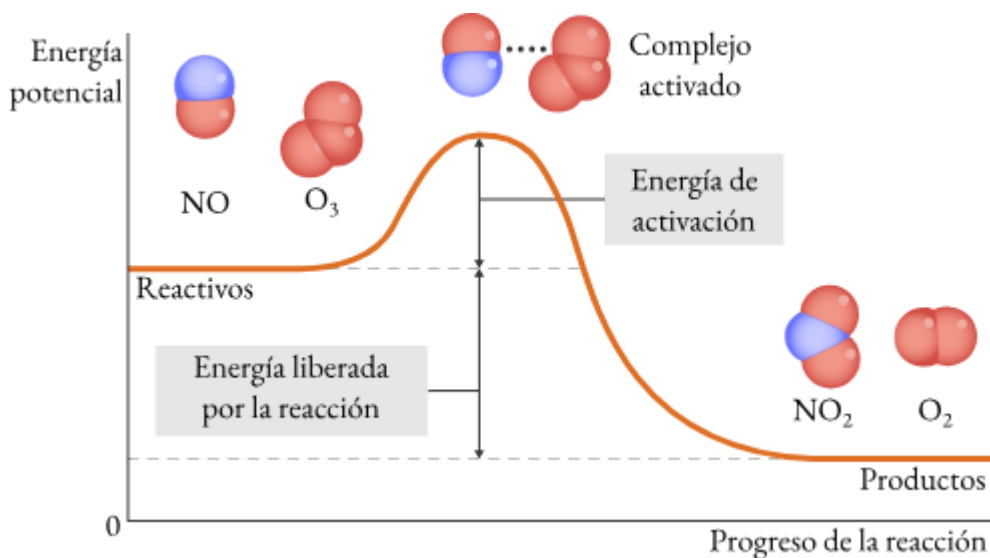


Figura 15. Imatge de l'energia que allibera un enllaç. [Font](#)

#### 2.2.1.1. Enllaç iònic

Aquest enllaç es dona quan un dels dos àtoms implicats cedeix un electró, i l'altre el rep, d'aquesta forma un queda positiu i l'altre negatiu. Com que tots dos tenen càrregues oposades s'atrauen i, per tant, queden enllaçats. Aquest enllaç se sol donar entre metalls i no-metalls, perquè un tendeix a donar i l'altre a rebre electrons. Un exemple és el clorur de sodi (NaCl).

#### 2.2.1.2. Enllaç covalent

Aquest altre enllaç és una mica diferent, perquè es basa en la compartició d'electrons, d'aquesta manera els tots poden guanyar electrons que és el que volen. Aquesta unió sempre es fa amb elements no-metalls, ja que sempre necessiten electrons.

Existeixen els covalents polars en la que la diferencia d'electronegativitats entre els àtoms és força gran i, en canvi, en els apolars la diferència d'electronegativitats és molt baixa.

Un exemple de covalent polar és l'aigua (H<sub>2</sub>O).

#### 2.2.1.2.1. Enllaç $\pi$

Els enllaços  $\pi$  són un tipus d'enllaços químics que es donen en els enllaços covalents. Aquests es donen quan l'enllaç es porta a terme en l'orbital p, com que aquest orbital presenta dos lòbuls, un a sobre i un a sota, quan es comparteixen els electrons d'aquest orbital apareixen quatre lòbuls com veiem a la figura 16 i llavors dona lloc a l'enllaç  $\pi$ , que és el de la dreta.

Aquests enllaços  $\pi$  estan molt presents en els sistemes aromàtics, fent que aquells electrons es quedin fixes i no es puguin moure.

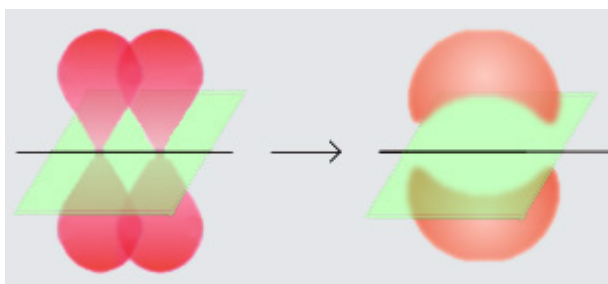


Figura 16. Imatge a l'esquerra hi ha quatre lòbuls en orbitals p i a la dreta l'enllaç  $\pi$ . [Font](#)

#### 2.2.1.3. Enllaç metàl·lic

Aquest es dona sempre en metalls i consisteix en la compartició d'electrons en un núvol electrònic que hi ha al seu voltant.

### 2.3. Interaccions intermoleculars

Les interaccions intermoleculars són enllaços entre molècules, però d'una forma molt més feble que els enllaços químics, per aquest motiu se solen formar amb més facilitat, però també duren menys.

#### Ponts d'hidrogen

Aquesta és una de les interaccions intermoleculars més importants, ja que es dona amb molta facilitat. Aquesta apareix en el moment en el qual un àtom d'hidrogen s'uneix a un àtom d'oxigen, nitrogen o fluor, donant lloc a una interacció molecular forta. La distància a la qual es produeixen els ponts d'hidrogen és molt diversa, pel fet que poden ser febles o forts, però solen variar entre 2,2 Å i 3,2 Å, encara que hi ha moltes excepcions.



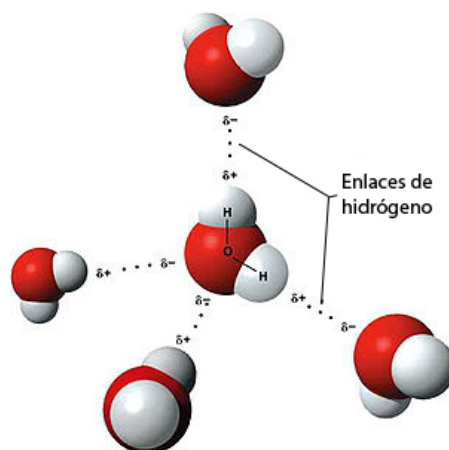


Figura 17. Imatge d'uns ponts d'hidrogen. [Font](#)

### Forces de Van der Waals

Aquestes són unes forces que són molt dèbils, però que alhora tenen un paper fonamental. Es divideixen en tres categories:

- Interaccions dipol-dipol: es produeix entre molècules polars, on les càrregues positives i negatives fan que s'apropin. Es produeix de 3 a 5 Å.
- Interaccions dipol permanent-dipol induït: Es produeix quan una molècula polar (amb càrregues) induïx a una molècula apolar (sense càrregues) fent que obtingui càrregues i atraiant-se. La millor distància està de 2 a 4 Å.
- Interaccions dipol instantani-dipol instantani (forces de London): Forces molt dèbils que es donen en molècules polars i apolars fent que pel moviment dels electrons per un instant apareguin dipols induïnt dipols a una altra molècula fent que totes dues s'atraïguin. La distància òptima està al voltant de 3 a 4 Å.

### Hidrofòbiques

Aquestes interaccions es basen en el principi de què les molècules apolars (sense càrrega) l'aigua les repel i com que totes són així s'acaben ajuntant per evitar el contacte amb l'aigua. Quan totes estan agrupades empeses per la repulsió de l'aigua, formen enllaços febles de Van der Waals entre elles.

D'aquesta forma si estan en una cadena si hi ha dues molècules apolars que repelen l'aigua, probablement s'agruparan formant un enllaç feble i modificant la forma de la cadena.

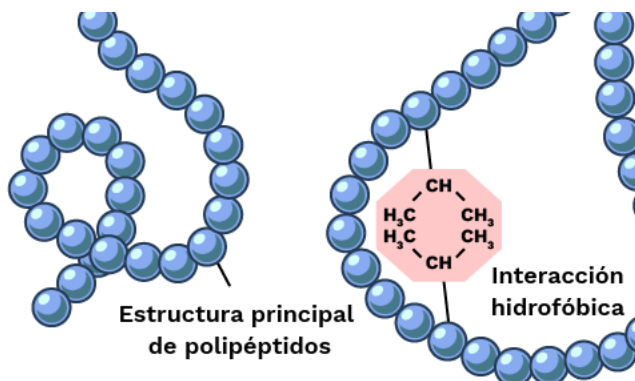


Figura 18. Imatge d'un enllaç hidrofòbic. [Font](#)

### $\pi$ - $\pi$ Interaccions d'apilament

Aquestes són unes interaccions que es donen només amb sistemes aromàtics (els hexàgons), i com bé diu el nom "apilament", han d'estar una a sobre de l'altre. Hi ha dues opcions, que estigui una perfectament a sobre de l'altre, o bé que estigui desplaçat, com bé veiem a la figura 19. També hi ha casos en els quals la interacció es pot produir en forma de T, és a dir, en perpendicular l'un de l'altre. En general, la distància a la qual es produeix aquesta interacció és de 3,3 a 3,8 Å.

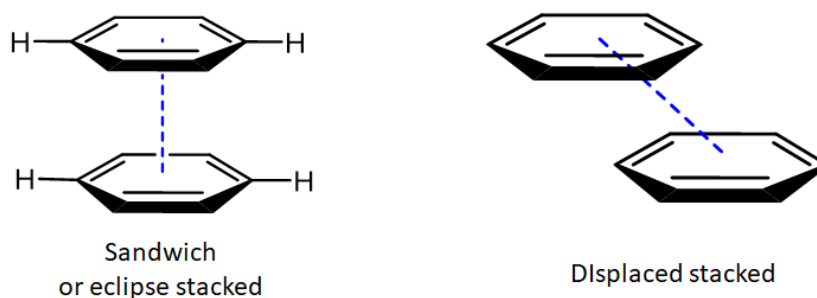


Figura 19. Imatge dels sistemes aromàtics un a sobre de l'altre. [Font](#)

Tot i això, encara que els dos sistemes aromàtics estiguin un a sobre de l'altre no n'hi ha prou, perquè es necessita que les càrregues siguin les adequades. Com veiem a la figura 20 a la figura de l'esquerra com que els dipols positius estan una sobre de l'altre, es repelen i el mateix passa amb els negatius. Per altra banda, en la desplaçada sí que funciona.

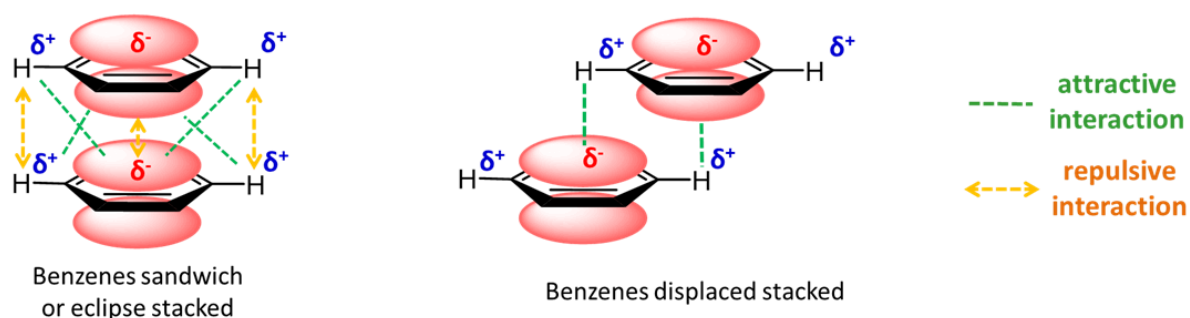


Figura 20. Imatge de sistemes aromàtics amb les atraccions i repulsions. [Font](#)

A la figura 21 podem veure un model que sí que funcionaria, ja que els dipols es complementen i així les càrregues s'atrauen com veiem amb les fletxes, per tant, aquest sí que és correcte.

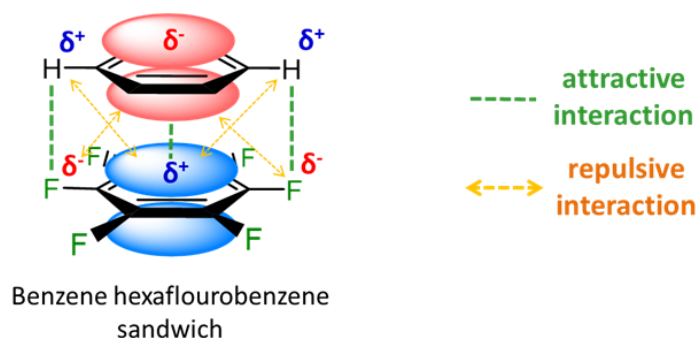


Figura 21. Imatge de la  $\pi$ - $\pi$  interaccions d'apilament correcte. [Font](#)

## Enllaços d'halogen

Aquesta interacció és específica del grup dels halògens de la taula periòdica (F, Cl, Br, I, At) i funciona com els ponts d'hidrogen. En aquest enllaç el carboni s'enllaça amb els halògens, ja que aquests estan lleugerament carregats negativament, en canvi, el carboni positivament.

### The Polar C-X Bond

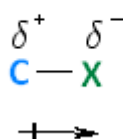


Figura 22. Imatge d'un enllaç d'halogen. [Font](#)

## Interaccions catió- $\pi$

Les interaccions catió- $\pi$  es donen com a resultat de fortes forces d'atracció entre un catió (càrrega positiva) i el núvol d'electrons  $\pi$  que formen part dels grups aromàtics (hexàgons). Aquesta interacció, habitualment, es produeix entre 2 i 6 Å, encara que hi ha una distància òptima depenent del catió.

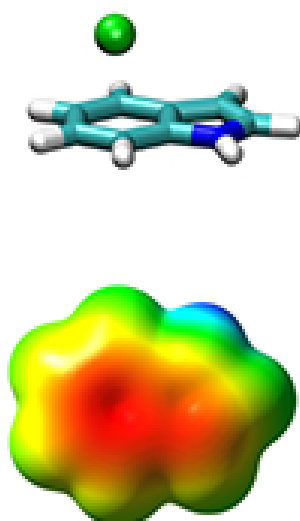


Figura 23. Imatge d'una interacció catió- $\pi$ . [Font](#)

### 2.3.1. Energia d'unió

L'energia d'unió és un dels conceptes més importants d'aquest treball, perquè és l'energia que em calcula la web que usaré en el marc aplicat ([que explicaré més endavant](#)) i que serà d'on treure les dades en les quals basaré els resultats del meu marc aplicat.

L'energia d'unió és aquella energia que s'allibera en el moment en el qual es produeixen les interaccions intermoleculars entre els aminoàcids de fixació i els àtoms del substrat, és a dir, aquelles forces febles temporals que fan que el substrat es quedi fixat perquè l'aminoàcid catalitzador pugui fer la seva feina.

Com més baixa sigui aquesta energia d'unió, vol dir que hi ha més interaccions intermoleculars i que el substrat està millor fixat i llavors és necessària menys energia. L'energia d'unió fa que es redueixi l'energia d'activació de l'enzim, fent que sigui més eficient.

## 2.4. Reacció química que treballaré

Aquí parlaré de la reacció química concreta que fa l'enzim que he escollit.

### 2.4.1. Compostos bàsics de la reacció

#### 2.4.1.1. Alcohols

Els alcohols són compostos orgànics derivats dels hidrocarburs en els quals s'ha substituït l'àtom d'hidrogen pel grup OH. Hi ha diferents tipus d'alcohols: primaris, secundaris i terciaris. Jo només parlaré dels primaris, que són els que treballaré.

Els alcohols primaris tenen una estructura en la qual el carboni central té enllaçat un radical, un grup OH i dos H, com es veu a la figura 15. Quan un alcohol primari s'oxida sempre es produeix un trencament de l'enllaç C-H i la formació d'un enllaç C=O, això fa que doni lloc a aldehids i després a àcids carboxílics.

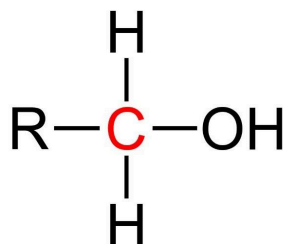


Figura 24. Fórmula d'un alcohol primari. [Font](#)

#### 2.4.1.2. Aldehids

Els aldehids són compostos orgànics que es caracteritzen per tenir a la seva cadena el grup funcional -CHO terminal, és a dir, que al final de la cadena tenen aquest grup funcional.

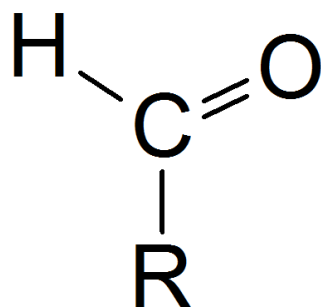


Figura 25. Grup funcional dels aldehids. [Font](#)

Els aldehids són uns compostos que són importants a la indústria, ja que es poden usar en diferents sectors. Aquestes són algunes d'elles:

- Indústria química: Alguns aldehids com el formaldehid (un dels aldehids més usats) serveixen per fer resines, plàstics i molts altres productes sintètics.
- Indústria de la perfumeria: Un dels usos més importants dels aldehids són els perfums, gràcies a la capacitat aromatitzant d'alguns d'ells, per aquest motiu, s'usa molt en la creació de perfums i fragàncies.
- Indústria alimentària: S'usa com a saboritzants en molts aliments i també en la conserva d'aquests.
- Indústria farmacèutica: Alguns aldehids com el tricloroacetaldehid poden servir com a sedants.

#### 2.4.1.3. Àcids carboxílics

Els àcids carboxílics són compostos orgànics que es caracteritzen per tenir a la seva cadena el grup funcional -COOH terminal. La principal diferència respecte a l'estructura química entre els àcids carboxílics i els aldehids és que els àcids carboxílics tenen en el grup funcional un OH on els aldehids tenen només un H.

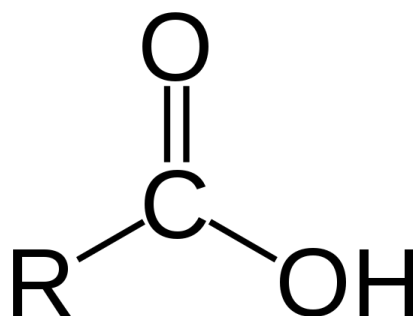


Figura 26. Grup funcional dels àcids carboxílics. [Font](#)

### 2.4.2. Metabolisme dels alcohols

La reacció que jo utilitzaré és la que un alcohol primari passa a ser un àcid carboxílic, centrant-me en el pas d'alcohol a aldehyd, que és la reacció que porta a terme el meu enzim.

La reacció concreta en la seva forma de fórmula és la que veiem a la figura 27. Al principi tenim l'alcohol primari que en oxidar-se, com he dit anteriorment, es trenca un enllaç C-H i es forma un enllaç C=O, d'aquesta manera es forma un aldehyd. Més tard, aquest aldehyd s'oxida formant un grup OH on abans hi havia un H i forma un àcid carboxílic.

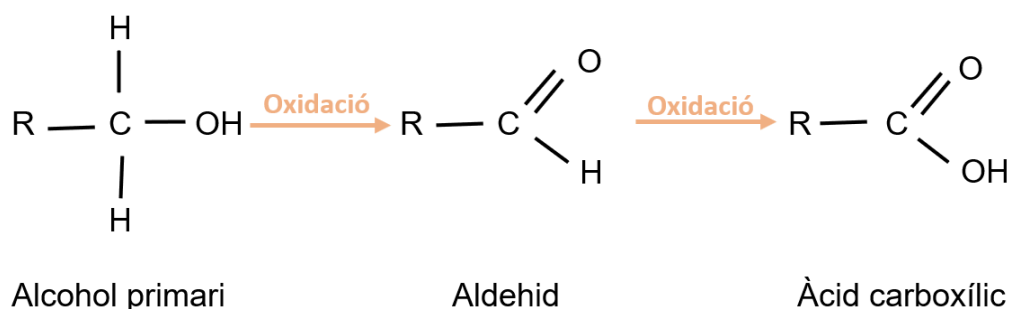


Figura 27. Reacció d'alcohol primari a àcid carboxílic. Font pròpia

## 2.5. Lligands

Els lligands són uns compostos orgànics que són capaços d'enllaçar-se a una altra molècula, majoritàriament a un metall, mitjançant un o diversos àtoms. Els lligands puc dir que són una selecció molt àmplia, el que engloba moltes molècules, en

l'àmbit dels enzims, un lligand pot arribar a ser un inhibidor, un activador o fins i tot un substrat.

Per altra banda, un substrat és una molècula que és catalitzada per un enzim, per tant, a un substrat el podem anomenar substrat o bé lligand.

Ara explicaré l'estructura dels lligands que he escollit per fer servir en el meu marc aplicat.

### 2.5.1. Etanol

L'etanol és un lligand que té la fórmula química  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , en conseqüència, és un alcohol. Aquest lligand té un punt d'ebullició més baix que l'aigua, al voltant dels  $78^\circ\text{C}$  i una temperatura de fusió d'uns  $-114^\circ\text{C}$ .

Com podem observar a la figura 28 l'etanol té l'estructura que he mencionat, però té una forma diferent, ja que podem veure que l'oxigen no forma una línia recta.

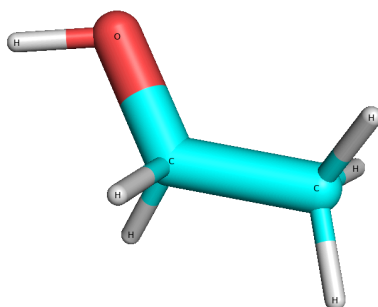


Figura 28. Imatge de l'etanol. Font: PyMOL

Aquesta molècula té molts usos, per aquest motiu és una de les molècules més conegudes:

- Begudes alcohòliques. És el principal component de les begudes alcohòliques i com que és força tòxic és necessari que sigui eliminat pel nostre organisme mitjançant un procés que explicaré a continuació.
- Combustible: L'etanol s'usa moltes vegades com a combustible per a tota mena de vehicles.
- Indústria farmacèutica: Serveix principalment com a desinfectant i s'usa moltes vegades en productes per netejar.



Ara parlaré del metabolisme de l'etanol, ja que necessitaré saber bé en què es converteix per a poder explicar com funciona la indústria amb ell. Aquest metabolisme és el que es produeix al nostre organisme, per tant, és important saber com funciona.

Quan una persona consumeix una beguda alcohòlica, és a dir, etanol, es porta a terme un procés amb diferents parts. Primer, l'etanol és oxidat per un enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) i obtenim l'acetaldehid, una molècula molt cancerígena. Ràpidament, és oxidat per l'enzim aldehid deshidrogenasa (ALDH) obtenint l'àcid etanoic. Quan una sèrie d'enzims fan que se succeeixin diverses reaccions en cadena s'anomena reaccions en cascada enzimàtica, com és aquest cas.

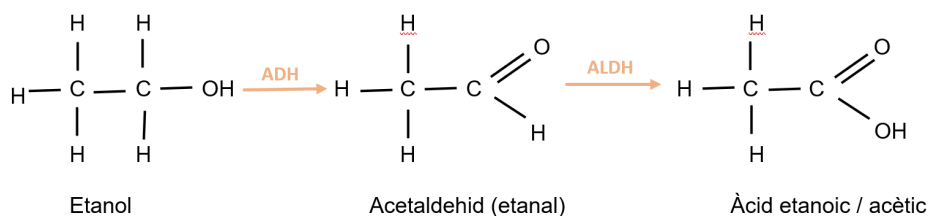


Figura 29. Reacció d'etanol a àcid etanoic / acètic. Font pròpia

### 2.5.2. Alcohol 4-aminofenètil·lic

El lligand que veiem a la figura 30 és l'alcohol 4-aminofenètil·lic amb una fórmula química  $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . Aquest lligand és una mica més gran i complex que l'etanol, ja que té un grup amino i un grup aromàtic (benzè).

En tenir un grup amino pot ser que es puguin formar certs ponts d'hidrogen amb ell, o inclús es podrien crear forces de Van der Waals de dipol-dipol, entre d'altres. Per altra banda, el grup aromàtic podria reaccionar amb un altre grup aromàtic formant una interacció  $\pi$ - $\pi$ , o també es podria formar una interacció  $\pi$ -catió, aquesta variabilitat em donarà moltes opcions a l'hora de fer el marc aplicat.

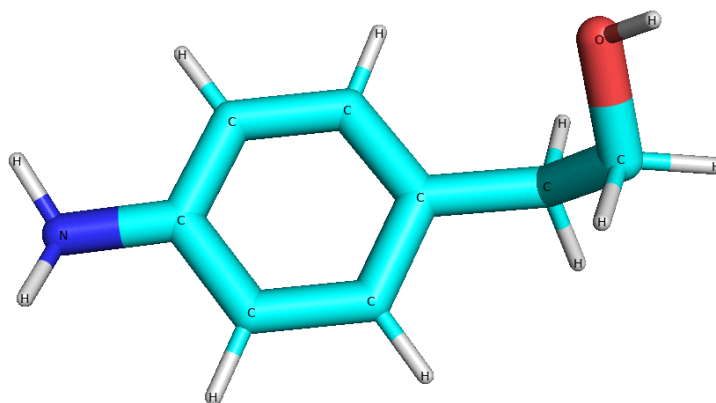


Figura 30. Imatge de l'alcohol 4-aminofenètilic. Font: PyMOL

Ara parlaré del metabolisme de l'alcohol 4-aminofenètilic. Primer de tot tenim l'alcohol 4-aminofenètilic que amb l'ajuda de l'enzim alcohol deshidrogenasa passa a aldehyd que, en aquest cas, és 2-(4-aminofenil)acetaldehyd. Un cop està en aquest compost l'enzim aldehyd deshidrogenasa el transforma en un àcid carboxílic anomenat àcid 4-aminofenil acètic.

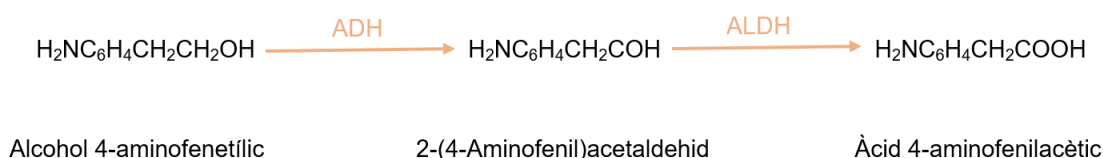


Figura 31. Reacció de l'Alcohol 4-aminofenètilic a Àcid 4-aminofenilacètic

## 2.6. Enzim

L'enzim que he escollit i amb el qual treballaré és l'enzim 1 AGN (segons el PDB<sup>2</sup>). Aquest enzim és un alcohol deshidrogenasa, que forma part del grup de les oxidoreductases. Ara l'explicaré en detall.

<sup>2</sup> El PDB és el Protein Data Bank, que és la base de dades on s'emmagatzemen les estructures tridimensionals de totes les proteïnes i àcids nucleics que han sigut resoltes. Explicat en més profunditat [més endavant](#).

### 2.6.1. Alcohol deshidrogenasa

Al cos humà de forma natural hi ha nou formes diferents d'alcohol deshidrogenasa, que totes formen part de les oxidoreductases, que estan repartides pel fetge i l'estómac. La funció varia entre elles, però l'objectiu principal és catalitzar els alcohols del nostre cos.

Primer de tot hem de dir que quan es pren una beguda que conté alcohol, òbviament, porta la molècula l'alcohol, i aquesta molècula al nostre cos és molt tòxica i pot afectar el nostre sistema nerviós. Si el nostre cos no tingués aquests enzims els aliments que tinguessin alcohol ens farien molt mal, però gràcies a elles no és així. De totes maneres, si els enzims arriben el punt de saturació, l'alcohol no es pot catalitzar i sí que pot ser molt perjudicial.

#### 2.6.1.1. Enzim 1AGN

Com he mencionat anteriorment, l'enzim 1 AGN és un holoenzim i una oxidoreductasa. Aquesta forma part del cos humà i té la funció de degradar l'alcohol que consumim per fer-lo menys tòxic i poder desfer-nos d'ell.

Aquest enzim destaca perquè té 1 cadena separada en 4 dominis identificats com a A, B, C i D i tots són iguals. En total té 373 aminoàcids entre totes les cadenes, donant lloc a què no sigui una proteïna gaire gran.

Aquest enzim i, en general, totes les alcohol deshidrogenases tenen una molècula i un metall que són fonamentals en la seva feina, són aquestes:

- NAD: El NAD o també anomenat dinucleòtid de nicotinamida i adenina. Aquest coenzim és d'oxidació-reducció i serveix per transportar electrons d'una reacció redox a una altra, així doncs té la forma  $\text{NAD}^+$  que és l'oxidant (rep electrons) i la forma  $\text{NADH}$  que és la reductora (dona electrons). El nom d'aquest coenzim és causat per la seva conformació, que es pot veure a la figura 32, que en aquest cas està en forma de  $\text{NAD}^+$ . Aquí es poden veure perfectament les parts del  $\text{NAD}^+$ , els dos nucleòtids units per grup fosfat estan assenyalats de color vermell, la vitamina adenina està marcada de color blau i, finalment, la vitamina nicotinamida que està assenyalada de color groc.

En el cas que sigui un NADH, l'única cosa que té de diferent és que tindrà un H més en l'anell de nicotinamida.

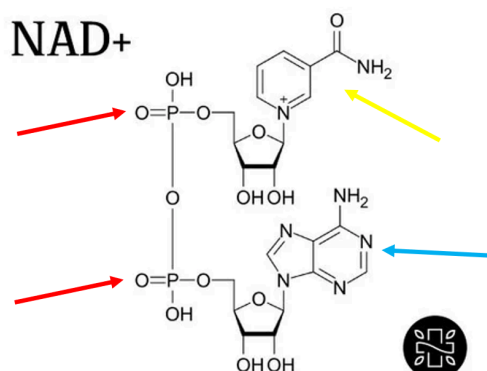


Figura 32. Estructura del NAD<sup>+</sup>. [Font](#)

- Ió Zn: Aquests ions metàl·lics simplement són metalls, però són importants, ja que se solen situar en el lloc on es duen a terme les reaccions i si localitzo un d'ells, podré saber que allà hi ha un centre actiu, perquè fa la funció d'estabilitzar i fixar el substrat.

## 2.7. Reaccions entre l'enzim i els substrats

En aquest apartat parlaré de com l'enzim reacciona amb el substrat i quin és el procés que es produeix al centre actiu de l'enzim. Com que els dos substrats són alcohols i l'enzim és el mateix, tots dos tindran el mateix procés, per tant, he decidit narrar-ho com una única explicació general, ja que no tenen diferències entre els dos.

### 2.7.1. Procés general

El procés general de l'oxidació d'un alcohol amb una alcohol deshidrogenasa és un procés molt precís en el que intervenen diferents molècules i compostos. Aquest és el mecanisme que utilitzen pas a pas:

**Pas 1**

El primer que passa és que l'alcohol arriba al centre actiu de l'enzim el qual hi ha un ió zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) que fa que l'OH de l'alcohol s'apropi i d'aquesta manera l'alcohol es queda fixat i preparat per l'oxidació.

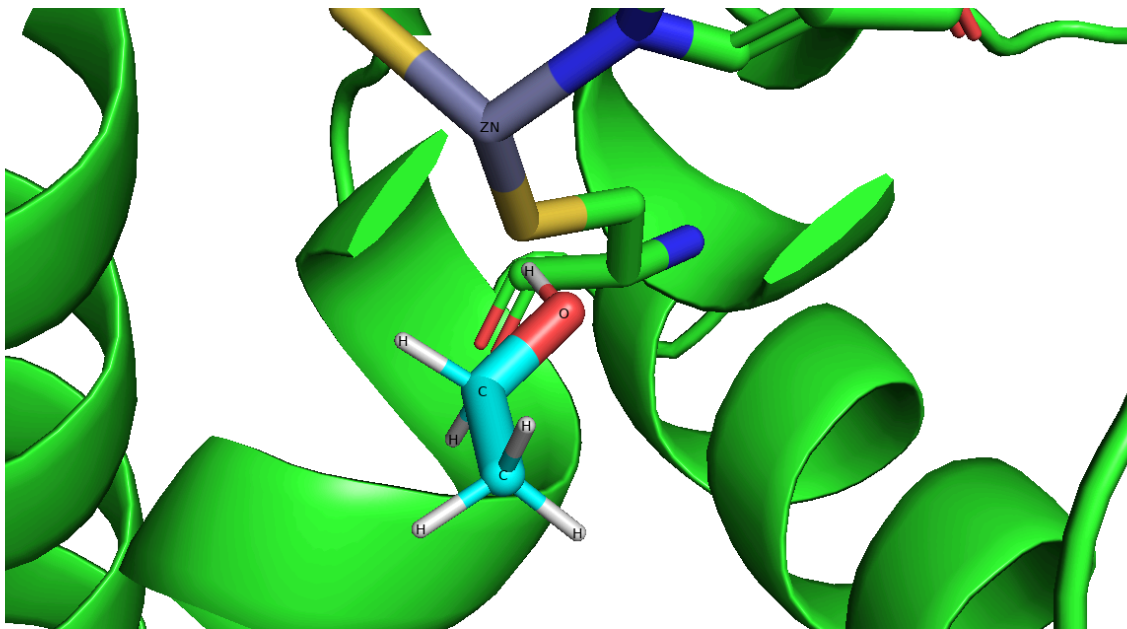


Figura 33. Imatge d'un alcohol que arriba al centre actiu de l'enzim. Font: PyMOL

**Pas 2**

En aquell moment podem veure el  $\text{NAD}^+$  “arriba” al centre actiu de l'enzim, això és molt important, ja que aquest coenzim és fonamental en l'oxidació. Doncs bé, aquesta molècula arriba al centre actiu i se situa molt a prop de l'alcohol, on funcionarà de receptor de protons i electrons.

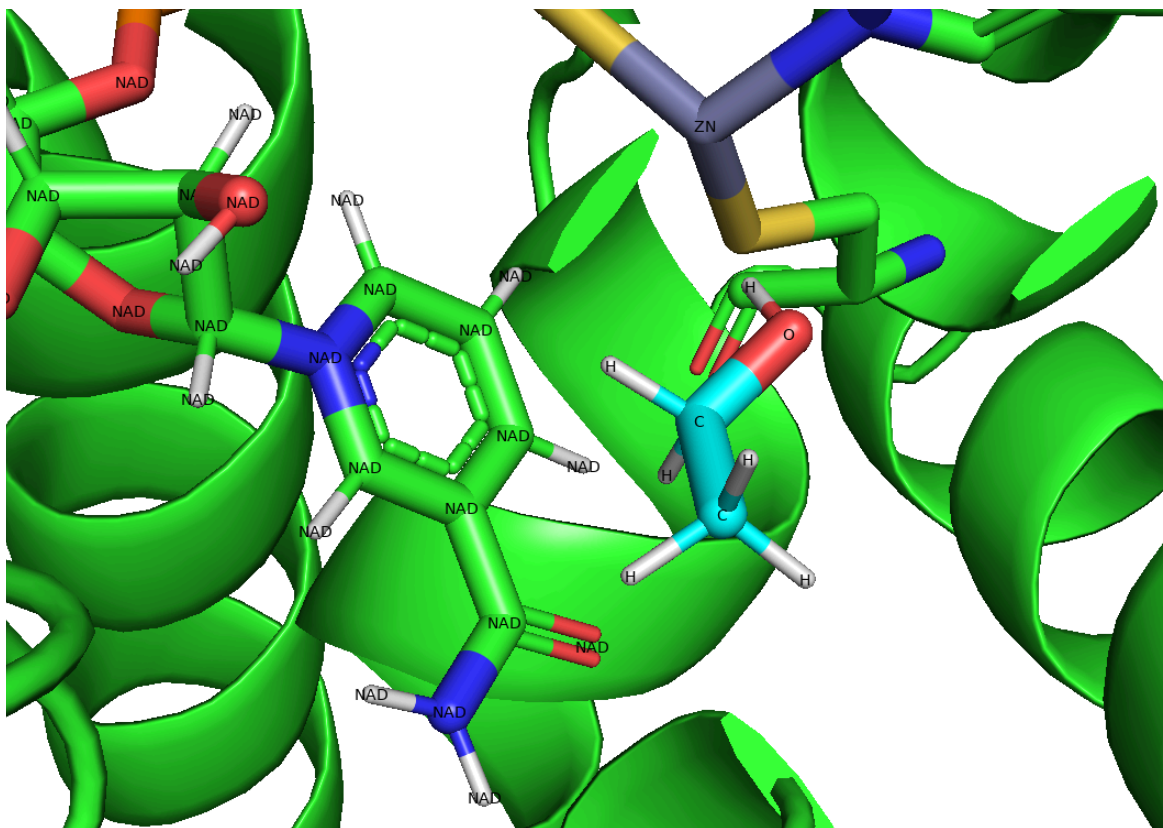


Figura 34. Imatge del centre actiu de l'enzim amb l'alcohol, el zinc i el NAD<sup>+</sup>.  
Font: PyMOL

### Pas 3

Com que és un alcohol que passarà a aldehid, la reacció se centra principalment en el grup hidroxil (-OH). Durant la reacció el substrat perd dos àtoms d'hidrogen, un en forma d'ió hidrur amb dos electrons i un protó (H<sup>-</sup>) i un altre en forma de protó (H<sup>+</sup>).

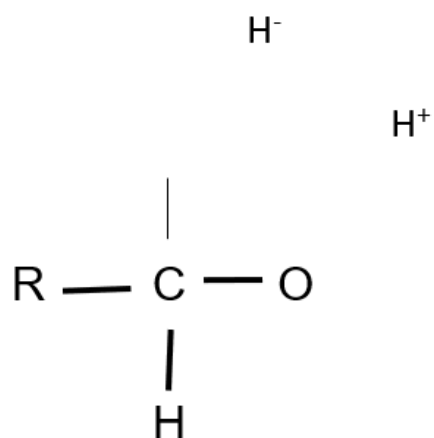


Figura 35. Imatge de quan l'alcohol deixa anar l'ió hidrur i el protó. Font pròpia

**Pas 4**

L'ió hidrur ( $\text{H}^-$ ) i el protó lliure ( $\text{H}^+$ ) que ha deixat anar l'alcohol van a parar a diferents llocs. L'ió hidrur va a parar a l'anell de nicotinamida del  $\text{NAD}^+$  que ara passarà a ser un  $\text{NADH}$ , per altra banda, el protó lliure és alliberat al medi.

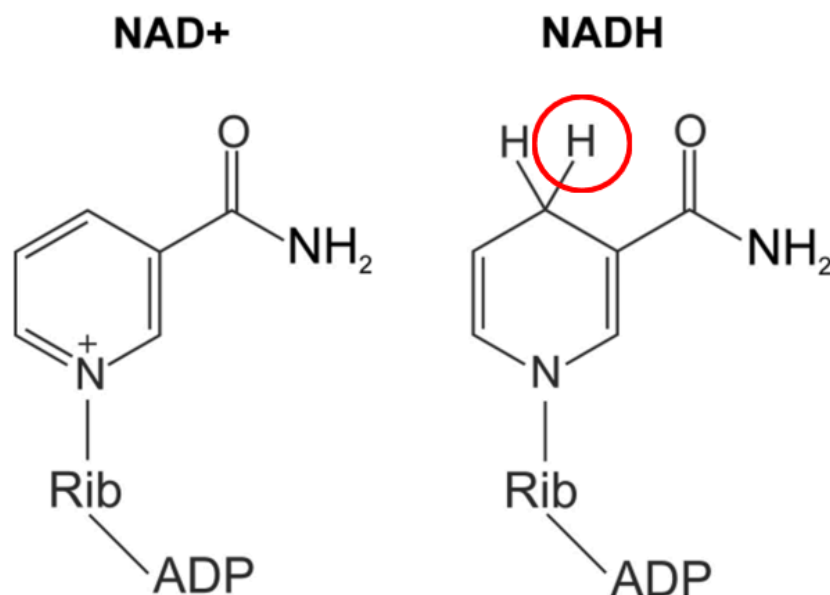


Figura 36. Imatge de l'hidrogen que rep el  $\text{NAD}^+$  i es converteix en  $\text{NADH}$ . [Font](#)

**Pas 5**

Un cop ha passat el procés d'oxidació, el que abans era un alcohol ara és un aldehyd, ja que s'ha alliberat de dos hidrògens el que fa que es converteixi en aquesta altra molècula.

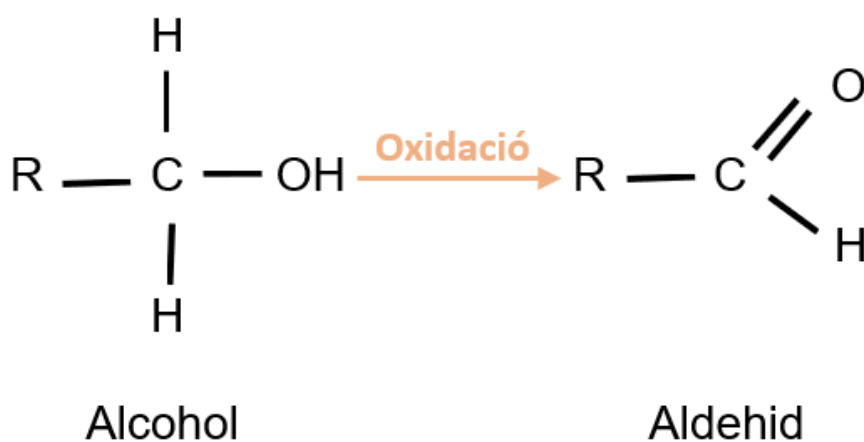


Figura 37. Imatge del pas d'alcohol a aldehyd en el procés d'oxidació. Font pròpia

**Pas 6**

Un cop finalitzat tot el procés, els productes s'alliberen del centre actiu donant lloc a què es torni a produir una altra reacció d'oxidació, perquè com he explicat, els enzims no es consumeixen.

## 2.8. Indústria

La síntesi d'acetaldehids o etanals és important a la indústria, ja que aquest compost té una gran quantitat d'usos industrials en diferents sectors: serveix a la indústria química per sintetitzar altres productes com el butanol; s'usa en el sector alimentari, com a conservant i per donar sabor; a la indústria tèxtil, per la fabricació de cuirs i un dels més importants; a la indústria de les fragàncies, com un component aromatitzant pels perfums.

El procés industrial del pas d'etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) a acetaldehid ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) s'anomena deshidrogenació de l'etanol, mitjançant la molècula d'hidrogen ( $\text{H}_2$ ). Aquesta reacció és una reacció endotèrmica, és a dir, que necessita energia externa en forma de calor per portar a terme la reacció química. La reacció química és molta senzilla i és la següent:



En aquesta reacció, tenim una molècula d'etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) que en aplicar calor esdevé acetaldehid (etanal) i s'allibera hidrogen.

En la gran majoria de casos per fer aquesta reacció s'usa preferiblement un catalitzador metàl·lic. Els catalitzadors més comuns són metalls com coure (Cu), plata (Ag), o òxids de zinc (ZnO). Aquests catalitzadors fan que s'acceleri la velocitat de la reacció, per tant, que trigui menys temps en completar-se.

Aquest procés treballa amb la base de què els punts d'ebullició i condensació de l'etanol i l'hidrogen gas són molt diferents. Primer escalfen l'etanol a temperatures molt elevades evaporant-se llavors entren en un reactor de llit fix i passen al condensador, l'etanal passa a estat líquid i l'hidrogen que s'ha separat es manté en



fase gas. Com que aquest hidrogen es manté en fase gas pot ser agrupat per fer-lo servir en altres processos industrials. D'aquesta manera obtenim etanal.

Com he dit, és una reacció endotèrmica, el que fa que aquest procés es dugui a terme a unes temperatures força elevades, que oscil·len entre 250°C i 400°C, depenent del catalitzador emprat. A més a més, també se sol incorporar la variant de la pressió en aquest tipus de reaccions, encara que es pot fer a pressió atmosfèrica, algunes indústries opten per pressions baixes per evitar la formació de subproductes no desitjats.

En el cas que durant el procés s'arribessin a temperatures més altes o sota condicions inadequades, es poden formar subproductes indesitjables, com l'èter dietílic o l'àcid acètic. Per això, és essencial controlar les condicions del procés i utilitzar catalitzadors adequats que afavoreixin la selectivitat cap a l'acetaldehid.

### 2.8.1. Problemes mediambientals

La deshidrogenació de l'etanol per produir acetaldehid a la indústria es considera un procés bastant net en comparació amb altres processos d'oxidació. De totes maneres, presenta diversos reptes mediambientals:

- Consum energètic: Aquest és el principal problema, això és pel fet que la deshidrogenació es realitza a temperatures molt elevades, entre 200°C i 400°C. En conseqüència, per obtenir aquestes temperatures fa falta una gran quantitat d'energia, que si ve de combustibles fòssils fa que la petjada mediambiental sigui molt elevada per culpa de l'alt consum. Per altra banda, seria possible utilitzar energies renovables, us preguntareu, doncs sí, però el problema és que per unes plantes industrials tan grans és molt complicat poder complir tota la demanda energètica de la planta només amb energies renovables.
- La desactivació dels catalitzadors: El principal problema amb això és que els catalitzadors poden patir desactivacions a causa de la formació de "coque" (acumulacions de carboni). En el cas que això es produeixi, fa que es redueixi l'eficàcia del procés i, a més a més, en molts casos, genera residus que han de ser tractats correctament. Per altra banda, també fa que s'hagi de gastar més en catalitzadors per anar-los regenerant contínuament.

### 3. ÀREA D'ESTUDI

#### 3.1. Programes informàtics usats pel desenvolupament del marc aplicat

##### 3.1.1. pyMOL

El PyMOL és un visor molecular, per tant, podem veure tota mena de molècules en 3 dimensions. Entre elles, proteïnes i lligands.

Amb aquest enllaç es pot descarregar aquesta aplicació: [pyMOL](#)

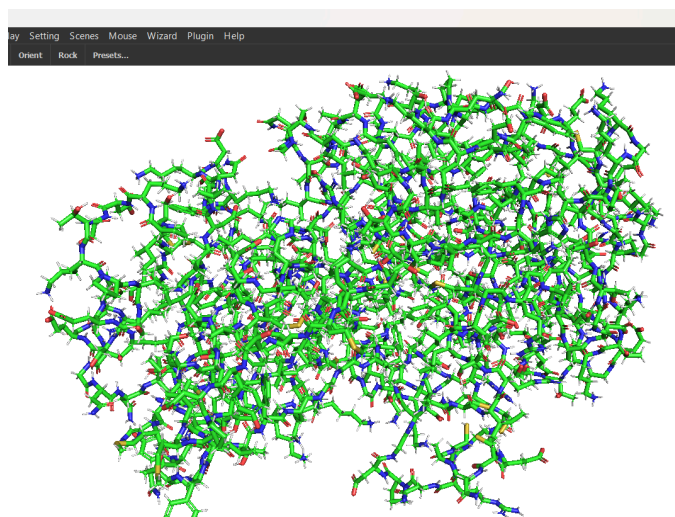


Figura 38. Imatge de l'enzim amb els aminoàcids amb forma de pals visualitzat en el programa PyMOL. Font: PyMOL

Aquí presento alguns dels controls més bàsics del PyMOL. Aquests es troben a la barra de la dreta, cada molècula té una barra d'eines amb les lletres A, S, H, L, C ("Action, Show, Hide, Label, Color"). Ara mencionaré les que més faré servir:

- "Action" → "Delete object". Serveix per a quan vull eliminar alguna de les molècules innecessàries.
- (Selecció d'àtoms) "Action" → "Remove atoms". Aquest control només està operatiu quan se seleccionen àtoms amb el cursor i en el cas que es vulguin eliminar.

- “Action” → “Zoom”. Això serveix per ampliar i veure des de més a prop una de les molècules o per alguns àtoms seleccionats.
- “Show” → “As” → “Sticks”. S’usa per poder veure la molècula seleccionada en forma de bastons.
- “Show” → “As” → “Cartoon”. Serveix per veure la proteïna en forma com si fos un “dibuix”. Quan s’obre un fitxer d’una proteïna aquesta visualització surt com a predeterminada.
- “Show” → “As” → “Surface”. Aquest mètode de visualització permet veure la proteïna amb la forma que té vist des de fora, és a dir, la seva superfície, d’aquesta manera es pot veure l’espai que ocupa.
- “Hide” → “Everything”. Serveix per amagar aquella molècula o part seleccionada, d’aquesta manera pot ser més fàcil veure les coses.
- “Label” → “Element symbol”. Serveix perquè la molècula o els àtoms seleccionats mostrin cadascun dels seus elements químics (C,O,H,N).
- “Label” → “Residue name”. Serveix perquè la molècula seleccionada o àtoms seleccionats mostrin quin és el seu “nom”, és a dir, quin és el tipus d’aminoàcid.
- “Label” → “Residue identifier”. Aquest és un identificador d’aminoàcids, com que tots estan numerats, aquest control et diu quin és el número identificador d’aquell aminoàcid.
- “Color”. Aquest serveix per si es vol canviar el color d’alguna secció o de la molècula sencera.

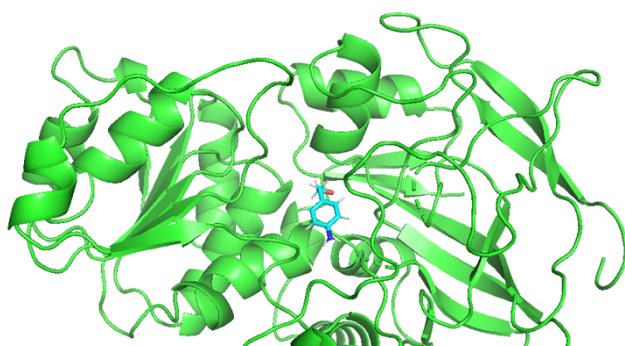


Figura 39. Imatge on es mostra que cada molècula (proteïna i lligand) tenen una barra d'eines. Font: PyMOL

Aquest programa té infinitat d'altres controls i opcions per fer tot el que vulguis amb la molècula. Aquests són alguns dels controls més útils, sense contar els de visualització:

- “File → “Open.” Aquesta és la forma de poder obrir arxius i treballar amb ells al programa PyMOL.
- “File → “Export Structure” → Export Molecule. Serveix per a quan es vol exportar el que has fet al programa, seria com guardar-ho.
- “Wizard → “Pair Fitting”. D'aquesta manera podem moure un substrat que acabem de crear i situar-lo perfectament en el centre actiu de l'enzim substituint pel que hi havia anteriorment (mitjançant una alineació dels àtoms).
- “Wizard → “Mutagénesis” → Proteïna → Escollir. Amb aquesta instrucció podem mutar els aminoàcids, escollint els que volem substituir i quins volem posar-hi.
- (Mode “3 bottons editing”) Ctrl + Botó dret → Botó esquerre per moure. Així podem rotar els aminoàcids mutats i no mutats les vegades que vulguem.
- “Plugin → “APBS electrostatic”. Així i introduint un fitxer APBS podem veure la molècula completa amb les seves càrregues, de color blau si té càrrega positiva i vermell si té càrrega negativa.
- “Display” → “Background”. Serveix per canviar el color de fons de la pantalla.

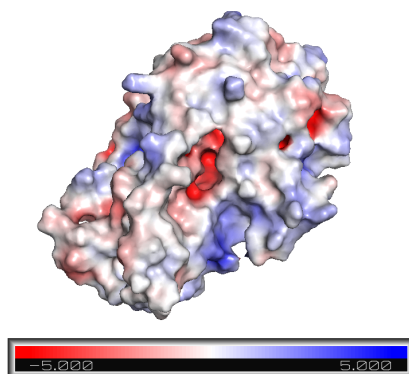


Figura 40. Enzim amb les càrregues, blau positiu i vermell negatiu. Font: PyMOL.

### 3.1.2. gVim

Aquesta aplicació serveix per modificar el codi d'alguns arxius, és a dir, fa la funció del terminal de Windows.

Utilitzar aquest mètode té molts beneficis, però alhora és molt difícil de dominar. Aquest és un dels controls fonamentals:

- Clicar “I”. Serveix per entrar en el mode d'edició del codi i d'aquesta manera modificar tot el que vulguem. Per sortir d'aquest mode, s'utilitza la tecla “Esc”

Amb aquest enllaç es pot descarregar aquesta aplicació: [gVim](#)

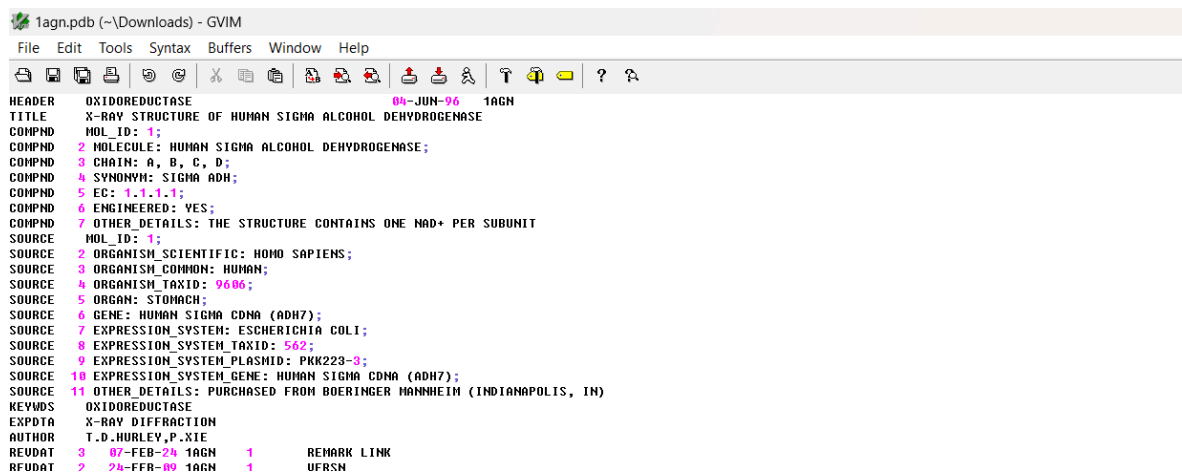


Figura 41. Imatge d'un arxiu visualitzar amb el programa “gVim”. Font: gVim.

## 3.2. Webs necessàries pel desenvolupament del marc aplicat

### 3.2.1. Protein Data Bank

Aquesta és la web que funciona com la biblioteca de proteïnes. Aquí puc trobar totes les estructures tridimensionals conegudes de proteïnes i àcids nucleics. Aquesta web és molt important perquè permet descarregar arxius que contenen els models tridimensionals de les proteïnes en format .pdb.

Amb aquest enllaç puc accedir a aquesta web: [Protein Data Bank](#)

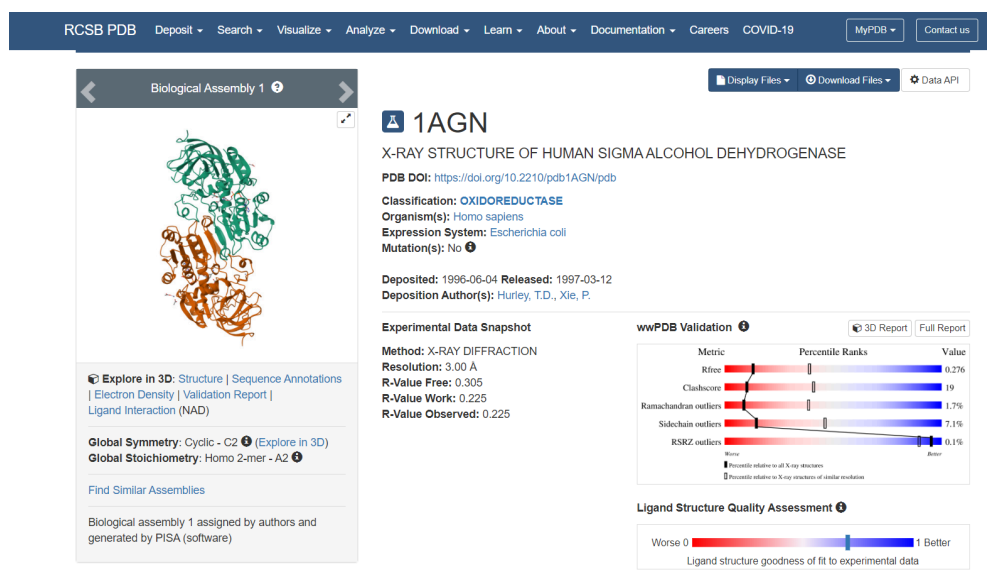


Figura 42. Imatge de l'enzim 1AGN al PDB. Font: web PDB.

### 3.2.2. DIY-molecules: build your own molecule

Aquesta és una web que permet formar lligands.

Amb aquest enllaç puc accedir: [DIY-molecules: build your own molecule](https://www.diy-molecules.com/)

**1. Draw here your molecule in 2D:**

**2. Give it a name:**

**3. Transfer** to the right-hand panel (H atoms will be added)

**4. Optimise** the structure in 3D. (Several times may be needed; [help](#))

**5. Observe** the molecule in 3D on the right-hand panel.

**6. You can also get 3D structures** typing their name in English:  and then you may **transfer to 2D**, for example to add some modifications.

ing this application, please [contact](#) the author. ♦ [Versión en español](#) ♦ [Version française](#) ♦

**DIY-molecules: build your own molecule**

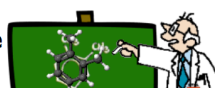


Figura 43. Imatge de la web “DIY-molecules: build your own molecule”. Font:

[“DIY-molecules: build your own molecule”](https://www.diy-molecules.com/)

### 3.2.3. De .pdb a .pqr

Els arxius .pdb i .pqr són dos arxius molt importants i indispensables per fer aquest treball. Són arxius que fan possible que veiem les molècules en tres dimensions, és a dir, que són els arxius que guarden les molècules.

Els dos arxius tenen es diferencien per algunes característiques. Per una part, els documents en format .pdb no tenen incorporades les càrregues de la proteïna, el radi iònic de cada àtom i els hidrògens, és a dir, falten algunes informacions fonamentals dels àtoms. Per altra banda, els arxius .pqr sí tenen tot això.

Aquesta web l'única cosa que fa és transformar els arxius .pdb en .pqr, és a dir, afegir algunes informacions que manquen. La web ha estat creada per [poissonboltzmann.org](http://poissonboltzmann.org).

Amb aquest enllaç puc accedir a aquesta web: [Transformació de .pdb a .pqr](http://poissonboltzmann.org)

The screenshot shows the 'PDB2PQR Job Configuration' web interface. On the left is a dark sidebar with a logo and navigation links: Home, Tools, About, Documentation, and Announcements. The main content area has a light blue header with a progress bar showing five steps: 1. PDB2PQR Configuration (active), 2. PDB2PQR Job Status, 3. APBS Configuration, 4. APBS Job Status, and 5. Visual. The configuration section includes: 'PDB Selection' with a 'PDB ID' field and an 'Upload a PDB file' button; 'pKa Options' with a 'pH' field set to 7.0 and radio buttons for 'No pKa calculation' and 'Use PROPKA to assign protonation states at provided pH' (selected); 'Forcefield Options' with a 'Please choose a forcefield to use' section containing buttons for AMBER, CHARMM, PEOEPB, PARSE, SWANSON, TYL06, and User-defined Forcefield; and 'Additional Options' with a 'Please choose an output naming scheme to use' section containing buttons for Internal naming scheme, AMBER, CHARMM, PARSE, PEOEPB, SWANSON, and TYL06. Below these are several checkboxes: 'Ensure that new atoms are not rebuilt too close to existing atoms' (checked), 'Optimize the hydrogen bonding network' (checked), 'Assign charges to the ligand specified in a MOL2 file' (unchecked), 'Create an APBS input file' (checked), 'Add/keep chain IDs in the PQR file' (checked), 'Insert whitespaces between atom name and residue name, between x and y, and between y and z' (unchecked), 'Make the protein's N-terminus neutral (requires PARSE forcefield)' (unchecked), 'Make the protein's C-terminus neutral (requires PARSE forcefield)' (unchecked), and 'Remove the waters from the output file' (checked). A green 'Start Job' button is located at the bottom right of the configuration area.

Figura 44. Imatge de la web de transformació de PDB a PQR. Font: [poissonboltzmann.org](http://poissonboltzmann.org)

### 3.2.4. APBS

Aquesta web ha estat creada per [poissonboltzmann.org](http://poissonboltzmann.org) i una de les funcions que té és que permet calcular l'energia d'unió entre una proteïna i el substrat, és a dir, calcula com de bé s'integren entre les dues molècules. Més endavant, en l'apartat de termodinàmica parlaré de com es fa el càlcul.

Amb aquest enllaç puc accedir a aquesta web: [APBS](http://poissonboltzmann.org)

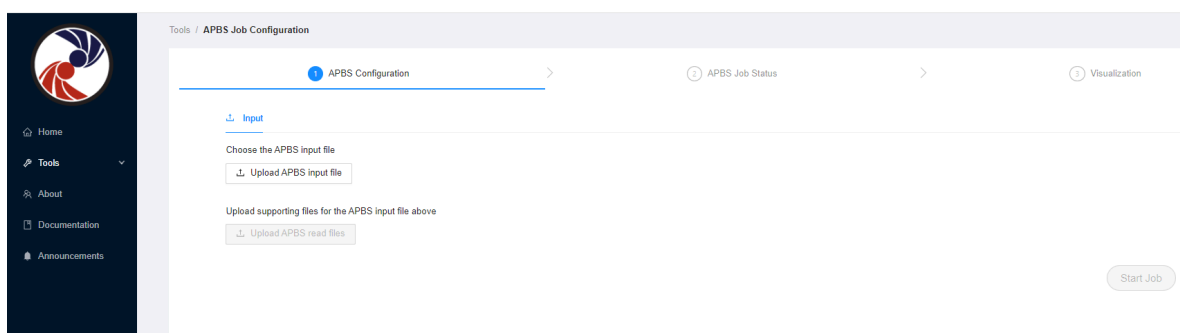


Figura 45. Imatge de la web de poissonboltzman.org. Font: poissonboltzmann.org



## 4. MARC APLICAT

En el marc aplicat d'aquest treball faré una introducció al sistema de visualització i modificació de proteïnes a través d'eines digitals i de modelització, mutant enzims per reduir l'energia d'unió.

### 4.1. Termodinàmica

Primer vull parlar una mica de la termodinàmica, que és en el que es basen els meus càlculs i crec que és important explicar com funcionen.

#### 4.1.1. Sistemes termodinàmics

Un sistema termodinàmic es defineix com la part de l'univers objecte d'estudi, posant exemples, podrien ser, una cèl·lula, una persona, l'atmosfera terrestre, la barreja d'una benzina...

Un sistema podria estar separat de la resta de l'univers (voltants del sistema), és a dir, que està separat per unes parets reals o imaginàries.

Hi ha diferents tipus de sistemes termodinàmics:

- Sistema aïllat: En aquest no s'intercanvia ni matèria ni energia amb els voltants.
- Sistema tancat: En aquest s'intercanvia energia (calor i treball) amb els voltants però no matèria.
- Sistema obert: És aquell sistema que intercanvia matèria i energia amb els voltants.

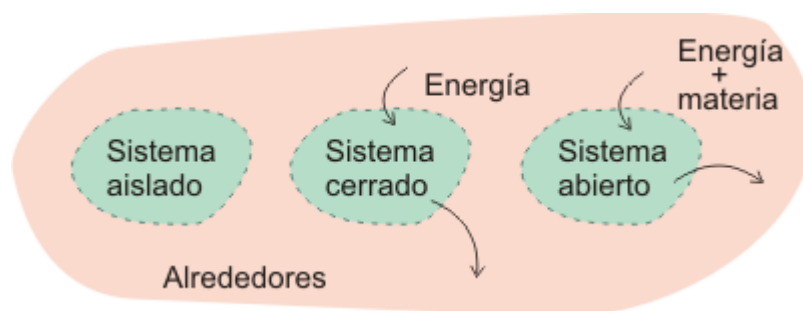


Figura 46. Imatge dels tres tipus de sistemes termodinàmics. [Font](#)

### 4.1.2. Entalpia i entropia

Aquests són dos conceptes termodinàmics són molt importants i ara explicaré.

#### 4.1.2.1. Entalpia

Aquesta propietat representa la quantitat total d'energia interna d'un sistema, tenint en compte l'energia cinètica i potencial de les partícules i també contant l'energia associada als enllaços químics dels seus components. La seva unitat són els Jules (J).

La fórmula per poder calcular l'entalpia és:

$$H = U + PV$$

On  $H \rightarrow$  entalpia,  $U \rightarrow$  energia interna,  $P \rightarrow$  Pressió,  $V \rightarrow$  Volum del sistema

#### 4.1.2.2. Entropia

Aquesta és una altra propietat, però que mesura el grau de "desordre" o aleatorietat d'un sistema termodinàmic, podríem dir que és una forma per mesurar la distribució de l'energia dins d'un sistema.

### 4.1.3. L'energia lliure de Gibbs

L'energia lliure de Gibbs, representada amb una  $G$ , és una magnitud termodinàmica que mesura la quantitat de treball útil que pot realitzar un sistema a pressió i temperatura constants. Aquesta energia de Gibbs combina l'entalpia i l'entropia, que són les propietats que he mencionat anteriorment, i també la temperatura.

L'energia lliure de Gibbs es pot definir mitjançant aquesta equació:

$$G=H-TS$$

On  $G \rightarrow$  Energia lliure de Gibbs,  $H \rightarrow$  Entalpia del sistema,  $T \rightarrow$  Temperatura (k)  
 $S \rightarrow$  Entropia del sistema.

A més a més, un dels factors més importants d'aquesta magnitud és que serveix per predir l'espontaneïtat d'un procés o no, és a dir, si necessita energia externa o no.

Si  $\Delta G < 0$ : el procés és espontani i pot passar sense aportació d'energia externa.

Si  $\Delta G > 0$ : el procés no és espontani i requereix energia externa per succeir.

Si  $\Delta G = 0$ : el sistema està en equilibri i no hi ha cap canvi net.

#### 4.1.4. Cicle termodinàmic

Un cicle termodinàmic són una sèrie de processos en el que un sistema experimenta una sèrie de canvis en les seves propietats termodinàmiques (T, P, V).

La web que he mencionat anteriorment i que és la que utilitzaré per fer el càlcul, empra l'equació que està definida a la figura 47 per obtenir l'energia d'unió. Aquesta energia d'unió s'avalua segons l'energia de la transferència des d'un entorn dielèctric homogeni cap a un entorn dielèctric inhomogeni, amb constants dielèctriques diferents per l'interior i l'exterior de la proteïna, basat en l'energia lliure de Gibbs.

Aquesta web fa el càlcul de l'energia d'unió, però he de mencionar que és un càlcul aproximat, és a dir, que no es fa de forma extremadament precisa. El càlcul és estàtic, és a dir, sense moviment de les proteïnes, i no dinàmic. El motiu de què no faci un càlcul dinàmic, simulant el moviment de les proteïnes, és perquè encara que seria molt més precís, si ho fes amb totes les variables, tenint en compte els coenzims, el moviment de les proteïnes o altres factors, faria que aquest càlcul fos massa complex donant lloc a què si s'executés amb un ordinador convencional, podria trigar mesos o anys a fer el càlcul, i per fer-ho en menys temps s'hauria d'emprar un superordinador, del qual no dispo.

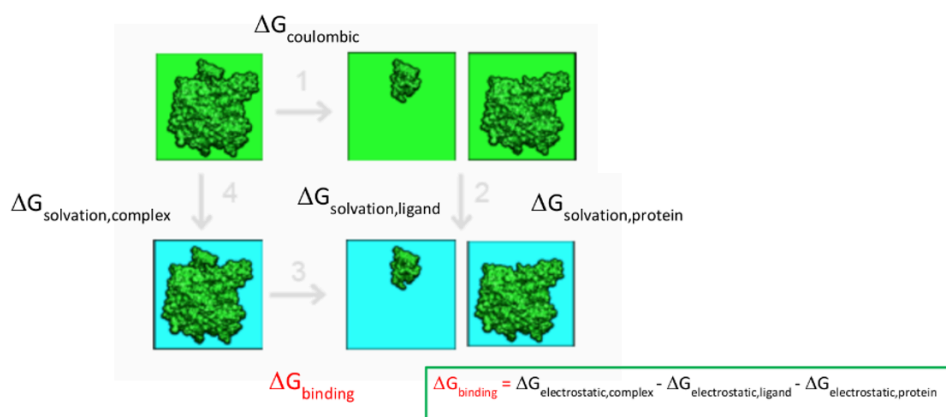


Figura 47. Imatge del cicle termodinàmic. [Font](#)

## 4.2. Procés general de les mutacions

### 4.2.1. Preparació de l'enzim i el lligand

Ara prepararé l'enzim i el lligand en el programa informàtic per a poder treballar i fer el marc aplicat. Aquest procés només s'ha de fer una vegada, que és aquesta, la de la preparació i com que guardaré tots els arxius que preparem, ja els tindrè per a quan els necessiti.

#### Pas 1:

Primer de tot he de començar amb la preparació de la proteïna i el lligand per a poder portar a terme els càlculs. Jo utilitzaré l'enzim 1AGN i el lligand etanol i el lligand àcid 4-aminofenilacètic (Figura 57).

El primer que he fet és anar a la pàgina web del "Protein Data Bank" i localitzar el meu enzim, que és l'alcohol deshidrogenasa 1 AGN. Un cop allà he descarregat el model de la proteïna en format .pdb.

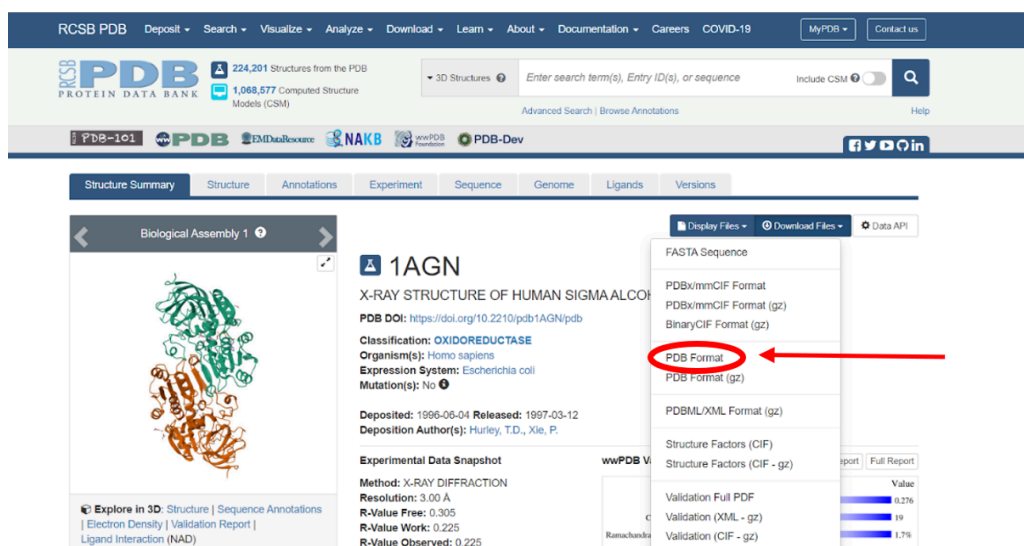


Figura 48. Pàgina web del Protein Data Bank en la que descarrego l'enzim 1AGN en format .pdb. [Font](#)

**Pas 2:**

Un cop descarregat necessito el terminal de l'ordinador per poder veure el codi de l'arxiu, no obstant això, com que no em funcionava gaire bé perquè tinc un ordinador Windows, he instal·lat un programa que fa la mateixa funció, anomenat “gVim”. En el meu cas he descarregat en el format per 64 bits, que és el format del meu ordinador.

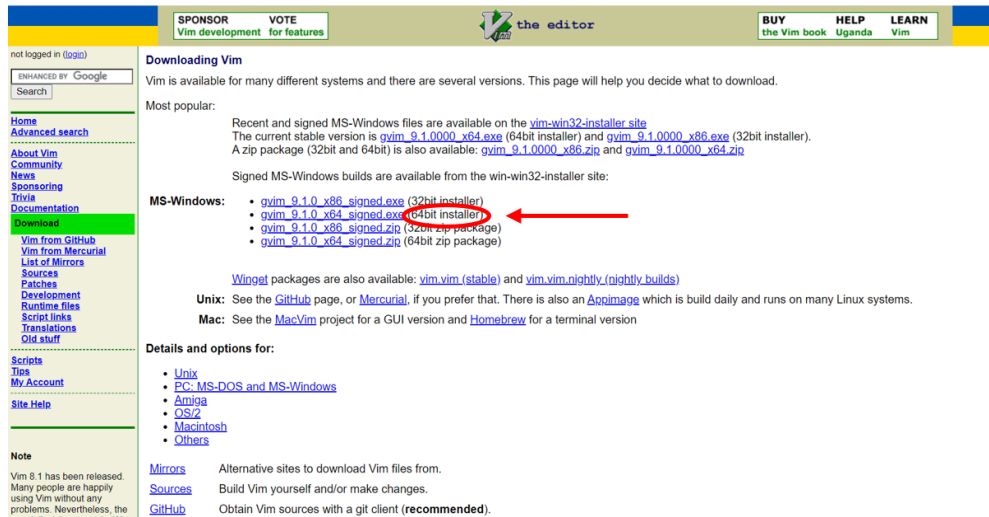


Figura 49. Imatge de la pàgina de descàrrega del programa gVim. [Font](#)

**Pas 3:**

Quan he descarregat l'aplicació he obert el meu enzim amb aquesta aplicació, això ho he fet anant a on tenia l'arxiu de l'enzim, jo el tenia a les baixades, i després l'he obert amb el programa que acabo de descarregar, que és el que està destacat a la figura 50.

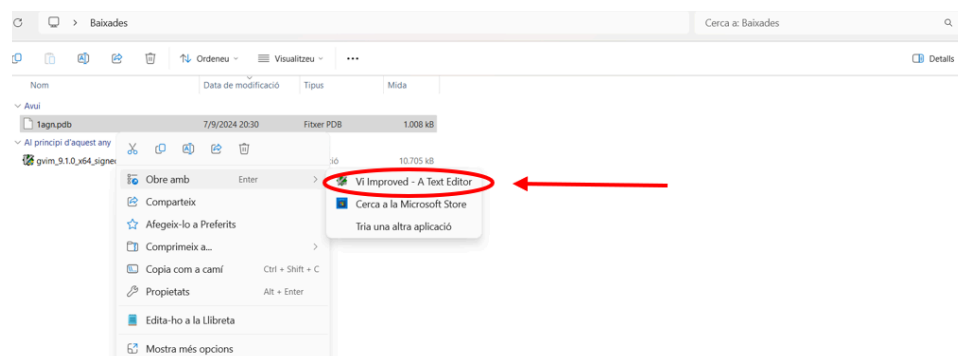


Figura 50. Imatge de la selecció de l'enzim 1AGN a la carpeta de baixades. Font: Explorador de fitxers de Windows

Un cop he obert l'arxiu, tot es veu com a la figura 51, on puc veure moltes de les característiques d'aquest enzim, que són les mateixes dades que hi ha a l'arxiu .pdb. De totes maneres, el que a mi m'interessa són les dades que hi ha més a baix, on a l'esquerra posi "atom".

```

HEADER      OXIDOREDUCTASE
TITLE       X-RAY STRUCTURE OF HUMAN SIGMA ALCOHOL DEHYDROGENASE
COMPND      MOL_ID: 1;
COMPND      2 MOLECULE: HUMAN SIGMA ALCOHOL DEHYDROGENASE;
COMPND      3 CHAIN: A, B, C, D;
COMPND      4 SYNONYM: SIGMA ADH;
COMPND      5 EC: 1.1.1.1;
COMPND      6 ENGINEERED: YES;
COMPND      7 OTHER_DETAILS: THE STRUCTURE CONTAINS ONE NAD+ PER SUBUNIT
SOURCE      MOL_ID: 1;
SOURCE      2 ORGANISM_SCIENTIFIC: HOMO SAPIENS;
SOURCE      3 ORGANISM_COMMON: HUMAN;
SOURCE      4 ORGANISM_TAXID: 9606;
SOURCE      5 ORGAN: STOMACH;
SOURCE      6 GENE: HUMAN SIGMA CDNA (ADH7);
SOURCE      7 EXPRESSION_SYSTEM: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE      8 EXPRESSION_SYSTEM_TAXID: 562;
SOURCE      9 EXPRESSION_SYSTEM_PLASMID: pW229-2;
SOURCE      10 EXPRESSION_SYSTEM_GENE: HUMAN SIGMA CDNA (ADH7);
SOURCE      11 OTHER_DETAILS: PURCHASED FROM BOEHRINGER MANNHEIM (INDIANAPOLIS, IN)
KEYWDS      OXIDOREDUCTASE
EXPDTA      X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR      T.D.HURLEY,P.XIE
REVDAT      3 07-FEB-74 TAGN 1 REMARK LINK
REVDAT      2 24-FEB-76 TAGN 1 VERSN
REVDAT      1 12-MAR-77 TAGN 0
JRNL        AUTH P.XIE,S.H.PARSONS,D.C.SPECKHARD,V.F.BOSRON,T.D.HURLEY
JRNL        TITL 3-RAY STRUCTURE OF HUMAN CLASS 10 SIGMAALCOHOL
JRNL        TITL 2 DEHYDROGENASE. STRUCTURAL BASIS FOR SUBSTRATE SPECIFICITY.
JRNL        REF J.BIOL.CHEM. 0 272 18558 1997
JRNL        REFN ISSN 0021-9258
  
```

Figura 51. Imatge de les dades de l'enzim visualitzades amb el programa gVim.  
Font: gVim

#### Pas 4:

Un cop he trobat la zona que posa "atom" a la columna de l'esquerra, sé que he arribat a la part de l'arxiu on aquestes dades de tots els àtoms són les que realment conformen cada àtom del meu enzim. Aquí puc veure cada àtom que conforma cada aminoàcid amb totes les seves dades, d'esquerra a dreta, primer hi ha el número de l'àtom, després quin element químic és, la següent columna és de quin aminoàcid forma part aquell àtom, la següent és una lletra sola i correspon a quin domini forma part (A,B,C,D), la posterior indica quin és el número de l'aminoàcid del qual forma part aquell àtom, les següents tres columnes són les coordenades d'aquell àtom, la penúltima indica durant el temps de la creació del model l'àtom ha estat tot el temps en el seu lloc o no i l'última no la faré servir.

Perquè el model funcioni correctament m'he d'assegurar que no hi hagi aminoàcids de doble conformació, això vol dir que en el moment que van crear el model alguns àtoms que no estaven del tot fixats, es movien, i en diferents moments tenien unes coordenades desiguals. Per trobar-los m'he assegurat que en la penúltima columna sempre posi "1,00" que vol dir que està completa i que no s'ha mogut. Com que he comprovat que no hi ha cap aminoàcid de conformació puc continuar endavant.

1agn.pdb (~\Downloads) - GVIM

|      |    |     |     |   |    |       |        |        |      |       |   |
|------|----|-----|-----|---|----|-------|--------|--------|------|-------|---|
| ATOM | 62 | C   | LYS | A | 10 | 6.033 | 7.781  | 1.338  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 63 | O   | LYS | A | 10 | 6.819 | 6.909  | 1.731  | 1.00 | 19.62 | O |
| ATOM | 64 | CB  | LYS | A | 10 | 4.457 | 6.897  | -0.380 | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 65 | CG  | LYS | A | 10 | 3.806 | 6.987  | -1.768 | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 66 | CD  | LYS | A | 10 | 3.055 | 8.307  | -1.972 | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 67 | CE  | LYS | A | 10 | 2.224 | 8.280  | -3.245 | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 68 | NZ  | LYS | A | 10 | 1.181 | 9.348  | -3.235 | 1.00 | 19.62 | N |
| ATOM | 69 | N   | ALA | A | 11 | 5.450 | 8.659  | 2.150  | 1.00 | 19.62 | N |
| ATOM | 70 | CA  | ALA | A | 11 | 5.722 | 8.698  | 3.581  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 71 | C   | ALA | A | 11 | 4.566 | 9.335  | 4.352  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 72 | O   | ALA | A | 11 | 4.014 | 10.364 | 3.946  | 1.00 | 19.62 | O |
| ATOM | 73 | CB  | ALA | A | 11 | 7.018 | 9.471  | 3.860  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 74 | N   | ALA | A | 12 | 4.233 | 8.744  | 5.493  | 1.00 | 19.62 | N |
| ATOM | 75 | CA  | ALA | A | 12 | 3.166 | 9.255  | 6.338  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 76 | C   | ALA | A | 12 | 3.749 | 10.399 | 7.165  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 77 | O   | ALA | A | 12 | 4.069 | 10.231 | 8.341  | 1.00 | 19.62 | O |
| ATOM | 78 | CB  | ALA | A | 12 | 2.647 | 8.143  | 7.236  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 79 | N   | VAL | A | 13 | 3.926 | 11.553 | 6.535  | 1.00 | 19.62 | N |
| ATOM | 80 | CA  | VAL | A | 13 | 4.503 | 12.688 | 7.242  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 81 | C   | VAL | A | 13 | 3.502 | 13.239 | 8.253  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 82 | O   | VAL | A | 13 | 2.297 | 12.981 | 8.155  | 1.00 | 19.62 | O |
| ATOM | 83 | CB  | VAL | A | 13 | 4.974 | 13.812 | 6.270  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 84 | CG1 | VAL | A | 13 | 5.835 | 14.831 | 7.009  | 1.00 | 19.62 | C |
| ATOM | 85 | CG2 | VAL | A | 13 | 5.780 | 13.214 | 5.134  | 1.00 | 19.62 | C |

Figura 52. Imatge del fitxer de l'enzim visualitzat amb el programa gVim on es veuen tots els àtoms de la proteïna. Font: gVim.

### Pas 5:

Un cop m'he assegurat que no hi ha cap aminoàcid de doble conformació he d'observar totes les dades que he vist anteriorment amb un programa que interpreti les dades i les mostri en tres dimensions, això ho faré amb el programa PyMOL. Aquí puc veure la cadena completa de la proteïna, clarament es poden veure els quatre dominis de l'enzim. També puc observar metalls (que són les esferes grises), hi ha el NAD<sup>+</sup> i algunes altres molècules. Tot això es pot veure a la Figura 53.

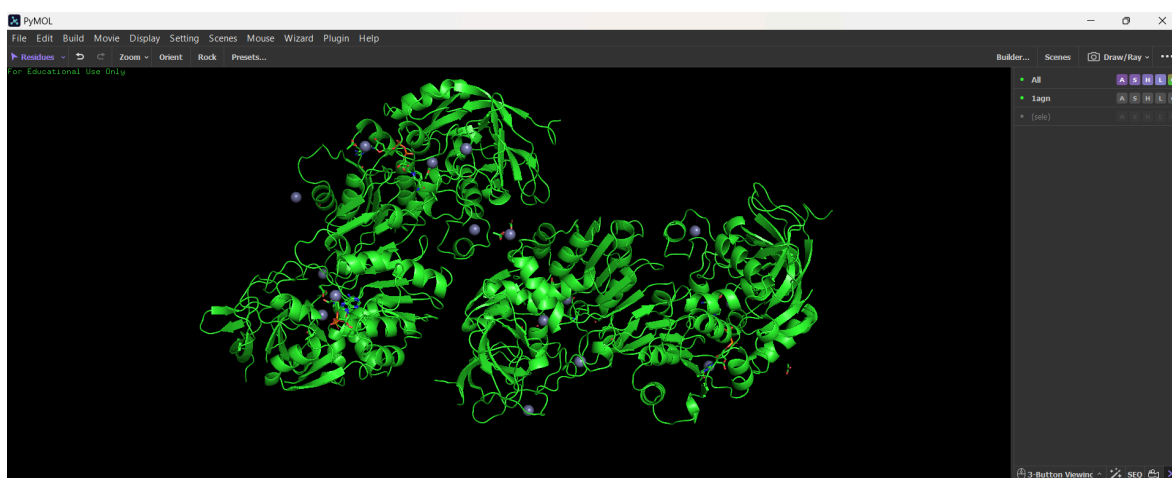


Figura 53. Imatge de l'enzim sense cap canvi. Font: PyMOL

**Pas 6:**

Com que sé que els quatre dominis de l'enzim tenen la mateixa funció, és a dir, un centre actiu, una estructura..., per simplificar-ho, he decidit treballar només amb un domini de l'enzim. Per fer-ho, necessito esborrar els altres 3 cadenes, per fer-ho utilitzaré el codi "select chain B" i després l'esborro, i així amb les tres cadenes, fins que quedi només la cadena que vull, la A.



Figura 54. Imatge de la cadena A de l'enzim. Font: PyMOL.

**Pas 7:**

Ara el que he de fer és esborrar els ions acetat que són els substrats que hi havia al model, que no els necessito, excepte el que està al costat d'un grup  $Zn^{+}$  i conforma el centre actiu, que l'usaré com a referència. Per altra banda, també he d'esborrar els grups  $Zn^{+}$  que hi hagi menys el que estigui al centre actiu.



Figura 55. Imatge de la cadena A de l'enzim. Font: PyMOL.



**Pas 8:**

Posteriorment, he format els dos lligands que utilitzaré, en format .pdb. Per una banda, he format un etanol, que és el substrat natural del meu enzim i, per altra banda, he format l'alcohol precursor de l'àcid 4-aminofenilacètic que és l'altre que usaré.

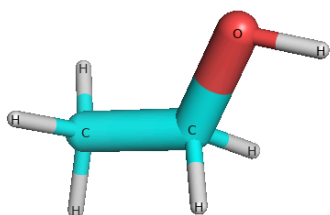


Figura 56. Imatge de l'etanol.  
Font: PyMOL.

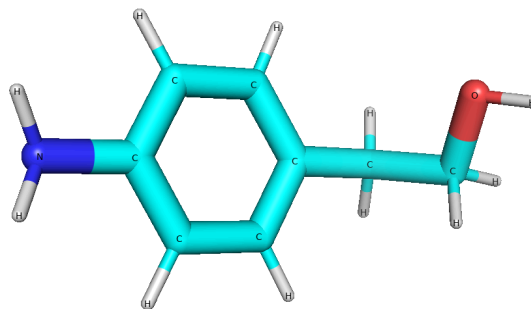


Figura 57. Imatge de l'alcohol precursor  
de l'àcid 4-aminofenilacètic. Font: PyMOL.

**Pas 9:**

Seguidament, he inserit els dos lligands amb l'enzim en dos arxius Pymol diferents. Com que al principi no se situen automàticament al centre actiu he d'utilitzar l'eina Pair Fitting per situar-lo exactament on ha d'estar. Per poder situar-los al centre actiu de l'enzim he agafat de referència l'ió acetat que havia deixat i l'he situat perfectament gràcies a l'eina Pair Fitting, substituint l'un per l'altre, en els dos arxius.

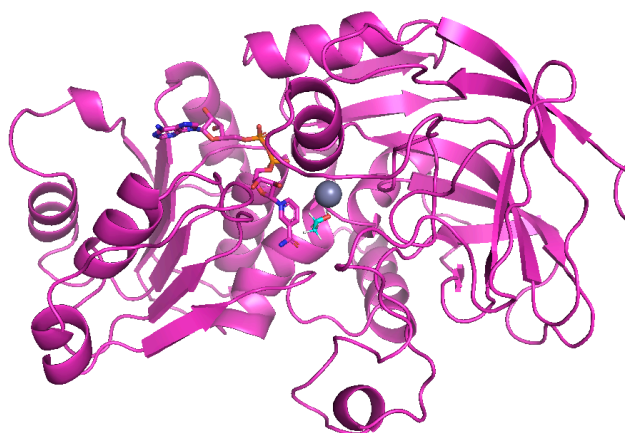


Figura 58. Imatge de l'enzim amb el lligand etanol. Font: PyMOL.

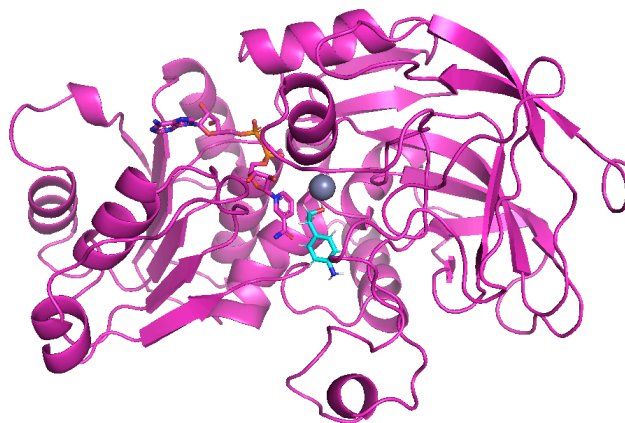


Figura 59. Enzim amb el lligand de l'alcohol precursor de l'àcid 4-aminofenilacètic. Font: PyMOL.

### Pas 10:

Un cop he situat cada lligand al seu lloc, he esborrat la part de l'enzim i he exportat els dos lligands anant a "File", "export Structure" i "Export Molecule". Una vegada exportats vaig necessitar la meva tutora de la Facultat de Química que va determinar les càrregues del lligand (s'ha d'usar un programa de pagament). Un cop fet me'l va tornar a enviar i el vaig tornar a situar a l'enzim.

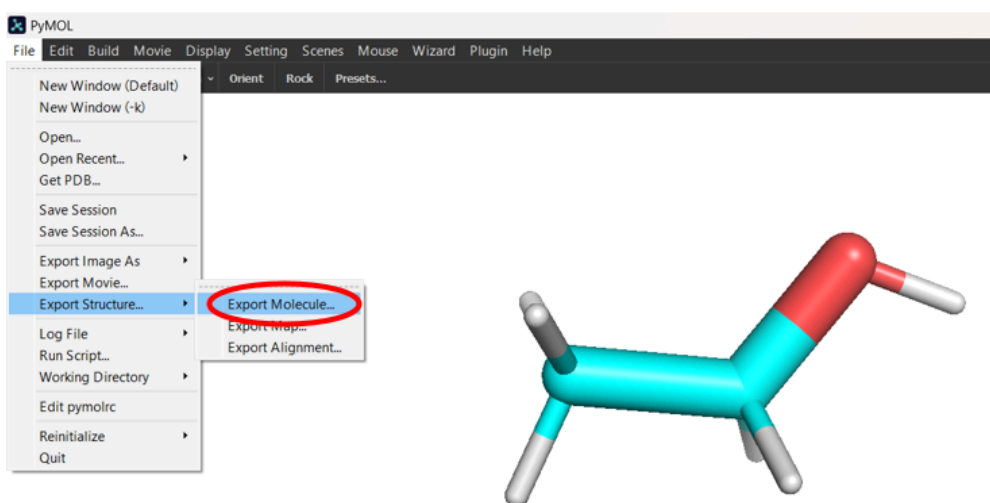


Figura 60. Imatge en el moment d'exportar la molècula d'etanol. Font: PyMOL.

**Pas 11:**

Un cop he tornat a inserir els dos lligands he decidit esborrar el  $\text{NAD}^+$  perquè d'aquesta manera puc estalviar càlculs, ja que si no fos així es complicarien molt els càlculs i en ser un model estàtic, no afectarà molt en els resultats, de totes maneres si el deixés, seria una feina massa complicada per un ordinador convencional. A més a més, també he esborrat el  $\text{Zn}^+$  per simplificar el sistema.

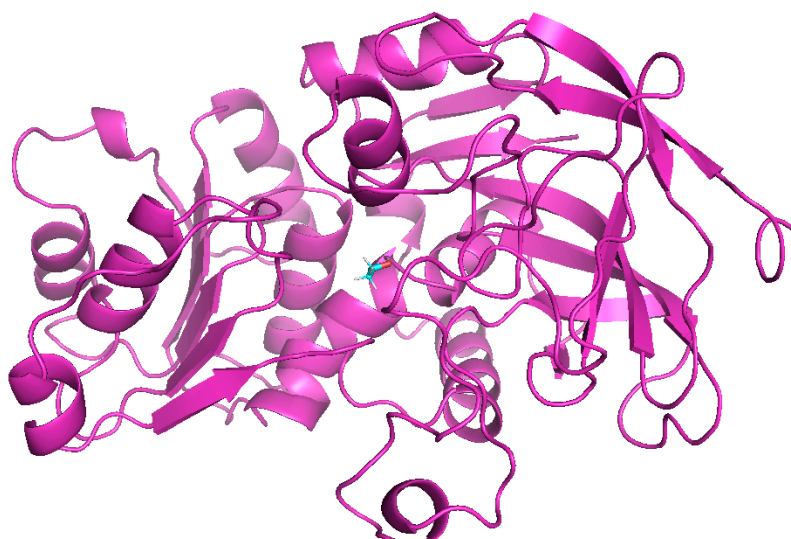


Figura 61. Imatge de l'enzim amb el lligand. Font: PyMOL.

**Pas 12:**

Ara que ho tinc tot, tinc la proteïna sense càrregues i en format .pdb, ho he de passar de format .pdb a .pqr, és a dir, afegir les càrregues de la proteïna, el radi iònic de cada àtom i els hidrògens, tenint en compte que treballaré amb un pH de 7, és a dir, neutre. Per fer-ho utilitzaré una pàgina web, amb la configuració que he posat a la figura 62, el que he hagut de fer és pujar el fitxer en pdb. i que m'ho transformi a .pqr.

The screenshot shows the 'PDB Selection' web interface. On the left is a dark sidebar with a logo and links: Home, Tools, About, Documentation, and Announcements. The main content area has a light blue header with the text 'PROPKA: Web Interface'. Below this, the 'PDB Selection' section includes a 'PDB Source' dropdown, a 'PDB ID' input field with an 'Upload a PDB file' button, and a 'Please upload a PDB file' section with a 'Select File' button and an 'EtOH.pdb' file listed. A note states: 'For continued support of this server, please register your use of this software.' with a 'Register Here' button. The 'pKa Options' section has a 'pH' input set to 7.0 and two radio buttons: 'No pKa calculation' (selected) and 'Use PROPKA to assign protonation states at provided pH'. The 'Forcefield Options' section has a 'Please choose a forcefield to use' label and a row of buttons: AMBER (selected), CHARMM, PEOEPB, PARSE, SWANSON, TYLO6, and User-defined Forcefield. Below this is another row of buttons for 'Please choose an output naming scheme to use': Internal naming scheme, AMBER (selected), CHARMM, PARSE, PEOEPB, SWANSON, and TYLO6. The 'Additional Options' section contains several checkboxes: 'Ensure that new atoms are not rebuilt too close to existing atoms' (checked), 'Optimize the hydrogen bonding network' (checked), 'Assign charges to the ligand specified in a MOL2 file' (unchecked), 'Create an APBS input file' (checked), 'Add/keep chain IDs in the PQR file' (checked), 'Insert whitespaces between atom name and residue name, between x and y, and between y and z' (unchecked), 'Make the protein's N-terminus neutral (requires PARSE forcefield)' (unchecked), 'Make the protein's C-terminus neutral (requires PARSE forcefield)' (unchecked), and 'Remove the waters from the output file' (checked). A green 'Start Job' button is on the right.

Figura 62. Imatge de la web. [Font](#)

### Pas 13:

Quan tinc la proteïna i els lligands en format .pqr he unit els dos lligands amb la seva proteïna per separat al Pymol i he exportat cada sistema com anteriorment.

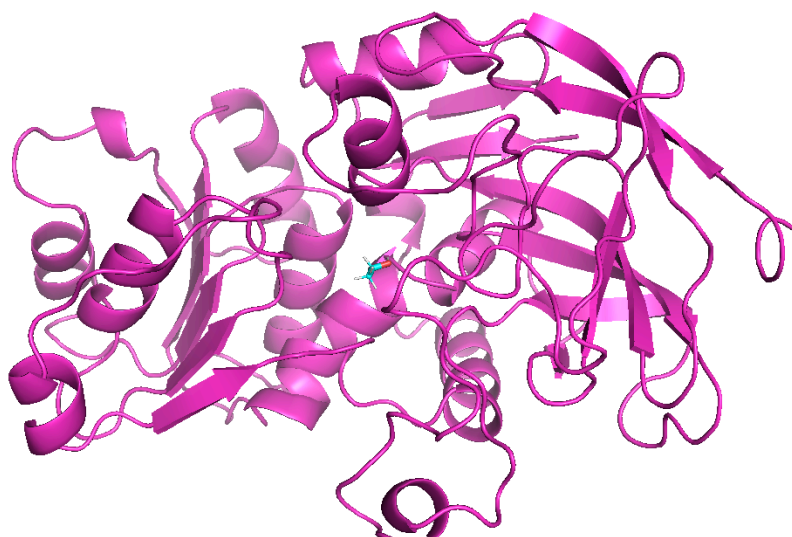


Figura 63. Imatge de l'enzim i el lligand amb els hidrògens. Font: PyMOL.

**Pas 14:**

Ara ja és quan he de fer el càlcul de l'energia d'unió, per fer-ho necessito (tot en .pqr) el lligand, l'enzim i un arxiu amb els dos junts. A més a més, també necessito un fitxer d'input que sigui el que li digui a la web el que ha de llegir i com. Per crear-lo he agafat una plantilla que m'han facilitat i he modificat amb el "gVim" una part perquè llegeixi el que jo vull, això consisteix a posar el nom de l'arxiu que ha de llegir, perquè el pugui identificar, això s'ha de fer a la part de dalt i a l'inici dels tres paràgrafs.

```

APBS.in (~\OneDrive\Documents\Treball de Recerca\Models\Model 4\0\Lligand 1) - GVIM
File Edit Tools Syntax Buffers Window Help
[Icons]
read
  mol pqr lligand.pqr # lligand
  mol pqr proteina.pqr # protein kinase A
  mol pqr complex.pqr # complex
end

elec name lligand # BALANOL ENERGY CALCULATION
mg auto
dime 97 97 97 # Grid dimensions
cglen 70 70 70 # Coarse grid lengths
cgcent mol 3 # Coarse grid centered on the complex
fglen 16 16 16 # Fine grid lengths
fgcent mol 1 # Fine grid centered on the complex
mol 1
lpbe # Linearized PB
bcfl sdh # Monopole boundary condition
ion 1 0.000 2.0 # Zero ionic strength
ion -1 0.000 2.0
pdie 2.0 # Solute dielectric
sdie 78.00 # Solvent dielectric
chgn sp10 # Linear charge discretization
srfa smol # Smoothed molecular surface
srad 0.0 # Solvent probe radius
swin 0.3 # Surface spline window (not used)
sdens 10.0 # Sphere density
temp 298.15 # Temperature
gamma 0.105 # Surface tension (not used)
calcenergy total
calcforce no
end

elec name proteina # PROTEIN KINASE A CALCULATION
mg auto
dime 97 97 97
cglen 70 70 70
cgcent mol 3
fglen 16 16 16
fgcent mol 1
mol 2
lpbe
bcfl sdh
ion 1 0.000 2.0
ion -1 0.000 2.0
pdie 2.0
sdie 78.00
chgn sp10
srfa smol
srad 0.0
swin 0.3
sdens 10.0
temp 298.15
gamma 0.105
calcenergy total
calcforce no
end

elec name complex # COMPLEX CALCULATION

```

Figura 64. Imatge del fitxer input. Font: gVim.

#### 4.2.2. Mutació i càlcul a la web

Aquesta és la part en la qual faré les mutacions dels enzims i les introduiré a la web perquè pugui fer-me el càlcul pertinent. A diferència de l'altre punt, aquest procés l'hauré de començar des de zero cada vegada que vulgui fer una mutació, però com que és sempre igual l'ha explicat de la forma general.

A l'hora de posar el número del pas he decidit continuar amb l'ordre de la secció anterior.

**Pas 15:**

Aquest és el pas de les mutacions, com que és un pas en el qual faré diverses modificacions les explicaré més endavant, però en el procés general seria com si anessin en aquest pas 15.

**Pas 16:**

Un cop tinc l'enzim amb les mutacions que vull introduir he de passar-ho per la web per fer el càlcul. Per fer-ho, primer, he d'eliminar el lligand, ja que només l'estava utilitzant per orientar-me. Per fer-ho he d'anar al menú del lligand i clicar a "Actions" i després a "delete object".

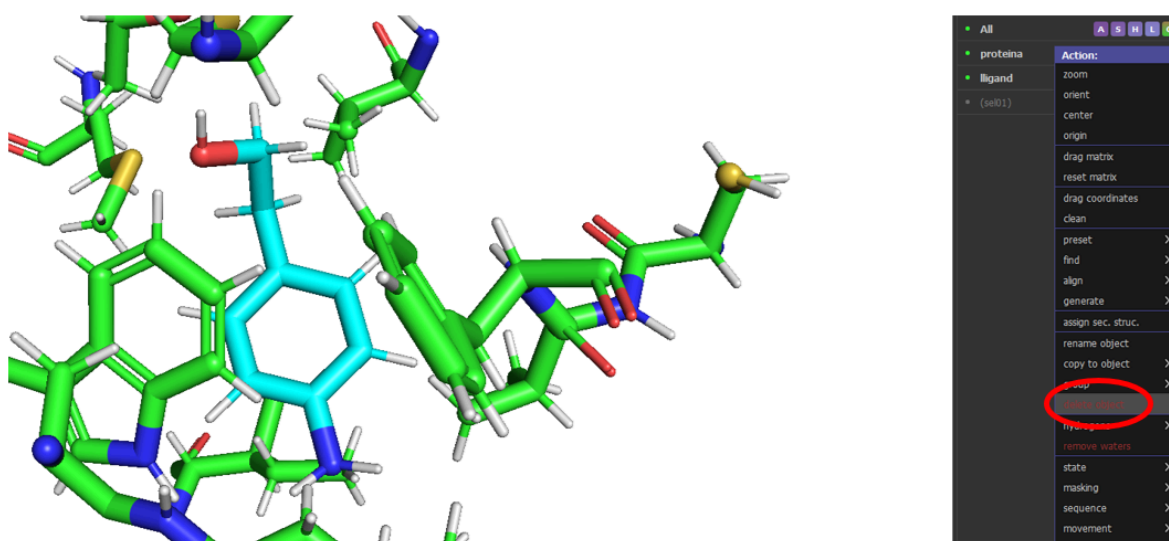


Figura 65. Imatge en el moment de l'eliminació del lligand. Font: PyMOL.

**Pas 17:**

Un cop he eliminat el lligand necessito exportar la molècula, que en veritat és l'enzim sol amb les mutacions que hagi fet.

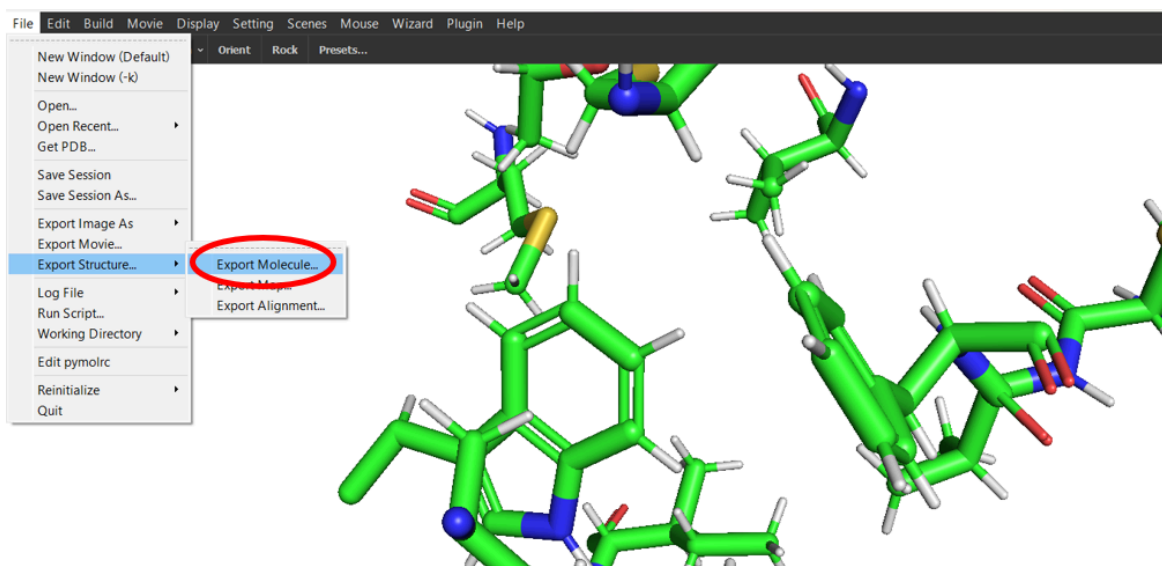


Figura 66. Imatge en el moment d'exportar l'enzim mutat. Font: PyMOL.

### Pas 18:

Un cop exporto la molècula escullo una carpeta on la vull guardar i és molt important guardar l'arxiu amb el nom de proteïna sense errors i en format .pqr, que és el que ensenyo a la figura 67.

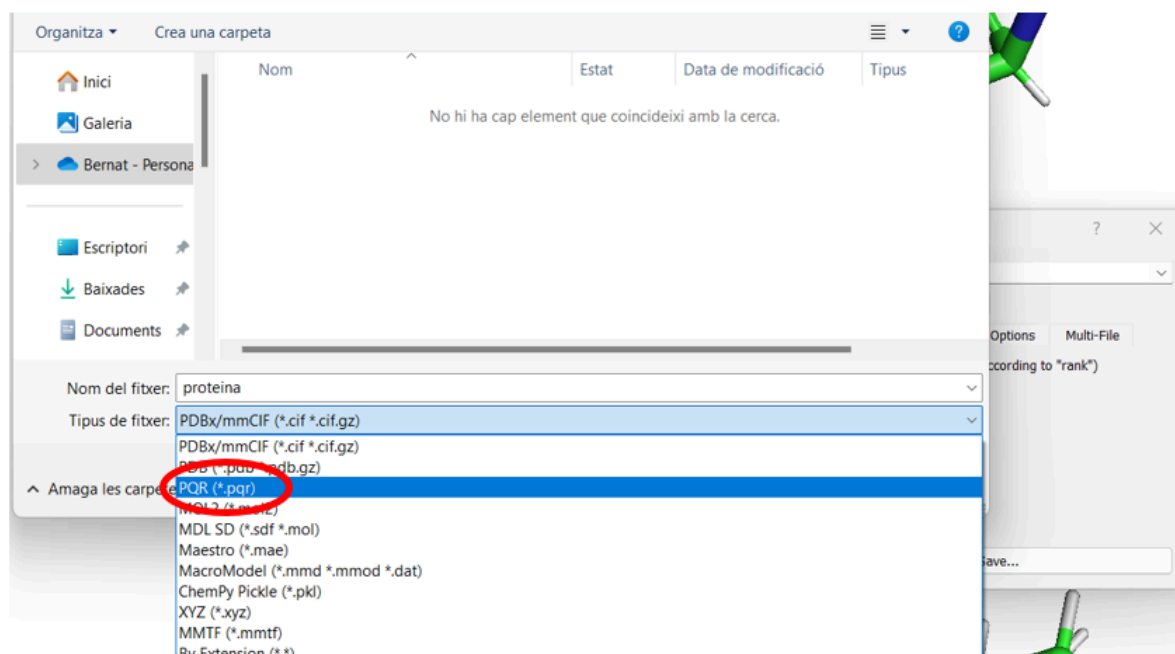


Figura 67. Imatge del moment de guardar el document de la proteïna. Font: PyMOL.

**Pas 19:**

Un cop he guardat la proteïna, com que ja tenia el lligand i el fitxer APBS de la preparació el que em falta és el complex (proteïna i lligand en un mateix arxiu), per fer això entro al PyMOL i obro el fitxer del lligand i el de la proteïna a la vegada de la carpeta on ho havia guardat tot anteriorment.

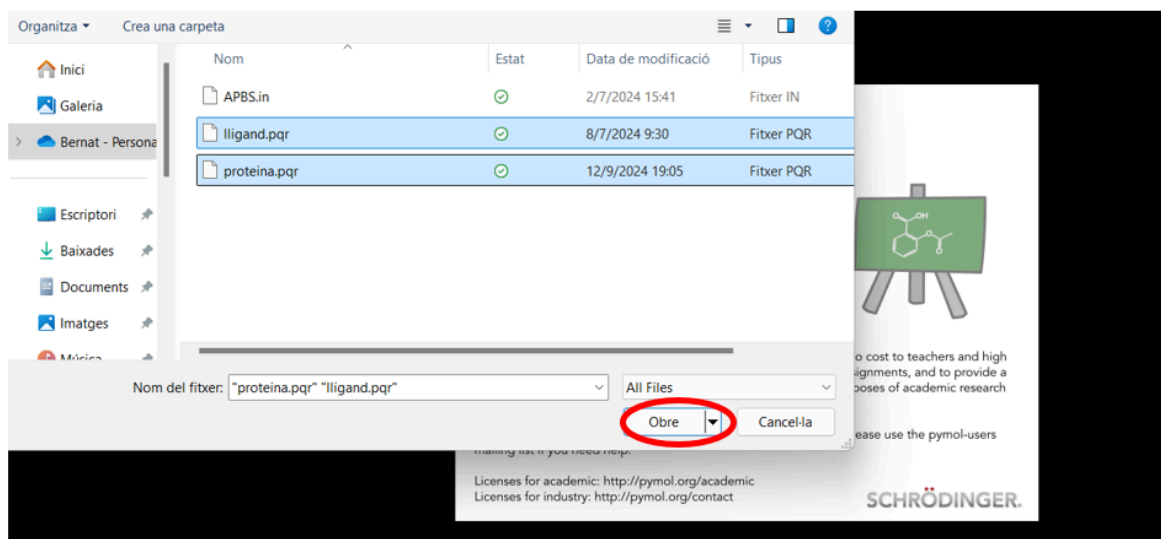


Figura 68. Imatge en el moment d'inserir la proteïna i el lligand al PyMOL. Font: PyMOL.

Un cop fet el que he mencionat veurem que la proteïna mutada i l'enzim estan junts, tal com es veu a la figura 69.

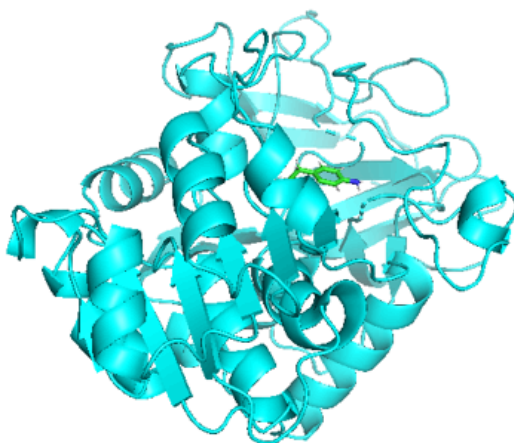


Figura 69. Imatge del complex. Font: PyMOL.



**Pas 20:**

En el moment que m'he assegurat que tot estava en ordre ha sigut el moment d'exportar l'enzim mutat amb el lligand. Llavors torno a exportar la molècula, però, molt important, aquesta vegada amb el nom de "complex" i en format .pqr, a la carpeta que he escollit i així ho tinc tot en una sola carpeta.

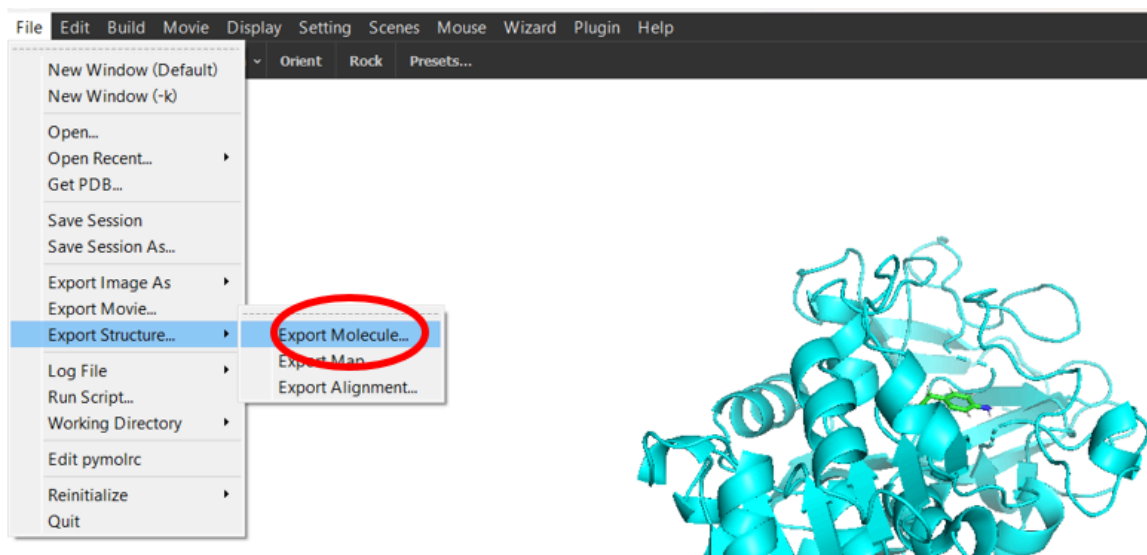


Figura 70. Imatge en el moment d'exportar la molècula complex. Font: PyMOL.

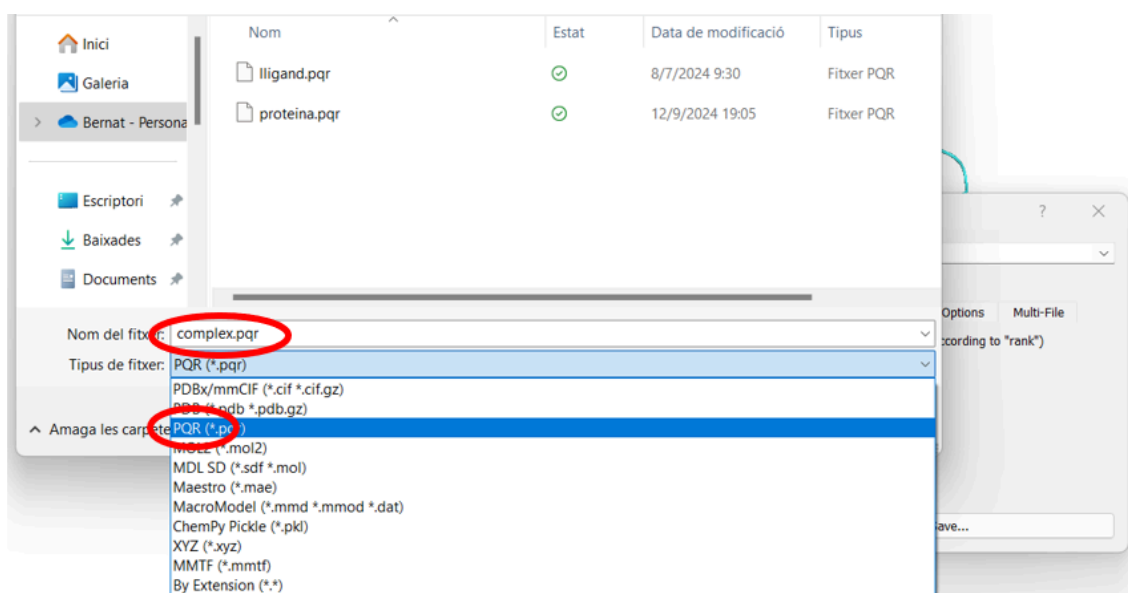


Figura 71. Imatge en el moment de guardar el complex en format PQR a la carpeta. Font: PyMOL.

**Pas 21:**

Aquest pas és només per assegurar-me que tinc els quatre arxius que necessito sols en una carpeta. Aquests arxius són el lligand, la proteïna i el complex en format .pqr i el fitxer d'input APBS. Aquí m'he d'assegurar a fons que he escrit correctament els noms dels arxius tals i com els he escrit en el fitxer input, si no és així, segurament no funcionarà. Com que estic completament convençut passaré a calcular l'energia d'unió que necessitarà aquest enzim que he modificat.

|                                                                                                |                                                                                   |                 |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|
|  APBS.in      |  | 2/7/2024 15:41  | Fitxer IN  |
|  complex.pqr  |  | 12/9/2024 19:19 | Fitxer PQR |
|  lligand.pqr  |  | 8/7/2024 9:30   | Fitxer PQR |
|  proteïna.pqr |  | 12/9/2024 19:05 | Fitxer PQR |

Figura 72. Imatge de la carpeta amb tots els arxius necessaris. Font: PyMOL.

**Pas 22:**

En aquest moment ja estic a la web i he posat tots els fitxers necessaris i li he donat a “Start Job”. Aquesta pàgina em farà el càlcul de l'energia d'unió d'aquell enzim amb el lligand, és a dir, com de bé s'uneixen els dos.

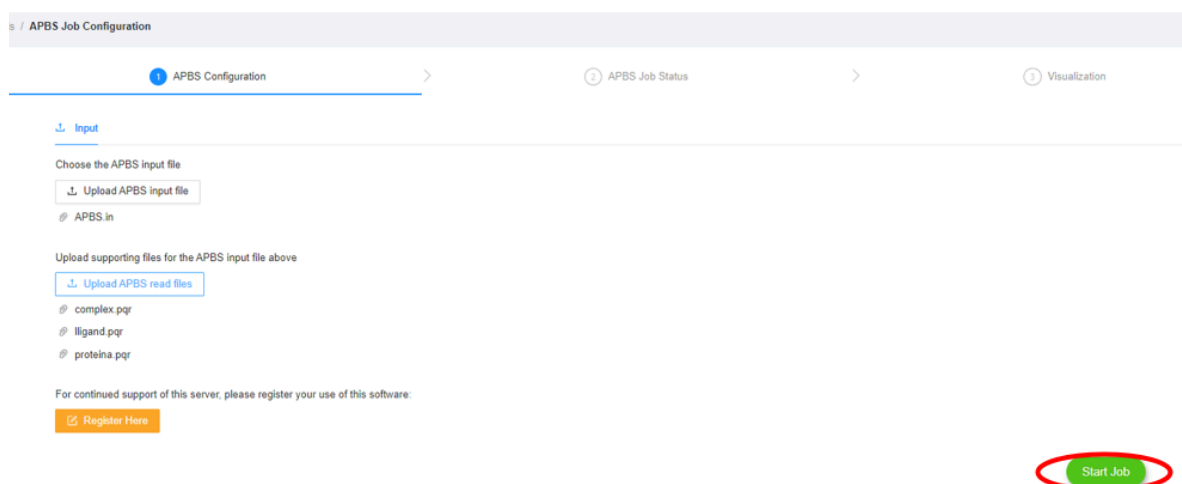


Figura 73. Imatge de la web del càlcul. [Font](#)

**Pas 23:**

Un cop comença sol trigar uns segons, o a vegades més, per fer el càlcul. Un cop la web hagi acabat de llegir els meus arxius i faci els càlculs per saber la quantitat d'energia, per saber el resultat, el que he de fer és clicar a "Show line numbers" i després a "Stdout", aquí s'obrirà una pestanya.

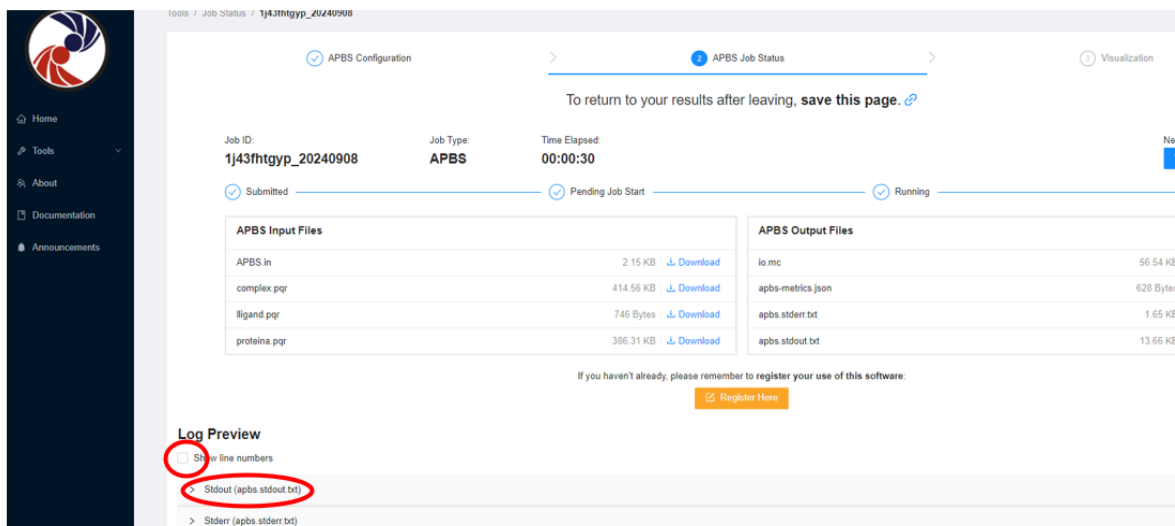


Figura 74. Imatge de la web un cop fet el càlcul. [Font](#)

**Pas 24:**

Un cop oberta, he de baixar fins a baix de tot, fins a la fila 326, on puc trobar l'energia d'unió de l'enzim amb el lligand. Com que aquest és el mètode general, aquestes dades corresponen a l'enzim sense cap mutació, però, òbviament, després sí que seran resultats d'enzims mutats.

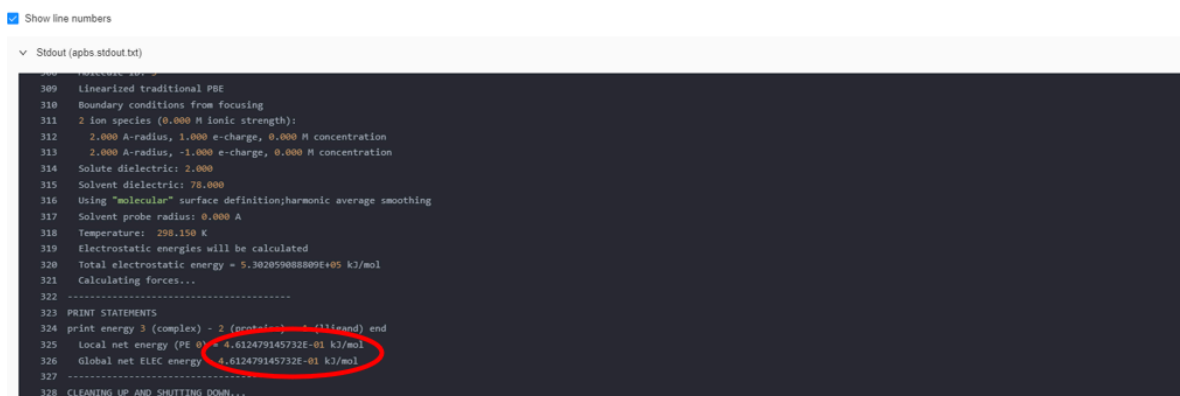


Figura 75. Imatge de la web amb els resultats. [Font](#)

### 4.3. Estudi

#### 4.3.1. Pregunta del marc aplicat

Puc reduir l'energia d'unió entre l'enzim 1AGN i alcohol 4-aminofenètilic, és a dir, un lligand no natural de l'enzim?

#### 4.3.2. Hipòtesi de l'optimització de l'enzim

**Hipòtesi 1:** En mutar l'enzim 1AGN reduiré l'energia d'unió entre l'enzim i el lligand alcohol 4-aminofenètilic.

**Hipòtesi 2:** En mutar l'enzim 1AGN forçant la formació d'interaccions intermoleculars entre els aminoàcids i el substrat reduiré l'energia d'unió entre l'enzim i el lligand alcohol 4-aminofenètilic.

#### 4.3.3. Mutació de l'enzim

En aquest apartat del meu marc aplicat modificaré l'enzim alcohol deshidrogenasa 1AGN perquè pugui catalitzar millor els lligands: etanol i alcohol 4-aminofenètilic.

##### 4.3.3.1. Mutació 1

Ara faré la primera mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

##### **Pas 1:**

El primer que he fet ha sigut posar el fons de color blanc, perquè crec que d'aquesta manera es pot identificar millor. Seguidament, he demanat al programa que em mostri tots els àtoms de la proteïna en forma de bastons, ja que d'aquesta forma puc situar-me molt millor i seleccionar els aminoàcids més fàcilment. Després he seleccionat tots els aminoàcids que hi havia al voltant del lligand, als que algun seria interessant fer-li mutacions. Un cop acabat això he fet que no mostri tots els àtoms de la proteïna, però seguidament he demanat que els que havia seleccionat es mostrin en forma de bastons, d'aquesta forma, tinc visibles només els aminoàcids que m'interessen i així és molt més fàcil orientar-se i treballar.

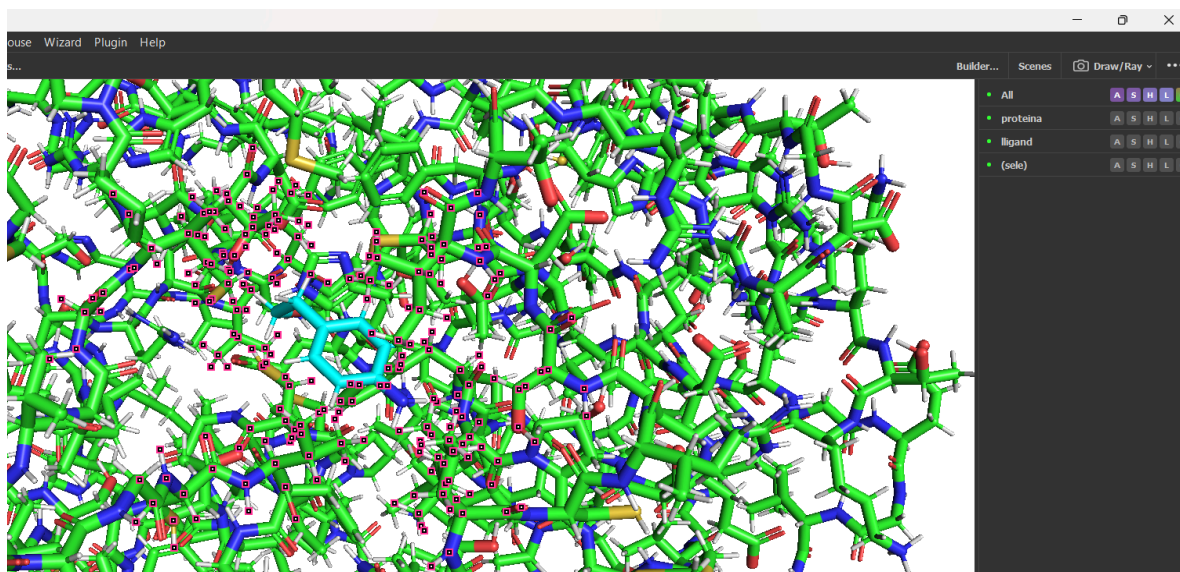


Figura 76. Imatge dels aminoàcids que vull que siguin visibles. Font: PyMOL.

## Pas 2:

Un cop he fet tot això he de trobar alguns aminoàcids que formin interaccions moleculars amb el substrat perquè l'energia d'unió que necessiti l'enzim sigui menor. En aquest cas he trobat que l'aminoàcid 141 si li pugués afegir un aminoàcid que tingués un grup aromàtic, podria forçar que es produís una interacció intermolecular  $\pi$ - $\pi$ . A més a més, com que probablement ocuparà molt espai hauré de modificar l'aminoàcid 93 perquè li deixi una mica d'espai. Un cop determinats els aminoàcids que vull mutar he de saber quin és el seu identificador i el seu tipus d'aminoàcid, el 141 és una metionina i el 93 és una fenilalanina, com veiem a les figures 77 i 78.

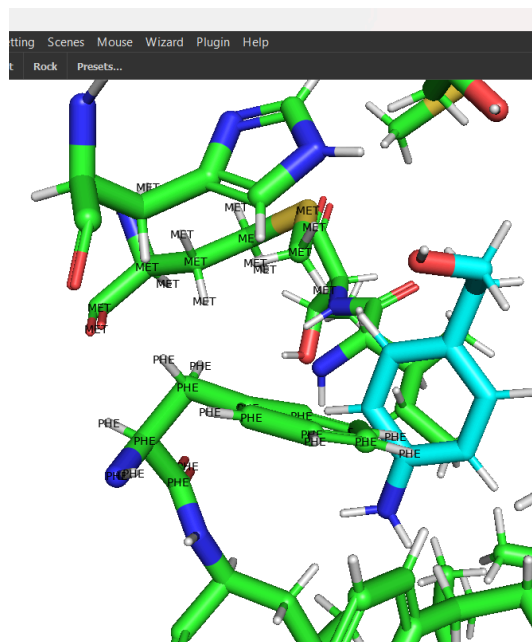


Figura 78. Imatge del tipus d'aminoàcid dels aminoàcids 141 i 93. Font: PyMOL.

Un cop he decidit el que vull modificar he de fer-ho, he fet els passos per entrar en el menú de mutacions i després de diversos intents he trobat un aminoàcid aromàtic que pot encaixar bé, és el triptòfan en la posició número 6, que el situa pràcticament en paral·lel, però amb el benzè desplaçat, que també permet que es produeixi la interacció, per tant, perfecte. De totes maneres, com havia previst, com que el triptòfan ocupa molt espai l'aminoàcid 93 està molestant, com a resultat, l'hauré de modificar també.

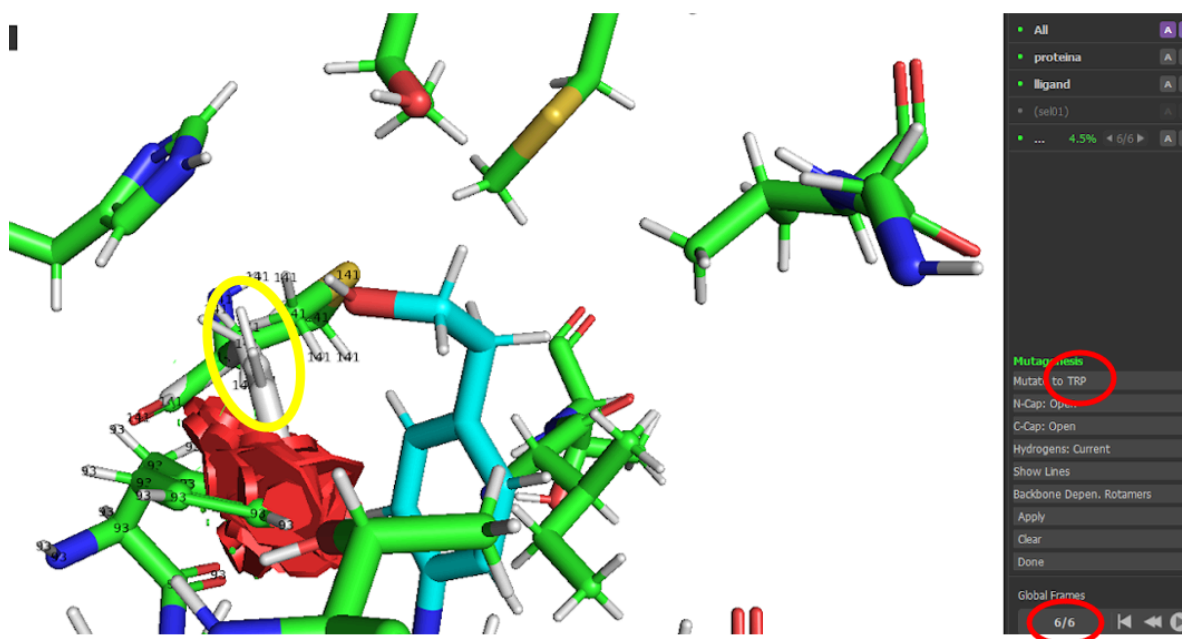


Figura 79. Imatge de la modificació de l'aminoàcid 141. Font: PyMOL.

Aquí es pot veure l'enzim després de la mutació, assenyalat en groc hi ha la primera mutació que he fet Met141Trp. Per altra banda, assenyalat en vermell hi ha l'aminoàcid 93 que és el que ara modificaré perquè està molestant al triptòfan.

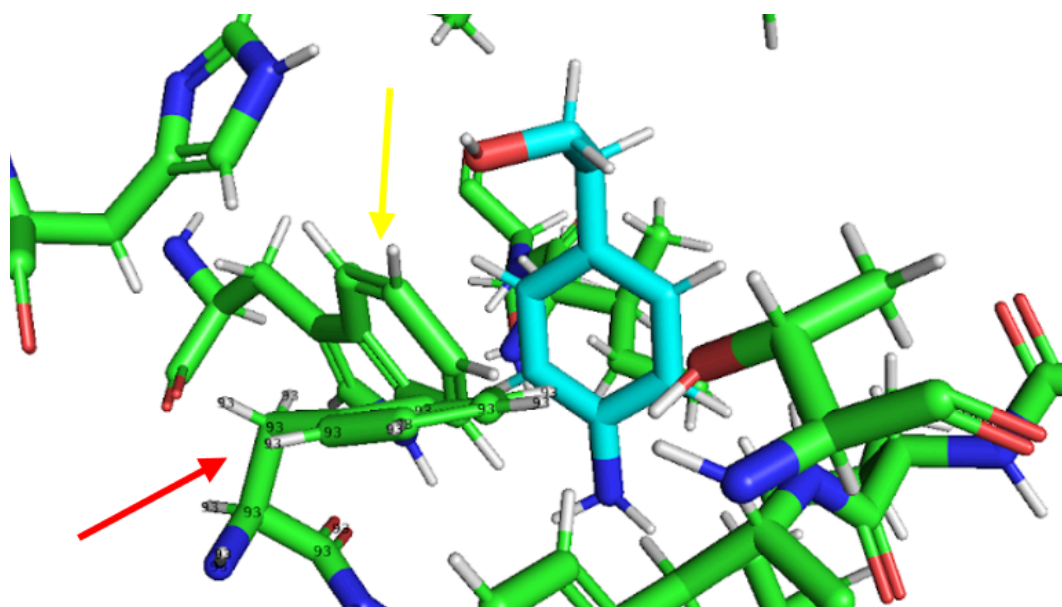


Figura 80. Imatge de l'enzim després de la primera mutació. Font: PyMOL.



**Pas 4:**

Ara el que estic fent és modificar l'aminoàcid 93 perquè no molesti tant al triptòfan, això ho faré modificant l'aminoàcid de fenilalanina a alanina, que com que és l'aminoàcid més petit és el que menys espai ocupa, això es pot veure al cercle de color groc que la part blanca és la futura alanina, perquè aquí encara ho estic modificant.

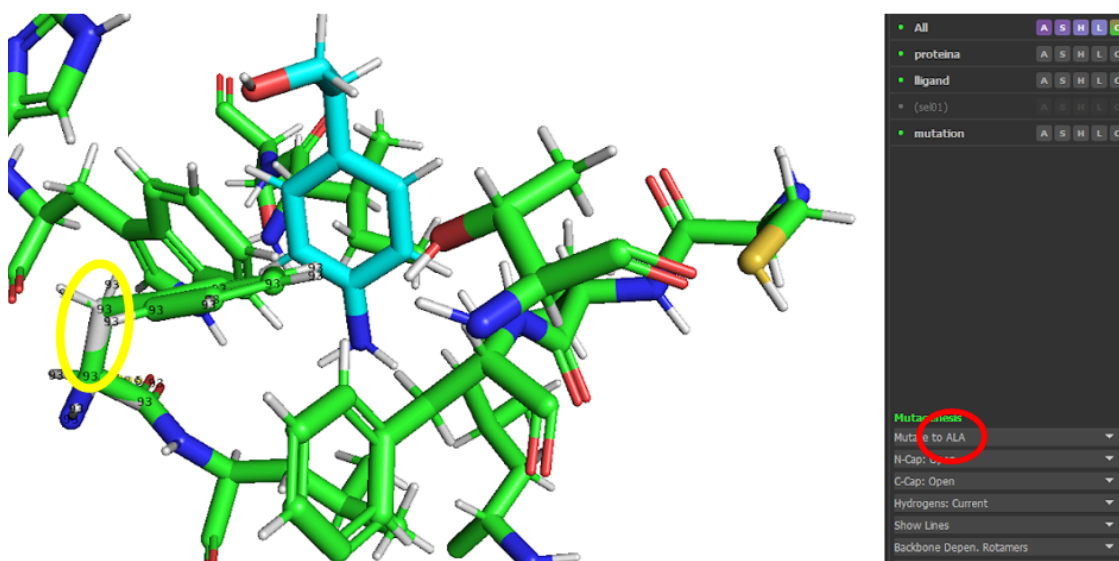


Figura 81. Imatge de la modificació de l'aminoàcid 93. Font: PyMOL.

A la figura següent ja es pot veure com he acabat la mutació i es veu que hi ha l'alanina sola i que en ser tan petita no molesta al triptòfan.

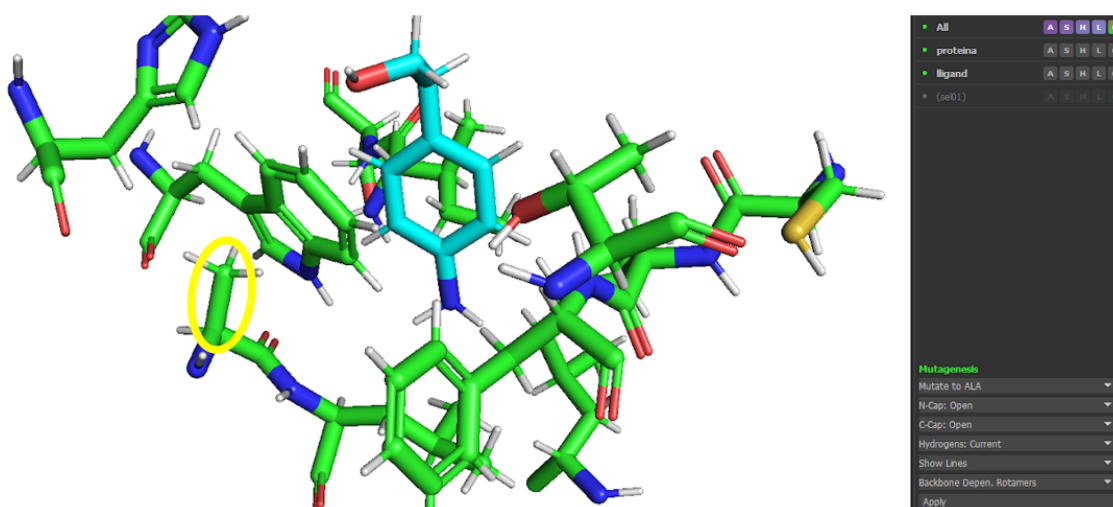


Figura 82. Imatge després de les dues mutacions. Font: PyMOL.



**Pas 5:**

En aquest pas he utilitzat l'eina de la mesura per mesurar a quina distància estan els dos grups aromàtics entre ells i es veu que hi ha una distància d'entre 2 i 5 Å.

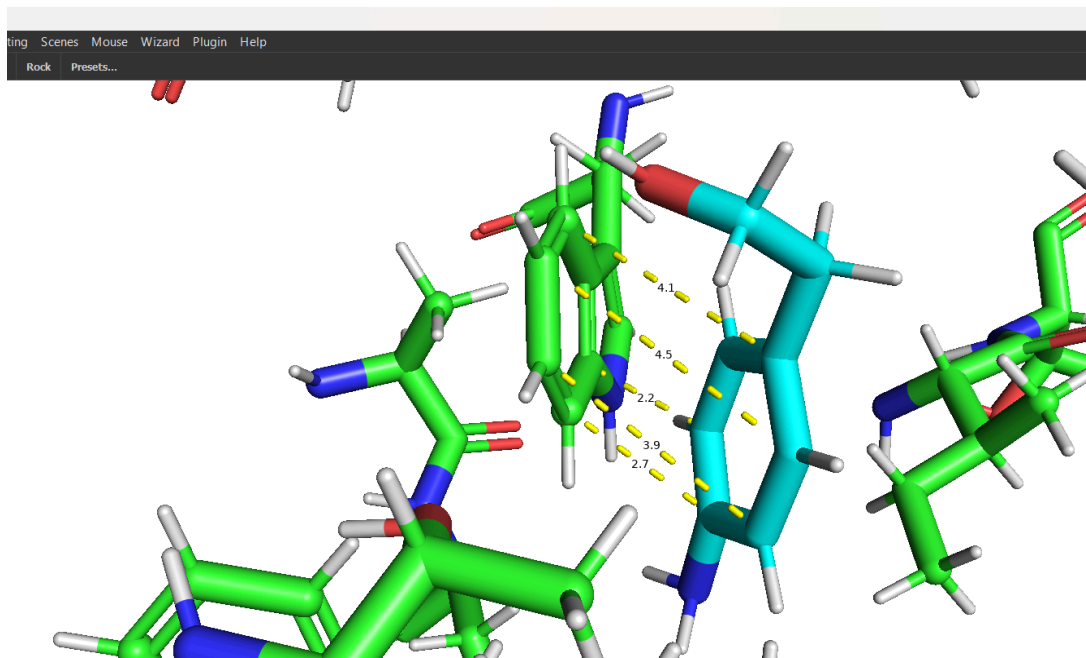


Figura 83. Imatge de la distància (en armstrongs) entre el triptòfan i el grup aromàtic del substrat. Font: PyMOL.

**Pas 6:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

#### 4.3.3.2. Mutació 2

Ara faré la segona mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

Com que en la mutació anterior m'he adonat que els dos grups aromàtics estaven una mica allunyats entre ells, faré una altra modificació a veure si els resultats són millors amb aquella distància o amb la que implementaré ara. Com es veu en la

figura 84, el grup aromàtic del substrat i el del triptòfan (aminoàcid 141) estan força allunyats entre ells, algunes zones de fins i tot de 4,5 Å.

El que faré per apropar-los és rotar cap a l'esquerra un dels "braços" del triptòfan (el que té un cercle blanc, assenyalat amb una fletxa vermella) i així quedaran molt més a prop. En aquest moment aquest braç està situat en un angle de 13,1°.

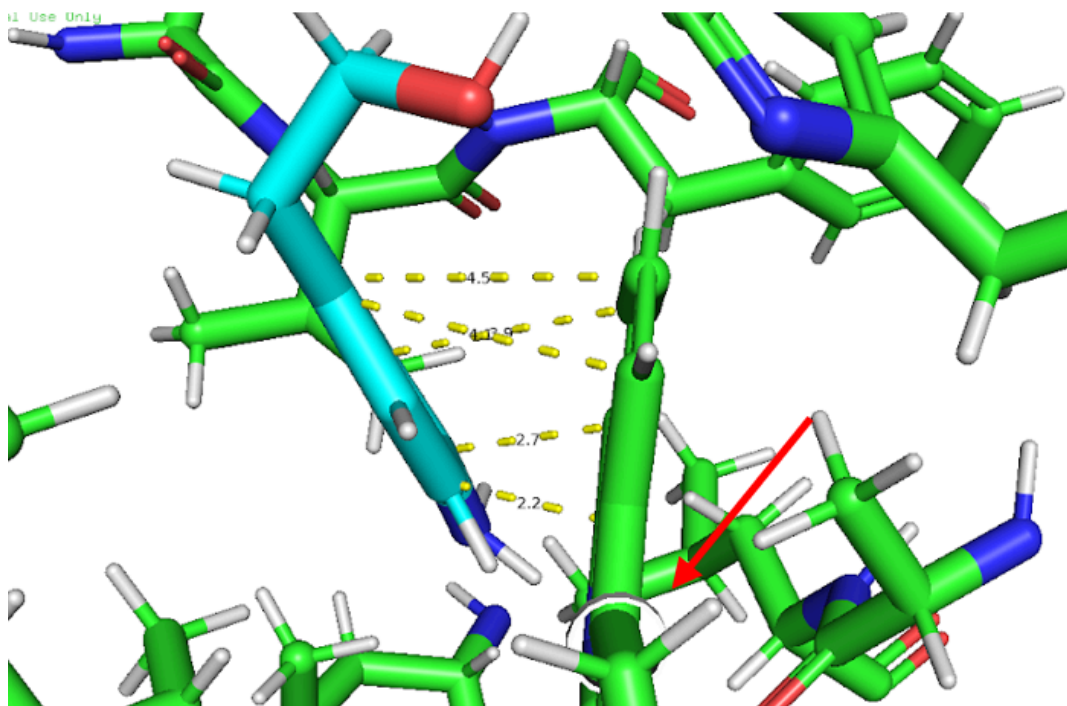


Figura 84. Imatge de la mutació anterior, es veu que estan una mica allunyats.

Font: PyMOL.

## Pas 2:

En aquest moment estic rotant el "braç" del triptòfan, que fa que el grup aromàtic giri i es situï molt més a prop del grup aromàtic del substrat, amb una distància màxima de 3,3 Å. Tot i que no estan del tot alineats perfectament, jo crec que pot funcionar, perquè a aquesta distància es podria formar una interacció  $\pi$ - $\pi$ .

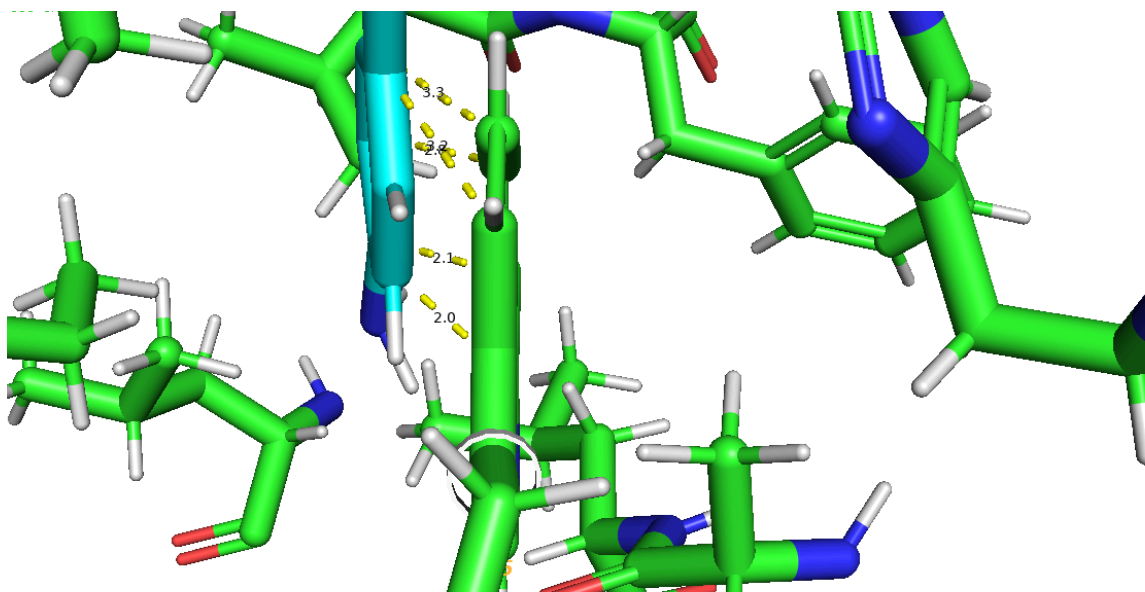


Figura 85. Imatge de l'enzim en el moment de la modificació. Font: PyMOL.

### Pas 3:

Aquí es pot veure com queda l'enzim després de la modificació que he fet, el grup aromàtic del substrat i el grup aromàtic de l'aminoàcid 141 queden molt més junts. Finalment, la modificació deixa el "braç" del triptòfan en un angle de  $-20,5^\circ$ .

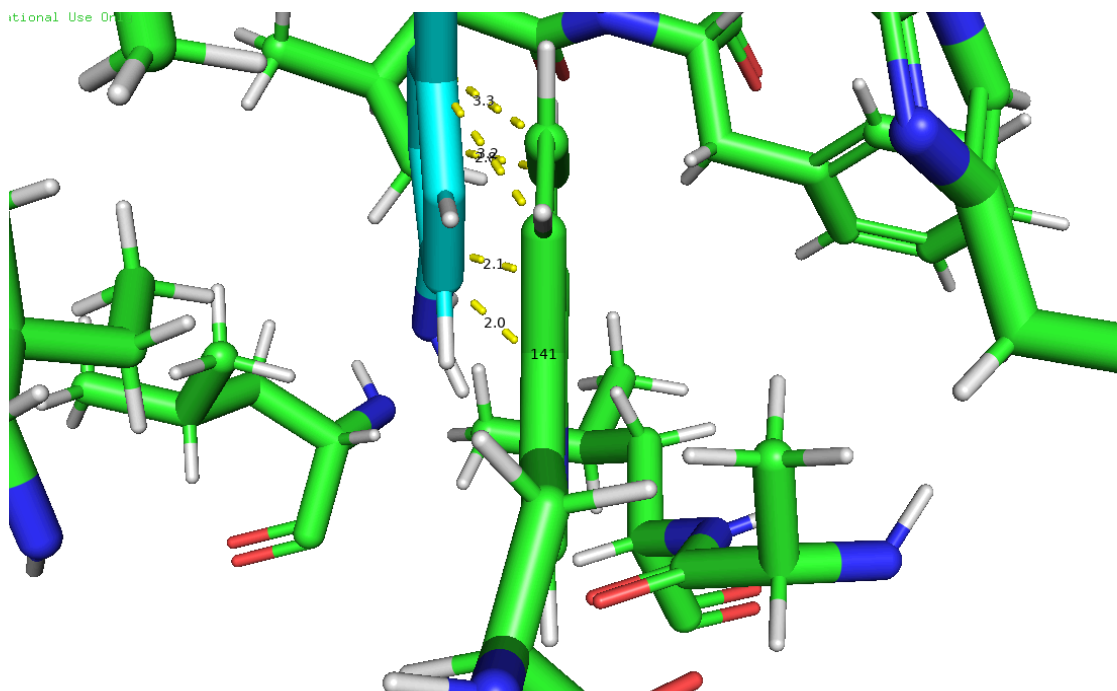


Figura 86. Imatge després de la modificació. Font: PyMOL.

**Pas 4:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

**4.3.3.3. Mutació 3**

Ara faré la tercera mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

El primer que he fet, igual que en els casos anteriors, és posar els fons de pantalla de color blanc i que els aminoàcids es mostrin amb forma de bastons. Després el que he fet és seleccionar els aminoàcids que estan a prop del substrat i fer que només es mostrin aquells.

**Pas 2:**

Encara que en els casos anteriors ja ho he fet, en aquesta mutació continuo amb la intenció de formar una interacció  $\pi$ - $\pi$  que em funcioni bé. Encara no sé quin aminoàcid modificaré així que miro els aminoàcids que hi ha al voltant del substrat i m'imagino algun que podria mutar i que quedés en la posició que m'interessa.

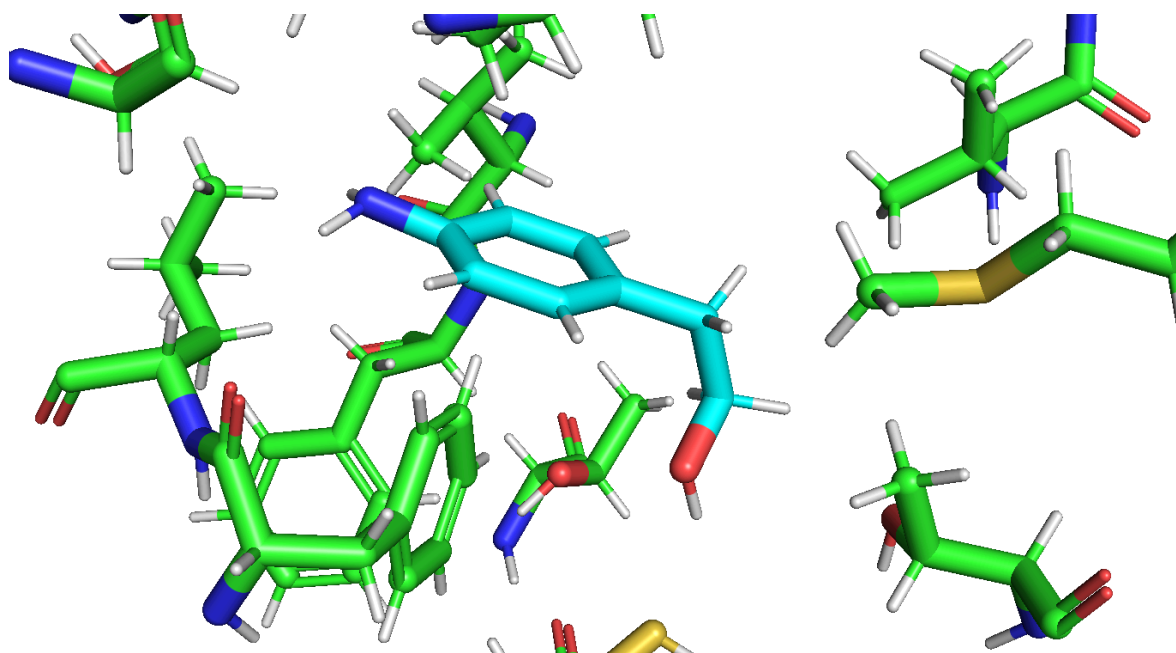


Figura 87. Imatge del centre actiu de l'enzim. Font: PyMOL.

**Pas 3:**

Després d'estar una estona mirant quin podria ser l'aminoàcid que mutés, m'he decidit per l'aminoàcid 93 que és una fenilalanina, com es pot veure a la figura 89. El que jo tinc pensat és rotar el grup aromàtic i que d'aquesta forma quedin alineats el del substrat i el de la fenilalanina.

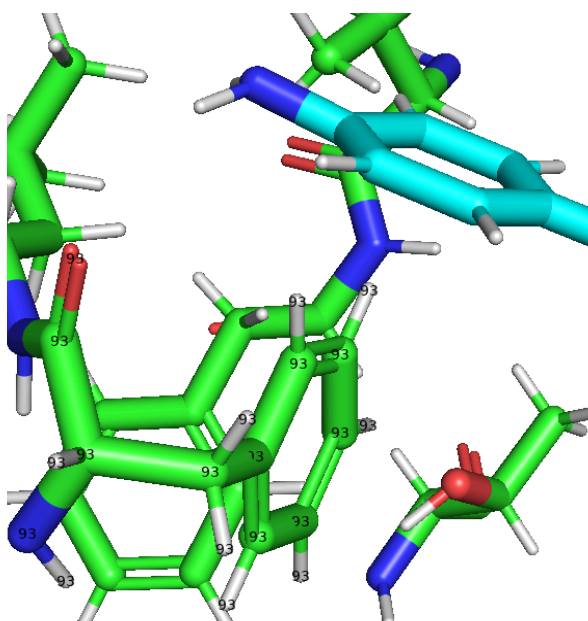


Figura 88. Imatge de l'aminoàcid 93, que és el que modificaré. Font: PyMOL.

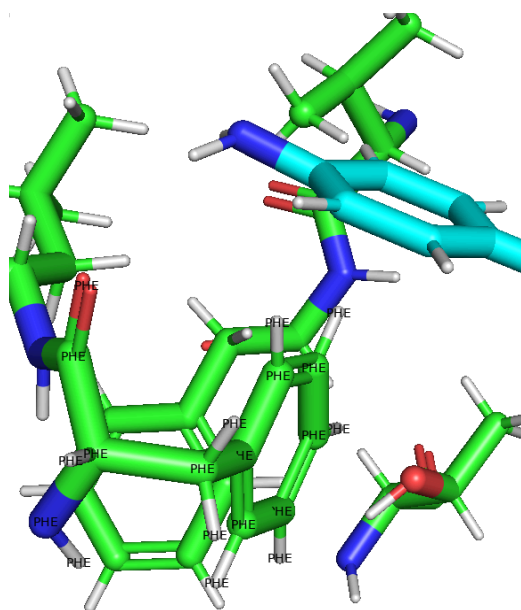


Figura 89. Imatge de la fenilalanina que modificaré. Font: PyMOL.

**Pas 4:**

En aquest moment estic a punt de fer la modificació que consistirà a rotar el grup aromàtic de l'aminoàcid 93 perquè quedi en paral·lel al grup aromàtic del substrat. Abans de girar-lo he vist que l'aplicació indica que està en un angle de  $95,2^\circ$ , tal com he assenyalat amb la fletxa vermella a la figura 90.

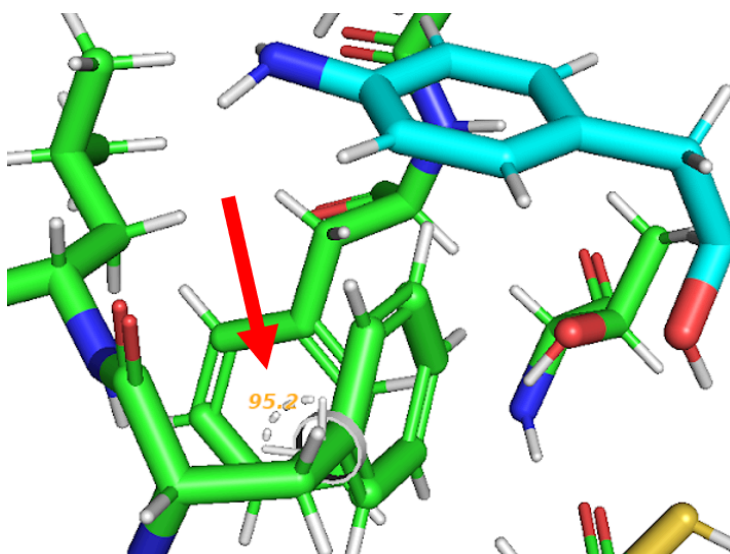


Figura 90. Imatge en el moment abans de fer la rotació. Font: PyMOL.

**Pas 5:**

Un cop he acabat de girar el grup aromàtic m'he fixat l'angle que indica ara que és de  $-162,2^\circ$ . A més a més, he fet que la modelització es vegi de perfil perquè d'aquesta forma es pugui veure que els dos grups aromàtics estan situats el més en paral·lel possible.

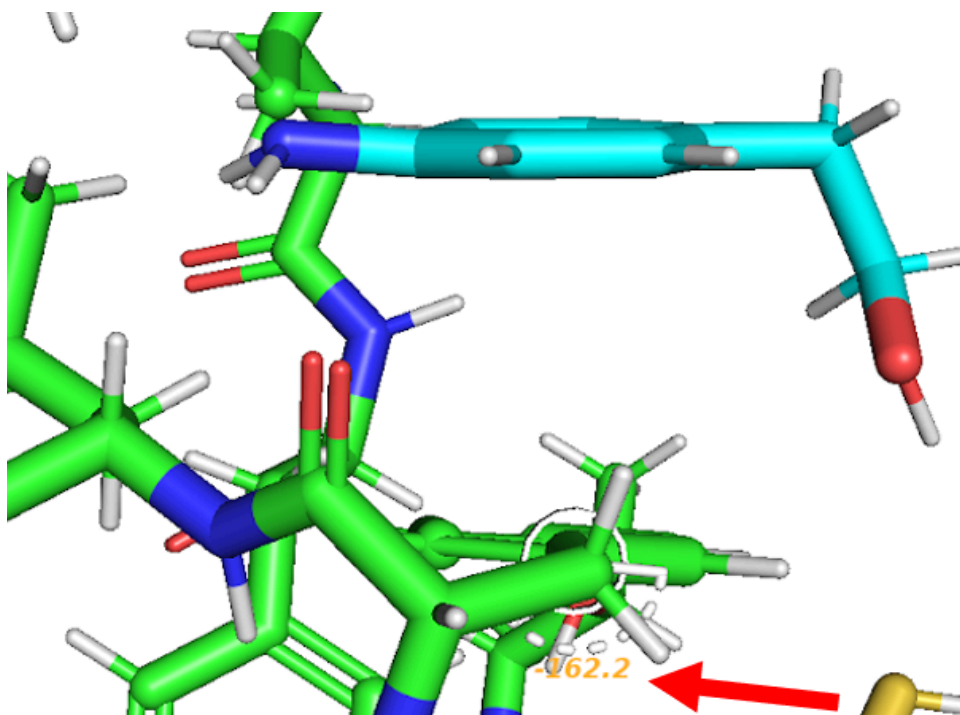


Figura 91. Imatge després de la modificació. Font: PyMOL.



**Pas 6:**

Un cop he acabat la modificació el que he fet és mesurar en Å quina és la distància entre els dos grups aromàtics. A la figura 92 es pot observar que varien entre els 4,1 i 4,4 Å, que encara que no està dins de la distància ideal a la qual es donen les interaccions  $\pi$ - $\pi$ , potser em dona bons resultats. Per altra banda, com que he fet tres mutacions amb interaccions  $\pi$ - $\pi$  i cadascuna està a una distància diferent, això em pot servir per comprovar per mi mateix quina és la distància idònia.

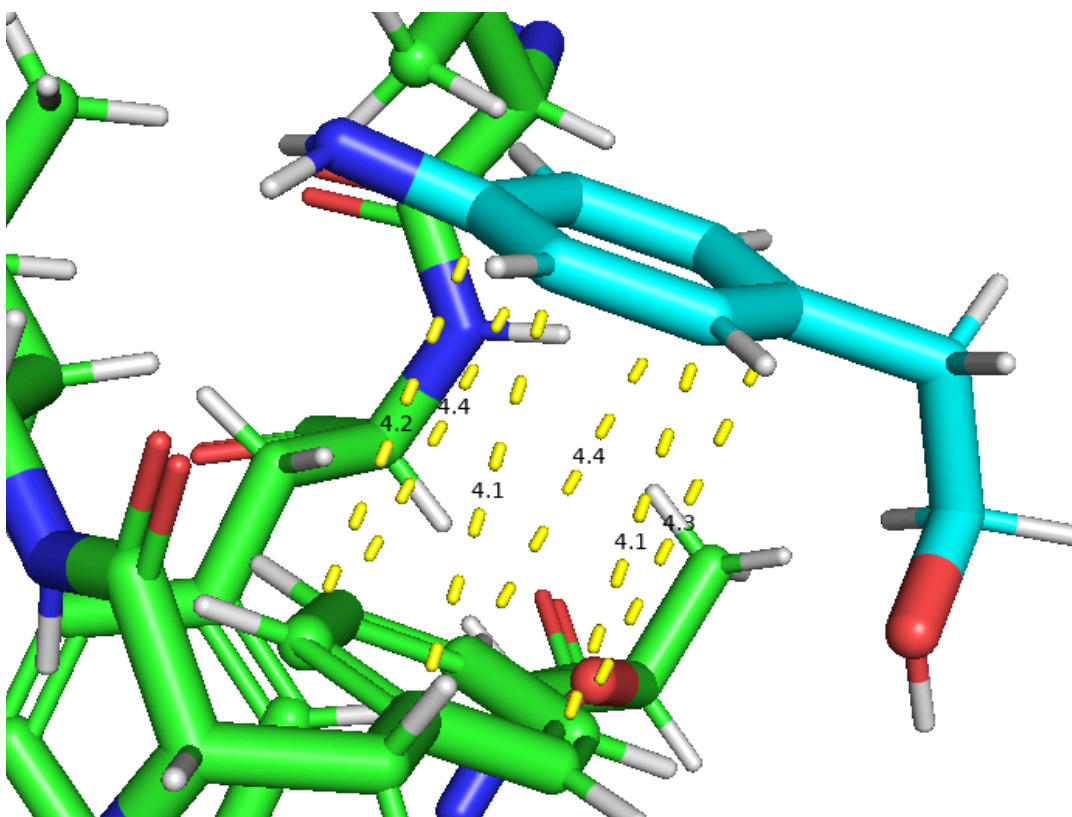


Figura 92. Imatge de les mesures de distància en armstrongs dels dos grups aromàtics. Font: PyMOL.

**Pas 7:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

## 4.3.3.4. Mutació 4

Ara faré la quarta mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

Primer de tot he fet el pas 1 de la primera mutació per deixar els fons blanc i que només es vegin els aminoàcids que m'interessa veure.

**Pas 2:**

Un cop ho he fet, busco algun aminoàcid que si el modifico pugui crear una interacció intermolecular per reduir l'energia d'unió. En aquest cas he trobat que si modifico l'aminoàcid 94, que és una leucina, podria posar-hi un altre que tingui una conformació diferent perquè formi un pont d'hidrogen amb el grup Amino (àtom de nitrogen) del substrat, d'aquesta manera en formar un pont d'hidrogen necessitaria menys energia d'unió.

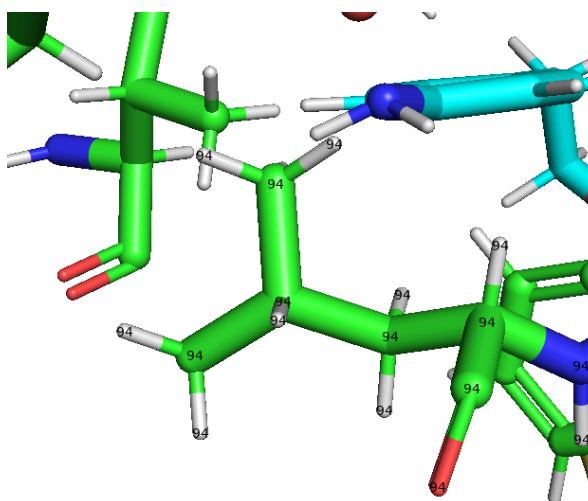


Figura 93. Imatge de l'aminoàcid que vull modificar, el 94. Font: PyMOL.

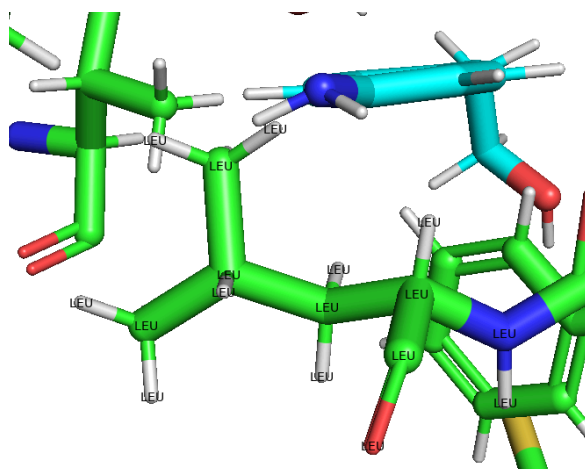


Figura 94. Imatge de l'aminoàcid que vull modificar, una leucina. Font: PyMOL.



**Pas 3:**

Com es veu a la figura 95 està una mica allunyat, així que després de revisar la forma de tots els aminoàcids que hi ha crec que podria funcionar bé un àcid glutàmic.

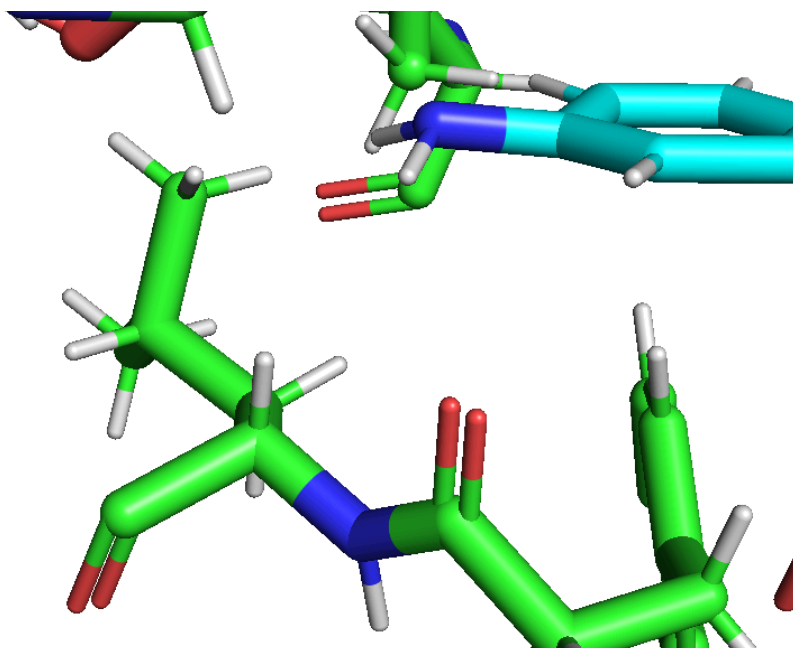


Figura 95. Imatge de l'enzim on es veu la distància entre l'aminoàcid 94 i el substrat. Font: PyMOL.

**Pas 4:**

Ara estic provant com quedaria un àcid glutàmic (Glu) substituint a la leucina anterior. Després de comprovar totes les posicions possibles, crec que la posició 2 és la millor, ja que hi ha un hidrogen que queda pràcticament a sota del grup Amino, el que forçarà que es generi un pont d'hidrogen entre ells, com es pot veure a la figura 96.

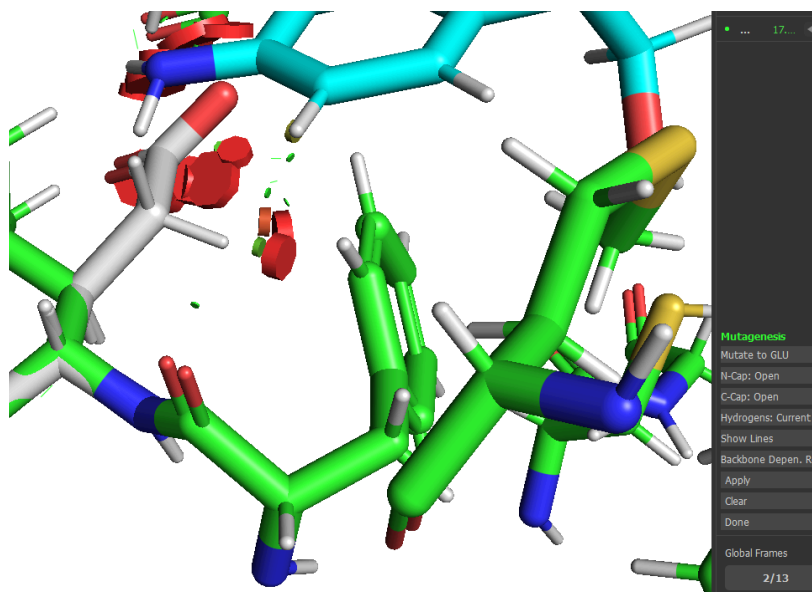


Figura 96. Imatge del moment de la mutació. Font: PyMOL.

#### Pas 5:

Un cop feta la mutació he mesurat quina era la distància final entre l'hidrogen de l'àcid glutàmic i el grup Amino del substrat i resulta que era d'1,4 Å.

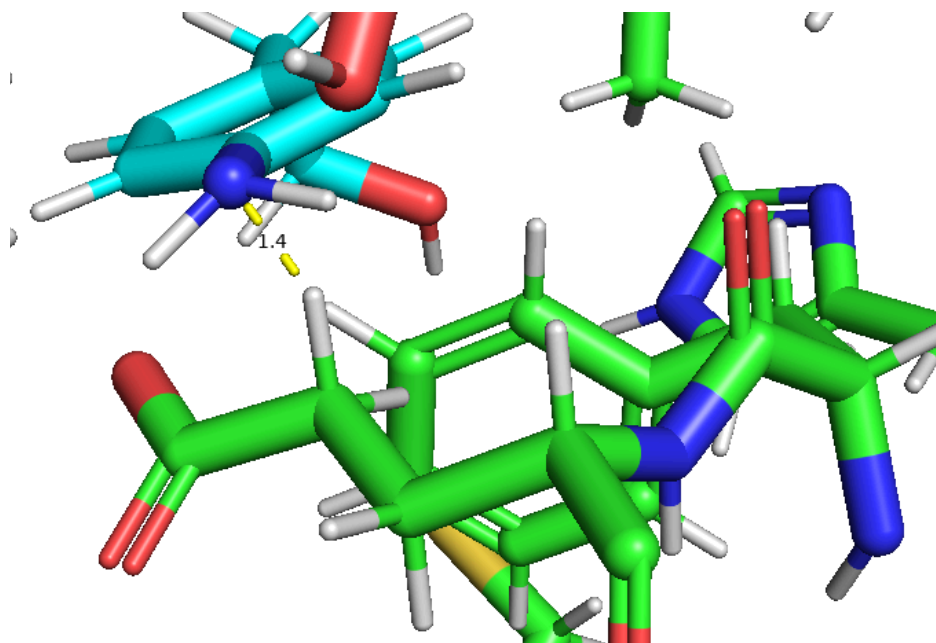


Figura 97. Imatge de l'enzim després de la mutació, amb la distància en Å entre l'hidrogen i el grup amino. Font: PyMOL.

**Pas 6:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

**4.3.3.5. Mutació 5**

Ara faré la tercera mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

Primer de tot he fet el pas 1 de la primera mutació per deixar els fons blanc i que només es vegin els aminoàcids que m'interessa veure.

**Pas 2:**

Com que encara no sé quin aminoàcid vull modificar el que faré és buscar algun que em pugui servir, aquesta vegada, com l'anterior, el que faré és intentar forçar la formació d'un pont d'hidrogen entre l'àtom d'un aminoàcid i un hidrogen del substrat.

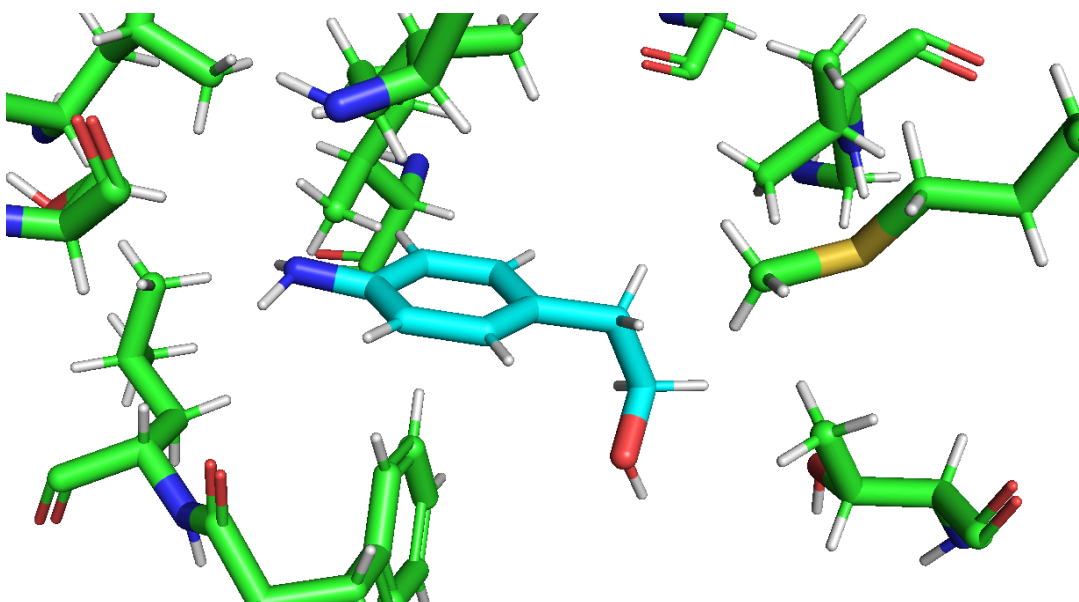


Figura 98. Imatge del centre actiu de l'enzim. Font: PyMOL.

**Pas 3:**

Després d'estar revisant una estona he pensat en una modificació que encara que pot ser una mica complexa, crec que pot funcionar bé. Concretament, he pensat a modificar l'aminoàcid 93, que és una fenilalanina, com es veu a les figures 99 i 100.

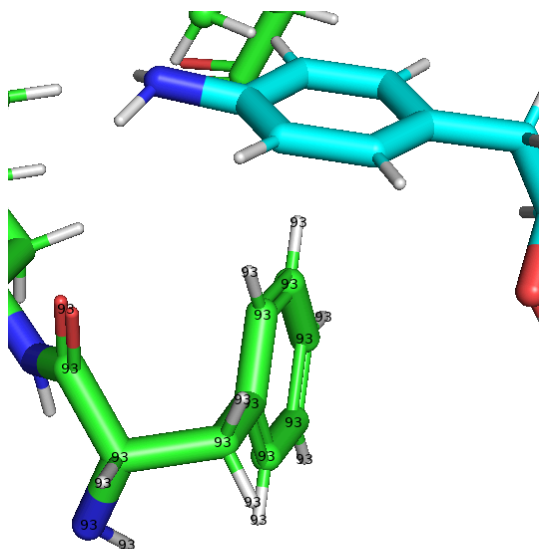


Figura 99. Imatge de l'aminoàcid que modificaré, el 93. Font: PyMOL.

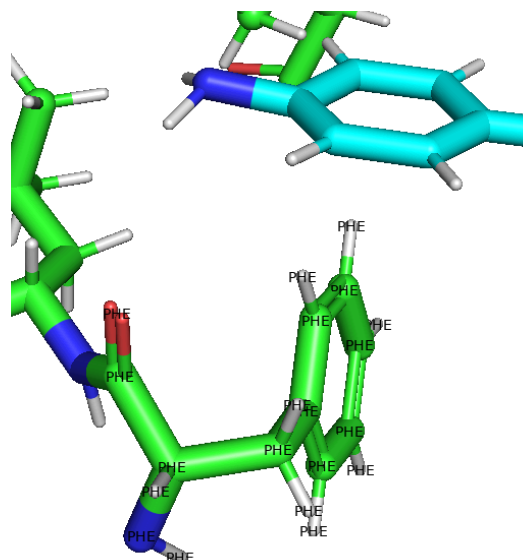


Figura 100. Imatge de la fenilalanina que vull modificar. Font: PyMOL.

**Pas 4:**

La mutació que jo he pensat per a forçar el pont d'hidrogen, primer, consisteix a canviar la fenilalanina (aminoàcid 93) per un àcid glutàmic. Concretament, en el moment de mutar, he decidit posar la posició 8 de 19, ja que era la que a mi m'anava millor.

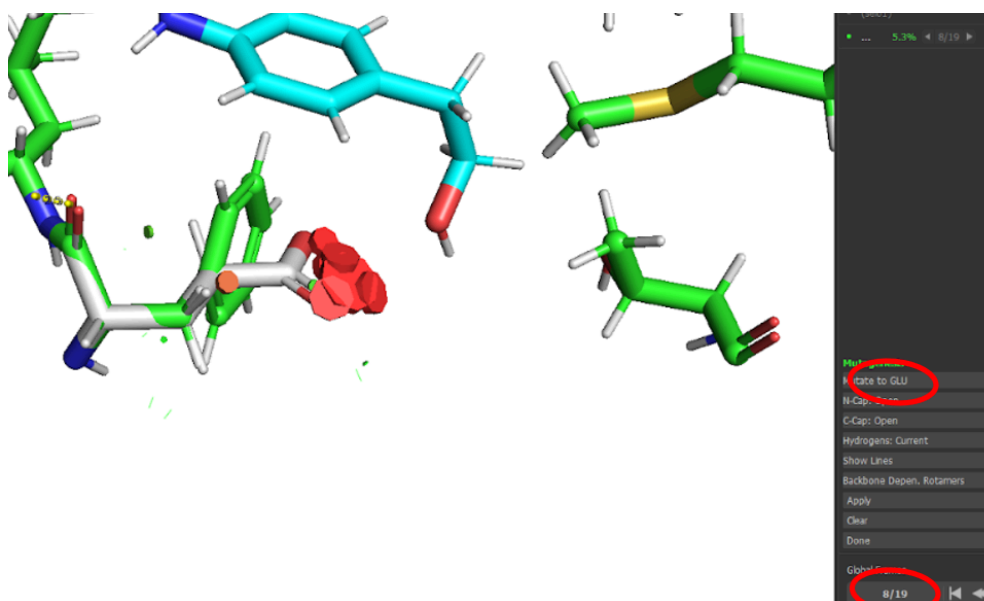


Figura 101. Imatge en el moment de la mutació. Font: PyMOL.

#### Pas 5:

Tal com es veu a la figura 102, l'aminoàcid que acabo de mutar, de moment, no provoca cap pont d'hidrogen, per aquest motiu, faré unes rotacions i que així quedi col·locat perfectament.

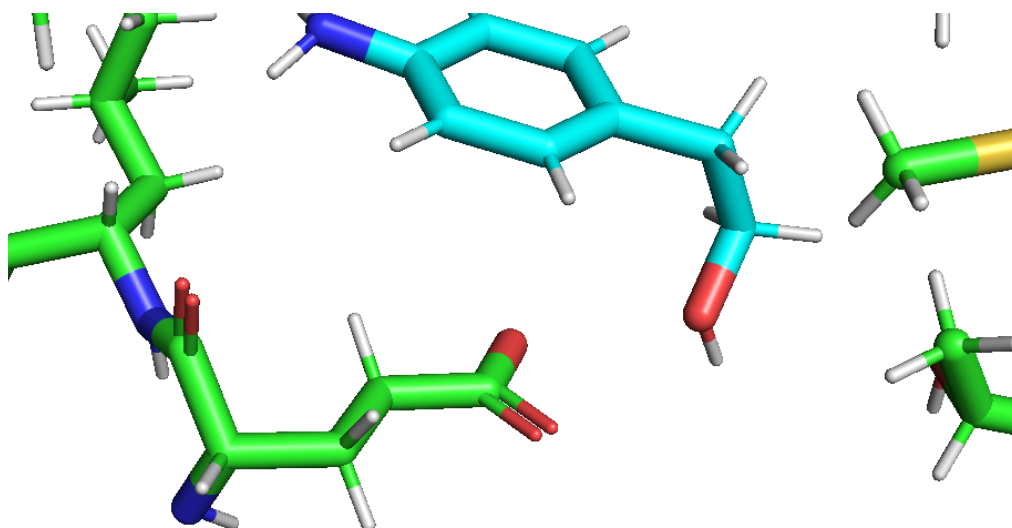


Figura 102. Imatge després de la mutació. Font: PyMOL.

#### Pas 6:

Aquesta és la posició abans de la primera rotació, com es pot veure a la figura 103, té un angle de  $-179,4^\circ$ , però amb l'eina de rotar, ho puc modificar com jo vulgui.

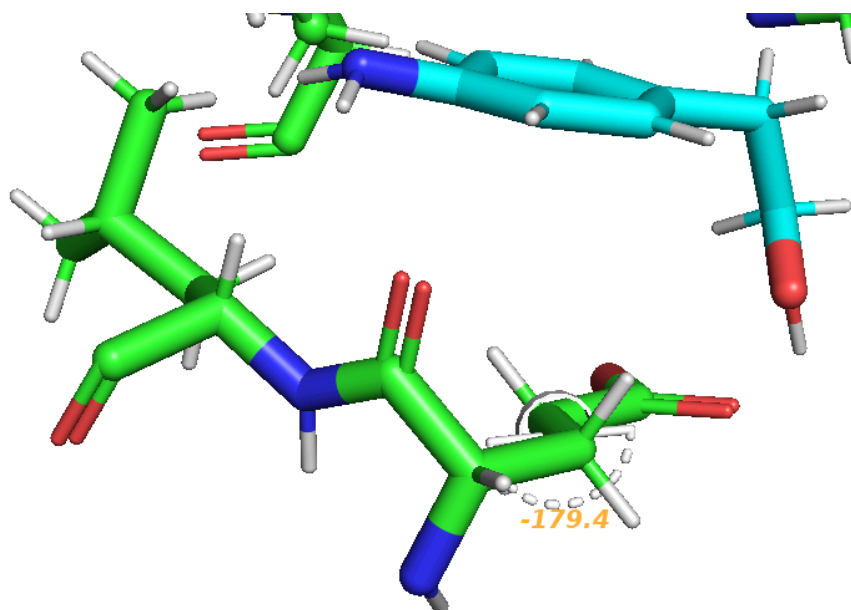


Figura 103. Imatge abans de la primera rotació. Font: PyMOL.

#### Pas 7:

Després de la primera rotació així és com queda l'aminoàcid, es veu a la figura 104 que ara està una mica més a prop, però encara és molt difícil que es produeixi un pont d'hidrogen. En finalitzar la primera rotació queda un angle de  $105^\circ$ . A causa de la distància actual, com tenia previst, faré una segona rotació.

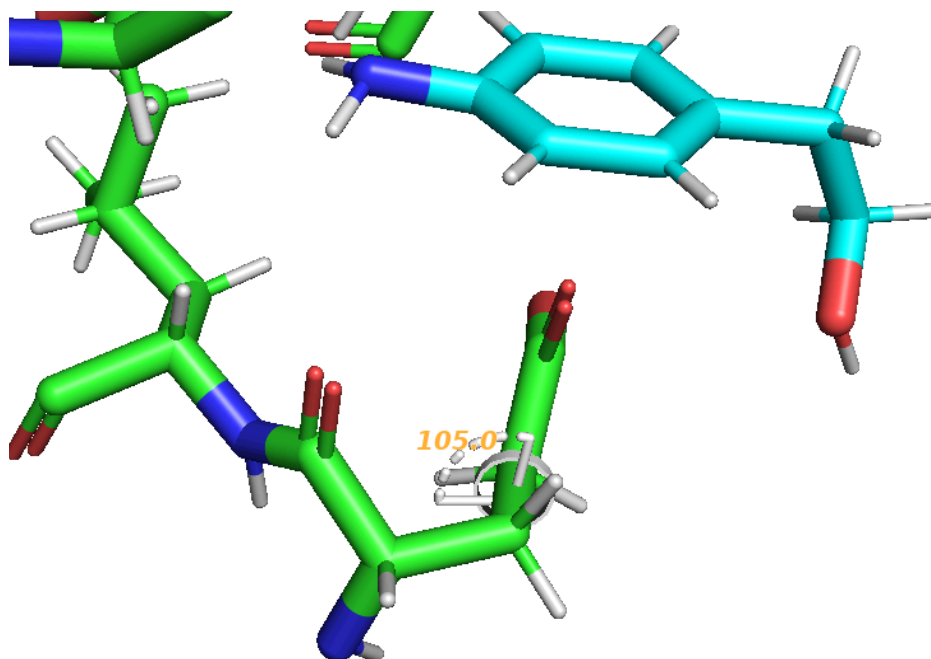


Figura 104. Imatge després de la segona rotació. Font: PyMOL.

**Pas 8:**

Com que necessito que l'oxigen que hi ha a la punta de l'aminoàcid 93 pugui formar un pont d'hidrogen amb els hidrògens del grup aromàtic del substrat, necessito que pugui una mica, i per això faré la segona rotació. Es pot veure a la figura 105, que el carboni que vull rotar té un cercle blanc i que abans de girar-lo té un angle de 67,2°.

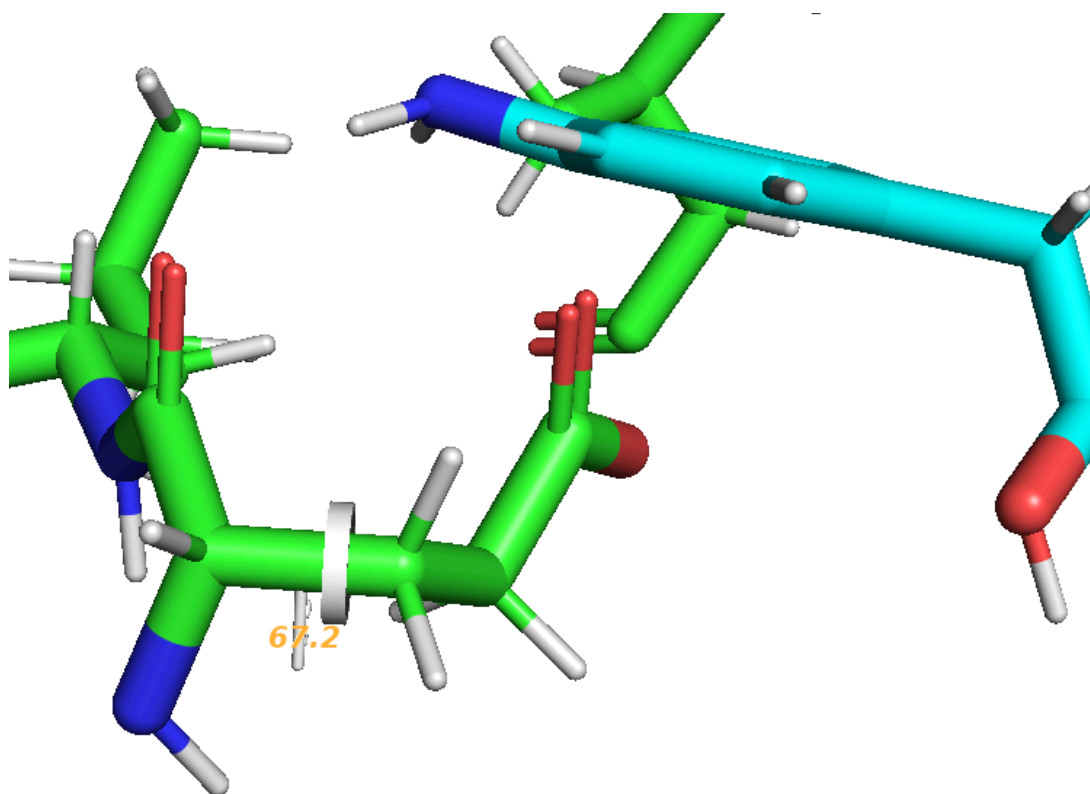


Figura 105. Imatge abans de la segona rotació. Font: PyMOL.

**Pas 9:**

En finalitzar la rotació l'he deixat en un angle de 145,1°, ja que d'aquesta forma es pot veure que l'oxigen queda a una distància d'1,9 i 2,5 Å, i com que la distància ideal és d'entre 2,2 i 3,2 Å, crec que són uns valors molt fidels.

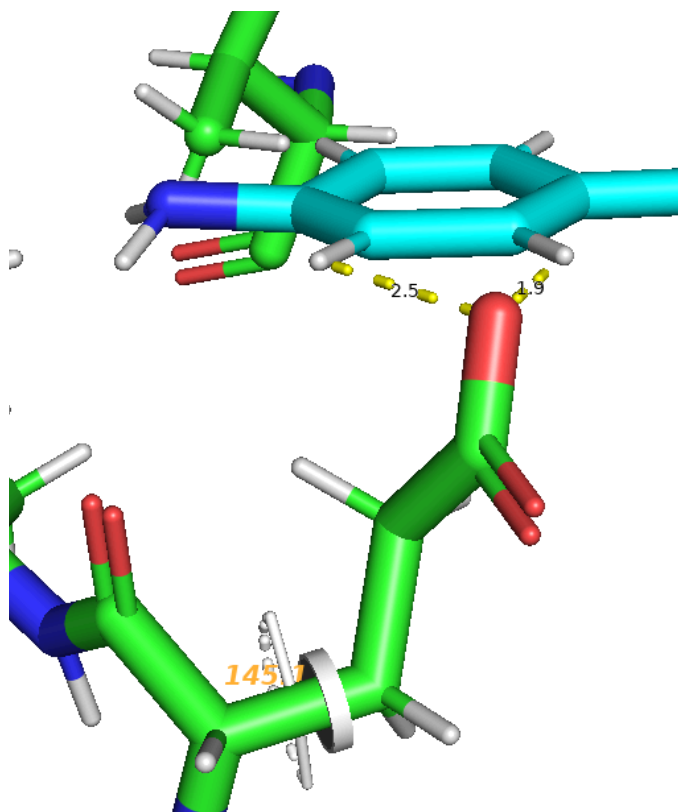


Figura 106. Imatge després de la segona rotació. Font: PyMOL.

#### Pas 10:

En el moment que ja anava a exportar la molècula per passar els models per la web he fet una última revisada i m'he adonat que l'aminoàcid que acabava de moure estava xocant amb un altre que ja hi havia, com es veu a la figura 107. Aquest aminoàcid que molesta és el número 141 i és una metionina. En conseqüència, he decidit que aquesta metionina l'he de mutar en un aminoàcid més petit, com una alanina.



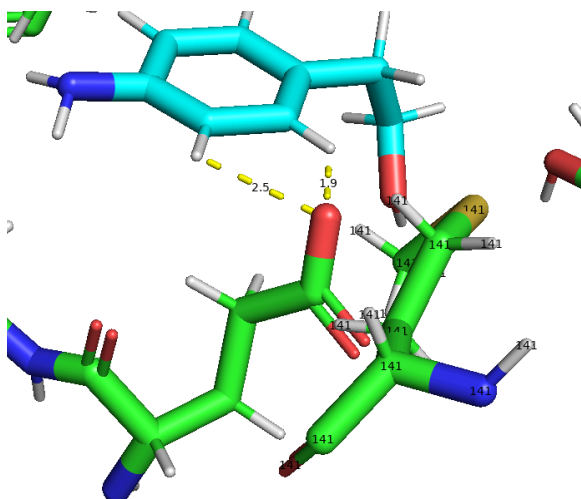


Figura 107. Imatge de l'aminoàcid 93 que molesta. Font: PyMOL.

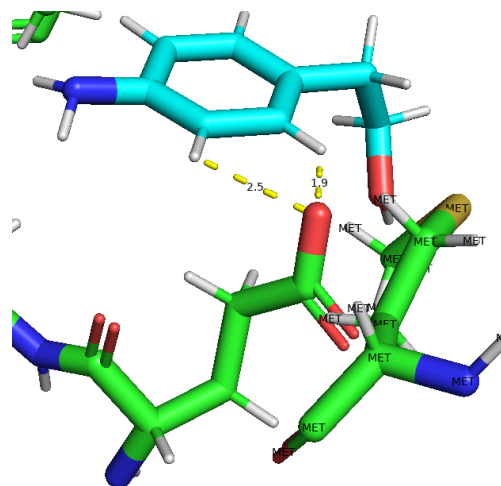


Figura 108. Imatge de la metionina que molesta. Font: PyMOL.

### Pas 11:

Aquest és el moment en el qual acabo de mutar la metionina 93 en una alanina, que com que és més petita, no xoca amb l'aminoàcid 93, que realment és l'important en aquesta mutació 5.

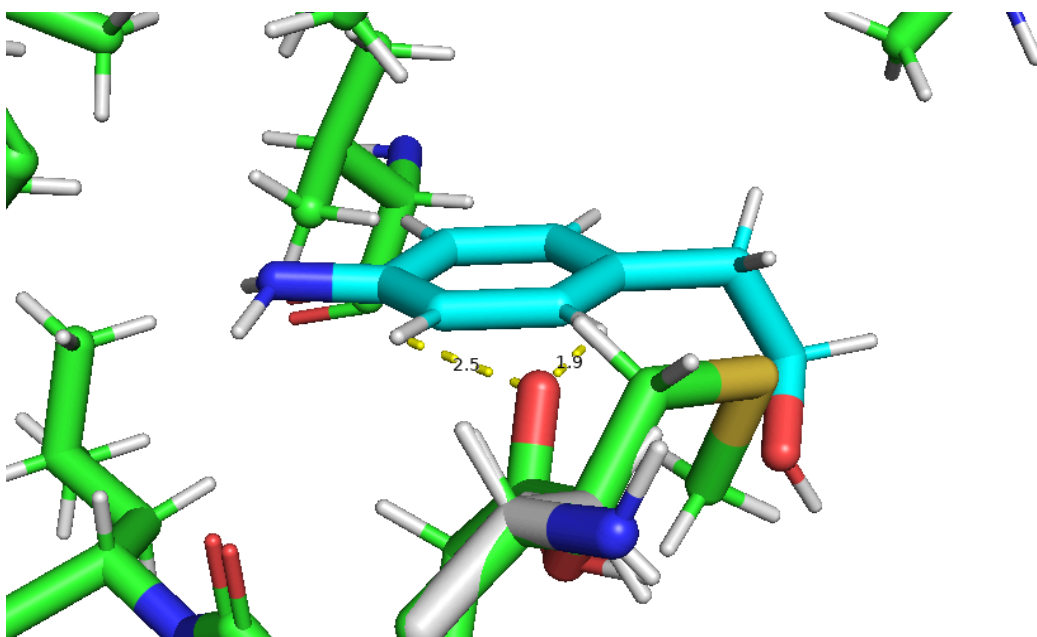


Figura 109. Imatge després de la segona mutació. Font: PyMOL.

**Pas 12:**

Finalment, després de dues mutacions i dues rotacions així és com ha quedat finalment, on estic forçant al fet que els hidrògens del substrat estableixin un pont d'hidrogen amb l'oxigen de l'aminoàcid 93.

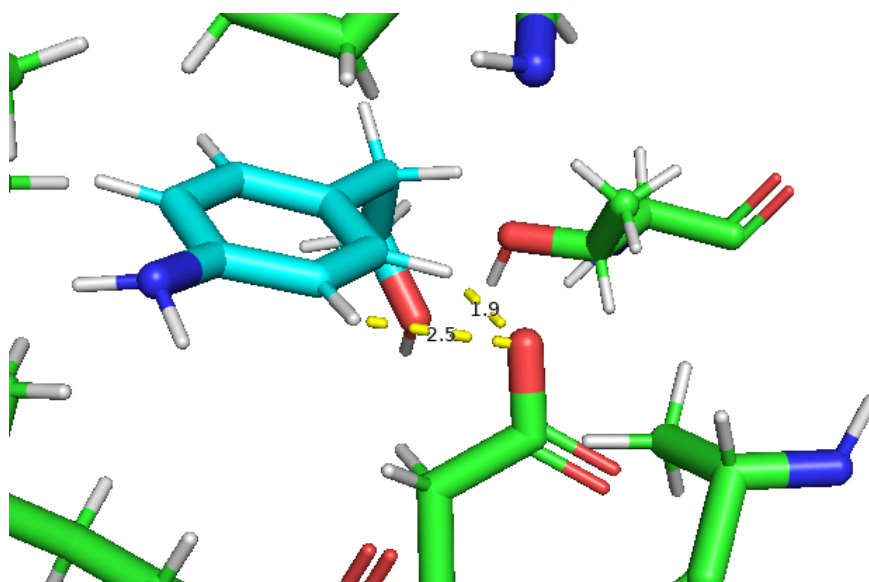


Figura 110. Imatge al final de les mutacions i rotacions. Font: PyMOL.

**Pas 13:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

## 4.3.3.6. Mutació 6

Ara faré la sisena mutació al meu enzim. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

Primer de tot he fet el pas 1 de la primera mutació per deixar els fons blanc, però aquesta vegada he fet que la proteïna es mostri la seva superfície, tal com es veu a la figura 111. Es pot observar que hi ha el “forat” on hi ha el centre actiu de l’enzim i que el substrat està situat allà dins, d’aquesta forma potser trobo per fer altres mutacions que redueixin l’energia d’unió.

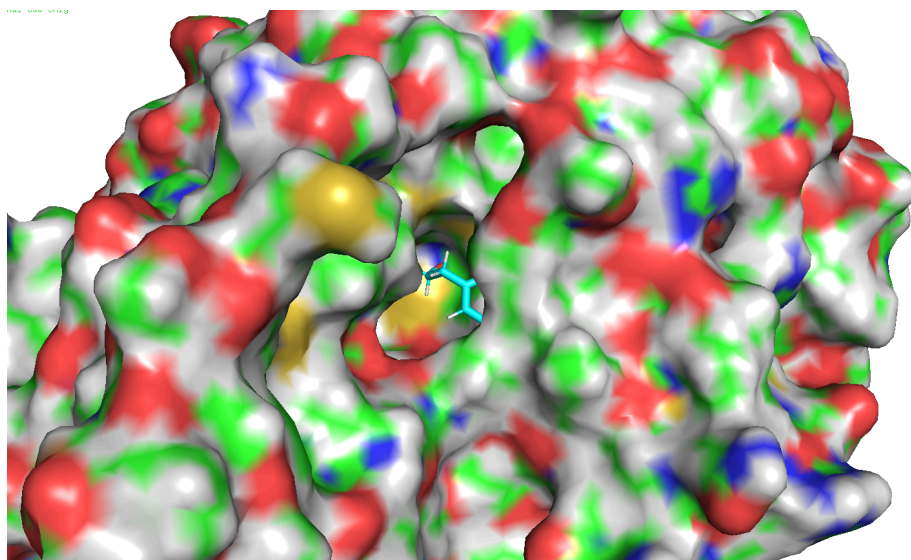


Figura 111. Imatge de la superfície de l’enzim, on es veu el centre actiu. Font: PyMOL.

**Pas 2:**

El que he fet és ampliar més fins a arribar al centre actiu amb el substrat. Quan ho he ampliat m’ha cridat molt l’atenció que hi havia un hidrogen del grup aromàtic que no se’l veia, ja que estava “sota” de la superfície de l’enzim, com he assenyalat de color vermell. Llavors he pensat que potser passava això perquè no tenia prou espai i era repulsat per un altre aminoàcid i llavors he decidit modificar-ho.

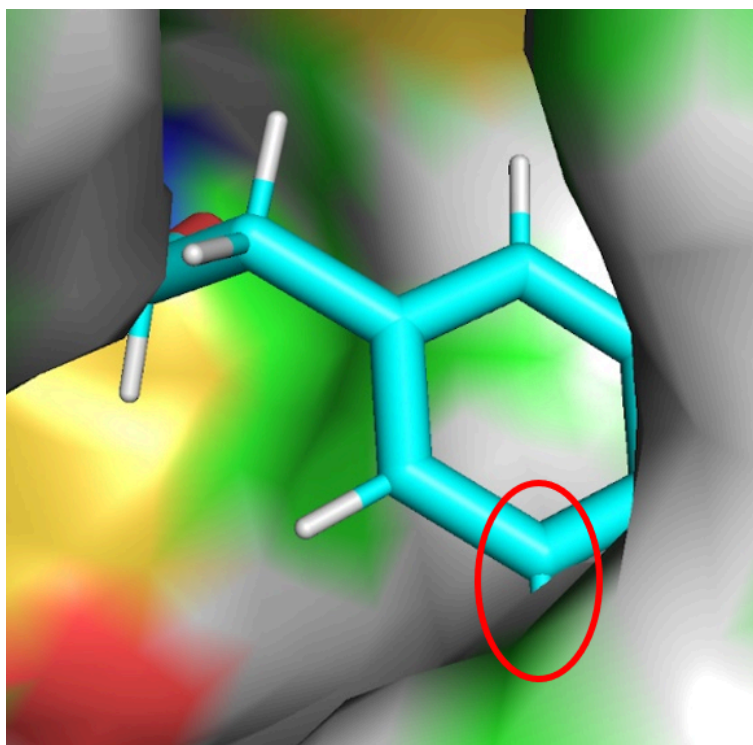


Figura 112. Imatge del substrat al centre actiu. Font: PyMOL.

### Pas 3:

Com que vull que el substrat i l'aminoàcid de l'enzim he intentat buscar quin aminoàcid era per poder modificar-lo i que millori el rendiment. El que he fet és detectar quin era i marcar-lo en forma de pals junt amb uns altres perquè es vegi millor, però he deixat de fons la superfície de l'enzim per orientar-me.

Concretament, he detectat que l'aminoàcid que feia nosa era el número 318 i que era una valina.

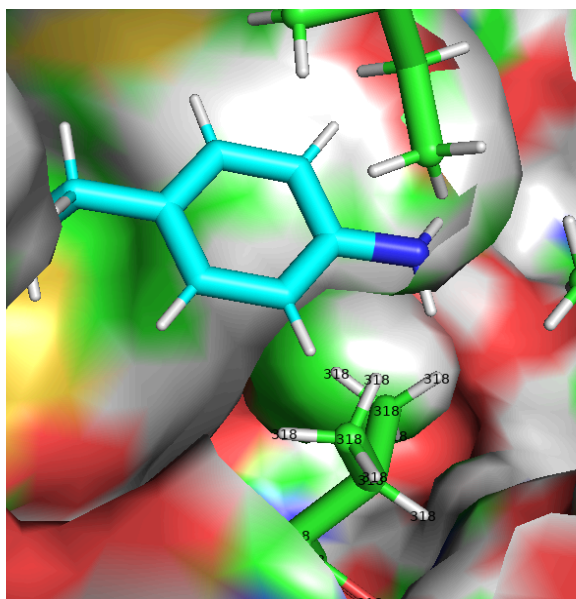


Figura 113. Imatge de l'aminoàcid 318, el que vull modificar. Font: PyMOL.

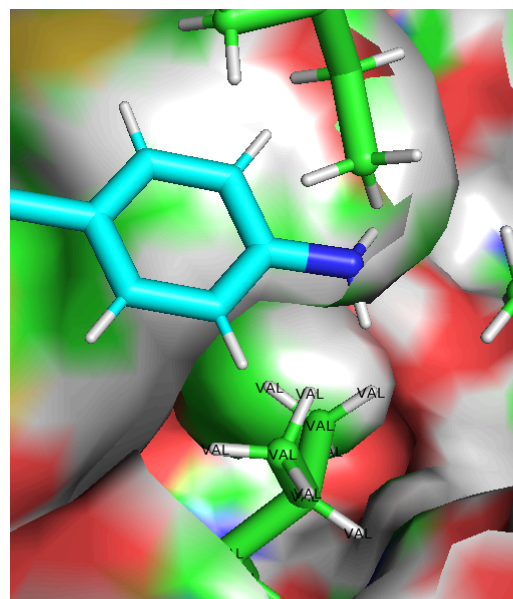


Figura 114. Imatge de l'aminoàcid que vull modificar, és una valina. Font: PyMOL.

#### Pas 4:

Un cop he identificat l'aminoàcid que vull mutar he de decidir quin és el que vull posar en el seu lloc. Com que el problema principal és que provoca repulsió i no deixa prou espai al substrat, el que faré és posar una alanina, ja que és l'aminoàcid més petit de tots i crec que pot funcionar molt millor que la valina que hi ha actualment.

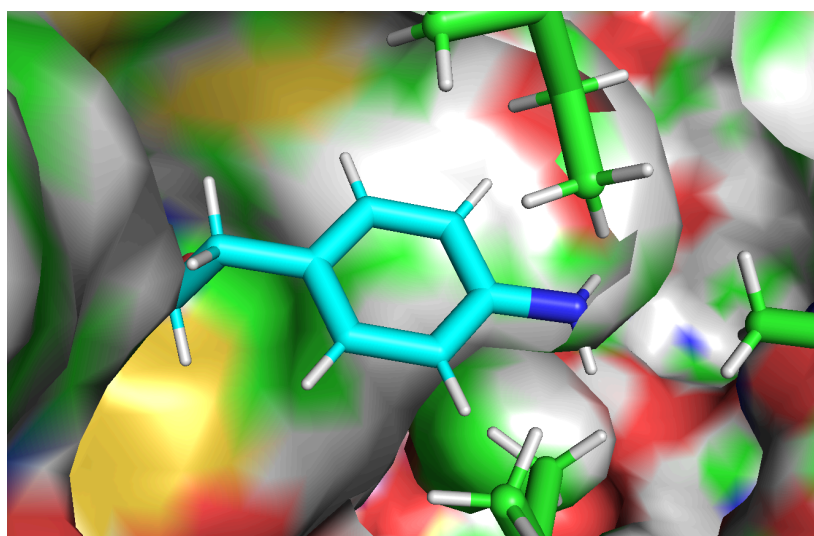


Figura 115. Imatge del substrat i l'aminoàcid 318. Font: PyMOL.



**Pas 5:**

Ara el que faré és posar l'alanina que he decidit posar en el lloc de la valina actual. Com sempre vaig al menú de "Wizard" i "Mutagenesis" i llavors escullo l'aminoàcid alanina, com que és un aminoàcid d'un sol carboni no té diferents posicions per escollir com altres vegades.

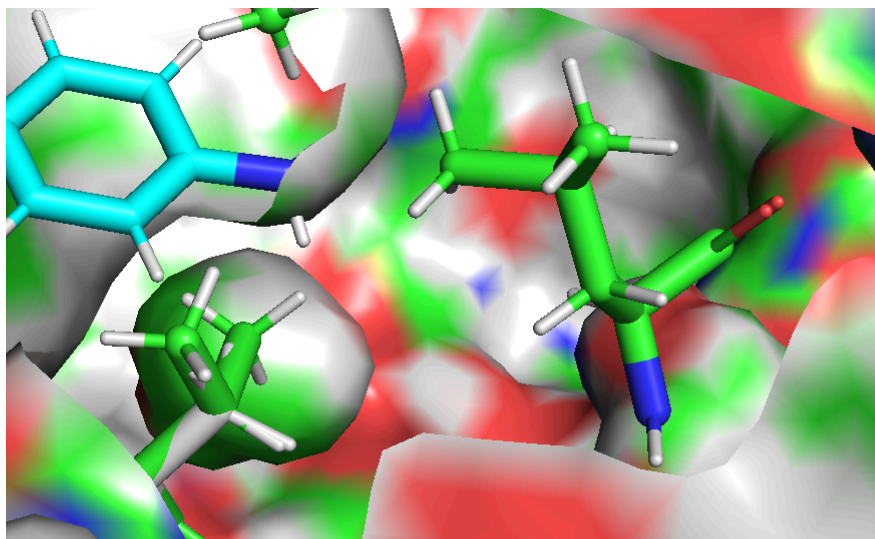


Figura 116. Imatge en el moment de la mutació. Font: PyMOL.

**Pas 6:**

Un cop he acabat la mutació el que he fet és comprovar que l'aminoàcid 318 no repulsarà més al substrat, fent que es redueixi l'energia d'unió. Com he assenyalat de color vermell, ara no estan tan junts, el que fa que no es repulsin.

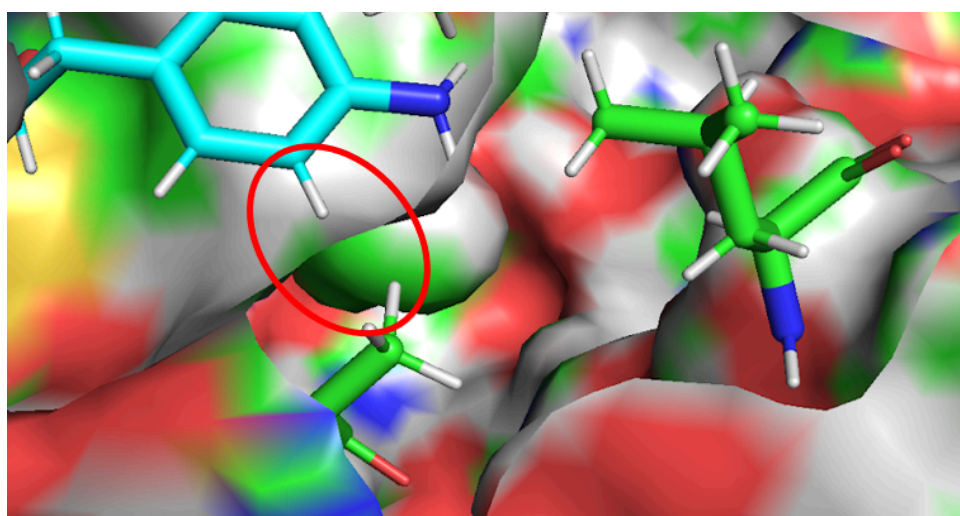


Figura 117. Imatge després de la mutació. Font: PyMOL.

**Pas 7:**

Per acabar, el que he fet és tornar a mostrar la superfície de l'enzim i es pot veure a la figura 118 que ara ocupa menys espai i que, probablement, el substrat no el repel·lirà i podrà col·locar-se millor.

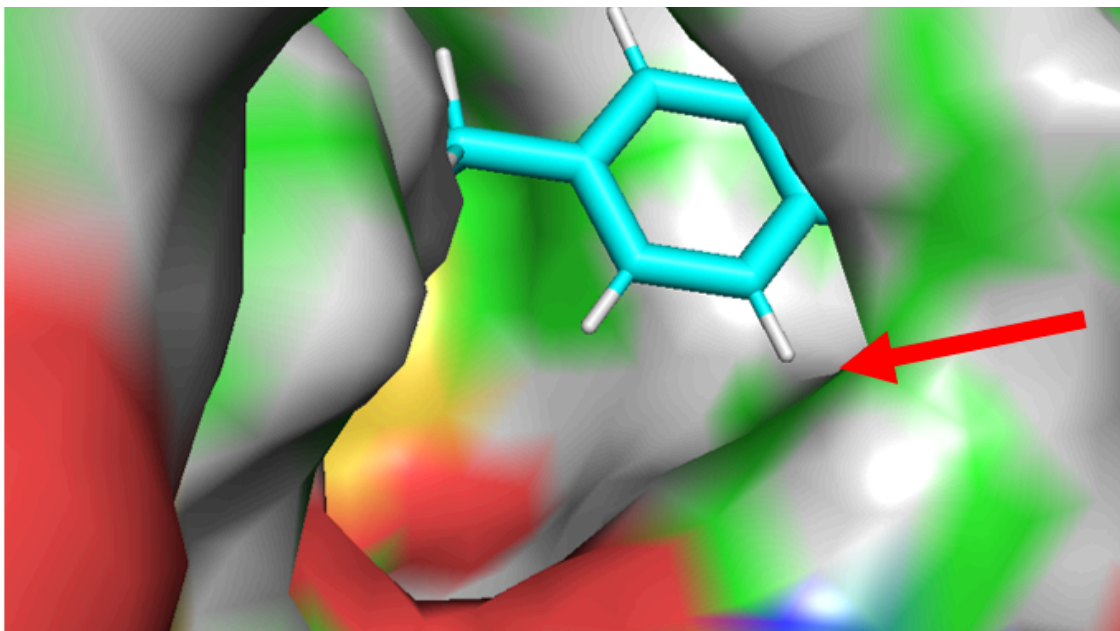


Figura 118. Imatge del centre actiu després de la mutació. Font: PyMOL.

**Pas 8:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

#### 4.3.3.7. Mutació 7

Ara faré la setena mutació al meu enzim, encara que per aquesta modificació treballaré amb l'enzim obtingut a la mutació 6, per intentar millorar-lo encara més. Aquests són els passos que he seguit:

**Pas 1:**

El primer que he fet és posar el fons de color blanc i després he tornat a posar l'enzim mostrant la seva superfície, com en el cas anterior.

**Pas 2:**

Com que en la modificació anterior vaig detectar que en una zona de l'enzim, un aminoàcid es repulsava amb el substrat, he decidit revisar que en cap altre punt succeís això. En conseqüència, he "tornat" al mateix punt d'abans a assegurar-me.

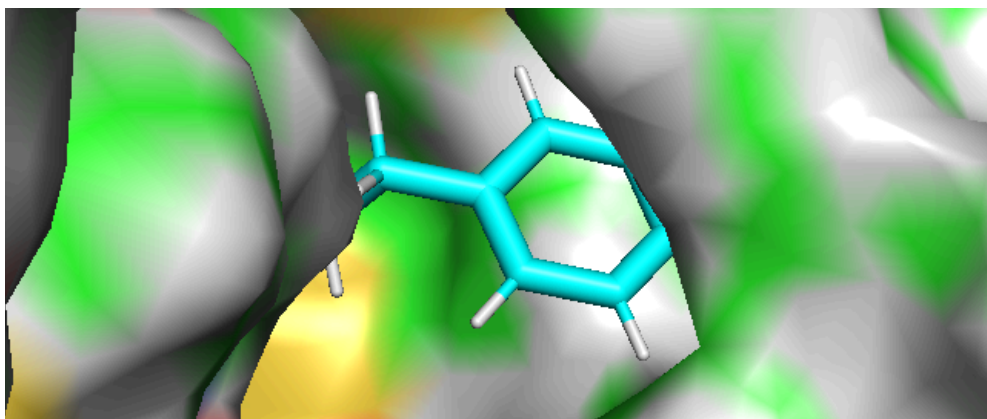


Figura 119. Imatge del centre actiu de l'enzim Font: PyMOL.

**Pas 3:**

Quan estava comprovant que cap aminoàcid afectés el substrat, he detectat que passa una cosa semblant al cas anterior amb un dels hidrògens del grup Amino, el que està assenyalat a la figura 120. Encara que pot semblar que està bé, en veritat, es veu que una part de l'hidrogen queda sota la superfície de l'enzim i, per tant, es repulsa amb aminoàcid que hi ha en aquella localització.

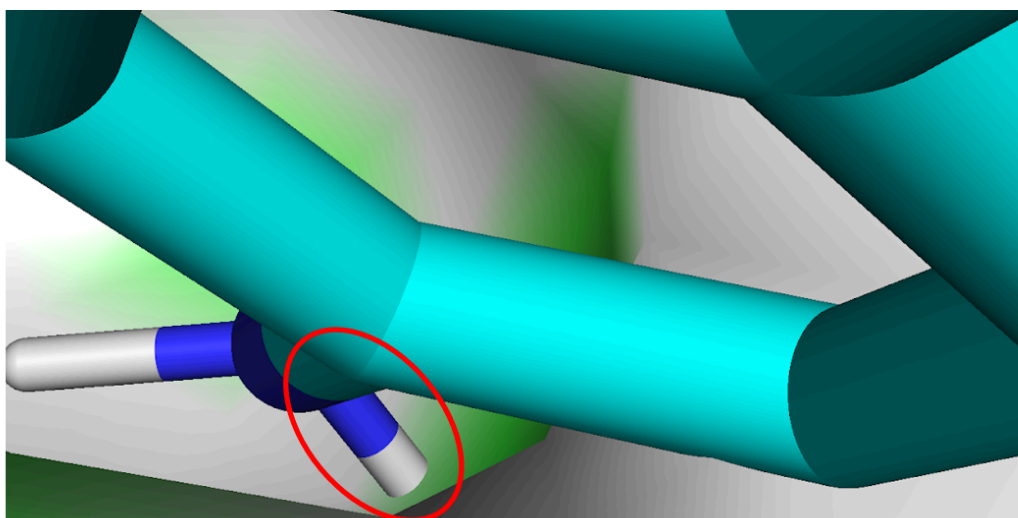


Figura 120. Imatge de l'hidrogen que està afectat. Font: PyMOL.



**Pas 4:**

Un cop m'he adonat del fet que l'aminoàcid d'aquella zona s'havia de modificar, el que he fet ha sigut que els aminoàcids de la zona propera es mostrin en forma de bastons, d'aquesta forma és més fàcil detectar-lo. Llavors l'he trobat, és l'aminoàcid número 94 i és una leucina, tal com es veu a la figura 121.

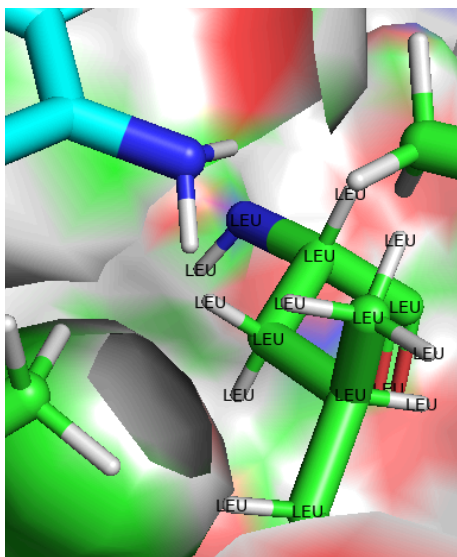


Figura 121. Imatge de l'aminoàcid a modificar, és una leucina. Font: PyMOL.

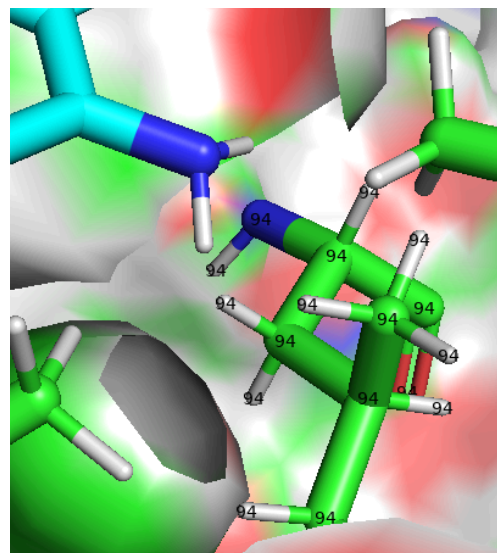


Figura 122. Imatge de l'aminoàcid a modificar, és el número 94. Font: PyMOL.

**Pas 5:**

Ara he de decidir quin aminoàcid posar en el lloc de la leucina. Com que és un problema del fet que es repelen entre ells perquè estan molt a prop, el que faré serà posar un aminoàcid més petit, com l'alanina, perquè d'aquesta forma se solucioni el problema.

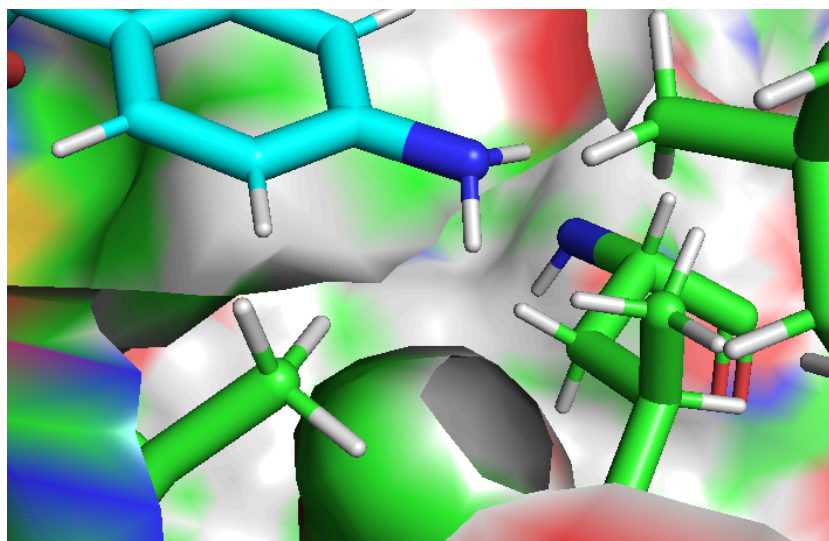


Figura 123. Imatge del substrat i aminoàcid a mutar Font: PyMOL.

#### Pas 6:

Un cop que sé quin és l'aminoàcid que he de modificar i per quin ho he de fer és el moment de la mutació. El que he de fer és marcar que vull una alanina i seleccionar la leucina que vull mutar.

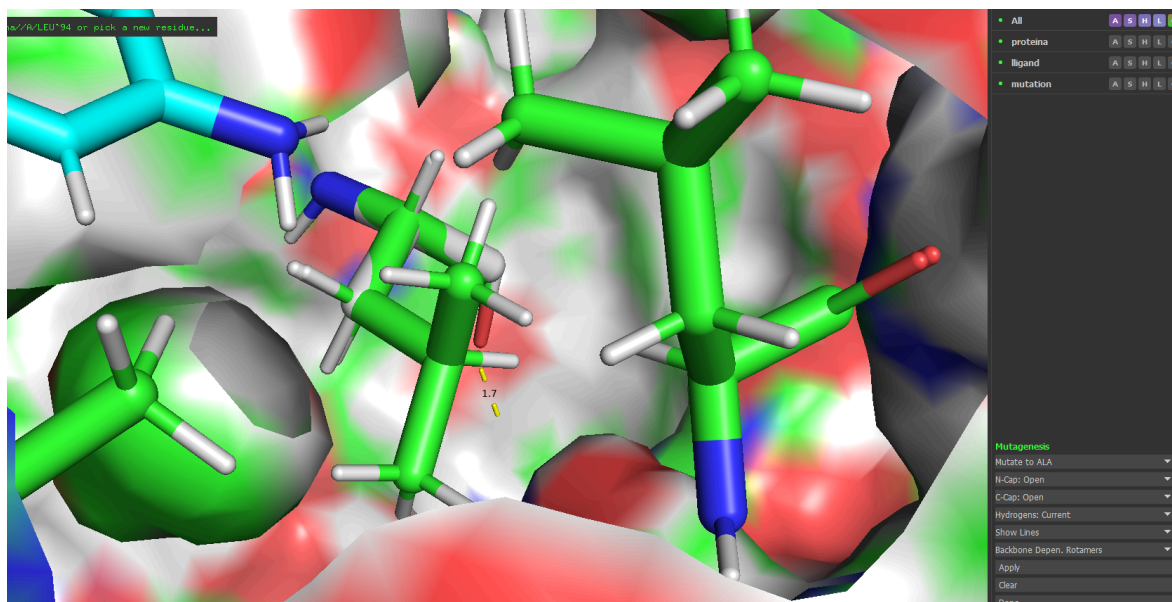


Figura 124. Imatge en el moment de la mutació. Font: PyMOL.

**Pas 7:**

Un cop he acabat la mutació el que faig és assegurar-me que la mutació ha sortit com jo tenia previst. Com es pot veure a la figura 125, la mutació ha sortit com esperava i ara el substrat i l'aminoàcid 94 estan molt més separats, cosa que fa que no es repulsin i l'energia d'unió sigui més baixa, que és el que vull.

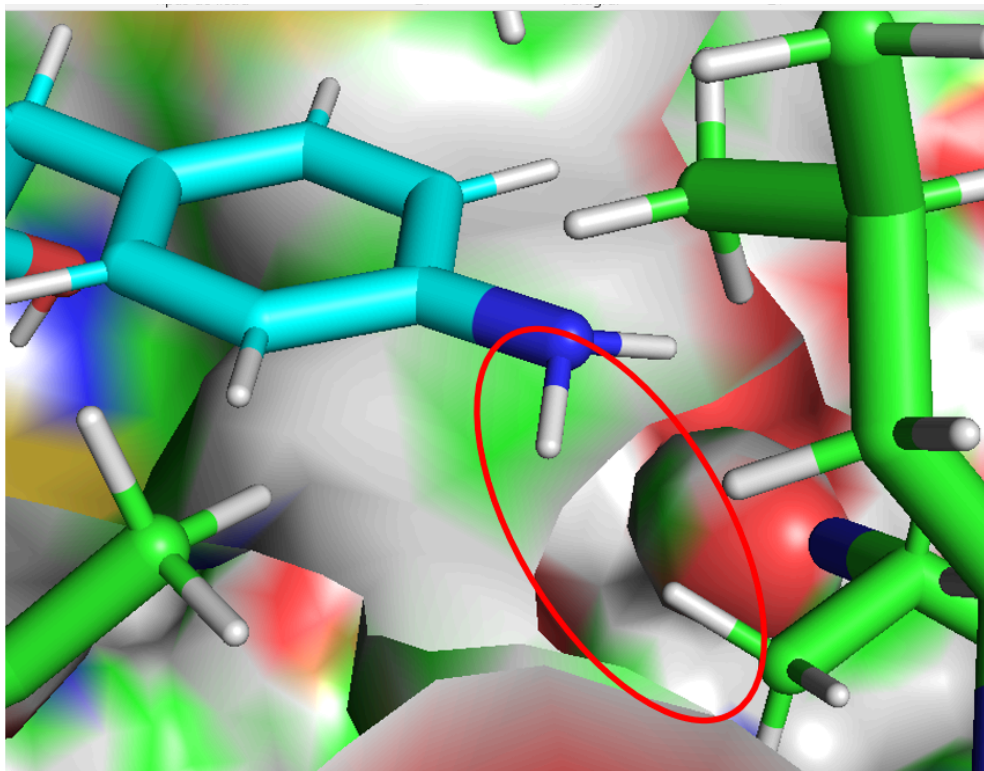


Figura 125. Imatge després de la mutació. Font: PyMOL.

**Pas 8:**

Un cop ho he acabat tot el que he fet és posar tota la proteïna en format superfície i tornar a aquell d'hidrogen del grup Amino que estava per “sota” de la superfície. Un cop he arribat allà, que és la figura 126, el que he vist és que l'hidrogen es pot veure completament, el que vol dir la mutació ha funcionat.

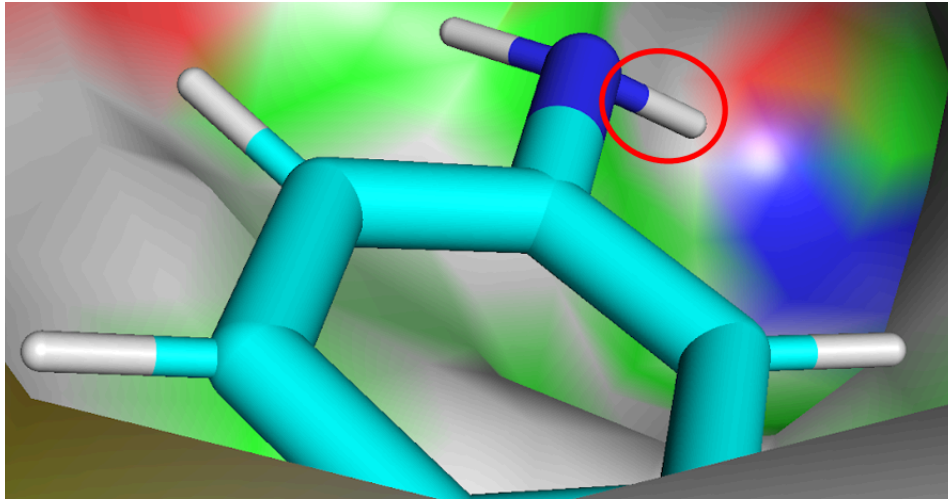


Figura 126. Imatge del substrat al centre actiu. Font: PyMOL.

**Pas 9:**

A partir d'aquí el procés per pujar totes les dades a la web per fer el càlcul és sempre el mateix, per tant, a partir d'aquí els passos que seguiré són els que hi ha a partir del pas 16 del procés general.

#### 4.3.4. Resultats

En aquesta secció del marc aplicat, exposaré els resultats que he obtingut de les mutacions anteriors.

##### **Taula 1: Resultats de les energies d'unió obtingudes de les mutacions**

En el moment que he passat tots els arxius per la web del càlcul de poissonboltzman.org seguint els passos al peu de la lletra del procés general, les energies d'unió que he obtingut els que he col·locat tots en aquesta taula. La quadricula en qüestió té cinc columnes:

A la primera columna apareixen totes les proteïnes amb les seves respectives mutacions en les quals he estat treballant. La primera de totes és la “proteïna mostra”, que funciona com a control, ja que tots els resultats són relatius als seus valors, és a dir, que si aconseguixo un valor per sota del control, serà un èxit, en canvi, si no és així vol dir que no ha millorat. A més a més, a part del control, tenim les altres proteïnes que fan referència a les que he obtingut de les mutacions realitzades darrerament, cada mutació va amb la seva respectiva proteïna.

A la segona columna tinc els valors de les mutacions de l'enzim respecte a l'etanol, que és el lligand natural de la proteïna 1AGN. A aquest no li donaré gaire importància, ja que el treball està pensat per millorar l'energia en relació amb l'altre substrat, per tant, no les tractaré en excés.

A la tercera columna tinc el mateix que a la segona però en aquesta ocasió amb l'alcohol 4-aminofenètilic. Aquí aniran a parar les dades de la web en combinar l'alcohol 4-aminofenètilic amb cadascuna de les proteïnes amb les mutacions.

La quarta columna és molt important perquè indica quines són les mutacions que he fet en cada proteïna, si he mutat un aminoàcid o si he fet una rotació en un altre, d'aquesta forma és molt fàcil veure quines són les mutacions que s'han fet a cada enzim.

L'última columna és la que indica la interacció intermolecular que he intentat forçar en aquella mutació.

Abans de parlar sobre els resultats, he d'explicar com s'han d'interpretar. El que vull dir és que si al final del número posa E+01 kJ/mol, vol dir que s'ha de multiplicar una vegada per 10 i que llavors el E+00 kJ/mol serà un número més petit que el que tingui E+01 kJ/mol, igual que el E-01 kJ/mol serà un número encara més petit que els anteriors.

Ja com a última cosa, vull tornar a recordar que les dades aconseguides les consideraré millors o pitjors en comparació amb les dades control.

Totes les dades de l'etanol són molt més elevades que les del grup control, sense cap excepció. Per fer-nos una idea de la gran diferència d'energies d'unió entre el grup control i la resta, només fa falta agafar el millor resultat dels no control, que és el de la proteïna 1, i es pot observar que és més del doble que la de la "proteïna mostra".

Per altra banda, les dades de l'alcohol 4-aminofenètilic són molt més semblants i la majoria estan al voltant de les de la proteïna control. A més a més, a la proteïna 6 i 7 s'han millorat considerablement les dades de la proteïna mostra, ja que tenen valors molt inferiors a l'enzim control. També cal afegir, que la modificació que ha tingut pitjors resultats ha sigut la 2, i per molta diferència.

Addicionalment, es pot veure que sempre he modificat, més o menys, els mateixos aminoàcids. De totes maneres, és important veure que depenent de l'aminoàcid final que he deixat, els valors han sigut molt diferents entre ells.

Per altra banda, si ens fixem més en el tipus d'interacció, es pot veure que si les interaccions no tenen unes relacions clares entre elles, és a dir, que no totes les interaccions  $\pi$ - $\pi$  d'apilament tenen resultats dolents ni tots els ponts d'hidrogen tenen bons resultats, però sí que les d'evitar repulsions han donat molt bons resultats.

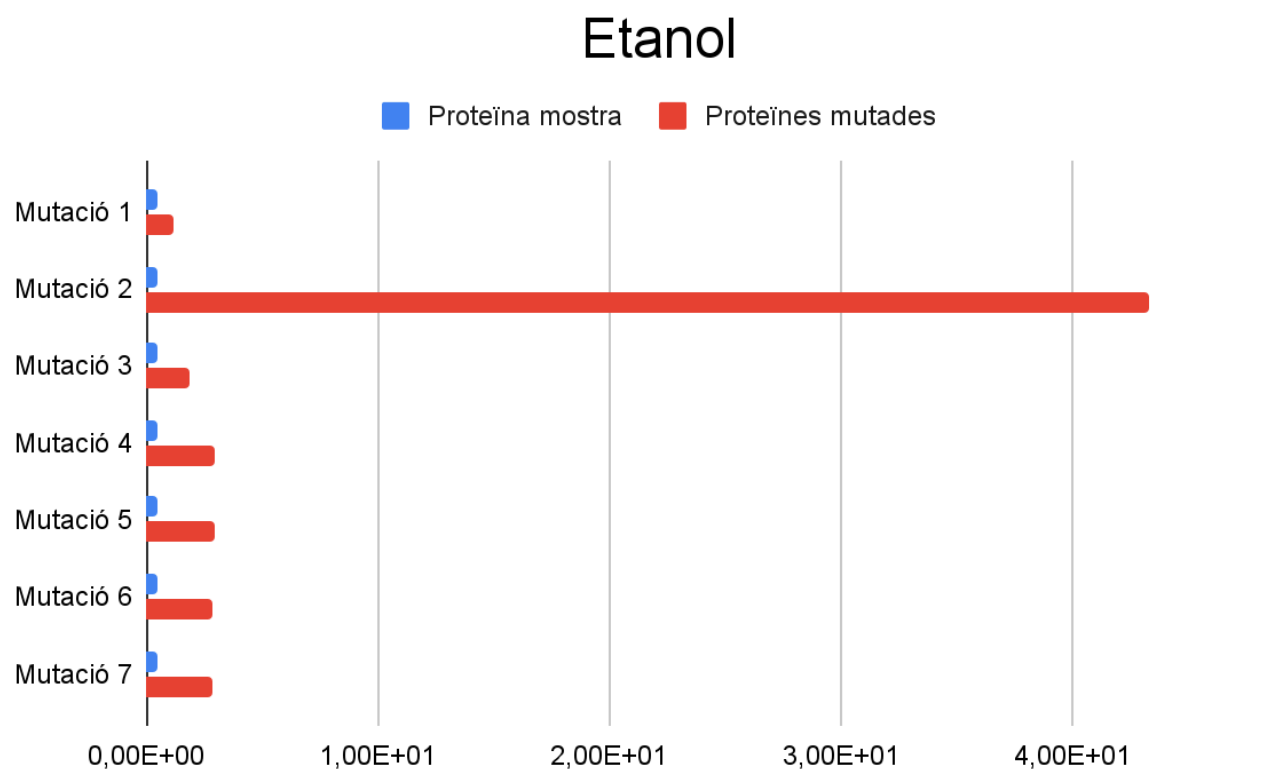
**Taula 1: Resultats de les energies d'unió obtingudes de les mutacions**

|                 | Etanol (Natural)          | Alcohol 4-aminofenetílic  | Aminoàcids modificats                         | Tipus d'interacció forçada              |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Proteïna mostra | 4.612479145732E-01 kJ/mol | 1.291145765906E+01 kJ/mol | -                                             | -                                       |
| Proteïna 1      | 1.210533276536E+00 kJ/mol | 1.394493908746E+01 kJ/mol | Met141Trp<br>Phe93Ala                         | Interacció $\pi$ - $\pi$<br>d'apilament |
| Proteïna 2      | 4.334680554106E+01 kJ/mol | 4.005716044706E+02 kJ/mol | Rotació aminoàcid                             | Interacció $\pi$ - $\pi$<br>d'apilament |
| Proteïna 3      | 1.918890484478E+00 kJ/mol | 1.495676116671E+01 kJ/mol | Rotació aminoàcid                             | Interacció $\pi$ - $\pi$<br>d'apilament |
| Proteïna 4      | 3.007640856770E+00 kJ/mol | 2.366634627928E+01 kJ/mol | Leu94Glu                                      | Pont d'hidrogen                         |
| Proteïna 5      | 2.987275178530E+00 kJ/mol | 1.570565647785E+01 kJ/mol | Phe93Glu<br>Met141Ala<br>Rotacions aminoàcids | Pont d'hidrogen                         |
| Proteïna 6      | 2.875153611866E+00 kJ/mol | 9.778452159799E+00 kJ/mol | Val318Ala                                     | Cap → No repulsió                       |
| Proteïna 7      | 2.903011311297E+00 kJ/mol | 6.730800745854E+00 kJ/mol | Leu94Ala                                      | Cap → No repulsió                       |

### Gràfic 1: Gràfic de les energies d'unió respecte al lligand etanol

En aquest gràfic es poden veure de forma molt més visual les dades obtingudes només del lligand etanol.

El que més crida l'atenció és que la mutació 2 ha obtingut uns resultats nefastos, ja que està molt per sobre de les altres dades. Per aquest motiu faré un altre gràfic descartant la mutació 2 perquè tot es vegi molt millor.

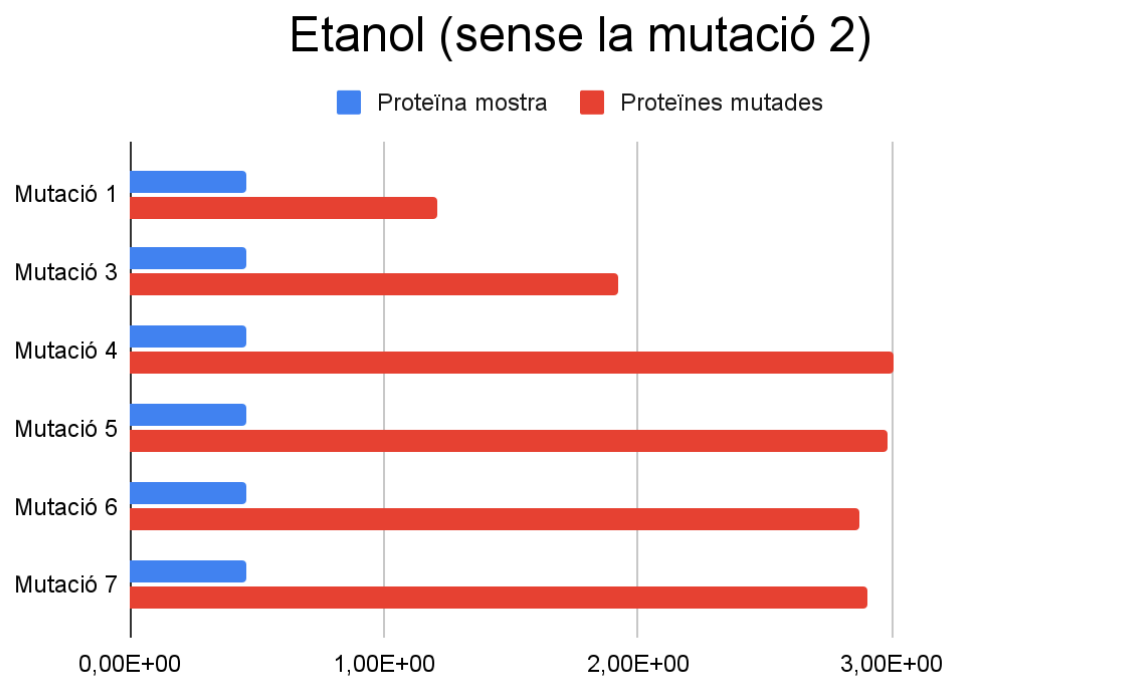




**Gràfic 2: Gràfic de les energies d'unió respecte al lligand etanol sense tenir en compte la mutació 2.**

Aquest és el segon gràfic del lligand etanol, però com que he eliminat la mutació 2, es pot veure tot molt millor.

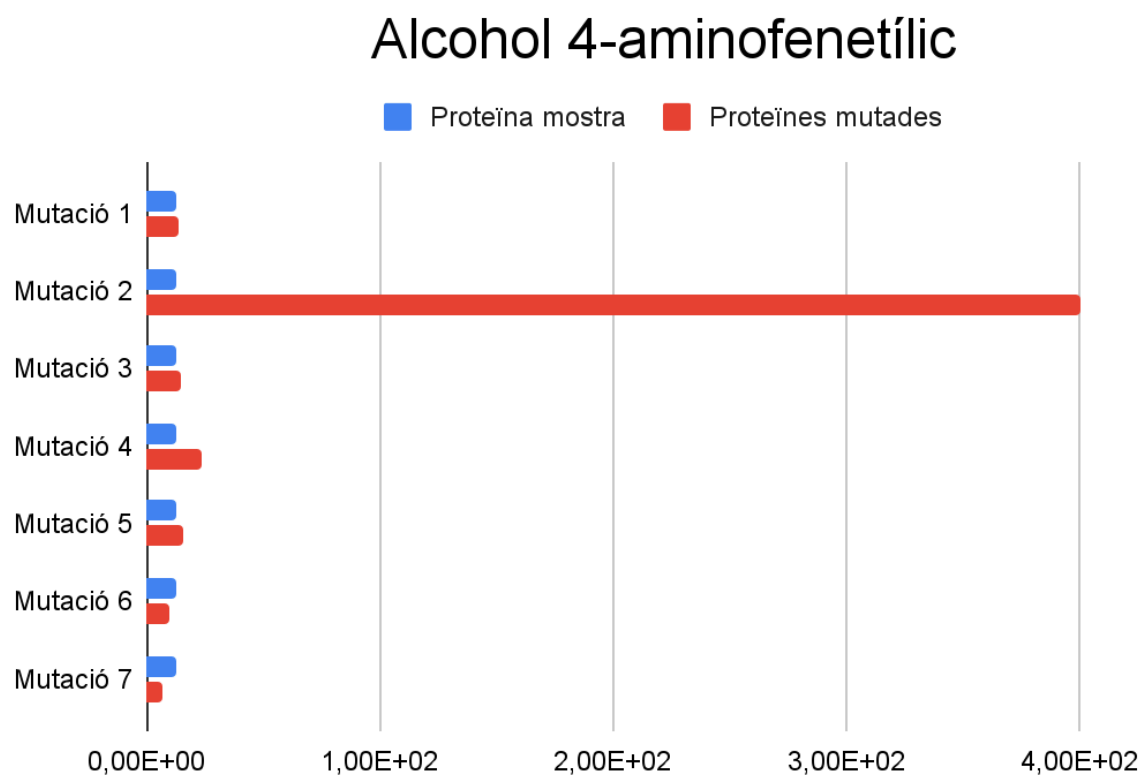
Com ja he mencionat abans, es pot veure que cap de les proteïnes mutades (color vermell) s'ha apropat gens a l'energia d'unió que tenia la proteïna mostra (color blau).



**Gràfic 3: Gràfic de les energies d'unió respecte al lligand alcohol 4-aminofenètilic.**

Aquest és el gràfic que conté les dades obtingudes de l'alcohol 4-aminofenètilic amb cadascuna de les proteïnes.

Com passa en el gràfic 1, la mutació 2 ha sigut tan dolenta que la descartaré perquè es puguin veure bé totes les dades i es puguin contrastar els resultats.

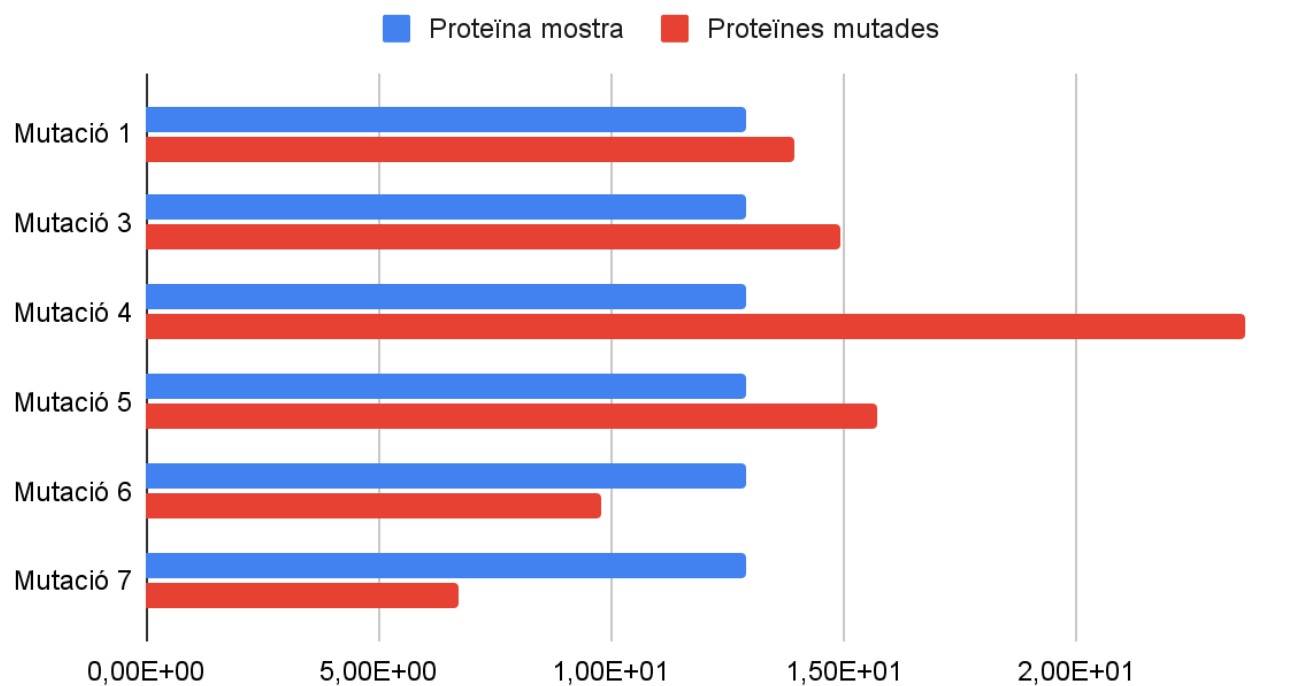


**Gràfic 4: Gràfic de les energies d'unió respecte al lligand alcohol 4-aminofenètilic sense tenir en compte la mutació 2.**

Com he dit anteriorment, aquest és el gràfic de l'alcohol 4-aminofenètilic sense tenir en compte la mutació 2.

Aquí es pot veure clarament que les proteïnes mutades estan a valors similars a la mostra, de fet, inclús les proteïnes 6 i 7 milloren el rendiment que la mostra, tal com es veu al gràfic.

### Alcohol 4-aminofenètilic (sense la mutació 2)



**Taula 2: Dades de totes les mutacions per visualitzar tretes de la web**

Aquesta és la taula que dona els enllaços a la web que realitza el càlcul i, es poden veure realment les dades que he mostrat a la taula 1 i als gràfics anteriors.

|                 | Etanol (Natural)      | Alcohol 4-aminofenetílic |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|
| Proteïna Mostra | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 1      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 2      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 3      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 4      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 5      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 6      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 7      | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |

Com que aquests enllaços només mantenen les dades a la web a partir de 14 de la seva creació, aquí deixo totes les altres dades a les quals es pot accedir sempre en una carpeta del Drive. Per veure les dades s'ha d'obrir el document "apbs.stdout.txt" i baixar a baix de tot i mirar el número que indica el "Local net energy".

**Taula 3: Dades de les mutacions per visualitzar desades al Drive.**

|                       | Etanol (Natural)      | Alcohol 4-aminofenetílic |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| Proteïna Mostra Dades | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 1            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 2            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 3            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 4            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 5            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 6            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |
| Proteïna 7            | <a href="#">Dades</a> | <a href="#">Dades</a>    |

#### 4.3.5. Discussió

Ara faré la discussió dels resultats que he obtingut en l'apartat anterior. Separaré la discussió en dues parts: una en la que parlaré dels resultats obtinguts respecte a l'etanol i en l'altre de l'alcohol 4-aminofenètilic.

##### **Etanol**

En els resultats de l'etanol es pot veure que cap mutació millora o iguala l'energia d'unió de la proteïna mostra, cosa que ja m'esperava abans de començar el marc aplicat, gràcies als coneixements adquirits del marc teòric.

El motiu pel qual no he obtingut els resultats esperats és perquè l'etanol és el lligand natural de l'enzim, això vol dir que l'enzim en qüestió ja està especificat completament a l'estructura de l'etanol, tal com havia estudiat en el marc teòric, que és una de les característiques principals dels enzims. Aquesta especificitat es dona perquè l'enzim és “creat” de forma natural, exclusivament per l'etanol, i llavors té la forma ideal perquè s'adhereixi i es produeixi la reacció de forma òptima. El motiu de què aquest enzim sigui tan específic es deu al fet que s'ha anat perfeccionant al llarg dels anys seguint la teoria de l'evolució de Darwin<sup>3</sup>, i d'aquesta forma l'enzim ha anat modificant-se durant el temps fins que avui té una especificitat perfecta amb l'etanol, el que el fa el més eficient possible.

De totes maneres, per assegurar-me de què el que pensava era correcte li vaig preguntar a la meva tutora de la Facultat de Química de la UB, la Marina Corbella Morato<sup>4</sup>, i ella m'ho ha confirmat.

---

<sup>3</sup> La teoria de l'evolució de Darwin, exposada a *L'origen de les espècies* del 1959, explica que totes les espècies d'organismes, incloses les plantes i els animals, evolucionen al llarg del temps en un procés que s'anomena selecció natural. Les variacions que es produeixen entre els individus d'una espècie sorgeixen de mutacions i recombinacions genètiques. Els organismes que gràcies a les seves diferències aconseguixen sobreviure o reproduir-se més en el seu medi tenen una probabilitat més gran de viure i reproduir-se, transmetent així les seves “característiques” als seus descendents. Al llarg del temps, això dona lloc al desenvolupament de noves espècies.

<sup>4</sup> La meva tutora del Treball de Recerca de la Universitat de Barcelona i doctora en programes computacionals.

### Alcohol 4-aminofenètilic

Com s'ha vist els resultats, les dades obtingudes de les mutacions són molt semblants, el que farà que expliqui cadascuna d'elles en detall.

A la mutació 1 vaig intentar forçar una interacció  $\pi$ - $\pi$  d'apilament, però he vist que no va funcionar, i no va millorar a la proteïna mostra. El motiu pel qual no va resultar, probablement, és degut al fet que els dos grups aromàtics no estaven prou alineats i, a més a més, no tots els valors estaven a la franja de distància d'interacció òptima, com es veu a la figura 83, per tant, la interacció no es devia produir amb la força que hauria de fer-ho.

La mutació 2 va ser un desastre, com ja s'ha vist abans, la proteïna 2 ha sigut la que ha donat pitjors resultats, ja que dona al voltant de 400 kJ/mol, quan la de la mostra són 12 kJ/mol. El motiu pel qual s'ha produït això és per les forces de repulsió, perquè vaig situar els dos grups aromàtics a una distància d'uns 2,2 Å, com es veu a la figura 86, quan la distància idònia està sobre els 3,3 a 3,8 Å, això va provocar que els àtoms dels dos grups es repel·lissin i l'energia d'unió augmentés tant. Tanmateix, això m'ha ajudat a demostrar que és molt important respectar les distàncies que estan predefinides, ja que si no les interaccions no es donaran com ho haurien de fer.

A la mutació 3 he continuat intentant fer una interacció  $\pi$ - $\pi$  d'apilament. En els resultats s'ha vist que no són dades dolentes, perquè no estan gaire lluny dels valors de la proteïna mostra. Tot i això, crec que no han sigut millors perquè els dos grups aromàtics estaven massa lluny entre ells. Això torna a demostrar que la distància a l'hora de fer interaccions intermoleculars és molt important, però que també és millor que les dues molècules estiguin molt allunyades i l'enllaç sigui molt dèbil a què estiguin massa a prop i es repelin.

A la mutació 4 he intentat fer un pont d'hidrogen. Com he mostrat abans, els resultats obtinguts no han sigut els desitjats, ja que he obtingut 23 kJ/mol i la proteïna mostra 12 kJ/mol, gairebé ho duplica. Una altra vegada els resultats són així per les distàncies, perquè vaig intentar forçar la formació d'un pont d'hidrogen massa a prop del nitrogen, fent que es repel·lissin entre ells.

A la mutació 5 he fet una modificació amb molts passos per intentar formar un pont d'hidrogen, però no ha acabat donant els seus fruits. Encara que vaig aconseguir formar-lo i que estava a una distància òptima, no va ser prou, això és pel fet que, segurament, és necessari que es produeixin molts ponts d'hidrogen per marcar la diferència i no només un.

En canvi, en la mutació 6 s'han obtingut molt bons resultats. Aquesta mutació la vaig fer perquè vaig adonar-me de què hi havia un aminoàcid de fixació en la proteïna mostra que feia que el substrat no estigués acoblat el centre actiu, és a dir, que hi havia un aminoàcid que feia que una part del substrat fos repel·lida i llavors no encaixava bé. Si més no, en mutar aquest aminoàcid a un altre de més petit, ha fet que la repulsió es redueixi i ha reduït molt l'energia d'unió passant dels 12 kJ/mol de la proteïna mostra als 9,7 kJ/mol d'aquesta proteïna, mostrant una millora significativa.

A l'última mutació vaig aprofitar la proteïna 6 per fer-li alguns canvis i millorar-la encara més. En concret el que he fet és detectar que hi havia un altre aminoàcid de fixació que afectava que el substrat s'acoblés correctament, fent que es repel·lissin entre ells, per reduir la repulsió, vaig mutar aquell aminoàcid perquè tingués una altra forma i que no es repelessin i així reduir l'energia d'unió. En fer els càlculs es pot veure que s'ha reduït aquesta energia d'unió a, pràcticament, la meitat.

#### 4.3.6. Conclusions del marc aplicat

Jo en començar les mutacions de l'enzim en el meu marc aplicat em vaig proposar dues hipòtesis, les dues relacionades amb el lligand 2.

La hipòtesi 1 sí s'ha complert, a causa del fet que després de les mutacions a l'enzim, he aconseguit que es redueixi considerablement l'energia d'unió. Això sí, fa falta remarcar que ho he fet sense forçar cap interacció intermolecular, ho he fet modificant la forma del centre actiu i evitant repulsions entre els aminoàcids del centre actiu i el substrat.

La hipòtesi 2 no s'ha complert, pel fet que encara que hagi obtingut millors resultats que els que tenia inicialment, no ho he fet forçant la formació d'interaccions intermoleculars.

Per altra banda, he tret altres conclusions del marc aplicat:

- Els enzims amb els seus respectius lligands naturals no es poden millorar, perquè ja estan optimitzats al màxim i la seva estructura tridimensional del centre actiu és perfecta pel substrat.
- L'energia d'unió d'un substrat amb un enzim no es basa només en les interaccions que s'estableixen, sinó que també amb el fet que no hi hagi cap repulsió que afecti el substrat.
- La distància de les forces intermoleculars és molt important, perquè si estan molt a prop, es repel·leixen, però si estan molt lluny, no interactuen, per tant, han d'estar a un punt mitjà.

M'agradaria comentar què és veritat que per millorar encara més el rendiment dels meus enzims podria haver variat factors com el pH o la temperatura del medi. Malgrat això, en ser un càlcul estàtic, fa que aquests factors no facin variar pràcticament el resultat, perquè encara que ho vaig provar variant el pH i la temperatura, els valors variaven de forma que no afectaven en res al resultat final. En el cas que hagués fet un càlcul dinàmic, sí que s'hagués tingut en compte aquestes dades i haguessin afectat molt el resultat final, però aquest càlcul en un ordinador normal no era factible, per tant, vaig decidir prescindir de modificar valors com la temperatura o el pH del medi i deixar-los en valors fixos en totes les mutacions.



## 5. CONCLUSIONS GENERALS DEL TREBALL

En aquest treball de recerca primer he fet un marc teòric en el qual he exposat tot el que respecta a enzims i he explicat a fons la part més important, el centre actiu de la proteïna. Seguidament, he explicat quines són les unions entre molècules, les més fortes i les més dèbils, perquè les forces intermoleculars són importantíssimes en el moment en el qual els aminoàcids catalitzadors creen les interaccions amb el substrat. A continuació, he explicat els lligands que he escollit i quin és el seu metabolisme, junt amb l'enzim que els catalitzarà. Finalment, he parlat de com s'obtenen acetaldehids a la indústria química.

La pregunta que em vaig formular a l'inici del treball va ser: Són els enzims una alternativa verda a la síntesi d'aldehids a la indústria?

La resposta a aquesta pregunta confirma la meua hipòtesi, perquè segons els resultats que he obtingut, és possible mutar un enzim i que s'obtinguin bons resultats, el que em fa pensar que si una indústria necessita sintetitzar aldehids, podrien mutar una alcohol deshidrogenasa perquè s'adapti al substrat que necessiten i així obtenir un procés molt més verd i eficient del que tenen actualment.

Aquesta alternativa verda a la síntesi d'aldehids donaria molts beneficis mediambientals i econòmics per les indústries químiques. Això ho dic perquè, avui en dia, per sintetitzar aldehids tenen una despesa energètica molt gran, a causa de la necessitat d'augmentar la temperatura perquè es doni la reacció química, en canvi, si utilitzessin enzims, com que solen treballar a unes temperatures de 37 °C, no tenen aquesta despesa energètica que els fa perdre molts diners i que també contamina al planeta.

En el cas que s'emprés, la mutació d'enzims amb ordinador seria també fonamental en la disminució de la despesa econòmica, perquè la mutació d'enzims amb l'ordinador i el seu respectiu càlcul, fa que es redueixin molt les despeses de les proves de les mutacions, ja que pots fer una simulació molt fidel de com funcionaria i els resultats que donaria, estalviant molt temps i diners.

Sense l'ús de l'ordinador, per provar l'eficàcia d'un enzim s'hauria de modificar genèticament l'ADN d'una cèl·lula amb ajuda d'una eina de modificació genètica, extreure l'enzim de la cèl·lula, replicar-lo i provar la seva eficàcia amb el substrat

que es voldria catalitzar, això provoca una despesa de temps i de diners enorme per només un intent, i com que això és ciència, probablement, s'hauria de fer més d'un, ja que no sortiria a la primera.

En canvi, si s'usa una eina informàtica de mutació d'enzims amb l'ordinador, permet fer tots els canvis que es vulguin, sense cap despesa, i la comprovació de la seva eficàcia de forma molt precisa amb l'ús de models molt detallats. Dono per fet que una indústria podria permetre's una modelització dinàmica, perquè fos més realista, i faria que es pogués comprovar si funciona abans de fer la modificació genètica. Per altra banda, és veritat que es necessitaria un superordinador que pogués fer els càlculs en un temps de diverses hores, però, una empresa sí que podria demanar d'utilitzar un temps el superordinador per fer les seves investigacions.

En el cas que sí que s'hagués fet la modelització i s'haguessin obtingut els resultats que es volguessin, sí que s'hauria de fer el procés de modificació genètica en una cadena d'ADN, extreure l'enzim de la cèl·lula, fer moltes còpies per posar-los en bioreactors i que sintetitzessin l'aldehid, però, d'aquesta forma només s'ha de fer una sola vegada.

Per altra banda, a part de la hipòtesi, m'havia proposat tres objectius:

- Primer: Considero que he après molt sobre els enzims gràcies a aquest Treball de Recerca, ja que m'he entregat en fer el marc teòric sobre els enzims i he après molt sobre el seu funcionament.
- Segon: He descobert com funciona el procés d'obtenció d'aldehids a partir d'etanol en la indústria i com es podria implantar el funcionament dels enzims.
- Tercer: També asseguro que he après i he dominat el programa de mutació de proteïnes i he calculat muntanyes de vegades l'energia d'unió d'aquestes, així que considero que l'he assolit.

Després de fer d'acabar el Treball de Recerca considero que m'he gestionat bé portant la feina al dia i, a més a més, considero que he assolit tots els objectius que m'havia proposat abans de començar el treball.

Per altra banda, he de destacar que no tot ha sigut fàcil, ja que durant el transcurs del treball m'han sorgit diversos problemes que han posat a prova la meua capacitat de solucionar-los.

El primer problema que vaig tenir va ser que tinc un ordinador Windows, pel fet que necessitava usar algunes funcions del sistema operatiu Mac d'Apple. Això ho vaig notar a l'hora d'usar el terminal de Windows, ja que alguns controls no els acceptava, per aquest motiu, vaig descarregar un programa alternatiu.

Per altra banda, també he tingut problemes a l'hora d'aprendre el funcionament del programa informàtic PyMOL, perquè no l'havia usat abans i m'ha costat una mica aprendre totes les opcions que té i com veure millor les proteïnes, tot i això, al final, ho vaig aprendre i ara tinc molt control.

Un altre problema, encara que forma part de la ciència, és l'encert i l'error, ja que a l'hora de mutar, vaig haver de descartar una gran quantitat de models que no m'aportaven res i quedar-me uns pocs.

Considero que aquest treball podria servir de referència per a fer un altre Treball de Recerca en el que sí que es fes una dinàmica molecular, fent que els resultats siguin molt més precisos que els que he obtingut jo, també és veritat que per fer això faria falta unes eines de les quals no solen disposar alumnes de batxillerat.

Un cop finalitzar aquest treball, acabo amb una sensació d'orgull, perquè encara que al principi semblava una muntanya, l'he aconseguit pujar a poc a poc i, finalment, he obtingut un resultat del qual estic força satisfet, per tant, podria dir que ha sigut una bona experiència.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- **[1]** Protein Data Bank [en línia]. <<https://www.rcsb.org/#Category-welcome>> [Consulta 9 de maig de 2024]
- **[2]** Reddy Enugala, Thilak; Corbella Morato, Marina; C. L. Kamerlin, Shina i Widersten, Mikael. The Role of Substrate-Coenzyme Crosstalk in Determining Turnover Rates in *Rhodococcus ruber* Alcohol Dehydrogenase. ACS Catalysis: 16 de juliol de 2020. <[Article 1](#)> [Consulta 6 de maig de 2024]
- **[3]** Hall, Melanie i S. Bommaris, Andreas. Enantioenriched Compounds via Enzyme-Catalyzed Redox Reactions. Chemical Reviews: 22 de maig de 2024. <[Article 2](#)> [Consulta 6 de maig de 2024]
- **[4]** S. Carey, John; Laffan, David; Thomson, Colin i T. Williams, Mike. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. Royal Society of Chemistry: 3 maig de 2006. <[Article 3](#)> [Consulta 6 de maig de 2024]
- **[5]** Zheng, Yu-Guo; Yin, Huan-Huan; Yu, Dao-Fu; Chen, Xiang; Tang, Xiao-Ling; Zhang, Xiao-Jian; Xue, Ya-Ping; Wang, Ya-Jun; Liu Zhi-Qiang. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases: 11 de novembre de 2011 <[Article 4](#)> [Consulta 6 de maig de 2024]
- **[6]** Ramírez Ramírez, Joaquín i Ayala Aceves, Marcela. “Enzimas : ¿Qué son y cómo funcionan?” [en línia]. Institut de Biotecnologia UNAM: 1 de desembre de 2014. <<https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/art91.pdf>> [Consulta 8 de maig de 2024]
- **[7]** Lewis, Theodore; L. Stone, William. “Proteins Enzymes”. National Library of Medicine (NIH): 24 d’abril de 2023. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554481/>> [Consulta 8 de maig de 2024]
- **[8]** Preparation of Aldehydes and Ketones: Toppr <<https://www.toppr.com/guides/chemistry/aldehydes-ketones-and-carboxylic-acids/preparation-of-aldehydes-and-ketones/>> [Consulta 8 de maig de 2024]
- **[9]** “Enzyme”. Britannica: 16 d’abril de 2024. <https://www.britannica.com/science/enzyme> [Consulta 9 de maig]

- **[10]** Viladrich Iglesias, Nina. Els enzims: estructura, funcionament i aplicacions en Conservació - Restauració. Universitat de Barcelona: Curs 2017-18<[https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/125403/1/Viladrich\\_Nina\\_TFG\\_ENZIMS.pdf](https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/125403/1/Viladrich_Nina_TFG_ENZIMS.pdf)> [Consulta 9 de maig]
- **[11]** “What are the types of enzymes?”[en línia]. AAT Bioquest. 19 de maig de 2023.<<https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/what-are-the-types-of-enzymes>> [Consulta 10 de juny de 2024]
- **[12]** “El metabolismo del alcohol” [en línia]. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.  
<<https://www.niaaa.nih.gov/publications/el-metabolismo-del-alcohol#:~:text=Primer%2C%20la%20ADH%20metaboliza%20el,altamente%20t%C3%B3xico%20y%20carcin%C3%B3geno%20conocido.&text=Luego%2C%20el%20acetaldeh%C3%ADdo%20se%20metaboliza,carbono%20para%20una%20f%C3%A1cil%20eliminaci%C3%B3n.>>> [Consulta 11 de juny de 2024]
- **[13]** “Reacciones de Oxidación-Reducción”[en línia]. Universitat de València <<https://www.uv.es/jmarques/documentos/redox.pdf>> [Consulta 12 de juny de 2024]
- **[14]** “Aldehídos en la industria química” [en línia]. Contyquim <<https://contyquim.com/blog/aldehidos-en-la-industria-quimica>> [Consulta 20 de juny de 2024]
- **[15]** Bozeman Science (26 de novembre de 2011). *Enzymes* [Vídeo] <<https://www.youtube.com/watch?v=ok9esggzN18>> [Consulta 8 de maig de 2024]
- **[16]** AcademiaVasquez (19 d'octubre de 2013). *Enzimas: Clasificación* [Vídeo] <<https://www.youtube.com/watch?v=6vEQ3o2b1wU>> [Consulta 10 de juny de 2024]
- **[17]** Grence Ruiz, Teresa i Sagristà Mas, Anna. Biologia 1er de Batxillerat. Grup Promotor Santillana: 2022. ISBN: 9788413158273
- **[18]** Grence Ruiz, Teresa i Macià Arqué, Pere. Biologia 2n de Batxillerat. Grup Promotor Santillana: 2016. ISBN: 9788490470374
- **[19]** “Ligandos y receptores” [en línia]. Khan Academy. <<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/signal-transduction/a/signal-perception>> [Consulta 10 de juny de 2024]

- **[20]** Cornejo, Paz María de Lourdes. “Los ácidos carboxílicos” [en línia]. Universitat autònoma del Estado del Hidalgo. <<https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa3/n8/m9.html>> [Consulta 10 de juny de 2024]
- **[21]** Espinosa, Mireya Amelia. “Alcoholes” [en línia]. <[http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79678/secme-1022\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79678/secme-1022_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> [Consulta 9 de setembre de 2024]
- **[22]** Merino, Jesús i Noreiga, María José. “Enzimas” [en línia]. Open course ware. <<https://ocw.unican.es/pluginfile.php/715/course/section/397/Tema%25202B-Bloque%2520I-Enzimas.pdf>> [Consulta 9 de setembre de 2024]
- **[23]** M. Heckmann, Christian i Paradisi, Francesca. “Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools” [en línia]. Chemistry Europe <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cctc.202001107>> [Consulta 9 de setembre de 2024]
- **[24]** “Aminoácidos” [en línia]. Amino Academy. <<https://nhco-nutrition.es/aminoacidos/>> [Consulta 9 de setembre de 2024]
- **[25]** Cardona Serrate, Fernando. “Los enzimas. Introducción a la enzimología” [en línia]. Universitat Politècnica de València. <<https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/146362/Cardona%20-%20LOS%20ENZIMAS.%20INTRODUCCI%C3%93N%20A%20LA%20ENZIMOLOG%C3%8DA..pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [Consulta 11 de setembre de 2024]
- **[26]** “Host-Guest Chemistry and  $\pi$ - $\pi$  Stacking Interactions” [en línia]. Libre Texts Chemistry. <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic\\_Chemistry/Inorganic\\_Chemistry\\_\(LibreTexts\)/06%3A\\_Acid-Base\\_and\\_Donor-Acceptor\\_Chemistry/6.05%3A\\_Intermolecular\\_Forces/6.5.01%3A\\_Host-Guest\\_Chemistry\\_and\\_-\\_stacking\\_interactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Inorganic_Chemistry_(LibreTexts)/06%3A_Acid-Base_and_Donor-Acceptor_Chemistry/6.05%3A_Intermolecular_Forces/6.5.01%3A_Host-Guest_Chemistry_and_-_stacking_interactions)> [Consulta 11 de setembre de 2024]
- **[27]** “The Polar Carbon–Halogen Bond” [en línia]. Libre Texts Chemistry. <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Smith\)/07%3A\\_Alkyl\\_Halides\\_and\\_Nucleophilic\\_Substitution/7](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Smith)/07%3A_Alkyl_Halides_and_Nucleophilic_Substitution/7)>

- [.05%3A The Polar CarbonHalogen Bond](#)> [Consulta 11 de setembre de 2024]
- **[28]** Biol, J Mol. “Cation- $\pi$  interactions and their functional roles in membrane proteins” [en línia]. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8338773/>> [Consulta 11 de setembre de 2024]
  - **[29]** Martín Blas, Teresa i Serrano Fernández, Ana. “Sistema termodinámico” [en línia]. Universidad Politécnica de Madrid (UPM). <<https://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/termo1p/sistema.html>> [Consulta 13 de setembre de 2024]
  - **[30]** Gutierrez, Paola. “Entalpía: concepto, tipos y diferencia con entropía” [en línia]. Enciclopedia. <<https://enciclopedia.com/entalpia-concepto-tipos-y-diferencia-con-entropia-todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-estas-dos-propiedades-termodinamicas/>> [Consulta 13 de setembre de 2024]
  - **[31]** “23 Uses of Aldehydes” [en línia]. All uses of. <<https://allusesof.com/chemical/23-uses-of-aldehydes/>> [Consulta 13 de setembre de 2024]
  - **[32]** Pons Picart, Josefina. “Los metales y la formación de ligandos” [en línia]. UAB Divulga. <<https://www.uab.cat/web?cid=1096481466568&pagename=UABDivulga%2FPage%2FTemplatePageDetallArticleInvestigar&param1=1176360504632>> [Consulta 13 de setembre de 2024]
  - **[33]** Lubiano, Katrina. “¿Cuál es la diferencia entre  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$ ?” [en línia]. Neurogan <<https://neuroganhealth.com/es/blogs/noticias/diferencia-entre-nad-y-nadh>> [Consulta 14 de setembre de 2024]
  - **[34]** “Alcohol dehydrogenase” [en línia]. University of Wisconsin. <<https://www.chem.uwec.edu/Webpapers2001/clareymm/Pages/I/examp1.html>> [Consulta 14 de setembre de 2024]

- **[35]** “El brillante Louis Pasteur, más allá de la pasteurización” [en línea]. BBC News. 1 d’agost del 2015  
<[https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/08/150707\\_iwonder\\_louis\\_pasteur\\_guerra\\_contra\\_germenes\\_finde\\_dv](https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/08/150707_iwonder_louis_pasteur_guerra_contra_germenes_finde_dv)> [Consulta 15 de setembre de 2024]
- **[36]** Pillado, Kenichy. “Aldehídos en la industria química” [en línea]. ContyQuim. <<https://contyquim.com/blog/aldehidos-en-la-industria-quimica>> [Consulta 15 de setembre de 2024]
- **[37]** Ob-eye, Jeerati; Praserttham, Piyasan i Jongsomjit, Bunjerd Jongsomjit. “Dehydrogenation of Ethanol to Acetaldehyde over Different Metals Supported on Carbon Catalysts” [en línea]. MDPI. <<https://www.mdpi.com/2073-4344/9/1/66>> [Consulta 15 de setembre de 2024]
- **[38]** Martz, Eric. “Hydrogen bonds (H bonds)” [en línea]. Help, Index & Glossary for Protein Explorer. <<https://biomodel.uah.es/en/water/hbonds.htm>> [Consulta 16 de setembre de 2024]



## 7. ANNEXOS

### 7.1. Annex I. Tipus d'aminoàcids

Aquest annex conté tots els aminoàcids amb els que he treballat al llarg del treball, amb les imatges que he anat emprant per orientar-me i saber quin és l'aminoàcid que era òptim en cada ocasió.

A les imatges es pot veure que hi ha diversos colors, cada color representa un element químic. De totes maneres, com que els colors van variant, aquests no són els mateixos colors amb els quals he fet les mutacions. Aquests són les relacions color-aminoàcid d'aquest annex:

- Color groc: És un àtom de carboni.
- Color blau: És un àtom de nitrogen.
- Color vermell: És un àtom d'oxigen.
- Color daurat: És un àtom de sofre.
- Color blanc: És un àtom d'hidrogen.

#### ALANINA

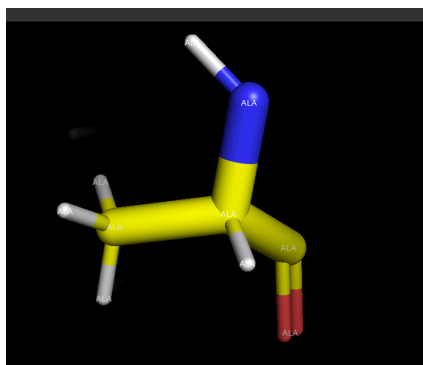


Figura 127. Imatge de l'aminoàcid alanina. Font pròpia (pyMOL)

## HISTIDINA

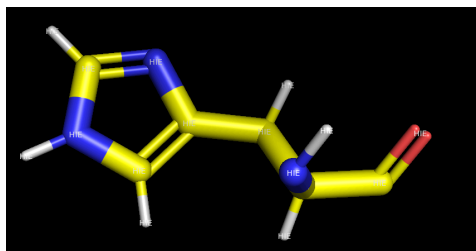


Figura 128. Imatge de l'aminoàcid histidina. Font pròpia (pyMOL)

## ISOLEUCINA

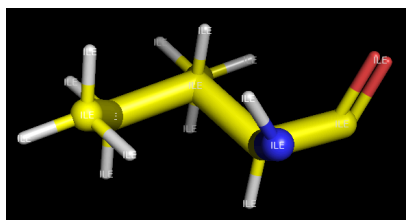


Figura 129. Imatge de l'aminoàcid isoleucina. Font pròpia (pyMOL)

## LEUCINA

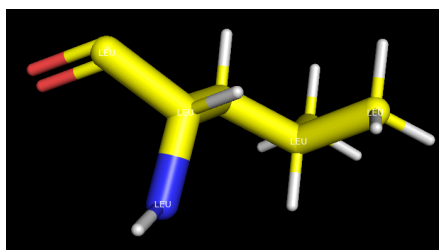


Figura 130. Imatge de l'aminoàcid leucina. Font pròpia (pyMOL)

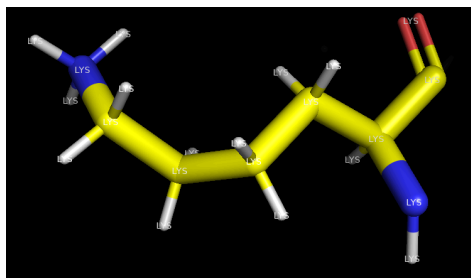
**LISINA**

Figura 131. Imatge de l'aminoàcid lisina. Font pròpia (pyMOL)

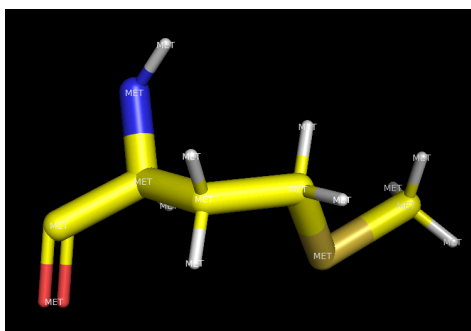
**METIONINA**

Figura 132. Imatge de l'aminoàcid metionina. Font pròpia (pyMOL)

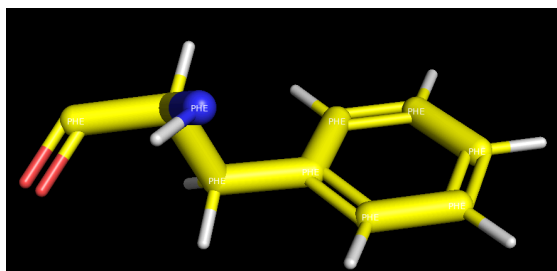
**FENILALANINA**

Figura 133. Imatge de l'aminoàcid fenilalanina. Font pròpia (pyMOL)

## TRIPTÒFAN

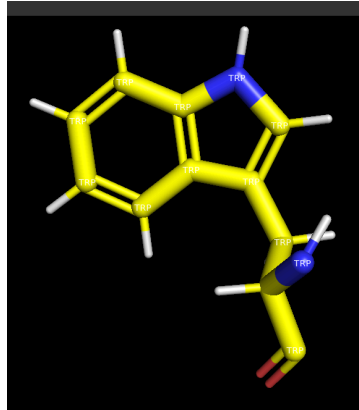


Figura 134. Imatge de l'aminoàcid triptòfan. Font pròpia (pyMOL)

## VALINA

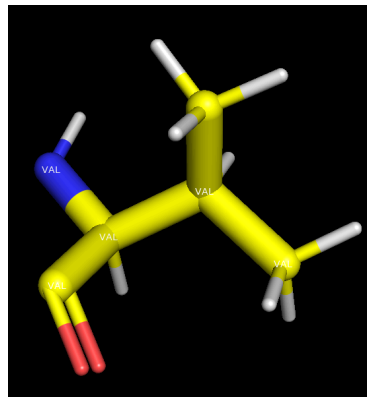


Figura 135. Imatge de l'aminoàcid valina. Font pròpia (pyMOL)

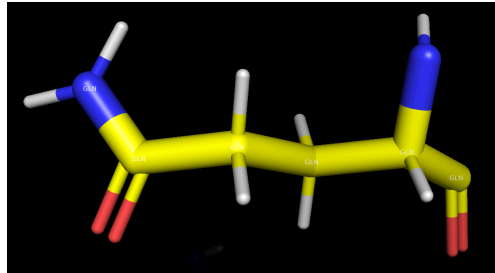
**GLUTAMINA**

Figura 136. Imatge de l'aminoàcid glutamina. Font pròpia (pyMOL)

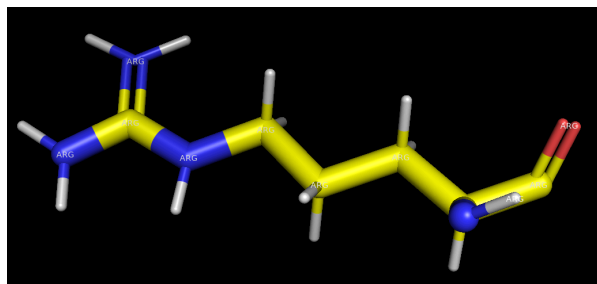
**ARGININA**

Figura 137. Imatge de l'aminoàcid arginina. Font pròpia (pyMOL)

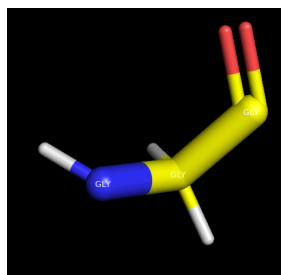
**GLICINA**

Figura x. Imatge de l'aminoàcid glicina. Font pròpia (pyMOL)

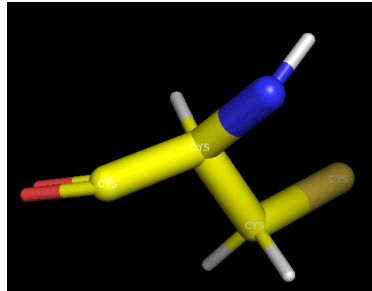
**CISTEÏNA**

Figura 138. Imatge de l'aminoàcid cisteïna. Font pròpia (pyMOL)

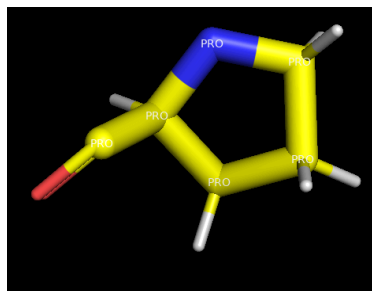
**PROLINA**

Figura 139. Imatge de l'aminoàcid prolina. Font pròpia (pyMOL)

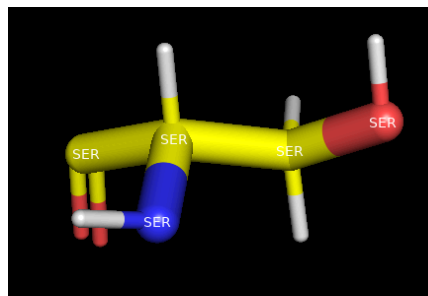
**SERINA**

Figura 140. Imatge de l'aminoàcid serina. Font pròpia (pyMOL)

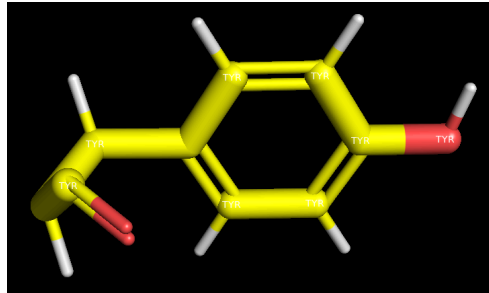
**TIROSINA**

Figura 141. Imatge de l'aminoàcid tirosina. Font pròpia (pyMOL)

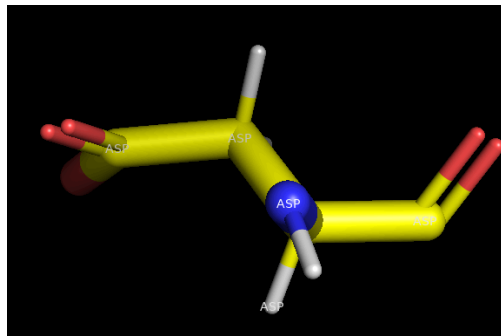
**ÀCID ASPÀRTIC**

Figura 142. Imatge de l'aminoàcid àcid aspàrtic. Font pròpia (pyMOL)

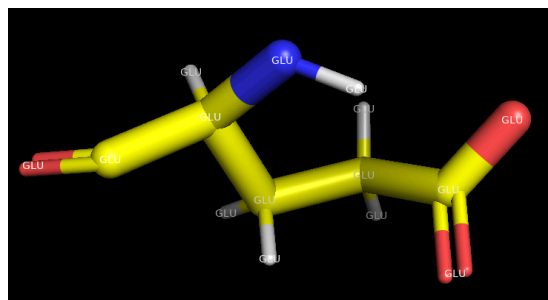
**ÀCID GLUTÀMIC**

Figura 143. Imatge de l'aminoàcid àcid glutàmic. Font pròpia (pyMOL)

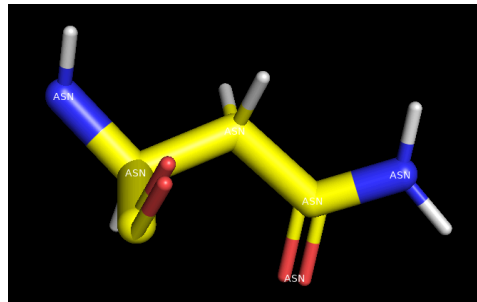
**ASPARAGINA**

Figura 144. Imatge de l'aminoàcid asparagina. Font pròpia (pyMOL)

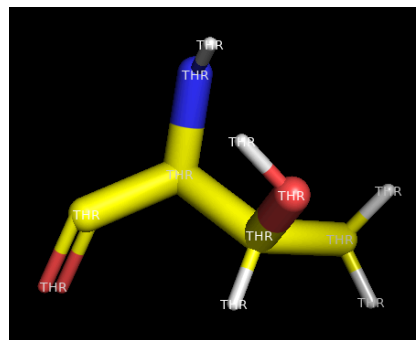
**TREONINA**

Figura 145. Imatge de l'aminoàcid treonina. Font pròpia (pyMOL)