

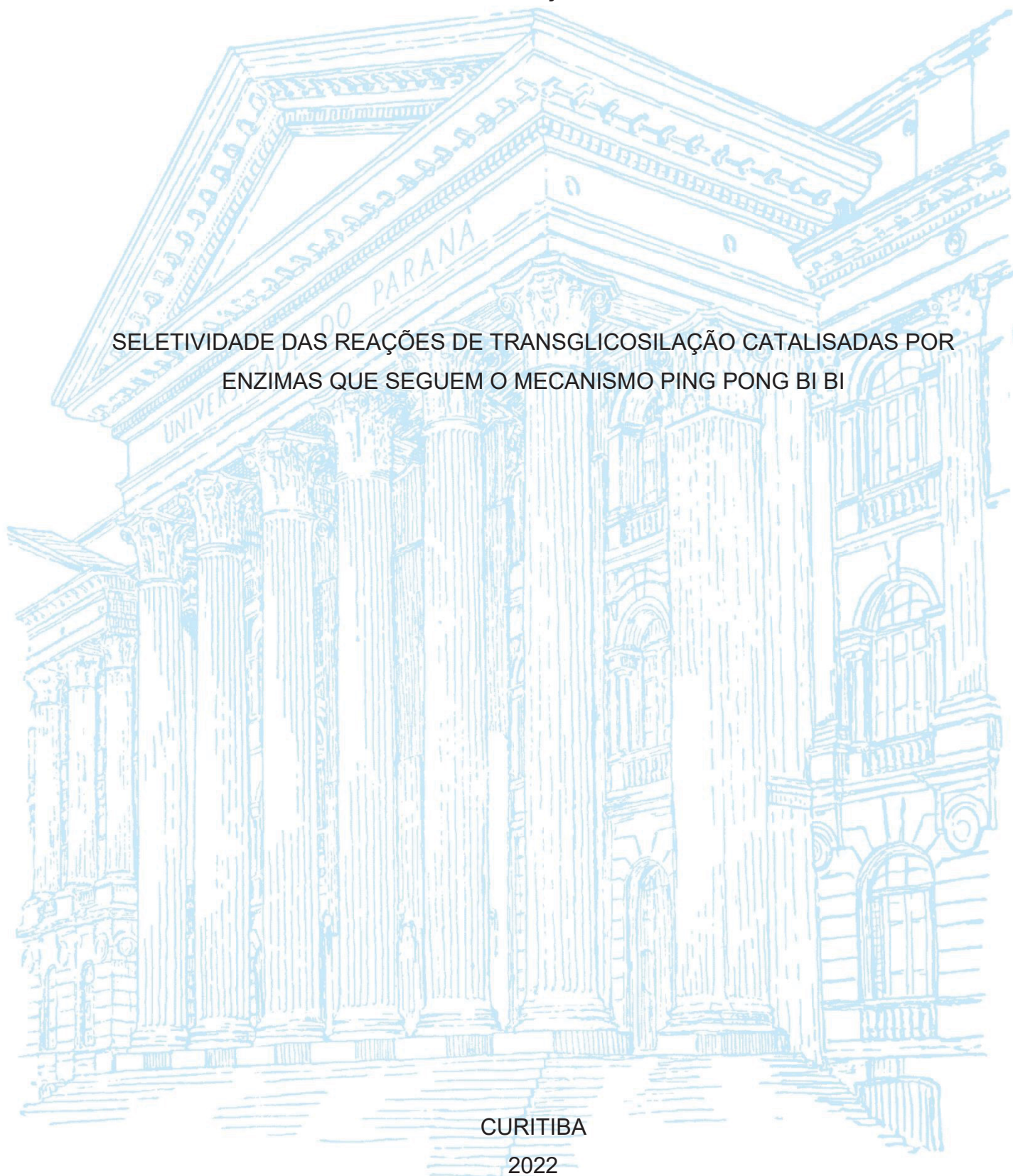
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSIANE PROENÇA FAGUNDES

SELETIVIDADE DAS REAÇÕES DE TRANSGLICOSILAÇÃO CATALISADAS POR
ENZIMAS QUE SEGUEM O MECANISMO PING PONG BI BI

CURITIBA

2022



JOSIANE PROENÇA FAGUNDES

SELETIVIDADE DAS REAÇÕES DE TRANSGLICOSILAÇÃO CATALISADAS POR
ENZIMAS QUE SEGUEM O MECANISMO PING PONG BI BI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Fagundes, Josiane Proença.

Seletividade das reações de transglicosilação catalisadas por enzimas que seguem o mecanismo Ping Pong bi bi. / Josiane Proença Fagundes. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell.

1. Engenharia química. 2. Estudo de casos. 3. Enzimas. 4. Transglicosilação. I. Mitchell, David Alexander. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Júnior CRB-9/1797

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JOSIANE PROENCA FAGUNDES** intitulada: **Seletividade das reações de transglicosilação catalisadas por enzimas que seguem o mecanismo Ping Pong bi bi**, sob orientação do Prof. Dr. DAVID ALEXANDER MITCHELL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de maio de 2022.

Assinatura Eletrônica 31/05/2022 17:29:22.0

DAVID ALEXANDER MITCHELL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 01/06/2022 19:11:21.0

ALINE BESCROVAINE PEREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica 31/05/2022 18:22:07.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos amores da minha vida. Obrigada

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse.

Agradeço em especial ao meu Orientador, Professor David pelos puxões de orelha, pela ajuda e por toda paciência. Muito obrigada por me aceitar sabendo que a engenharia não é minha área de formação, mas que se tornou minha paixão.

Aos meus queridos pais, por terem me guiado todos esses anos e por terem me mostrado os melhores caminhos a serem seguidos. Pelo seu amor e apoio incondicional.

As minhas irmãs, Jéssica, Geovana e Jamily, por todo apoio.

Meu agradecimento especial ao meu marido Fabiano, pelas longas conversas, pelas palavras de conforto após meus longos choros. E principalmente por toda a ajuda e por me amar incondicionalmente. Muito obrigada amor!

À UFPR por abrir portas e ajudar a alcançar voos que nem eu sabia que tinha.

“Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.

RESUMO

O interesse na produção de oligossacarídeos através da transglicosilação tem crescido nos últimos anos. Nas transglicosilações catalisadas por enzimas que seguem o mecanismo Ping Pong bi bi, há três reações concorrentes: a transglicosilação, a hidrólise primária (hidrólise da molécula doadora inicial) e a hidrólise secundária (hidrólise do produto de transglicosilação). Nas transglicosilações controladas cineticamente, o rendimento máximo do produto de transglicosilação depende das seletividades da enzima para transglicosilação em relação a ambas reações de hidrólise. Os métodos atuais para determinar a seletividade caracterizam apenas a seletividade da transglicosilação em relação à hidrólise primária. No trabalho atual, foi desenvolvido um modelo que pode ser usado para estimar ambas as seletividades a partir de um perfil de reação de rendimento percentual do produto de transglicosilação traçado em relação ao consumo percentual da molécula doadora. Através de estudos de caso da literatura, foi demonstrado como o modelo pode ser utilizado para quantificar os resultados de mutações destinadas a melhorar a seletividade. O modelo também foi usado para explorar estratégias para melhorar o rendimento do produto de transglicosilação. Esta exploração demonstra que não é suficiente ter altas seletividades para a transglicosilação em relação à hidrólise, sendo também necessário que a reação de transglicosilação tenha uma constante de equilíbrio razoavelmente alta.

Palavras-chave: Ping Pong bi bi. Enzima substituída. Glicosilases de retenção. Transglicosilases.

ABSTRACT

Interest in the production of oligosaccharides by transglycosylation has grown in recent years. In enzyme-catalyzed transglycosylations that follow the Ping Pong bi bi mechanism, there are three competing reactions: the transglycosylation itself, primary hydrolysis (i.e. of the initial donor molecule) and secondary hydrolysis (i.e. of the transglycosylation product). In kinetically controlled transglycosylations, the maximum yield of the transglycosylation product depends on the selectivities of the enzyme for transglycosylation in relation to these hydrolysis reactions. Current methods for determining selectivity only characterize the selectivity for transglycosylation in relation to primary hydrolysis. The current work develops a model that can be used to estimate both selectivities from a reaction profile of percentage yield of transglycosylation product plotted against the percentage consumption of the donor molecule. Case studies from the literature are used to show how the model can be used to quantify the results of mutations aimed at improving selectivity. The model is also used to explore strategies for improving the yield of the transglycosylation product. This exploration demonstrates that it is not sufficient to have high selectivities for transglycosylation in relation to hydrolysis, it is also necessary that the transglycosylation reaction have a reasonably high equilibrium constant.

Keywords: Ping Pong bi bi. Substituted enzyme. Retaining glycosidases. Transglycosylases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema simplificado da reação de transglicosilação	16
FIGURA 2: Mecanismo catalítico para as glicosil hidrolases e transglicosilases	18
FIGURA 3: Reações concorrentes no mecanismo Ping Pong bi bi.	19
FIGURA 4: Representação das três reações concorrentes num formato apropriado para a aplicação do método King-Altman de dedução de equações cinéticas. As reações são escritas em termos das várias formas da enzima.	23
FIGURA 5: Perfis para o rendimento percentual do produto de transglicosilação α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc em função da porcentagem de consumo do doador original α -L-FucpOCNP para a enzima do tipo selvagem AlfB de <i>Lactobacillus casei</i> (x) e os mutantes W130H (x) e H80F (x).	31
FIGURA 6: Perfis para “o rendimento percentual do produto de transglicosilação de Bn- β -D-Galf-(1,2)- α -D-Xylp em função da porcentagem de consumo do doador original pNP- β -D-Galf.	34
FIGURA 7: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com a constante de equilíbrio para a reação de transglicosilação mantida no valor do caso base ($K_{EQ(T)} = 0,88$) e diferentes valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$	37
FIGURA 8: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com diferentes valores da constante de equilíbrio da reação de transglicosilação.	38
FIGURA 9: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com um aumento de 10 vezes não apenas em $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$, mas também em $K_{EQ(T)}$	39
FIGURA 10: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com os valores do caso base ($K_{EQ(T)} = 0,88$, $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514$), com aumento nas concentrações iniciais do doador e do receptor.	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Símbolos usados para descrever as reações de transglicosilação, de hidrólise primária e de hidrólise secundária, e o código de letra correspondente utilizado nas equações cinéticas.....	24
TABELA 2: Seletividades para a enzima do tipo selvagem AlfB e duas formas mutantes, obtidas pelo ajuste do modelo aos dados de Teze et al.. (2021) para a reação de transglicosilação com α -L-FucpOCNP como doador e D-GlcNAc como receptor.....	31
TABELA 3: As seletividades para a enzima do tipo selvagem TxAbf e suas formas mutantes, obtidas pelo ajuste do modelo aos dados de Bissaro (2014) para a reação de transglicosilação com pNP- β -D-Galf como doador e Bn- α -D-Xylp como receptor.	34

LISTA DE SIGLAS

a_{receptor}	- Atividade termodinâmica da molécula receptora
$a_{\text{água}}$	- Atividade termodinâmica da água
A	- Molécula de substrato doador nos esquemas reacionais
A	- Concentração percentual normalizada de doador
B	- Molécula de substrato receptor nos esquemas reacionais
B	- Concentração percentual normalizada do receptor
b	- Molécula de água nos esquemas reacionais
b	- Concentração percentual normalizada de água
c	- Porcentagem de consumo do doador
D	- Denominador das equações de velocidade das reações
$[E]_T$	- Concentração total da enzima
$K_{\text{EQ(T)}}$	- Constante de equilíbrio para a reação de transglicosilação
K_M	- Constante de saturação
k_A	- Constante de especificidade da enzima para o doador
k_B	- Constante de especificidade da enzima para o receptor
k_b	- Constante de especificidade da enzima para a água
k_{cat}	- Constante catalítica
k_P	- Constante de especificidade da enzima para o grupo de saída
k_Q	- Constante de especificidade da enzima para o produto da transglicosilação
k_q	- Constante de especificidade da enzima para o produto final da hidrólise
P	- Molécula do grupo de saída durante a reação de transglicosilação
P	- Concentração percentual normalizada do grupo de saída
Q	- Molécula do produto da transglicosilação
Q	- Concentração percentual normalizada do produto da transglicosilação
q	- Molécula do produto final da reação de hidrólise
q	- Concentração percentual normalizada do produto final da hidrólise
R_{AB}	- Constante de especificidade relativa combinada para a reação direta de transglicosilação
R_{Ab}	- Constante de especificidade relativa combinada para a reação direta de hidrólise primária
R_{PQ}	- Constante de especificidade relativa combinada para a reação inversa de

	transglicosilação
R_{Qb}	- Constante de especificidade relativa combinada para a reação direta de hidrólise secundária
r_{HP}	- Velocidade da reação de hidrólise primária
r_{HS}	- Velocidade da reação de hidrólise secundária
r_T	- Velocidade da reação de transglicosilação
$r_{T/H}$	- Velocidade da reação de transglicosilação relativa às reações de hidrólise
$r_{T/HP}$	- Velocidade da reação de transglicosilação relativa à reação de hidrólise primária
$r_{T/HS}$	- Velocidade da reação de transglicosilação relativa à reação de hidrólise secundária
S	- Fator de seletividade
$S_{T/HP}$	- Seletividade da transglicosilação em relação à hidrólise primária
$S_{T/HS}$	- Seletividade da transglicosilação em relação à hidrólise secundária
Y_T	- Rendimento do produto de transglicosilação como porcentagem da quantidade de molécula doadora

Subscrito:

o indica o valor da grandeza em tempo zero.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2.1	AS ENZIMAS DE TRANSGLICOSILAÇÃO	16
2.2	SELETIVIDADE ENZIMÁTICA PARA REAÇÕES DE TRANSGLICOSILAÇÃO	20
3	JUSTIFICATIVA	22
3.1	OBJETIVOS	22
3.1.1	Objetivo geral	22
3.1.2	Objetivos específicos	22
4	DESENVOLVIMENTO DO MODELO	23
4.1	ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS	28
5	RESULTADOS	30
5.1	ESTUDO DE CASO 1	30
5.2	ESTUDO DE CASO 2	33
5.3	USO DO MODELO PARA EXPLORAR COMO OS PARÂMETROS AFETAM O RENDIMENTO DO PRODUTO DE TRANSGLICOSILAÇÃO	36
6	DISCUSSÃO	41
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
8	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO 1	52
	ANEXO 2	56
	ANEXO 3	69
	ANEXO 4	77
	ANEXO 5	88
	ANEXO 6	98
	ANEXO 7	101
	ANEXO 8	16

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda da sociedade em busca de alimentos saudáveis e de baixo valor calórico tem exigido um grande esforço da indústria alimentícia em formular alimentos mais saudáveis. Assim, os oligossacarídeos estão sendo constantemente incorporados à dieta humana, pois fornecem a nutrição básica e promovem a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (CUNHA, 2017).

Os oligossacarídeos são carboidratos compostos por resíduos de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas e estão presentes em diversos produtos naturais como frutas, leite e mel (lactose e sacarose); outros como a maltose e a celobiose são obtidos a partir da hidrólise química ou enzimática do amido e da celulose, respectivamente (GIESE et al., 2011). A síntese química não é a preferida em indústria porque é cara, trabalhosa, com baixos rendimentos e o uso de substâncias químicas de alto grau de pureza acaba não sendo uma alternativa sustentável. Atualmente, oligossacarídeos são produzidos através da via enzimática, sendo esta uma alternativa que supera essas limitações, uma vez que as condições de reação são controladas e a seletividade das enzimas utilizadas (FAIJES e PLANAS, 2007).

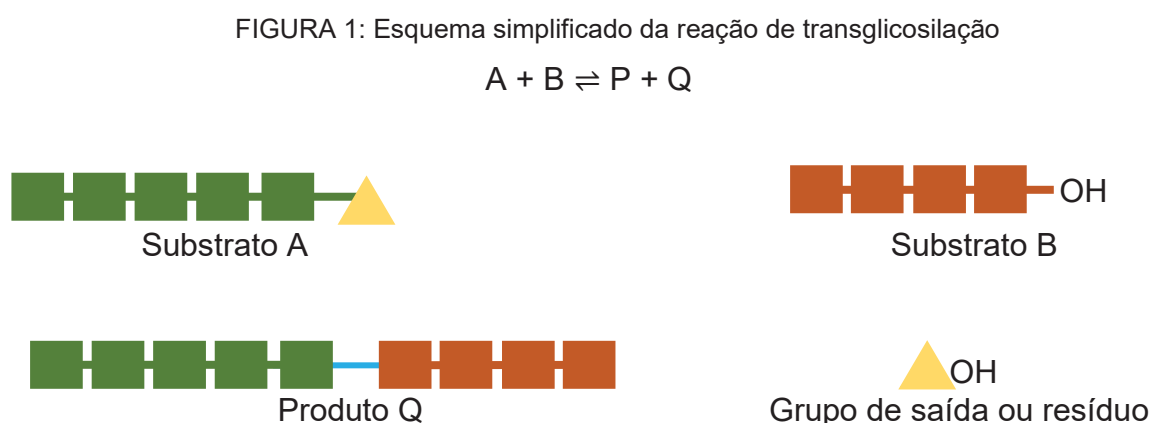
As enzimas utilizadas para síntese de oligossacarídeos são as glicosil transferases e as glicosil hidrolases, que catalisam a transferência de um monossacarídeo de um doador para um receptor através de uma reação de transglicosilação (FAIJES e PLANAS, 2007). Estas enzimas são ideais para a síntese de oligossacarídeos, pois transferem um resíduo glicosil para um receptor a partir de um açúcar doador. Esta transferência rende um produto com configuração retida ou invertida em seu carbono anomérico em relação ao doador (KITTL e WITHERS, 2010).

As enzimas que retêm a configuração do carbono anomérico seguem o mecanismo Ping Pong bi bi, que envolve a formação de um intermediário covalente (glicosil-enzima) que, por sua vez, pode seguir duas rotas: uma rota que envolve hidrólise da ligação glicosídica, liberando o monossacarídeo da extremidade não-redutora; enquanto que na outra rota, a transglicosilação, o intermediário é atacado por um receptor glicosídico (uma segunda molécula de substrato), gerando um novo glicosídeo (FRUTUOSO, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS ENZIMAS DE TRANSGLICOSILAÇÃO

Em uma reação de transglicosilação, parte da cadeia de um substrato A, chamado de doador, transferida à cadeia de um segundo substrato B, dito receptor. Os dois produtos desta reação são P, o grupo de saída que abandona o substrato A, e Q, o produto de interesse da transglicosilação formado pela ligação glicosídica de da parte de um substrato com o outro substrato liberando um grupo de saída. A FIGURA 1 resume em forma esquemática esse processo.



FONTE: A Autora (2022).

Galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos e isomaltooligossacarídeos são exemplos de oligossacarídeos formados através das reações de transglicosilação.

Os galactooligossacarídeos ("GOS") são encontrados naturalmente no leite materno e em alguns vegetais, podendo ser produzidos a partir da lactose pela reação de transgalactosilação, catalisada pela enzima β -galactosidase (TORRES et al., 2010; SANGWAN et al., 2011; BELORKAR e GUPTA, 2016; FISCHER e KLEINSCHMIDT, 2018; MANO et al., 2018; MARTINS et al., 2019).

Os isomaltooligossacarídeos ("IMOS") são carboidratos capazes de chegar intactos ao intestino grosso, onde são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos ali presentes, estimulando o seu crescimento e proporcionando efeitos benéficos à saúde (CASA-VILLEGAS et al., 2018).

Os frutooligossacarídeos ("FOS") são encontrados em pequenas quantidades em diversos vegetais, como aspargos, alcachofra de Jerusalém, chicória, cebola e batata doce. São açúcares não convencionais, não metabolizados pelo organismo humano e não calóricos, e considerados prebióticos, uma vez que promovem o crescimento de probióticos como *Acidophillus* e *Bifidus*, presentes na flora do cólon intestinal, o que possibilita a redução do pH do bolo fecal e, como consequência, a eliminação de microrganismos patogênicos. Também melhoram a absorção de sais minerais, como o cálcio, magnésio e ferro, além de diminuir o nível de colesterol total, fosfolipídios e triacilgliceróis no sangue (PASSOS e PARK, 2002; MANO et al., 2018; MARTINS et al., 2019).

Os FOS apresentam cerca de 40 a 60 % do poder edulcorante da sacarose, sendo um possível substituto deste, pois uma solução de FOS apresenta maior viscosidade e estabilidade térmica que a sacarose, propriedades altamente visadas pela indústria (CUNHA, 2017).

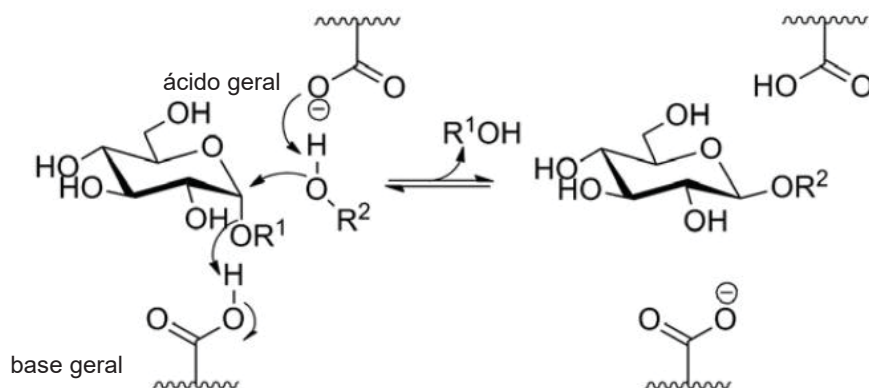
Inúmeras pesquisas surgiram nos últimos anos com a intenção de encontrar enzimas adequadas à síntese destes oligossacarídeos para uso na formulação de alimentos funcionais. Estas enzimas incluem transglicosilases (glicosil transferases, GT) e glicosidases (glicosil hidrolases, GH) (BISSARO et al., 2015).

As glicosil transferases atuam na síntese de ligações glicosídicas *in vitro*, em condições de reação de hidrólise reversa. O processo pode ser controlado termodinamicamente ou cineticamente. Em processos termodinamicamente, a produção do oligossacarídeo é feita em altas temperaturas e com adição de solventes orgânicos, o que pode acarretar na inativação da enzima (GIESE et al., 2011; MALET e PLANAS, 1998).

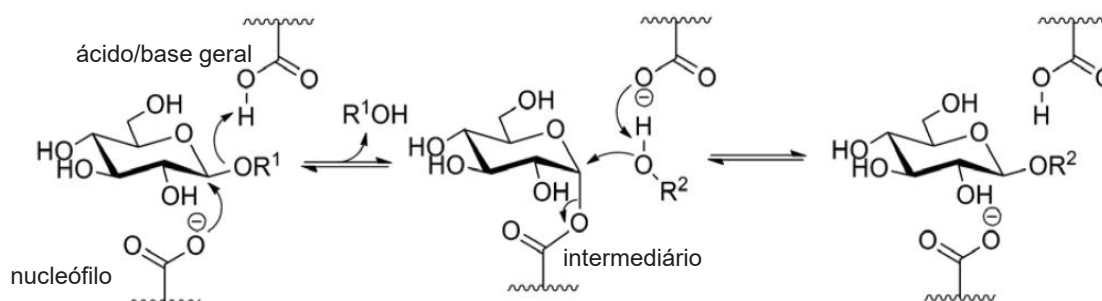
Nas condições cinéticas, a produção do oligossacarídeo depende do ataque do intermediário covalente por um receptor glicosídico ao invés da água. Esse receptor pode se um oligossacarídeo, um grupo aril glicosídeos ou glicosídeos fluorados (GIESE et al., 2011; MALET e PLANAS, 1998).

A utilização de enzimas são ideais para a síntese de oligossacarídeos, pois transferem um resíduo glicosil para um receptor a partir de um açúcar doador. Esta transferência rende um produto com configuração estereoquímica retida ou invertida em seu carbono anomérico em relação ao doador, permitindo, assim, a classificação destas enzimas como de retenção ou de inversão da configuração do carbono anomérico (FIGURA 2) (KITTL e WITHERS, 2010).

FIGURA 2: Mecanismo catalítico para as glicosil hidrolases e transglicosilases



(A) Nas glicosil hidrolases de inversão, R^1 é um sacarídeo e R^2 é um hidrogênio e nas glicosil transferases R^1 pode ser um nucleotídeo e R^2 um sacarídeo



(B) Nas glicosil hidrolases de retenção, R^1 é um sacarídeo e R^2 é um hidrogênio e nas transglicosilases R^1 e R^2 são sacarídeos.

FONTE: Adaptado de KITTL e WITHERS (2010).

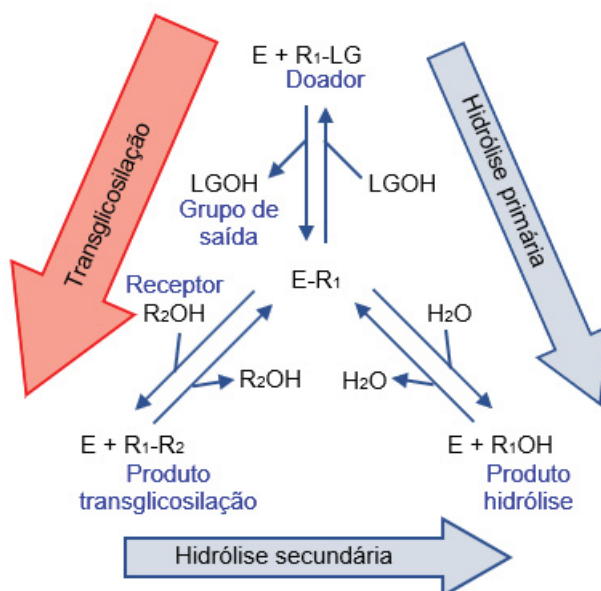
No mecanismo de inversão, uma molécula de água ataca, em apenas uma etapa, o carbono anomérico do substrato doador (FIGURA 2A) (McCARTER e WITHERS, 1994). Já o mecanismo de retenção ocorre em duas etapas, ou seja, envolve um deslocamento duplo - também conhecido como mecanismo Ping Pong bi bi - com a formação de um intermediário covalente que é uma enzima glicosilada (FIGURA 2B).

Quando a transglicosilação ocorre, o grupo hidroxila de outro açúcar funciona como substituto para a água (FIGURA 2B) (KITTL e WITHERS, 2010). No mecanismo de retenção, há participação de dois grupos carboxila pertencentes a ácidos glutâmicos ou aspárticos presentes em regiões conservadas do sítio ativo da enzima (FRUTUOSO, 2010).

No mecanismo Ping Pong bi bi (FIGURA 3), três reações podem ocorrer: a

reação de transglicosilação; uma reação de hidrólise primária, na qual a molécula doadora é hidrolisada diretamente; uma reação de hidrólise secundária, na qual o produto de transglicosilação é hidrolisado.

FIGURA 3: Reações concorrentes no mecanismo Ping Pong bi bi.



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: Em destaque (seta em vermelho) reação de interesse para produção de oligossacarídeos. E é a enzima livre. R_1-LG é um oligossacarídeo doador. $LG-OH$ é o grupo de saída. R_2-OH é um grupo receptor.

Diversos trabalhos já relataram a atividade de transglicosilação de algumas glicosidases, como por exemplo, a atividade de transglicosilação de uma dalcoquinase de *Dalbergia cochinchinensis* Pierre utilizando álcoois primários e secundários como receptores e de uma linamarase de *Manihot esculenta* Crantz utilizando álcoois primários, secundários e terciários. Neste caso, as enzimas hidrolisam pNPβGlc para formação de um intermediário enzima glicosil e transfere a glicose para um álcool receptor, formando alquilglicosídeos (COSTA, 2013).

2.2 SELETIVIDADE ENZIMÁTICA PARA REAÇÕES DE TRANSGLICOSILAÇÃO

Na avaliação de estratégias para melhorar as enzimas para uso em processos de transglicosilação, é útil determinar os parâmetros que caracterizam a seletividade da enzima para as reações de transglicosilação e hidrólise, sendo que até o momento, dois parâmetros foram utilizados:

- a) a razão entre a velocidade inicial da reação de transglicosilação e a velocidade inicial da reação de hidrólise primária, frequentemente referida como " r_T/r_H "
- b) o fator de seletividade "S".

Van Rantwijk et al. (1999) propuseram que tal parâmetro seria a razão da velocidade inicial da transglicosilação e a velocidade inicial da reação de hidrólise como segue na Eq.(1):

$$\frac{r_T}{r_H} = S \frac{a_{receptor}}{a_{\text{água}}} \quad (1)$$

onde $a_{receptor}$ e $a_{\text{água}}$ são as atividades termodinâmicas do receptor e da água, respectivamente. Em soluções diluídas, pode ser apropriado usar concentrações em vez de atividades termodinâmicas para as espécies de reação (HANSSON, 2001):

$$\frac{r_T}{r_H} = S \frac{[receptor]}{[H_2O]} \quad (2)$$

Tanto a razão r_T/r_H quanto o fator de seletividade se concentram na hidrólise primária, não incluindo os efeitos da hidrólise secundária. Como a hidrólise secundária ocorre após a formação do produto de transglicosilação, não é suficiente se concentrar nas velocidades iniciais, é necessário usar uma ferramenta analítica que considere todas as reações que aparecem na FIGURA 3.

A seletividade é influenciada pelas condições de reação em geral, por exemplo, a atividade de água. A atividade de água tem, assim, um efeito duplo: afeta a ação da água como reagente na hidrólise e modula as propriedades enzimáticas, uma vez que a atividade de água afeta a interação das moléculas de água com a

superfície da enzima, afetando a conformação da enzima e, conseqüentemente, o seu sítio ativo e, portanto, os valores das constantes de seletividade (ADLERCREUTZ, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

As glicosil hidrolases podem catalisar tanto as reações de hidrólise quanto a reação de transglicosilação. Na síntese de oligossacarídeos, as três reações competem entre si e, para obter altos rendimentos do produto de transglicosilação, é necessário ter uma enzima cujo sítio ativo favorece transglicosilação e suprime a hidrólise.

Métodos atuais para caracterizar a seletividade da reação não levam em conta a existência de dois tipos de hidrólise – primária e secundária – focando somente na primeira. Essa abordagem não é suficiente para entender o papel da hidrólise em limitar os rendimentos do produto de transglicosilação, de forma que seja necessário um método de análise que caracterize ambas as hidrólises no processo global.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo analítico para sistemas de transglicosilação com apenas um produto de interesse.

3.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo apropriado que considere as três reações concorrentes do tipo Ping Pong bi bi em um sistema de transglicosilação;
- Propor parâmetros que represente o fator de seletividade (S) para as enzimas de transglicosilação
- Aplicar o modelo em estudos de caso da literatura.
- Utilizar o modelo para explorar maneiras para maximizar o rendimento do produto de transglicosilação obtido durante o processo.

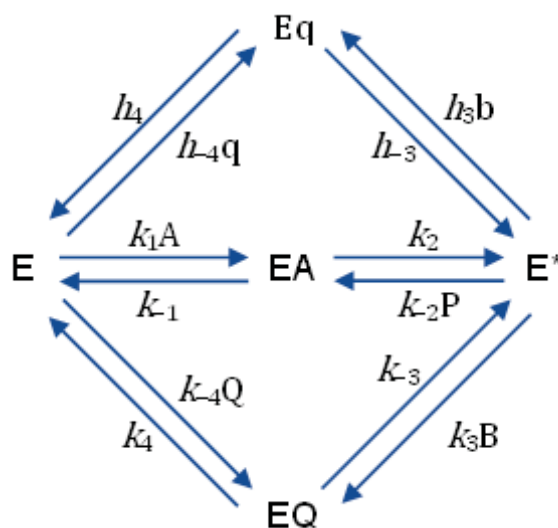
4 DESENVOLVIMENTO DO MODELO

Ao deduzir as equações para o sistema mostrado na FIGURA 2, usou-se a simbologia usada por Cornish-Bowden (2012) para as reações Ping Pong bi bi (ANEXO 1).

Foi utilizado o método King-Altman (1956), que consiste num método esquemático aplicado em qualquer mecanismo que contenha uma série de reações entre diferentes formas enzimáticas. Ela não é aplicável a reações não enzimáticas, a misturas de enzimas, ou a mecanismos que não contenham passos enzimáticos (ANEXO 2).

O primeiro passo no método King-Altman é incorporar todo o mecanismo em um esquema fechado que mostra todas as formas enzimáticas e as reações entre elas, como em FIGURA 4. Todas as reações devem ser tratadas como reações de primeira ordem. Isto significa que as reações de segunda ordem são definidas por uma constante de velocidade de pseudo-primeira ordem. Por exemplo, para a reação $E + A \rightarrow EA$, a constante de pseudo-primeira ordem seria dada por $k_1[A]$.

FIGURA 4: Representação das três reações concorrentes num formato apropriado para a aplicação do método King-Altman de dedução de equações cinéticas. As reações são escritas em termos das várias formas da enzima.



FONTE: A Autora (2022).

As equações obtidas pelo método King-Altman não foram expressas da mesma forma que Cornish-Bowden (2012) usou, ou seja, em função de k_{cat} , K_i e K_m . Em vez disso, optou-se por expressá-las em termos de constantes de especificidade (MITCHELL e KRIEGER, 2021).

O sistema modelado consiste em três reações: hidrólise primária, hidrólise secundária e transglicosilação, mostradas na FIGURA 3. Os símbolos utilizados para as diversas espécies reativas estão indicados na TABELA 1.

TABELA 1: Símbolos usados para descrever as reações de transglicosilação, de hidrólise primária e de hidrólise secundária, e o código de letra correspondente utilizado nas equações cinéticas.

Reação	Primeiro Substrato (doador)	Segundo Substrato (receptor)	Primeiro Produto (grupo de saída)	Segundo Produto (produto da reação)
Transglicosilação (r_T)	R ₁ -LG (A)	R ₂ -OH (B)	LG-OH (P)	R ₁ -R ₂ (Q)
Hidrólise Primária (r_{HP})	R ₁ -LG (A)	H ₂ O (b)	LG-OH (P)	R ₁ -OH (q)
Hidrólise Secundária (r_{HS})	R ₁ -R ₂ (Q)	H ₂ O (b)	R ₂ -OH (B)	R ₁ -OH (q)

FONTE: A Autora (2022).

Após a aplicação do método King-Altman ao esquema mostrado na FIGURA 4, chega-se a um conjunto de equações (ANEXO 3) para as velocidades da reação: de transglicosilação (r_T), da hidrólise primária (r_{HP}) e da hidrólise secundária (r_{HS}):

$$r_T = (k_A[A]k_B[B] - k_P[P]k_Q[Q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (3a)$$

$$r_{HP} = (k_A[A]k_b[b] - k_P[P]k_q[q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (3b)$$

$$r_{HS} = (k_Q[Q]k_b[b] - k_B[B]k_q[q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (3c)$$

Nessas equações, k_X é a constante de especificidade da enzima para a espécie indicada pelo subscrito X, $[E]_T$ é a concentração total da enzima e D é um denominador que é o mesmo para todas as três equações. Embora seja possível deduzir uma expressão para este denominador (ANEXO 4), não é necessário, uma vez que é cancelado das equações quando a variável independente é alterada do tempo para conversão fracionária do doador.

Para o esquema apresentado na FIGURA 4, os seguintes balanços nas espécies podem ser escritos

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_T - r_{HP} \quad (4a)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -r_T + r_{HS} \quad (4b)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = r_T + r_{HP} \quad (4c)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = r_T - r_{HS} \quad (4d)$$

$$\frac{d[b]}{dt} = -r_{HP} - r_{HS} \quad (4e)$$

$$\frac{d[q]}{dt} = r_T + r_{HS} \quad (4f)$$

Na análise, o rendimento do produto de transglicosilação Q é traçado em função da porcentagem de consumo do doador original A. Esta porcentagem de consumo (c) é dado por

$$c = \frac{[A]_0 - [A]}{[A]_0} \cdot 100 = 100 - 100 \frac{[A]}{[A]_0} \quad (5)$$

Portanto,

$$\frac{dc}{dt} = 0 - \frac{100}{[A]_0} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{100}{[A]_0} (-r_T - r_{HP}) = \frac{100}{[A]_0} (r_T + r_{HP}) \quad (6)$$

Várias modificações são feitas para chegar ao modelo final. Em primeiro lugar, a variável independente das Eqs. (4a) a (4f) é alterada de tempo para c e, em

segundo lugar, as concentrações das espécies são normalizadas, expressando-as como porcentagem da concentração inicial do doador A. Por último, as constantes de especificidade individuais nas Eqs. (4a) a (4f) não são estimadas individualmente, nem seus valores absolutos são determinados; ao contrário, “constantes de especificidade relativas combinadas” são determinadas. As constantes de especificidade relativas combinadas utilizadas no modelo final são definidas como

$$R_{AB} = \frac{k_A k_B}{k_A k_B} = 1 \quad (7a)$$

$$R_{Ab} = \frac{k_A k_b}{k_A k_B} \quad (7b)$$

$$R_{Qb} = \frac{k_Q k_b}{k_A k_B} \quad (7c)$$

$$R_{PQ} = \frac{k_P k_Q}{k_A k_B} \quad (7d)$$

Em outras palavras, tomando como base a preferência da enzima para catalisar a reação de transglicosilação na direção direta, R_{PQ} é a preferência relativa para catalisar a reação na direção inversa da transglicosilação, R_{Ab} é a preferência relativa para catalisar a reação de hidrólise primária e R_{Qb} é a preferência para catalisar a reação de hidrólise secundária.

Com as modificações acima realizadas, para um sistema em que as reações de hidrólise são irreversíveis, as Eqs. (4a) a (4f) podem ser reescritos como

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) - R_{Ab}Ab}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} = -1 \quad (8a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (8b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} = 1 \quad (8c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) - R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (8d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-R_{Ab}Ab - R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (8e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{R_{Ab}Ab + R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (8f)$$

onde A , B , P , Q , b e q (ou seja, em fonte itálica) são as concentrações normalizadas de A , B , P , Q , b e q , respectivamente, expressas como porcentagem da concentração inicial do doador A (ANEXO 5).

Com o propósito de relatar os resultados, os valores de R_{Ab} e R_{Qb} são usados para calcular os “coeficientes de seletividade transglicosilação/hidrólise”. Estes são definidos como

$$S_{T/HP} = \frac{1}{R_{Ab}} \quad (9a)$$

$$S_{T/HS} = \frac{1}{R_{Qb}} \quad (9b)$$

onde $S_{T/HP}$ é a seletividade para a transglicosilação em relação à hidrólise primária e $S_{T/HS}$ é a seletividade para a transglicosilação em relação à hidrólise secundária.

Adicionalmente, o valor do R_{PQ} é usado para calcular a constante de equilíbrio para a reação de transglicosilação ($K_{EQ(T)}$)

$$K_{EQ(T)} = \frac{k_A k_B}{k_P k_Q} = \frac{1}{R_{PQ}} \quad (10)$$

O rendimento percentual do produto de transglicosilação (Y_T , %) é calculado como

$$Y_T = \frac{[Q]}{[A]_o} \cdot 100 = Q \quad (11)$$

4.1 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS

Dois estudos de caso foram analisados: Teze et al. (2021) (Estudo de Caso 1) e Bissaro (2014) (Estudo de Caso 2). Detalhes das reações particulares de transglicosilação envolvidas são fornecidos individualmente para cada estudo de caso na Seção de resultados (Seção 5) e nos ANEXOS 6 e 7. Uma vez que os estudos de caso envolvem soluções aquosas relativamente diluídas, o conteúdo inicial de água é tomado como 55,5 M (i.e. 55500 mM). Os valores iniciais para outras espécies de reação são dados na Seção de resultados (Seção 5).

Em ambos os estudos de caso, os dados estão disponíveis apenas para o rendimento percentual de produto de transglicosilação ($y_T = Q$) em função do consumo percentual da molécula doadora (c). Em ambos os casos, os autores realizaram experimentos com várias enzimas diferentes: uma enzima do tipo selvagem e várias enzimas mutantes.

Um programa foi escrito no Scilab, utilizando a função *ode* para integrar um conjunto de Eqs. (8a) a (8f) para cada curva. Para cada curva ajustada, as Eqs. (8a) a (8f) contêm três constantes de especificidade relativas combinadas, R_{Ab} , R_{Qb} e R_{PQ} . Os valores de R_{Ab} e R_{Qb} para uma curva dependem apenas dos dados experimentais daquela curva (ou seja, são independentes dos valores obtidos para as outras curvas). Por outro lado, como a R_{PQ} representa o recíproco da constante de equilíbrio da reação de transglicosilação (ver Eq. 10), seu valor deve ser o mesmo para todas as curvas de um estudo de caso particular. Todas as curvas foram, portanto, ajustadas simultaneamente, sendo os parâmetros de ajuste: um valor separado de R_{Ab} para cada curva, um valor R_{Qb} para cada curva e um único valor de R_{PQ} para o estudo de caso como um todo.

O ajuste foi feito usando a função *fminsearch* do Scilab, e a função objetiva usada foi:

$$F_{\text{obj}} = \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (Q_{i,j(E)} - Q_{i,j(P)})^2 \quad (12)$$

onde m é o número de experimentos (cada experimento corresponde a uma enzima diferente) e n é o número total de consumos percentuais para os dados disponíveis em um determinado experimento. $Q_{i,j(E)}$ é a concentração percentual normalizada do

produto da transglicosilação para o i -ésimo percentual de consumo no experimento j e $Q_{i,j}(P)$ é a concentração percentual normalizada do produto de transglicosilação previsto pelo modelo para a mesma porcentagem de consumo no mesmo experimento.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DE CASO 1

O primeiro estudo de caso envolve o seguinte conjunto de reações de transglicosilação realizado por Teze et al. (2021):

Transglicosilação: $\alpha\text{-L-FucpOCNP} + \text{D-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{CNP} + \alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)-D-GlcNAc}$

Hidrólise primária: $\alpha\text{-L-FucpOCNP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CNP} + \text{L-Fuc}$

Hidrólise secundária: $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)-D-GlcNAc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CNP} + \text{L-Fuc}$

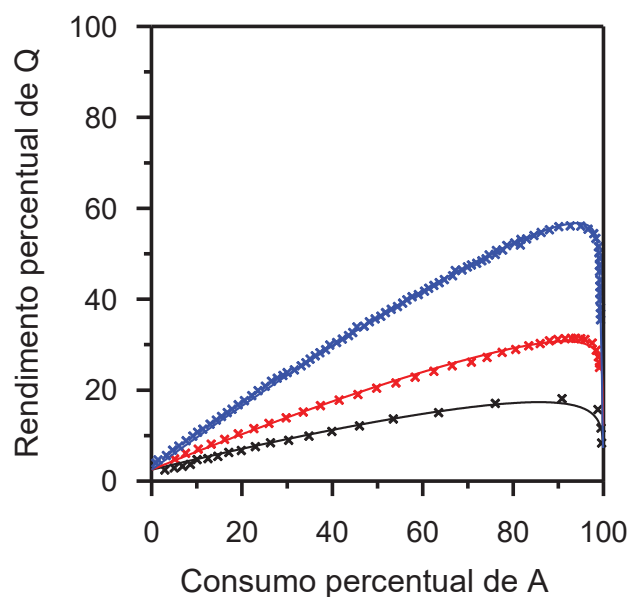
Para as reações acima, tem-se:

- $\alpha\text{-L-FucpOCNP}$ é 2-cloro-4-nitrofenil $\alpha\text{-L-}\alpha\text{-L-fucopiranosídeo}$
- D-GlcNAc é N-acetil-D-glucosamina
- CNP é 2-cloro-4-nitrofenil
- $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)-D-GlcNAc}$ é $\alpha\text{-L-fucopiranosil-(1}\rightarrow\text{3)-N-acetil-D-glucosamina}$
- L-Fuc é uma mistura de $\alpha\text{-L-Fucp}$ e $\beta\text{-L-Fucp}$.

As concentrações iniciais utilizadas por Teze et al. (2021) do doador ($\alpha\text{-L-FucpOCNP}$) e do receptor (D-GlcNAc) são ambas de 20 mM. Uma extrapolação dos dados experimentais para a ordenada dá uma concentração inicial de $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)-D-GlcNAc}$ de 0,5 mM para as três curvas.

As reações acima foram catalisadas por uma glicosil hidrolase do tipo selvagem de *Lactobacillus casei* (AlfB) e duas formas mutantes da enzima (TEZE et al., 2021). O modelo representado por Eqs. (8a) a (8f) se ajusta bem aos dados destas enzimas (FIGURA 5), dando um valor de $K_{\text{EQ(T)}}$ de 55,8 (intervalo de confiança de 95% = 54,3 a 57,3) e os valores de $S_{\text{T/HP}}$ e $S_{\text{T/HS}}$ listados em TABELA 2.

FIGURA 5: Perfis para o rendimento percentual do produto de transglicosilação α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc em função da porcentagem de consumo do doador original α -L-FucpOCNP para a enzima do tipo selvagem AlfB de *Lactobacillus casei* (x) e os mutantes W130H (x) e H80F (x).



FONTE: A Autora (2022).

TABELA 2: Seletividades para a enzima do tipo selvagem AlfB e duas formas mutantes, obtidas pelo ajuste do modelo aos dados de Teze et al. (2021) para a reação de transglicosilação com α -L-FucpOCNP como doador e D-GlcNAc como receptor.

Enzima	$S_{T,HP}$	Intervalo de confiança 95%	$S_{T,HS}$	Intervalo de confiança 95%
Tipo selvagem AlfB	892	822-975	4047	3606-4610
W130H	1893	1818-1976	15576	13947-17637
H80F	7107	6930-7294	92593	80645-108696

FONTE: A Autora (2022).

A enzima do tipo selvagem dá um baixo rendimento máximo do produto de transglicosilação, apenas 18%. Este fraco desempenho pode ser compreendido pela análise os valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ e as concentrações das espécies envolvidas. A enzima do tipo selvagem tem um $S_{T,HP}$ relativamente baixo de apenas 892. Este valor pode ser aplicado em Eq. (2) com o valor inicial de concentrações do receptor (20 mM) e água (55500 mM):

$$\frac{r_T}{r_{HP}} \Big|_0 = S_{T,HP} \frac{[\text{receptor}]_0}{[\text{água}]} = S_{T,HP} \frac{[\text{receptor}]_0}{55500 \text{ mM}} \quad (13)$$

dando um $r_T/r_{HP}|_o$ de 0,324. Em outras palavras, no início da reação, a velocidade de transglicosilação será cerca de um terço da velocidade de hidrólise primária.

Para a enzima do tipo selvagem, o valor de 4047 para a seletividade da transglicosilação sobre a hidrólise secundária ($S_{T,HS}$) é mais de 4 vezes maior do que $S_{T,HP}$. Entretanto, a alta concentração de água levará a velocidades significativas de hidrólise secundária, como pode ser visto pela adaptação da Eq. (13) para descrever a velocidade de transglicosilação em relação à hidrólise secundária:

$$\begin{aligned} \frac{r_T}{r_{HS}} &= S_{T,HS} \frac{[\text{doador}][\text{receptor}]}{[\text{produto da transglicosilação}][\text{água}]} \\ &= S_{T,HS} \frac{[A] \text{ mM} \cdot [B] \text{ mM}}{[Q] \text{ mM} \cdot 55500 \text{ mM}} \end{aligned} \quad (14)$$

As concentrações do produto de transglicosilação (Q) e dos substratos A e B variam durante a reação, portanto r_T/r_{HS} varia. Entretanto, o valor do $S_{T,HS}$ de 4047 obviamente contribui bem pouco para compensar a alta concentração de água no denominador.

Os rendimentos máximos do produto de transglicosilação são mais altos para os dois mutantes. No caso de W130H, os valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ são significativamente mais altos do que os valores correspondentes para a enzima do tipo selvagem. Entretanto, mesmo com o $S_{T,HP}$ de 1893, Eq. (13) dá um valor de $r_T/r_{HP}|_o$ de 0,688, portanto, no início da reação a velocidade de transglicosilação será de cerca de dois terços da velocidade de hidrólise primária. O bom desempenho do H80F é devido ao fato de tanto o $S_{T,HP}$ como o $S_{T,HS}$ serem muito mais altos do que os valores correspondentes para a enzima do tipo selvagem, e também muito mais altos do que os valores correspondentes para W130H. Com o $S_{T,HP}$ de 7107, Eq. (13) dá um valor de $r_T/r_{HP}|_o$ de 2,58, de modo que, no início da reação, a velocidade de transglicosilação será mais rápido do que a velocidade de hidrólise primária. Além disso, o valor de $S_{T,HS}$ de 92593 é 1,67 vezes maior do que a concentração de água (55500 mM), ajudando a favorecer a transglicosilação sobre hidrólise secundária.

5.2 ESTUDO DE CASO 2

O segundo estudo de caso envolve o seguinte conjunto de reações de transglicosilação realizado por Bissaro (2014):

Transglicosilação: $pNP-\beta-D-Galf + Bn-\alpha-D-Xylp \rightleftharpoons pNP + \beta-D-Galf-(1,2)-\alpha-D-Xylp$

Hidrólise primária: $pNP-\beta-D-Galf + H_2O \rightarrow pNP + \beta-D-Galf$

Hidrólise secundária: $\beta-D-Galf-(1,2)-\alpha-D-Xylp + H_2O \rightarrow Bn-\alpha-D-Xylp + \beta-D-Galf$

Nestas reações:

- Bn- β -D-Galf-(1,2)- α -D-Xylp é benzil- β -D-galactofuranosil-(1,2)- α -D-xilopiranosídeo
- Bn- α -D-Xylp é benzil α -D-xilopiranosídeo
- pNP - β -D-Galf é 4-nitrofenil β -D-galactofuranosídeo
- β -D-Galf é β -D-galactofuranosídeo
- pNP é 4-nitrofenol.

As concentrações iniciais utilizadas por Bissaro (2014) do doador (pNP - β -D-Galf) e do receptor (Bn- α -D-Xylp) foram ambos de 5 mM.

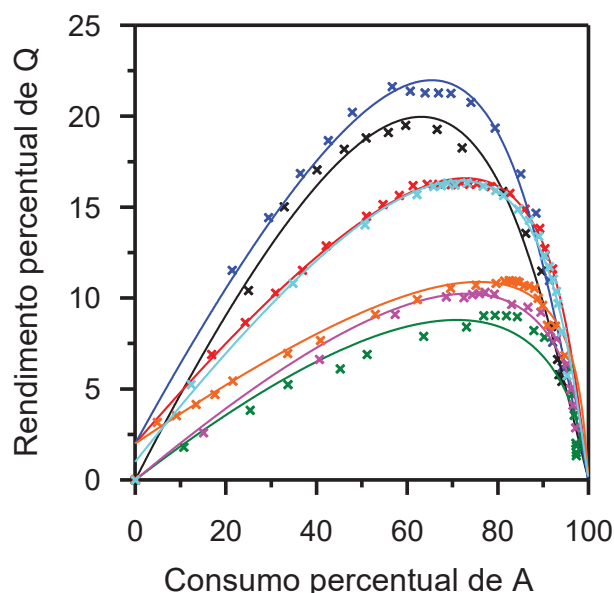
As reações acima são catalisadas pela enzima selvagem α -L-arabinofuranosidase de *Thermobacillus xylanilyticus* (TxAbf) e suas várias formas mutantes (BISSARO, 2014).

O modelo representado pelas Eqs. (8a) a (8f) se ajusta razoavelmente bem aos dados para estas enzimas (FIGURA 6) dando um valor de $K_{EQ(T)}$ de 0,88 (intervalo de confiança de 95% = 0,78 - 1,02) e os valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ listados na Tabela 3.

A enzima selvagem TxAbf possui uma alta seletividade para a reação de transglicosilação sobre a reação de hidrólise primária, com um valor de $S_{T,HP}$ de 10549. Com este valor de $S_{T,HP}$ e a concentração inicial do receptor de 5 mM, a Eq. (13) fornece um valor de $r_T/r_{HP}|_0$ de 0,96, o que significa que as velocidades de transglicosilação e hidrólise primária serão semelhantes no início da reação. Com relação às velocidades relativas de transglicosilação e hidrólise secundária, o valor

de $S_{T,HS}$ de 14514 faz relativamente pouco para compensar a concentração de água de 55500 mM no denominador de Eq. (14).

FIGURA 6: Perfis para “o rendimento percentual do produto de transglicosilação de Bn- β -D-Galf-(1,2)- α -D-Xylp em função da porcentagem de consumo do doador original pNP- β -D-Galf.



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: Os perfis obtidos por Bissaro (2014) para a enzima do tipo selvagem TxAbf (x) e os mutantes H98A (x), H98F (x), W99A (x), W99F (x), H98AW99A (x) e H98FW99F (x). As linhas sólidas representam as curvas ajustadas.

TABELA 3: As seletividades para a enzima do tipo selvagem TxAbf e suas formas mutantes, obtidas pelo ajuste do modelo aos dados de Bissaro (2014) para a reação de transglicosilação com pNP- β -D-Galf como doador e Bn- α -D-Xylp como receptor.

Enzima	$S_{T,HP}$	Intervalo de confiança de 95%	$S_{T,HS}$	Intervalo de confiança de 95%
TxAbf selvagem	10549	9718 - 11534	14514	12034 - 18282
H98A	4572	4310 - 4869	19194	15038 - 26525
H98F	9390	8643 - 10277	21413	16529 - 30395
W99A	2614	2410 - 2856	5023	4515 - 5659
W99F	2909	2687 - 3170	7348	6435 - 8562
H98AW99A	2307	2109 - 2546	9497	7981 - 11723
H98FW99F	5118	4796 - 5485	17271	13774 - 23148

FONTE: A Autora (2022).

O rendimento máximo do produto de transglicosilação obtido com a TxAbf selvagem é de apenas 19%. Isto é semelhante ao valor de 18% obtido para a AlfB selvagem no primeiro estudo de caso, apesar dos valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ para a TxAbf selvagem serem significativamente mais altos que os da AlfB selvagem. Isto mostra que os valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ não são os únicos fatores que influenciam o rendimento máximo do produto de transglicosilação; a constante de equilíbrio da reação, que é 55,8 para o Estudo de Caso 1 e apenas 0,88 para o Estudo de Caso 2, também é importante.

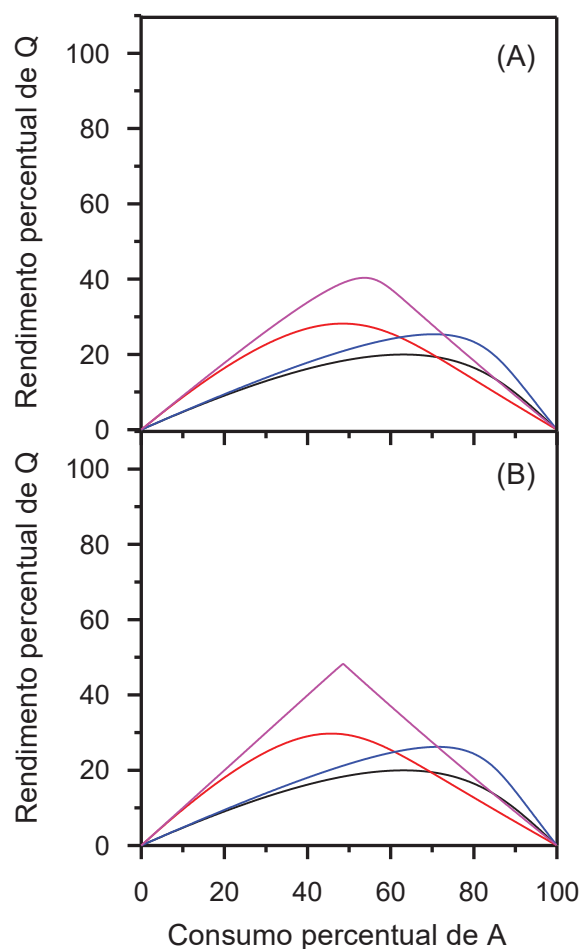
A mutante H98F fornece um rendimento máximo do produto de transglicosilação mais alto do que a TxAbf selvagem. Isto se deve principalmente ao aumento do $S_{T,HS}$. $S_{T,HP}$ é razoavelmente similar tanto para a enzima do tipo selvagem quanto para H98F, mas $S_{T,HS}$ para H98F é cerca de 1,3 vezes o valor para a TxAbf selvagem. Os mutantes H98A e H98FW99F também têm valores de $S_{T,HS}$ superior ao da TxAbf selvagem. Entretanto, seu desempenho é pior do que a TxAbf selvagem porque seus valores para $S_{T,HP}$ são aproximadamente metade do valor de $S_{T,HP}$ da TxAbf selvagem. Para as outras três mutantes (W99A, W99F e H98AW99A), os valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ são inferiores aos valores da enzima selvagem TxAbf e o desempenho da transglicosilação acaba sendo ruim em virtude disso.

5.3 USO DO MODELO PARA EXPLORAR COMO OS PARÂMETROS AFETAM O RENDIMENTO DO PRODUTO DE TRANSGLICOSILAÇÃO

O rendimento máximo do produto de transglicosilação no Estudo de Caso 2 foi relativamente baixo. Isso levou ao questionamento de como o aumento nas seletividades $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ e na constante de equilíbrio afetaria o rendimento máximo do produto de transglicosilação. Nesta seção, o modelo é usado para explorar isto. Os parâmetros do caso base são aqueles obtidos para a TxAbf selvagem na reação de transglicosilação estudada por Bissaro (2014): $K_{EQ(T)} = 0,88$, $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514$ (TABELA 3). Para todas as simulações, os valores iniciais são fixados em $[A] = 5 \text{ mM}$, $[B] = 5 \text{ mM}$, $[P] = 0 \text{ mM}$, $[q] = 0 \text{ mM}$ e $[b] = 55500 \text{ mM}$. Estes correspondem aos valores iniciais de concentração percentual normalizada de $A = 100$, $B = 100$, $P = 0$, $q = 0$ e $b = 1110000$.

A FIGURA 6 explora os efeitos de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ sobre o rendimento do produto de transglicosilação, com $K_{EQ(T)}$ sendo mantido no valor de 0,88. Aumentando tanto $S_{T,HP}$ quanto $S_{T,HS}$ individualmente tem um efeito modesto. Com um aumento de 10 vezes em $S_{T,HP}$ ou $S_{T,HS}$, o rendimento máximo do produto de transglicosilação é inferior a 30% (FIGURA 7A). De fato, um aumento de 1000 vezes em $S_{T,HP}$ ou em $S_{T,HS}$ causa uma melhora insignificante sobre o aumento de 10 vezes (compare FIGURA 7B com FIGURA 7A). Os melhores resultados são obtidos quando tanto $S_{T,HP}$ quanto $S_{T,HS}$ são aumentados simultaneamente. Quando ambos são aumentados em 10 vezes, o rendimento máximo do produto de transglicosilação é de cerca de 40%, aproximadamente o dobro do valor obtido para a situação da TxAbf selvagem (FIGURA 7A). Há pouco ganho adicional em tentar aumentar ainda mais esses valores sem alterar a reação em si. Mesmo com um aumento de 1000 vezes em ambas as seletividades, o rendimento máximo só atinge 48% (FIGURA 7B).

FIGURA 7: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com a constante de equilíbrio para a reação de transglicosilação mantida no valor do caso base ($K_{EQ(T)} = 0,88$) e diferentes valores de $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$.



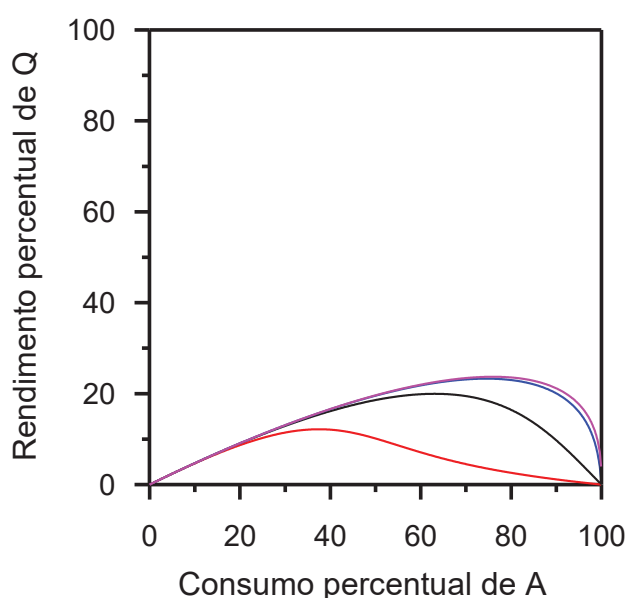
FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: Em ambas as partes (A) e (B), o estudo de caso base (—) tem $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514$. Part (A): (—) $S_{T,HP} = 10549 \times 10$ e $S_{T,HS} = 14514$; (—) $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 10$; (—) $S_{T,HP} = 10549 \times 10$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 10$. Part (B): (—) $S_{T,HP} = 10549 \times 1000$ e $S_{T,HS} = 14514$; (—) $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 1000$; (—) $S_{T,HP} = 10549 \times 1000$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 1000$.

Os resultados nas FIGURAS 5 e 6 sugerem que a constante de equilíbrio da reação de transglicosilação é importante: a reação estudada por Teze et al.. (2021) teve uma constante de equilíbrio 60 vezes maior que a reação estudada por Bissaro (2014) e um rendimento máximo do produto de transglicosilação quase 3 vezes maior (Veja as Seções 5.1 e 5.2). A constante de equilíbrio pode ser alterada pela alteração da reação; se a intenção é produzir um determinado produto de transglicosilação, então pode-se usar os mesmos grupamentos R_1 e R_2 (ver TABELA 1), mas com um grupo de saída diferente.

A FIGURA 8 explora os efeitos da $K_{EQ(T)}$ sobre o perfil previsto para o produto de transglicosilação, usando as seletividades da TxAbf selvagem $S_{T,HP}$ (10549) e $S_{T,HS}$ (14514). O valor da constante de equilíbrio afeta o rendimento, mas o efeito é modesto. Um aumento de $K_{EQ(T)}$ de 0,88 para 10 aumenta o rendimento máximo da transglicosilação do valor do caso base de 19% a apenas 23%. Um aumento insignificante ocorre quando $K_{EQ(T)}$ é aumentada para 100, o rendimento máximo previsto da transglicosilação é de apenas 24%.

FIGURA 8: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com diferentes valores da constante de equilíbrio da reação de transglicosilação.



FONTE: A Autora (2022).

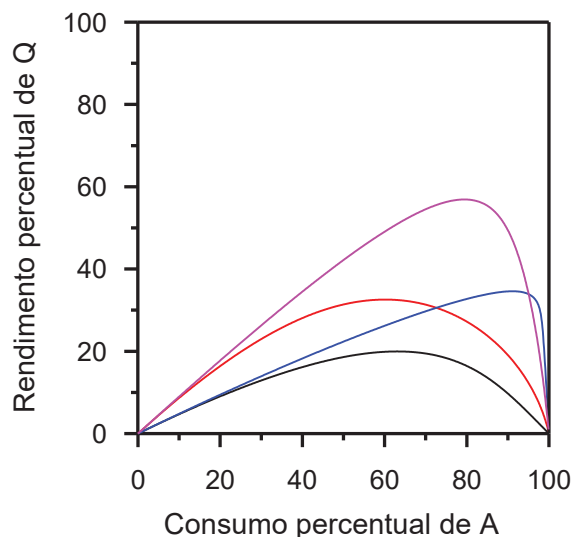
LEGENDA: Os perfis foram gerados com parâmetros para o caso base de $S_{T,HP}$ (10549) e $S_{T,HS}$ (14514) e vários valores de $K_{EQ(T)}$: (—) Caso base, com $K_{EQ(T)} = 0.88$, (—) $K_{EQ(T)} = 0.1$; (—) $K_{EQ(T)} = 10$; (—) $K_{EQ(T)} = 100$.

Os resultados das simulações mostradas nas FIGURAS 7 e 8 sugerem que se uma reação de transglicosilação tem uma constante de equilíbrio baixa e dá baixos rendimentos (menores que 20%), então, a melhor estratégia seria melhorar tanto a constante de equilíbrio quanto as seletividades simultaneamente.

A FIGURA 9 mostra que, se fosse possível melhorar $K_{EQ(T)}$, $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$ em 10 vezes cada para a formação do produto de transglicosilação de Bissaro (2014) ou seja, Bn- β -D-Galf-(1,2)- α -D-Xylp, então, o rendimento máximo do produto de transglicosilação chegaria a 57% (veja a curva magenta na FIGURA 9), triplicando o valor de 19% obtido com a TxAbf selvagem. Se $K_{EQ(T)}$ e apenas uma das duas

seletividades fossem melhorados em 10 vezes, o rendimento máximo previsto da transglicosilação ficaria em torno de 35% (veja as curvas vermelha e azul na FIGURA 9).

FIGURA 9: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com um aumento de 10 vezes não apenas em $S_{T,HP}$ e $S_{T,HS}$, mas também em $K_{EQ(T)}$.



FONTE: A Autora (2022).

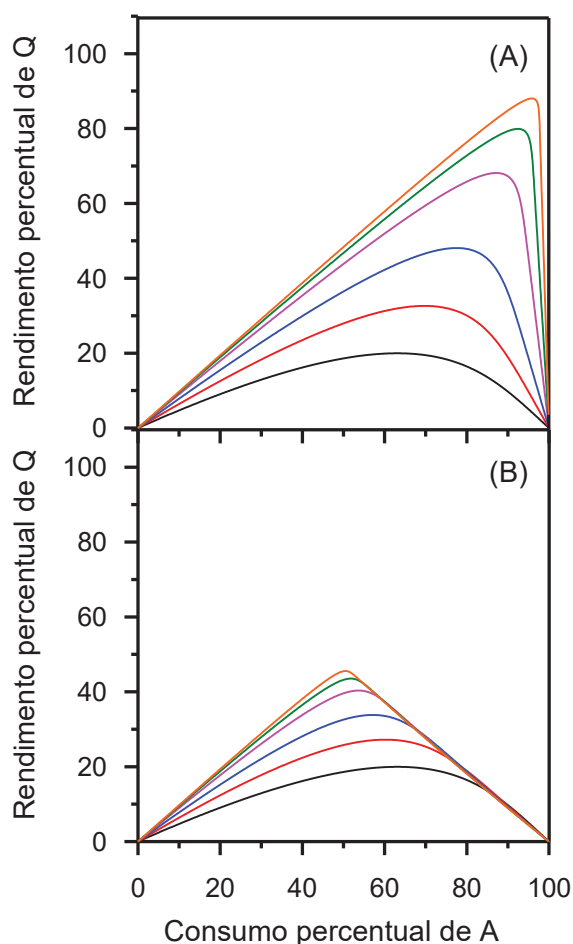
LEGENDA: Os vários cenários previstos são: (—) Caso base, com $K_{EQ(T)} = 0.88$, $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514$; (—) $K_{EQ(T)} = 10$, $S_{T,HP} = 10549 \times 10$ e $S_{T,HS} = 14514$; (—) $K_{EQ(T)} = 10$, $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 10$; (—) $K_{EQ(T)} = 10$, $S_{T,HP} = 10549 \times 10$ e $S_{T,HS} = 14514 \times 10$.

Uma estratégia alternativa é aumentar a concentração dos substratos, sem tentar melhorar a enzima. Bissaro (2014) utilizou 5 mM do doador, 4-nitrofenil β -D-galactofuranosídeo e 5 mM do receptor, benzil α -D-xilopiranosídeo. Rendimentos significativamente mais altos do produto de transglicosilação poderiam ser obtidos com a enzima do tipo selvagem se a concentração do receptor fosse aumentada (FIGURA 10A). Se a concentração inicial do doador for mantida em 5 mM, com concentrações iniciais do receptor de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 mM, os rendimentos máximos previstos do produto de transglicosilação serão de 20%, 33%, 48%, 68%, 80% e 88%, respectivamente.

Outra possível estratégia seria aumentar as concentrações iniciais do doador e do receptor em conjunto, embora, os rendimentos previstos não passem de 50% (FIGURA 10B). Se tanto o doador quanto o receptor tiverem concentrações iniciais de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 mM, os rendimentos máximos previstos do produto da transglicosilação serão de 20%, 27%, 34%, 40%, 44% e 46%, respectivamente.

Estas estratégias têm uma desvantagem significativa: mesmo que a reação seja interrompida quando o rendimento máximo do produto de transglicosilação é atingido, a mistura final do produto conterá um grande excesso de receptor não reagido no primeiro caso, e grandes quantidades de ambos doador e receptor não reagidos no segundo caso. Estes substratos são açúcares substituídos e, portanto, relativamente caros de produzir. Portanto, seria necessário um método eficiente para sua recuperação e reutilização em reações subsequentes, não sendo a melhor alternativa, visto que o custo do processo aumentaria.

FIGURA 10: Perfis previstos para o produto de transglicosilação com os valores do caso base ($K_{EQ(T)} = 0,88$, $S_{T,HP} = 10549$ e $S_{T,HS} = 14514$), com aumento nas concentrações iniciais do doador e do receptor.



FONTE: A Autora (2022).

LEGENDA: Em ambas as partes (A) e (B), o caso base tem o doador e o receptor em concentrações iniciais iguais a 5 mM (—). Parte (A): 5 mM do doador e as concentrações iniciais do receptor sendo (—) 10 mM, (—) 20 mM, (—) 50 mM, (—) 100 mM e (—) 200 mM. Part (B): Concentrações iniciais de ambos o doador e o receptor em (—) 10 mM, (—) 20 mM, (—) 50 mM, (—) 100 mM e (—) 200 mM.

6 DISCUSSÃO

Esta dissertação traz duas contribuições. Em primeiro lugar, desenvolve e aplica um modelo para determinar as seletividades para transglicosilação, em relação tanto à hidrólise primária quanto à hidrólise secundária, para as enzimas de retenção e transglicosilases que catalisam a reação de transglicosilação pelo mecanismo Ping Pong bi bi. Em segundo lugar, demonstra como este modelo pode ser utilizado para explorar estratégias para melhorar o rendimento do produto de transglicosilação. Estas contribuições são discutidas a seguir.

O uso de c , a porcentagem de consumo do doador, como variável independente faz com que o modelo representado por Eqs. (8a) a (8f) seja limitado à análise de dados, não podendo prever o comportamento da reação de transglicosilação em função de tempo. Mesmo como uma ferramenta analítica, o modelo não pode ser usado para analisar dados traçados em termos de tempo, mas isto não é uma desvantagem. De fato, muitas vezes se encontram problemas na identificabilidade dos parâmetros quando se tenta estimar parâmetros através do ajuste de modelos baseados no tempo a perfis temporais de reação, devido à necessidade de estimar os valores de constantes de saturação (K_M) e constantes de inibição (K_i) simultaneamente com as seletividades. Correlações significativas entre parâmetros tipicamente ocorrem, semelhantes aos encontrados no ajuste da equação de Michaelis-Menten à curva de progresso para estimar k_{cat} e K_M (CHOI; REMPALA; KIM, 2017).

O modelo do trabalho atual foi desenvolvido para o caso em que há um único produto de transglicosilação, como os cobertos pelos estudos de casos. Porém, o modelo pode ser estendido para sistemas mais complicados em que há mais de um produto da reação de transglicosilação e, consequentemente, mais do que uma reação de hidrólise. Para fazer isto, é necessário identificar a rede de reações que ocorrem no sistema e deduzir as equações apropriadas. Em seguida, é preciso obter perfis experimentais para as concentrações percentuais normalizadas das diversas espécies de reação e traçá-las em função da porcentagem do consumo do doador original. As seletividades transglicosilação/hidrólise (hidrólise primária e secundária) e as especificidades relativas da enzima para as diferentes reações de transglicosilação podem, então, ser estimadas pelo ajuste do modelo aos dados. A viabilidade de fazer isso é demonstrada pela aplicação de uma estratégia análoga

para determinar as especificidades relativas de enzimas na hidrólise de oligossacarídeos: Pereira et al.. (2016) mostraram que o modelo simples para a análise de esquemas lineares de hidrólise de oligossacarídeos (MITCHELL; CARRIÉRE; KRIEGER, 2008) poderia ser estendido à análise de esquemas ramificados de hidrólise.

Ao contrário do modelo proposto nesta dissertação, os métodos desenvolvidos anteriormente para analisar as influências relativas de transglicosilação e hidrólise sobre os rendimentos dos produtos de transglicosilação não distinguem a hidrólise primária e hidrólise secundária quantitativamente. Alguns autores utilizaram o fator de seletividade junto com a Eqs. (1) ou Eq. (2) (VAN RANTWIJK et al., 1999; HANSSON et al., 2001; MLADENOSKA et al., 2007; MLADENOSKA, WINKELHAUSEN, KUZMANOVA, 2008; ADLERCREUTZ, 2017) ou medições diretas das velocidades iniciais de transglicosilação e hidrólise (HUBER, KURZ, WALLENFELDS, 1976; FANG et al., 2006; BOHIN et al., 2013; FRUTUOSO e MARANA, 2013; GUERRERO e CONEJEROS, 2015; MLADENOSKA, 2016; YANG et al., 2017; FLORINDO et al., 2018; CHEN et al., 2019; HOFFMANN et al., 2020; KLIMACEK, SIGG, NIDETZKY, 2021; ZHAO et al., 2002). Outros autores se limitaram à avaliação qualitativa dos perfis de reação (TEZE et al., 2021; BISSARO, 2014; ARAB-JAZIRI et al., 2013; BISSARO et al., 2015).

Esta dissertação mostrou que, a fim de caracterizar a "seletividade transglicosilação/hidrólise" de uma enzima em uma reação de transglicosilação, não é suficiente determinar o fator de seletividade de Van Rantwijk et al. (1999) e Hansson et al. (2001), que aparece em Eqs. (1) e (2). Seu fator de seletividade caracteriza apenas a seletividade da enzima para transglicosilação em relação à hidrólise primária e, portanto, não leva a hidrólise secundária em conta. A análise desenvolvida na dissertação mostra que é importante caracterizar a seletividade da enzima para transglicosilação em relação às duas reações de hidrólise e que também é importante levar em conta a reversibilidade da reação de transglicosilação. Uma consequência disto é que, a fim de obter estimativas tanto das seletividades como da constante de equilíbrio, não é suficiente obter apenas as velocidades iniciais, no mínimo, é necessário obter um perfil de reação, semelhante aos perfis obtidos por Teze et al. (2021) e Bissaro (2014).

A obtenção de perfis de outros componentes envolvidos na reação, como, por exemplo, para o produto final de hidrólise "q" e também para o receptor "B", torna-se

interessante, porém não essencial. Nesses perfis, para se obter as melhores estimativas de parâmetros, os dados devem ser obtidos para baixo, médios e altos valores de consumo percentual do doador, a fim de caracterizar bem o aumento inicial, o pico e a descida do perfil para o produto de transglicosilação.

O modelo desenvolvido poderá ser útil para guiar as tentativas para melhorar o rendimento do produto de transglicosilação. Primeiro, como demonstrado nos estudos de caso (Veja as Seções 5.1 e 5.2), o modelo pode ser ajustado aos perfis de reação para obter estimativas das seletividades que enzimas do tipo selvagem e mutantes têm para transglicosilação em relação à hidrólise primária e secundária. Isto permitiria aos pesquisadores quantificar os efeitos de suas estratégias de engenharia de proteínas, com duas seletividades, em vez de serem limitadas a interpretações qualitativas dos perfis.

Segundo, como foi mostrado na Seção 5.3, as explorações teóricas das previsões do modelo podem ajudar a evitar tentativas fracassadas de melhorar os rendimentos: Na Seção 5.3, foi mostrado que, se a constante de equilíbrio da reação de transglicosilação for baixa, os esforços para melhorar as seletividades daria retornos limitados; também é necessário manipular a reação para aumentar a constante de equilíbrio.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo desenvolvido no trabalho atual pode ser usado para determinar tanto a seletividade para transglicosilação em relação à hidrólise primária quanto a seletividade para a transglicosilação em relação à hidrólise secundária.

O modelo também é uma ferramenta útil para guiar os esforços para melhorar o rendimento do produto de transglicosilação: tais esforços não devem ser limitados a melhorar as seletividades da enzima para transglicosilação em relação a hidrólise primária e secundária, também devem ser consideradas estratégias para maximizar a constante de equilíbrio da reação de transglicosilação.

8 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O modelo do trabalho atual foi desenvolvido para sistemas que apresentem um único produto de transglicosilação. Desta forma, propõem-se trabalhos futuros que visam estender o modelo desenvolvido para sistemas em que se têm vários produtos de transglicosilação distintos. O número de parâmetros destes modelos, entretanto, aumentam de forma significativa, já que cada produto de transglicosilação distinto terá sua própria reação de hidrólise secundária. Além disso, será também preciso identificar a seletividade da enzima para as diferentes transglicosilações que ocorrem em paralelo.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Comparison of lipases and glycoside hydrolases as catalysts in synthesis reactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**.101 (2017) 513–519, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8055-x>.
- ARAB-JAZIRI, F.; BISSARO, B.; DION, M.; SAUREL, O.; HARRISON, D.; FERREIRA, F.; MILON, A.; TELLIER, C.; FAURÉ, R.; O'DONOHUE, M.J. Engineering transglycosidase activity into a GH51 α -L-arabinofuranosidase. **New Biotechnology**. 30 (2013) 536- 544, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.04.002>.
- BELORKAR, S.A.; GRUPTA, A.K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. **AMB Expr**. 6 (2016) 82. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0253-5>.
- BISSARO, B. **La partition Hydrolyse / Transglycosylation chez les Glycoside Hydrolases: Proposition d'une hypothèse de synthèse à travers l'évolution moléculaire d'une α -L-arabinofuranosidase de la famille GH51 vers les premières transarabinofuranosylases de type non-Leloir**. Biochimie, Biologie Moléculaire. INSA de Toulouse, 2014. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-150901423847>.
- BISSARO, B.; DURAND, J.; BIARNÉS, X.; PLANAS, A.; MONSAN, P.; O'DONOHUE, M.J.; FAURÉ, R. Molecular design of non-Leloir furanose-transferring enzymes from α -L-arabinofuranosidase: A rationale for the engineering of evolved transglycosylases. **ACS Catalysis**. 5 (2015) 4598–4611, <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00949>.
- BOHIN, C.; PRAESTGAARD, E.; BAUMANN, M.J.; BORCH, K.; PRAESTGAARD, J.; MONRAD, R.N.; WESTH, P. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 97 (2013) 159-169, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3875-9>.
- CASA-VILLEGAS, M.; MARIN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. **Amylase** 2 (2018) 17–29. <https://doi.org/10.1515/amylase-2018-0003>.
- CHEN, H.; YANG, S.; XU, A.; JIANG, R.; TANG, Z.; WU, J.; ZHU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; LU, Y. Insight into the glycosylation and hydrolysis kinetics of α -glucosidase in the synthesis of glycosides. **Applied Microbiology and Biotechnology**.103 (2019) 9423–9432, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10205-6>.
- CHOI, B.; REMPALA, G.A.; KIM, J.K. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. **Sci. Rep**. 7:17018, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>.
- CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**, fourth ed., Wiley-Blackwell, Weinheim, 2012.

COSTA, S. G. **Purificação e caracterização bioquímica de β -glucosidases de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na suplementação de coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassas.** 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2017.

CUNHA, J. S. **produção e caracterização da enzima frutotransferase de *Aspergillus oryzae* ipt-301 visando a obtenção de frutooligosacarídeos.** 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alfenas. Instituto de Ciência e Tecnologia – Campus Poços de Caldas. Minas Gerais, 2017.

FAIJES, M.; PLANAS, A. (2007). In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1581–1594.

FANG, T.Y.; TSENG, W.C.; CHUNG, Y.T.; PAN, C.H. Mutations on aromatic residues of the active site to alter selectivity of the *Sulfolobus solfataricus* maltotriose synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54 (2006) 3585-3590, <https://doi.org/10.1021/jf060152>.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 17 (2018) 678-697. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>.

FLORINDO, R.N.; SOUZA, V.P.; UTTI, H.S. M; CAMILO, C.; MANZINE, L.R.; MARANA, S.R.; POLIKARPOV, I.; NASCIMENTO, A.S. Structural insights into β -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*. **New Biotechnology**. 40 (2018) 218–227, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.012>.

FRUTUOSO, M. A. **Estudo das bases moleculares de reações de transglicosilação em β -glicosidases GH1 de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*.** 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Bioquímica, Instituto de Química de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-10102014-111007/publico/DissertMairaArtisheffFrutuoso.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FRUTUOSO, M.A.; MARANA, S.R. A single amino acid residue determines the ratio of hydrolysis to transglycosylation catalyzed by β -glucosidases. **Protein e Peptide Letters**. (2013) 102-106, <https://doi.org/10.2174/0929866511307010102>.

GIESE, E. C.; HIROSI, T.; CORRADI DA SILVA, M. L.; da SILVA, R.; MELO, A. **Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos.** Semina: Ciências Agrárias, 32, 2, abril-junho, 2011, 683-699 Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil

GUERRERO, C.; CONEJEROS, R. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**. 70 (2015) 9-17, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>.

HANSSON, T.; ANDERSSON, M.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Influence of water activity on the competition between β -glycosidase-catalysed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. **Enzyme and Microbial Technology**. 29 (2001) 527– 534. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00421-5).

HOFFMANN, C.; GREY, C.; PINELO, M.; WOODLEY, J.M.; DAUGAARD, A.E.; ADLERCREUTZ, P. Improved alkyl glycoside synthesis by trans-glycosylation through tailored microenvironments of immobilized β -glucosidase. **ChemPlusChem** (2020) 137-141, <https://doi.org/10.1002/cplu.201900680>.

HUBER, R.E.; KURZ, G.; WALLENFELS, K. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. **Biochemistry** 15 (1976) 1994-2001, <https://doi.org/10.1021/bi00654a029>.

KING, E.L.; ALTMAN, C. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme catalyzed reactions. **Journal of Physical Chemistry A**. 60 (1956) 1375–1378. <https://doi.org/10.1021/j150544a010>.

KITTL, R.; WITHERS, S. G. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed Evolution. **Carbohydrate Research**. 345 (2010) 1272–1279. doi:10.1016/j.carres.2010.04.002

KLIMACEK, M.; SIGG, A.; NIDETZKY, B. On the donor substrate dependence of group-transfer reactions by hydrolytic enzymes: Insight from kinetic analysis of sucrose phosphorylase-catalyzed transglycosylation. **Biotechnology and Bioengineering**. 117 (2020) 2933-2943, <https://doi.org/10.1002/bit.27471>.

MALET, C.; PLANAS, A. (1998). From b-glucanase to b-glucansynthase: glycosyl transfer to a-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. **FEBS Letters**, v. 440, p. 208 – 212. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01448-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01448-3)

MANO, M.C.R.; IA Neri-Numa; SILVA, J. B.; PAULINO, B. N.; PESSOA, M. G.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 102 (2018) 17–37. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>.

MARTINS, G.N.; URETA, M.M.; TYMCZYSZYN, E.E.; CASTILHO, P. C.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A. Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. enzymatic synthesis and hydrolysis. **Frontiers in Nutrition** (2019) 78 <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>.

McCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, 4, 885–892. [http://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](http://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2).

MLADENOSKA, I. Synthesis of octyl- β -glucoside catalyzed by almond β - glucosidase in unconventional reaction media. **Food Technology and Biotechnology**. (2016) 211–216, <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4068>.

MLADENOSKA, I.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.
Transgalactosylation/hydrolysis ratios of various β -galactosidases catalyzing alkyl- β -galactoside synthesis in single-phased alcohol media. **Food Technology and Biotechnology**. 46 (2008) 311–316, <https://hrcak.srce.hr/file/41735>.

MLADENOSKA, I.; GREY, C.E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; ADLERCREUTZ, P. Competition between transglycosylation and hydrolysis in almond β -glucosidase-catalyzed conversion of p-nitrophenyl- β -D-glucoside in monophasic water/alcohol mixtures. **Biocatalysis and Biotransformation** 25 (2007) 382–385, <https://doi.org/10.1080/10242420701510494>.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Looking through a new lens: Expressing the Ping Pong bi bi equation in terms of specificity constants. **Biochemical Engineering Journal**. 178 (2022) 108276. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108276>.

MITCHELL, D.A.; CARRIÈRE, F.; KRIEGER, N. An analytical method for determining relative specificities for sequential reactions catalyzed by the same enzyme: General for mutation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. (2008) 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.015>.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p385-390, 2003. ISSN 0103-8478

PEREIRA, A.B.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A. Fingerprinting of oligosaccharide hydrolyzing enzymes that catalyze branched reaction schemes. **Biochemical Engineering Journal**. 113 (2016) 93–101, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.012>.

SANGWAN, V.; TOMAR, S.K.; SINGH, R.R.B.; SINGH, A.K.
Galactooligosaccharides: Novel components of designer foods. **Journal of Food Science** 76 (2011), R103-R111. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x>.

TEZE, D.; ZHAO, J.; WIEMANN, M.; KAZI, Z.G.A.; LUPO, R.; ZEUNER, B.; VUILLEMIN, M.; RØNNE, M.E.; CARLSTRÖM, G.; DUUS, J.Ø.; SANEJOUAND, Y.-H.; O'DONOHUE, M.J.; KARLSSON, E.N.; FAURÉ, R.; STÅLBRAND, H.; SVENSSON, B. Rational enzyme design without structural knowledge: A sequence-based approach for efficient generation of transglycosylases. **Chemistry - A European Journal**. 27 (2021) 10323–10334. <https://doi.org/10.1002/chem.202100110>.

TORRES, D.P.M.; GONÇALVES, M.P.F.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R.
Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 9 (2010) 438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>.

VAN RANTWIJK, F.; WOUDEBERG-VAN OOSTEROM, M.; SHELDON, R.A.
Glycosidase catalysed synthesis of alkyl glycosides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 6 (1999) 511–532. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00042-9).

YANG, J.; WANG, Q.; ZHOU, Y.; LI, J.; GAO, R.; GUO, Z. Engineering T. naphthophila β -glucosidase for enhanced synthesis of galactooligosaccharides by site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**. 127 (2017) 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.07.008>.

ZHAO, J.; TANDRUP, T.; BISSARO, B.; BARBE, S.; POULSEN, J.C.N.; ANDRÉ, I.; LEGGIO, L.L.; O'DONOHUE, M.J.; FAURÉ, R. Probing the determinants of the transglycosylation/hydrolysis partition in a retaining α -L- arabinofuranosidase. **New Biotechnology**. 62 (2021) 68–78, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.01.008>.

Os anexos a seguir são uma reprodução, com algumas modificações, do material suplementar do artigo intitulado “Enzymatic transglycosylation by the Ping Pong bi bi mechanism: Selectivity for transglycosylation versus primary and secondary hydrolysis” publicado em 20 de abril de 2022 por Biochemical Engineering Journal (Volume 182, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108440>). Embora o material suplementar esteja apresentado na forma de anexos individuais nesta dissertação, a numeração das equações do material suplementar do artigo foi mantida.

Copyright © 2022 Elsevier, reproduzido com autorização da Elsevier.

Josiane Proença Fagundes ^a, Fernando Augusto Pederson Voll ^{a,b}, Nadia Krieger ^{a,c}, David Alexander Mitchell ^{a,d}

^a Postgraduate Program in Chemical Engineering, Federal University of Paraná, P.O. Box 19011, Polytechnic Center, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

^b Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, P.O. Box 19011, Polytechnic Center, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Paraná, P.O. Box 19032, Polytechnic Center, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19046, Polytechnic Center, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

E-mail addresses:

Josiane Proença Fagundes (josih.proenca@gmail.com)

Fernando Augusto Pederson Voll (fernando_voll@utfpr.br)

Nadia Krieger (nkrieger@ufpr.br)

David Alexander Mitchell (davidmitchell@ufpr.br)

ANEXO 1

Overview of the system described by the model

This work addresses the kinetics of enzyme-catalyzed reactions that follow the Ping Pong bi bi mechanism (also known as the substituted enzyme mechanism) in the particular case in which the following three competing reactions are possible:



In each of these reactions, the first letter on the left-hand side represents the first substrate to enter the active site and the second letter on the left-hand side represents the second substrate to enter the active site. In a similar manner, the first letter on the right-hand side represents the first product to leave the active site and the second letter on the right-hand side represents the second product to leave the active site. When the same letter is used, it represents the same chemical species. In other words, there are 6 species in the system: A, B, P, Q, b and q.

Using the reaction " $A + B \rightleftharpoons P + Q$ " as an example, the order of events in the Ping Pong bi bi mechanism is as follows

1. The free enzyme binds to the first substrate (2a)

$$E + A \rightleftharpoons EA$$
2. The substrate transfers a group to the enzyme, producing a "substituted enzyme" and the first product (2b)

$$EA \rightleftharpoons E^*P$$
3. The first product is released, leaving the substituted enzyme in solution (2c)

$$E^*P \rightleftharpoons E^* + P$$
4. The substituted enzyme binds to the second substrate (2d)

$$E^* + B \rightleftharpoons E^*B$$
5. The substituted enzyme transfers the group to the second substrate, producing the second product (2e)

$$E^*B \rightleftharpoons EQ$$
6. The complex between the enzyme and the second product dissociates (2f)

$$EQ \rightleftharpoons E + Q$$

Since it is not possible to distinguish EA and E*P in steady-state kinetics, they are treated as a single species and represented by EA. Likewise, since it is not possible to distinguish E*B and EQ in steady-state kinetics, they are treated as a single species and represented by EQ. This results in the following four-step scheme for the Ping Pong bi bi reaction:

1. Binding of the first substrate $E + A \rightleftharpoons EA$ (3a)
2. Reaction to produce the first product, which is liberated $EA \rightleftharpoons E^* + P$ (3b)
3. Binding of the substituted enzyme to the second substrate, with reaction to produce the second product $E^* + B \rightleftharpoons E^*Q$ (3c)
4. Release of the second product $E^*Q \rightleftharpoons E + Q$ (3d)

Applying these steps to the reaction $A + b \rightleftharpoons P + q$ results in:

1. Binding of the first substrate $E + A \rightleftharpoons EA$ (4a)
2. Reaction to produce the first product, which is liberated $EA \rightleftharpoons E^* + P$ (4b)
3. Binding of the substituted enzyme to the second substrate, with reaction to produce the second product $E^* + b \rightleftharpoons E^*q$ (4c)
4. Release of the second product $E^*q \rightleftharpoons E + q$ (4d)

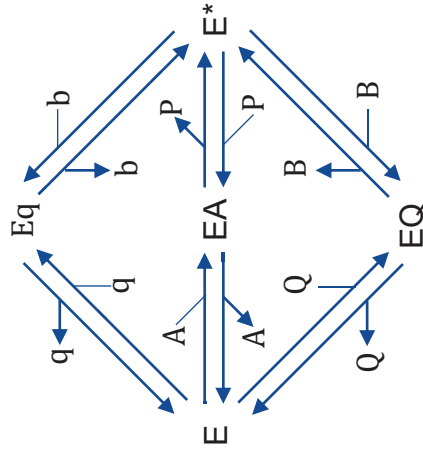
Likewise, applying these steps to the reaction $Q + b \rightleftharpoons B + q$ results in:

1. Binding of the first substrate $E + Q \rightleftharpoons EQ$ (5a)
2. Reaction to produce the first product, which is liberated $EQ \rightleftharpoons E^* + B$ (5b)
3. Binding of the substituted enzyme to the second substrate, with reaction to produce the second product $E^* + b \rightleftharpoons E^*q$ (5c)
4. Release of the second product $E^*q \rightleftharpoons E + q$ (5d)

An analysis of Eqs. (3), (4) and (5) shows that various of the reaction steps are common to more than one reaction. This can be shown more clearly by drawing the reaction scheme in a manner that shows the links between each form of the enzyme and in which each form of the enzyme appears only once (Fig. 1). Additionally, it is important to note that the substituted enzyme " E^* " is exactly the same in all three reactions.

In Annexes 2 to 6, we use the King-Altman method (1956) to derive kinetic equations for the system represented by Eqs. (1a) to (1c), using the procedure outlined by Cornish-Bowden (2012). In Annexes 7, we then use these kinetic equations to develop a model for transglycosylation in terms of the percentage consumption of the donor (species A).

(a)



(b)

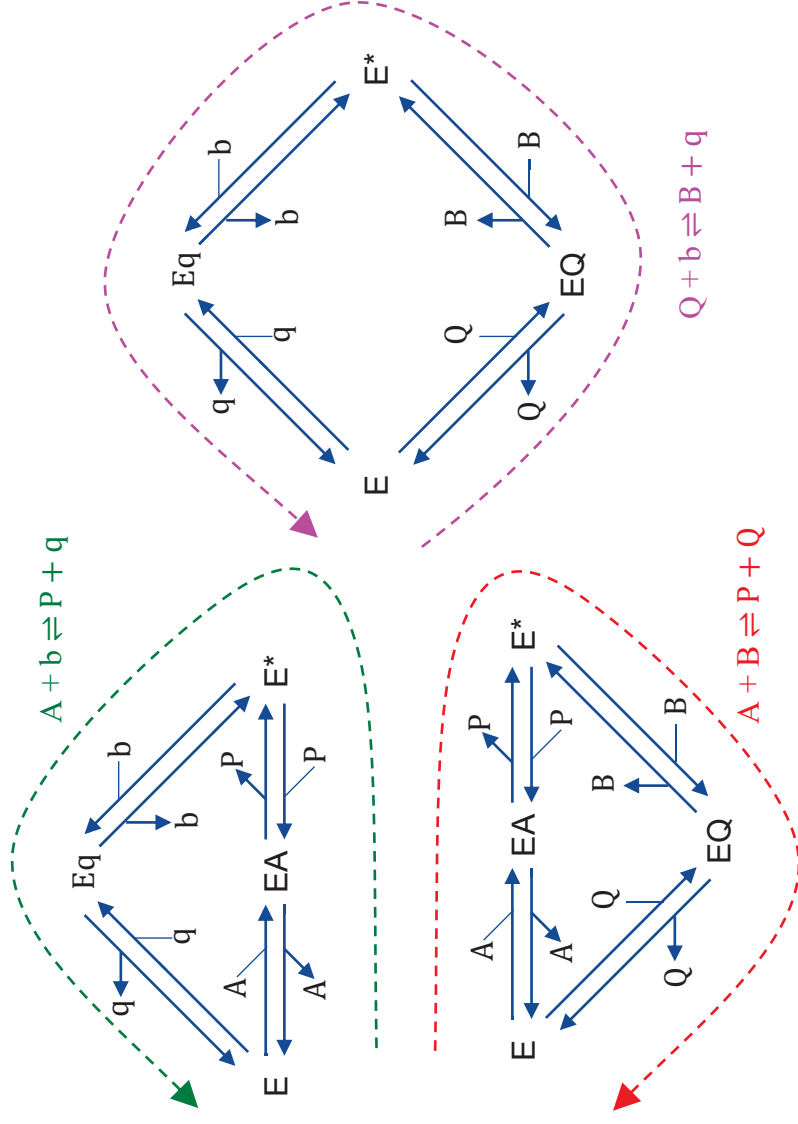


Figure 1: The reaction system that is analyzed in the current work. (a) Representation of the three reactions in a scheme in which each form of the enzyme appears only once. (b) Identification of the three individual (reversible) reactions that are possible given the scheme in (a). Two key features of this scheme are, first, that various of the reaction steps are common to more than one reaction and, second, that the substituted enzyme “ E^* ” is exactly the same in all three reactions.

ANEXO 2

Identification of the master pattern and the derived patterns for application of King-Altman method

Figure 2 shows the master pattern for the three reactions given in Eq. (1) and Fig. 3 shows the set of patterns derived from this master pattern. These derived patterns have the following characteristics (CORNISH-BOWDEN, 2012):

- they follow lines of the master pattern.
- they connect all of the enzyme forms that appear in the master pattern.
- they do not contain any closed loops.

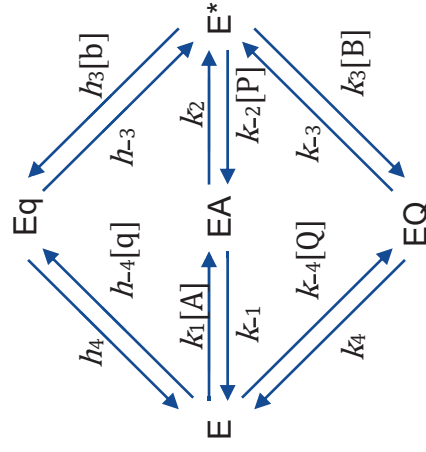


Figure 2: Master pattern used in the King-Altman method for deriving the rate equations for the reaction scheme in Figure 1a.

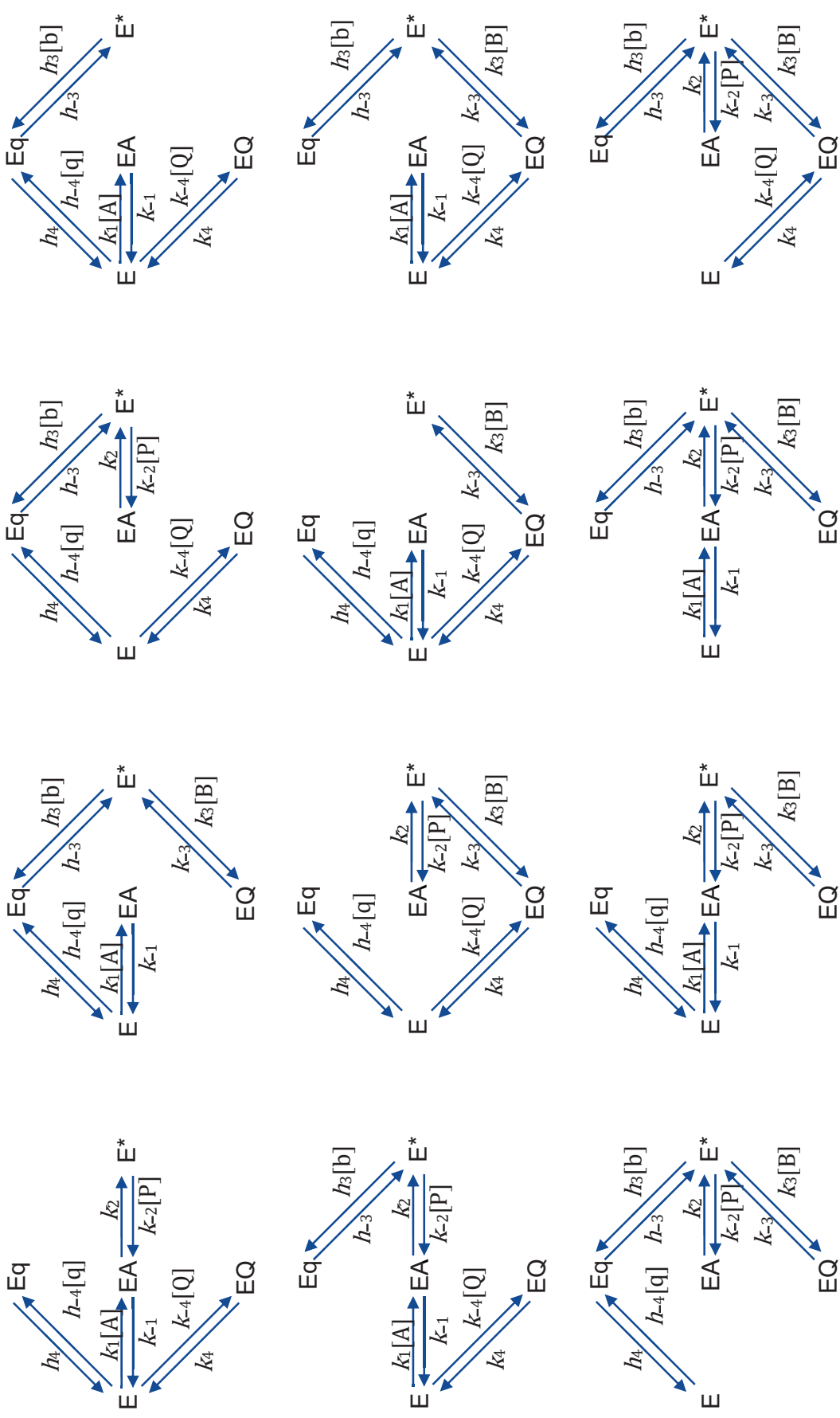


Figure 3: Patterns derived from the master pattern given in Figure 2. The rules for these derived patterns are given at the beginning of Annexes 2.

Use of the derived patterns to calculate the fractions of each of the enzyme forms

The derived patterns are used to guide the writing of the equations for the fractions of each enzyme form. For each enzyme form, the derived patterns are redrawn, retaining only the arrows that point towards the enzyme form being considered, along the routes available in the pattern. In each case, expressions are written for the numerators of the fractions. The denominator, denoted d , given as the sum of all the numerators, is calculated last. In the following subsections, the terms in the equations are written in the same sequence as the corresponding derived patterns appear in the figures.

1. Deduction of the equation for the fraction of the free enzyme (E)

From Fig. S4, the expression for the fraction of the enzyme in the form of free enzyme can be written as

$$\frac{[E]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_{-1}k_{-2}[P]k_4h_4 + k_{-1}k_{-3}h_3[b]h_4 + k_4k_2h_3[b]h_4 + k_{-1}k_4h_3[b]h_4 \\ + h_{-3}k_{-2}[P]k_{-1}k_4 + k_3[B]k_4k_2h_4 + k_{-1}k_3[B]k_4h_4 + k_{-1}k_3[B]k_4h_{-3} \\ + k_2k_{-3}h_3[b]h_4 + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-3}h_4 + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3} + k_2h_{-3}k_3[B]k_4 \end{array} \right)}{d} \quad (6)$$

The terms in this equation can be reorganized to group terms with the same species together

$$\frac{[E]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_3[B]k_4k_2h_4 + k_{-1}k_3[B]k_4h_4 + k_{-1}k_3[B]k_4h_{-3} + k_2h_{-3}k_3[B]k_4 \\ + k_{-1}k_{-2}[P]k_4h_4 + h_{-3}k_{-2}[P]k_{-1}k_4 + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-3}h_4 + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3} \\ + k_{-1}k_{-3}h_3[b]h_4 + k_4k_2h_3[b]h_4 + k_{-1}k_4h_3[b]h_4 + k_2k_{-3}h_3[b]h_4 \end{array} \right)}{d} \quad (7)$$

In this equation, the various terms can be rewritten as follows

$$\frac{[E]}{[E]_T} = \frac{\left(\frac{k_3 k_4 (k_2 h_4 + k_{-1} h_4 + k_{-1} h_{-3} + k_2 h_{-3}) [B]}{+ k_{-1} k_{-2} (k_4 h_4 + h_{-3} k_4 + k_{-3} h_4 + k_{-3} h_{-3}) [P]} \right)}{d} = \frac{\left(\frac{k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B]}{+ k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P]} \right)}{d} \quad (8)$$

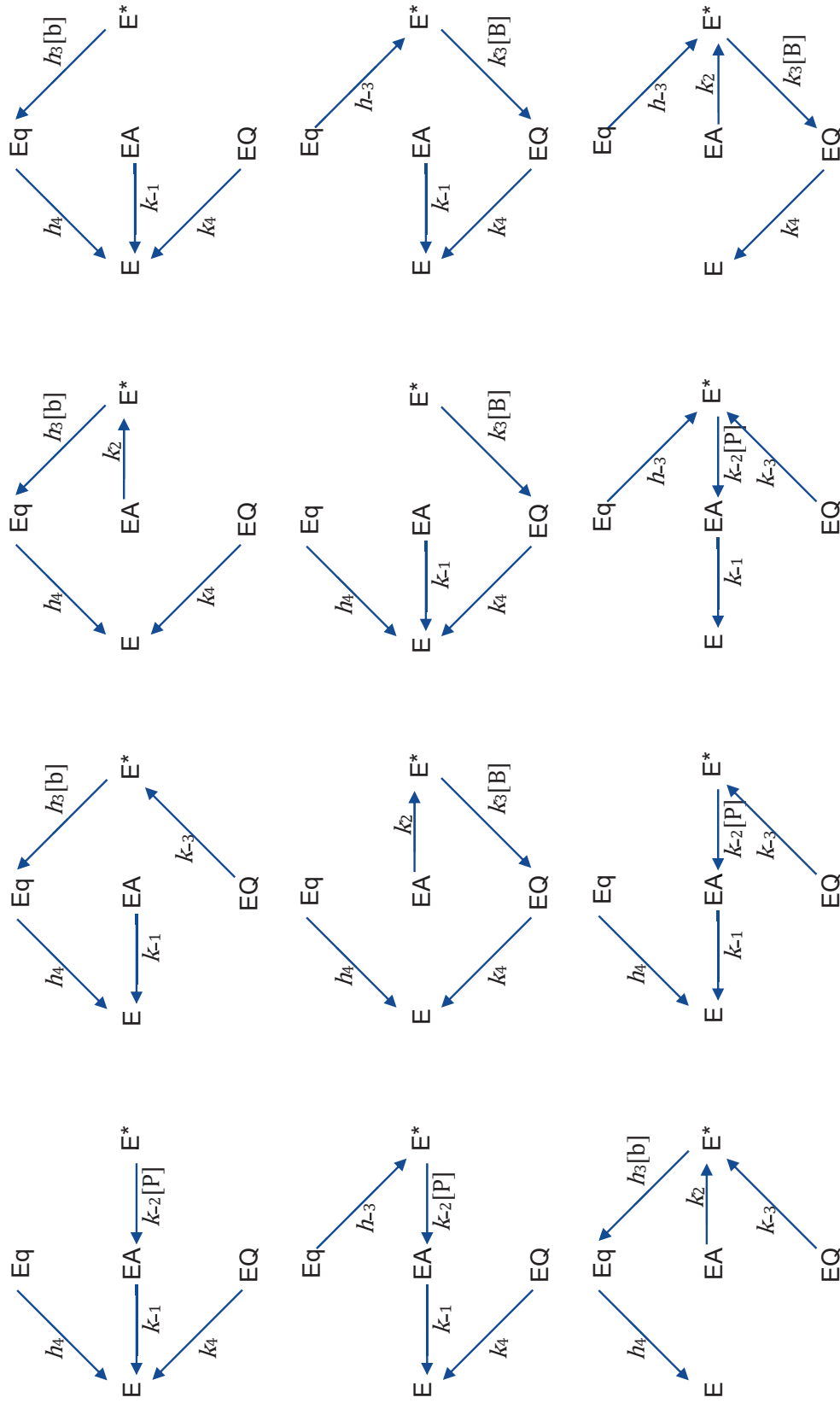


Figure 4: Derived patterns redrawn only with the arrows pointing to the free enzyme.

2. Deduction of the equation for the fraction of the enzyme complex EA

From Figure 5, the expression for the fraction of the enzyme in the form of EA can be written as

$$\frac{[EA]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1[A]k_{-2}[P]k_4h_4 + k_1[A]k_{-3}h_3[b]h_4 + k_4k_{-2}[P]h_{-3}h_{-4}[q] + k_4k_1[A]h_3[b]h_4 \\ + k_4k_1[A]k_{-2}[P]h_{-3} + k_{-4}[Q]k_{-3}k_{-2}[P]h_4 + k_3[B]k_4k_1[A]h_4 + k_3[B]k_4k_1[A]h_{-3} \\ + k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] + k_{-3}k_{-2}[P]k_1[A]h_4 + k_1[A]k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3} + k_{-2}[P]k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} \end{array} \right)}{d} \quad (9)$$

The terms in this equation can be reorganized to group terms with the same species together

$$\frac{[EA]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_3[B]k_4k_1[A]h_4 + k_3[B]k_4k_1[A]h_{-3} \\ + k_1[A]k_{-2}[P]k_4h_4 + k_4k_1[A]k_{-2}[P]h_{-3} + k_{-3}k_{-2}[P]k_1[A]h_4 + k_1[A]k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3} \\ + k_{-4}[Q]k_{-3}k_{-2}[P]h_4 + k_{-2}[P]k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_1[A]k_{-3}h_3[b]h_4 + k_4k_1[A]h_3[b]h_4 \\ + k_4k_{-2}[P]h_{-3}h_{-4}[q] + k_{-2}[P]k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] \end{array} \right)}{d} \quad (10)$$

In this equation, the various terms can be rewritten as follows

$$\frac{[EA]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_3k_4(h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_1k_{-2}(k_4h_4 + k_4h_{-3} + k_{-3}h_4 + k_{-3}h_{-3})[A][P] \\ + k_{-2}k_{-3}k_{-4}(h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_1h_3h_4(k_{-3} + k_4)[A][b] \\ + k_{-2}h_{-3}h_{-4}(k_4 + k_{-3})[P][q] \end{array} \right)}{d} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_3k_4(h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_1k_{-2}(k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A][P] \\ + k_{-2}k_{-3}k_{-4}(h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_1h_3h_4(k_{-3} + k_4)[A][b] \\ + k_{-2}h_{-3}h_{-4}(k_4 + k_{-3})[P][q] \end{array} \right)}{d} \quad (11)$$

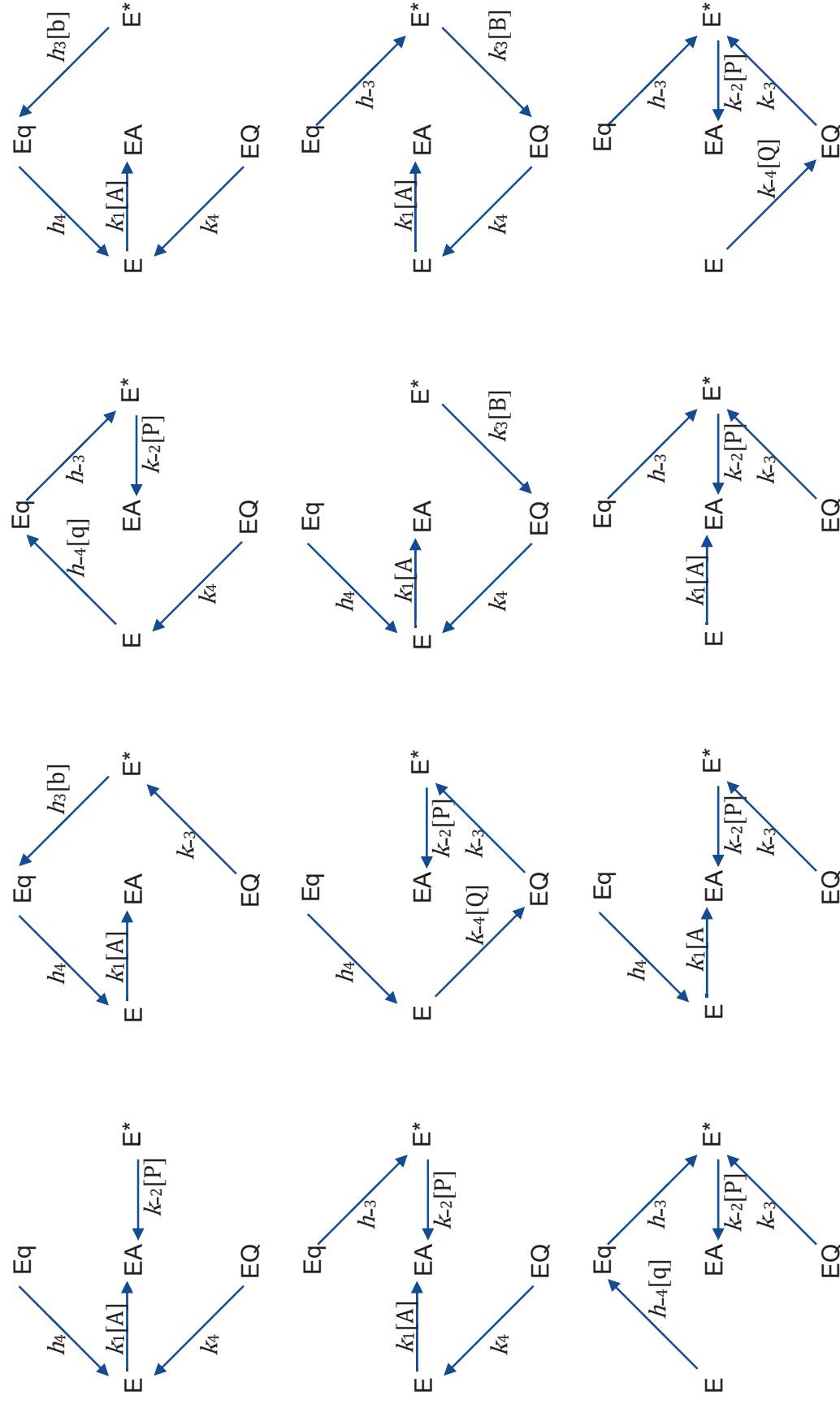


Figure 5: Derived patterns redrawn only with the arrows pointing to the enzyme complex EA.

3. Deduction of the equation for the fraction of the substituted enzyme (E^*)

From Figure 6, the expression for the fraction of the enzyme in the form of the substituted enzyme E^* is given by

$$\frac{[E^*]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1[A]k_2k_4h_4 + k_{-1}k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] + k_4k_2h_{-3}h_{-4}[q] + k_4k_{-1}h_{-3}h_{-4}[q] \\ + k_4k_1[A]k_2h_{-3} + k_2k_{-3}k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_2k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] + k_1[A]k_2k_{-3}h_4 + k_1[A]k_2k_{-3}h_{-3} + k_2k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} \end{array} \right)}{d} \quad (12)$$

The terms in this equation can be reorganized to group terms with the same species together

$$\frac{[E^*]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1[A]k_2k_4h_4 + k_4k_1[A]k_2h_{-3} + k_1[A]k_2k_{-3}h_4 + k_1[A]k_2k_{-3}h_{-3} \\ + k_2k_{-3}k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} + k_2k_{-3}k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_4k_2h_{-3}h_{-4}[q] + k_{-1}k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] + k_4k_{-1}h_{-3}h_{-4}[q] + k_2k_{-3}h_{-3}h_{-4}[q] \end{array} \right)}{d} \quad (13)$$

In this equation, the various terms can be rewritten as follows

$$\frac{[E^*]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_2(k_4h_4 + k_4h_{-3} + k_{-3}h_4 + k_{-3}h_{-3})[A] \\ + k_{-3}k_{-4}(k_2h_4 + k_{-1}h_4 + k_{-1}h_{-3} + k_2h_{-3})[Q] \\ + h_{-3}h_{-4}(k_4k_2 + k_{-1}k_{-3} + k_4k_{-1} + k_2k_{-3})[q] \end{array} \right)}{d} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_2(k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A] \\ + k_{-3}k_{-4}(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[Q] \\ + h_{-3}h_{-4}(k_2 + k_{-1})(k_{-3} + k_4)[q] \end{array} \right)}{d} \quad (14)$$

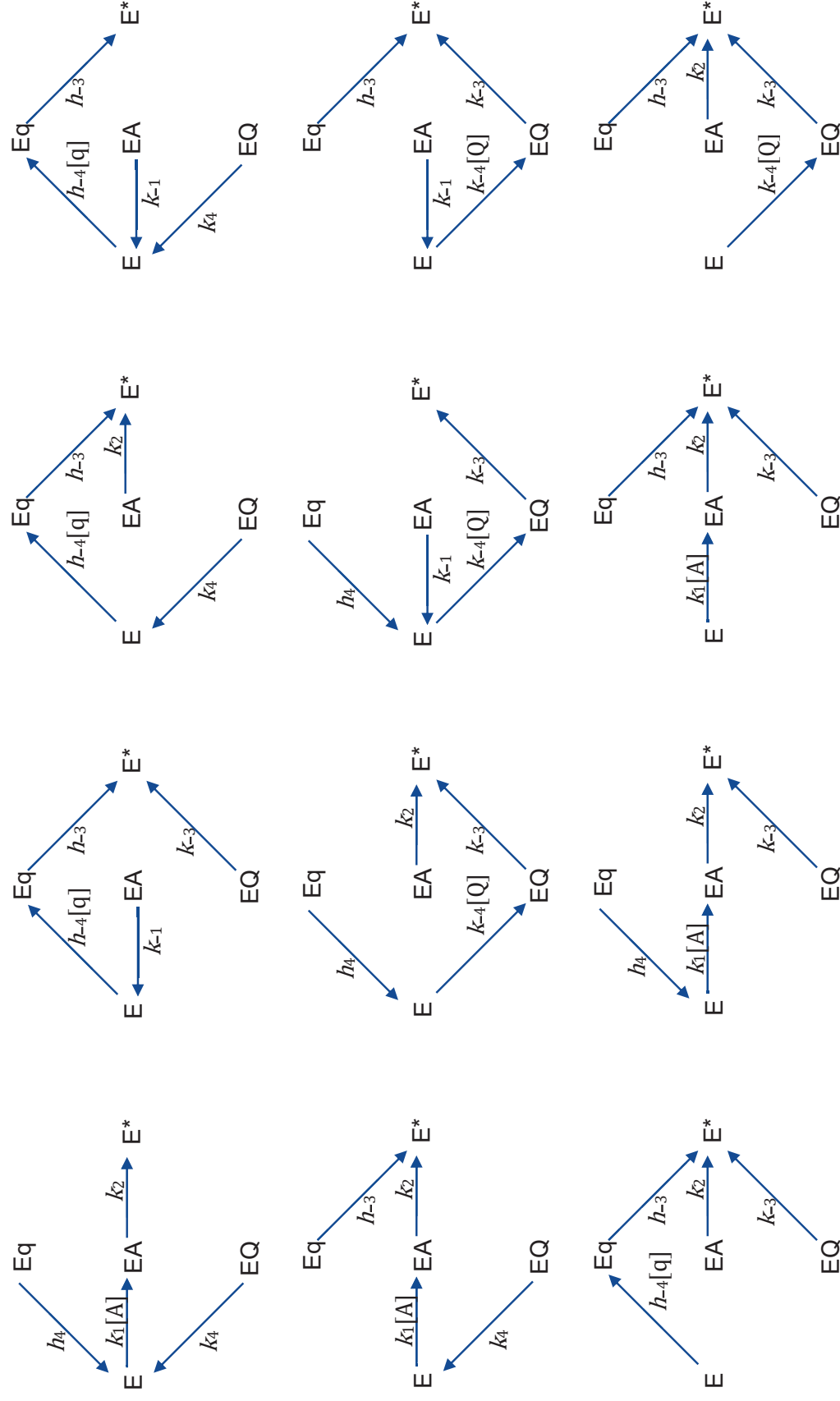


Figure 6: Derived patterns redrawn only with the arrows pointing to the substituted enzyme (E^*).

4. Deduction of the equation for the fraction of the enzyme complex EQ

From Figure 7, the expression for the fraction of the enzyme in the form of the complex EQ is given by

$$\frac{[EQ]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_{-1}k_{-2}[P]k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_3[B]h_{-3}h_{-4}[q] + k_2k_{-4}[Q]h_3[b]h_4 + k_{-1}k_{-4}[Q]h_3[b]h_4 \\ + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-4}[Q]h_{-3} + k_2k_3[B]k_{-4}[Q]h_4 + k_3[B]k_{-1}k_{-4}[Q]h_4 + k_3[B]k_{-1}k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_3[B]k_2h_{-3}h_{-4}[q] + k_1[A]k_2k_3[B]h_4 + k_1[A]k_2k_3[B]h_{-3} + k_2k_3[B]k_{-4}[Q]h_{-3} \end{array} \right)}{d} \quad (15)$$

The terms in this equation can be reorganized to group terms with the same species together

$$\frac{[EQ]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1[A]k_2k_3[B]h_4 + k_1[A]k_2k_3[B]h_{-3} \\ + k_2k_3[B]k_{-4}[Q]h_4 + k_3[B]k_{-1}k_{-4}[Q]h_4 + k_3[B]k_{-1}k_{-4}[Q]h_{-3} + k_2k_3[B]k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-4}[Q]h_4 + k_{-1}k_{-2}[P]k_{-4}[Q]h_{-3} \\ + k_{-1}k_3[B]h_{-3}h_{-4}[q] + k_3[B]k_2h_{-3}h_{-4}[q] \\ + k_2k_{-4}[Q]h_3[b]h_4 + k_{-1}k_{-4}[Q]h_3[b]h_4 \end{array} \right)}{d} \quad (16)$$

In this equation, the various terms can be rewritten as follows

$$\frac{[EQ]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_2k_3(h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_3k_{-4}(k_2h_4 + k_{-1}h_4 + k_{-1}h_{-3} + k_2h_{-3})[B][Q] \\ + k_{-1}k_{-2}k_{-4}(h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_3h_{-3}h_{-4}(k_{-1} + k_2)[B][q] \\ + k_{-4}h_3h_4(k_2 + k_{-1})[Q][b] \end{array} \right)}{d} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_2k_3(h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_3k_{-4}(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B][Q] \\ + k_{-1}k_{-2}k_{-4}(h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_3h_{-3}h_{-4}(k_{-1} + k_2)[B][q] \\ + k_{-4}h_3h_4(k_2 + k_{-1})[Q][b] \end{array} \right)}{d} \quad (17)$$

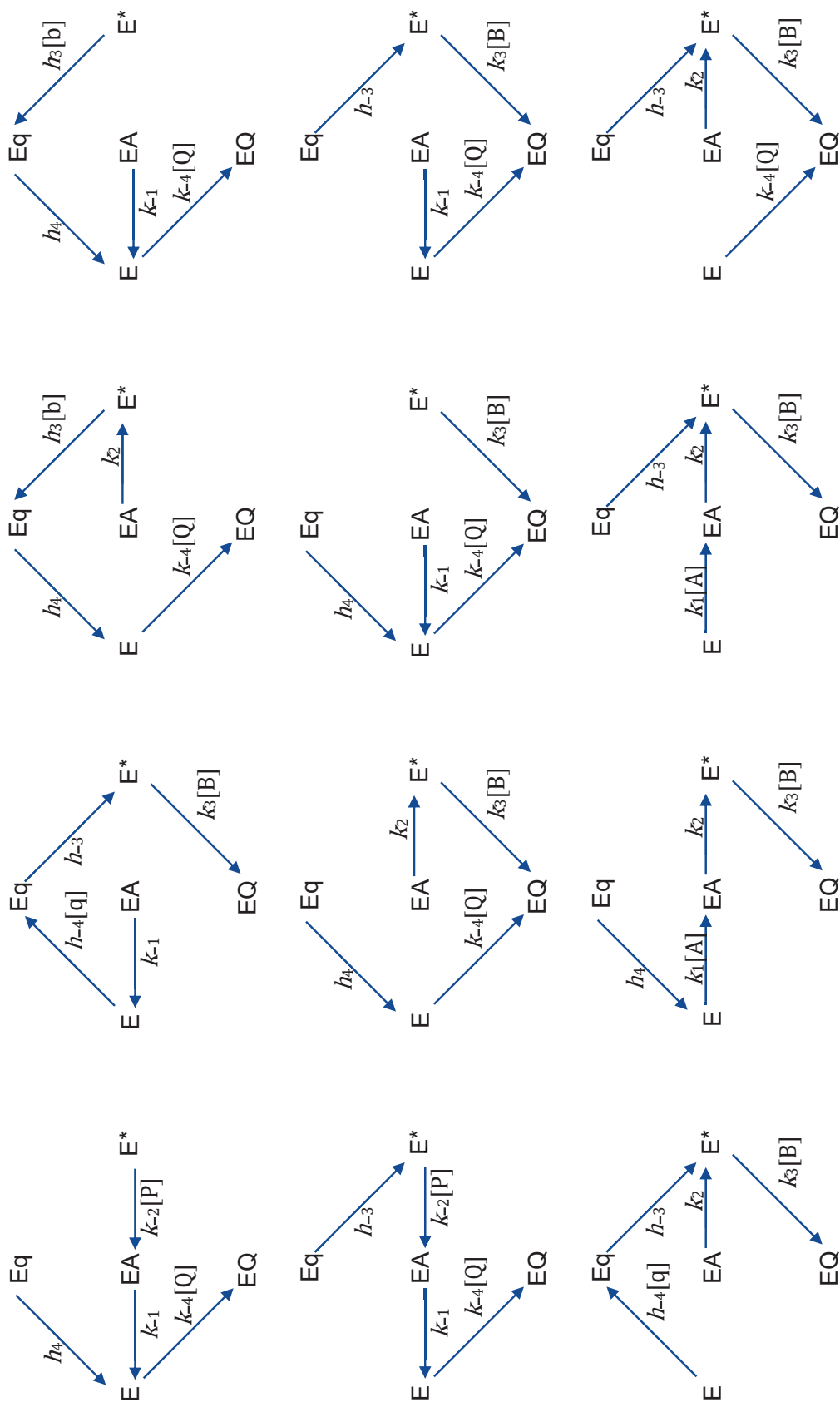


Figure 7: Derived patterns redrawn only with the arrows pointing to the enzyme complex EQ.

5. Deduction of the equation for the fraction of the enzyme complex Eq

From Figure 8, the expression for the fraction of the enzyme in the form of the complex Eq is given by

$$\frac{[Eq]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_4 k_{-1} k_{-2} [P] h_{-4} [q] + k_{-1} k_{-3} h_3 [b] h_{-4} [q] + k_2 k_4 h_3 [b] h_{-4} [q] + k_{-1} k_4 h_3 [b] h_{-4} [q] \\ + k_1 [A] k_2 k_4 h_3 [b] + k_2 k_3 [B] k_4 h_{-4} [q] + k_3 [B] k_4 k_{-1} h_{-4} [q] + k_{-1} k_{-3} k_{-4} [Q] h_3 [b] \\ + k_2 k_{-3} h_3 [b] h_{-4} [q] + k_{-1} k_{-2} [P] k_{-3} h_{-4} [q] + k_1 [A] k_2 k_{-3} h_3 [b] + k_2 k_{-3} k_{-4} [Q] h_3 [b] \end{array} \right)}{d} \quad (18)$$

The terms in this equation can be reorganized to group terms with the same species together

$$\frac{[Eq]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1 [A] k_2 k_4 h_3 [b] + k_1 [A] k_2 k_{-3} h_3 [b] \\ + k_2 k_3 [B] k_4 h_{-4} [q] + k_3 [B] k_4 k_{-1} h_{-4} [q] \\ + k_4 k_{-1} k_{-2} [P] h_{-4} [q] + k_{-1} k_{-2} [P] k_{-3} h_{-4} [q] \\ + k_{-1} k_{-3} k_{-4} [Q] h_3 [b] + k_2 k_{-3} k_{-4} [Q] h_3 [b] \end{array} \right)}{+ k_{-1} k_{-3} h_3 [b] h_{-4} [q] + k_2 k_4 h_3 [b] h_{-4} [q] + k_{-1} k_4 h_3 [b] h_{-4} [q] + k_2 k_{-3} h_3 [b] h_{-4} [q]} \quad (19)$$

In this equation, the various terms can be rewritten as follows

$$\frac{[Eq]}{[E]_T} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b] \\ + k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q] \\ + k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q] \\ + k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q] [b] \end{array} \right) \left(\begin{array}{l} k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b] \\ + k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q] \\ + k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q] \\ + k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q] [b] \end{array} \right)}{+ h_3 h_{-4} (k_{-1} k_{-3} + k_2 k_4 + k_{-1} k_4 + k_2 k_{-3}) [b] [q]} = \frac{+ h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2) (k_{-3} + k_4) [b] [q]}{d} \quad (20)$$

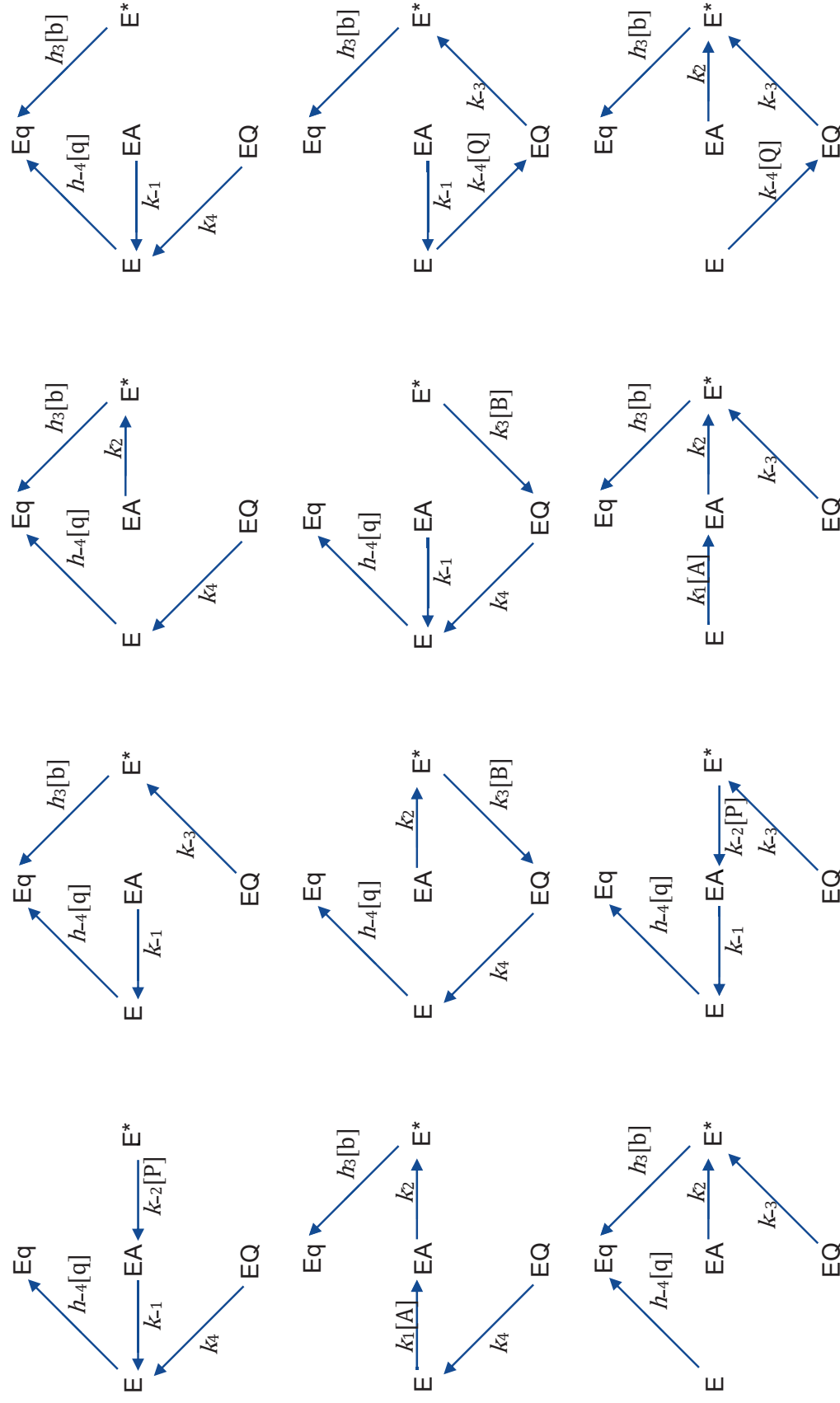


Figure 8: Derived patterns redrawn only with the arrows pointing to the enzyme complex Eq.

ANEXO 3

Deduction of expressions for the numerators of the rate equations

The rates of production of the product Q and the product q are given by

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_4[EQ] - k_{-4}[E][Q] \quad (21a)$$

$$\frac{d[q]}{dt} = h_4[Eq] - h_{-4}[E][q] \quad (21b)$$

Equation (8) can be rearranged to give an expression for [E]

$$[E] = \left(\frac{k_3k_4(k_2+k_{-1})(h_4+h_{-3})[B]}{+k_{-1}k_{-2}(k_4+k_{-3})(h_4+h_{-3})[P]} + h_3h_4(k_2+k_{-1})(k_4+k_{-3})[b] \right) \frac{[E]_T}{d} \quad (22)$$

Equation (17) can be rearranged to give an expression for [EQ]

$$[EQ] = \left(\frac{k_1k_2k_3(h_4+h_{-3})[A][B]}{+k_3k_{-4}(k_2+k_{-1})(h_4+h_{-3})[B][Q]} + \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-4}(h_4+h_{-3})[P][Q]}{+k_3h_{-3}h_{-4}(k_{-1}+k_2)[B][q]} + \frac{k_{-4}h_3h_4(k_2+k_{-1})[Q][b]}{d} \right) \frac{[E]_T}{d} \quad (23)$$

Equation (20) can be rearranged to give an expression for [Eq]

$$[\text{Eq}] = \left(\frac{k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b] + k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q] + k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q] + k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q] [b] + h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2) (k_{-3} + k_4) [b] [q]}{d} \right) \frac{[\text{E}]_{\text{T}}}{d} \quad (24)$$

1. Deduction of the numerator of the rate equation for $d[\text{Q}]/dt$

In Eq. (21a) above, the right-hand side of Eq. (22) can be used to substitute for [E] and the right-hand side of Eq. (23) can be used to substitute for [EQ]

$$\frac{d[\text{Q}]}{dt} = k_4 \left(\frac{k_1 k_2 k_3 (h_4 + h_{-3}) [A] [B] + k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] [Q] + k_{-1} k_{-2} k_{-4} (h_4 + h_{-3}) [P] [Q] + k_3 h_{-3} h_{-4} (k_{-1} + k_2) [B] [q] + k_{-4} h_3 h_4 (k_2 + k_{-1}) [Q] [b]}{d} - k_{-4} \left(\frac{k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] + k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P] + h_3 h_4 (k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3}) [b]}{d} \right) \frac{[\text{E}]_{\text{T}} [\text{Q}]}{d} \right) \quad (25)$$

This can be rearranged to give

$$\frac{d[\text{Q}]}{dt} = \left(\left(\frac{k_4 k_1 k_2 k_3 (h_4 + h_{-3}) [A] [B] + k_4 k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] [Q] + k_4 k_{-1} k_{-2} k_{-4} (h_4 + h_{-3}) [P] [Q] + k_4 k_3 h_{-3} h_{-4} (k_{-1} + k_2) [B] [q] + k_4 k_{-4} h_3 h_4 (k_2 + k_{-1}) [Q] [b]}{d} \right) - \left(\frac{k_{-4} k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] [Q] + k_{-4} k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P] [Q] + k_{-4} h_3 h_4 (k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3}) [b] [Q]}{d} \right) \right) \frac{[\text{E}]_{\text{T}}}{d} \quad (26)$$

In Eq. (26), the terms in $[B][Q]$ are equal and can be removed

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\left(\frac{k_4 k_1 k_2 k_3 (h_4 + h_{-3}) [A][B]}{+k_4 k_{-1} k_{-2} k_{-4} (h_4 + h_{-3}) [P][Q]} \right) - \left(\frac{+k_{-4} k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P][Q]}{+k_{-4} h_3 h_4 (k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3}) [b][Q]} \right) \right) \frac{[E]_T}{d} \quad (27)$$

In Eq. (27), the terms in $[P][Q]$ simplify and the terms in $[Q][b]$ simplify

$$\frac{d[Q]}{dt} = \left(\left(\frac{k_4 k_1 k_2 k_3 (h_4 + h_{-3}) [A][B]}{+k_4 k_3 h_{-3} h_{-4} (k_{-1} + k_2) [B][q]} \right) - \left(\frac{(k_{-4} k_{-1} k_{-2} k_{-3} (h_4 + h_{-3}) [P][Q])}{+k_{-4} h_3 h_4 k_{-3} (k_2 + k_{-1}) [b][Q]} \right) \right) \frac{[E]_T}{d} \quad (28)$$

The terms in Eq. (28) can be rearranged to give

$$\frac{d[Q]}{dt} = ((h_4 + h_{-3})(k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q]) - (k_2 + k_{-1})(k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q])) \frac{[E]_T}{d} \quad (29)$$

The numerator and denominator of Eq. (29) can be divided by $(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})$

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{\left(\left(\frac{(h_4 + h_{-3})(k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q])}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) - \frac{(k_2 + k_{-1})(k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q])}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) [E]_T}{d \frac{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (30)$$

The common factors within the fractions in the numerator of Eq. (30) can be canceled

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{\left(\frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q]}{(k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})} - \frac{k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) [E]_T}{d \over (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (31)$$

The fractions in the numerator of Eq. (31) can be further separated

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{\left(\left(\frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B]}{(k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})} - \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q]}{(k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})} \right) - \left(\frac{k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} - \frac{k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) \right) [E]_T}{d \over (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (32)$$

By inspection, k_A , k_B , k_P , k_Q , h_b and h_q can be identified (Table 1), such that the equation can be rewritten as

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{\left((k_A k_B [A][B] - k_P k_Q [P][Q]) - (k_Q h_b [Q][b] - k_B h_q [B][q]) \right) [E]_T}{d \over (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (33)$$

Table 1: The identities of the lumped parameters of the model in terms of the fundamental rate constants shown in Figure 2.

Specificity constants	Michaelis constants	Inhibition constants
$k_A = \frac{k_1 k_2}{(k_2 + k_{-1})}$		
$k_B = \frac{k_3 k_4}{(k_4 + k_{-3})}$	$K_{MB} = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{(k_2 + k_4)k_3}$ and $H_{MB} = \frac{(k_4 + k_{-3})h_{-3}}{k_3(k_4 + h_{-3})}$	$K_{IB} = \frac{k_{-3}}{k_3}$
$k_P = \frac{k_{-1} k_{-2}}{(k_2 + k_{-1})}$	$K_{MP} = \frac{(k_{-1} + k_2)k_{-3}}{k_{-2}(k_{-1} + k_{-3})}$ and $H_{MP} = \frac{(k_{-1} + k_2)h_{-3}}{k_{-2}(k_{-1} + h_{-3})}$	$K_{IP} = \frac{k_2}{k_{-2}}$
$k_Q = \frac{k_{-3} k_{-4}}{(k_4 + k_{-3})}$		
$h_b = \frac{h_3 h_4}{(h_4 + h_{-3})}$	$K_{Mb} = \frac{k_2(h_{-3} + h_4)}{(k_2 + h_4)h_3}$ and $H_{Mb} = \frac{k_{-3}(h_{-3} + h_4)}{(k_{-3} + h_4)h_3}$	$H_{ib} = \frac{h_{-3}}{h_3}$
$h_q = \frac{h_{-3} h_{-4}}{(h_4 + h_{-3})}$		

2. Deduction of the numerator of the rate equation for $d[q]/dt$

In Eq. (21b) above, the right-hand side of Eq. (22) can be used to substitute for $[E]$ and the right-hand side of Eq. (24) can be used to substitute for $[E_q]$:

$$\frac{d[q]}{dt} = h_4 \left(\frac{k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b]}{+ k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q]} + \frac{[E]_T}{d} - h_{-4} \left(\frac{k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B]}{+ k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q]} + \frac{[E]_T}{d} [q] \right) \right) \quad (34)$$

Eq. (34) can be rearranged to give

$$\frac{d[q]}{dt} = \left(\left(\frac{h_4 k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b]}{+ h_4 k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q]} + \frac{h_4 k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q]}{+ h_4 k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q] [b]} + h_4 h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2) (k_{-3} + k_4) [b] [q] \right) - \left(\frac{h_{-4} k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] [q]}{+ h_{-4} k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P] [q]} + \frac{[E]_T}{d} [q] \right) \right) \quad (35)$$

In Eq. (35), the terms in $[b][q]$ are equal and can be removed

$$\frac{d[q]}{dt} = \left(\left(\frac{h_4 k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A] [b]}{+ h_4 k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1}) [B] [q]} + \frac{h_4 k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3}) [P] [q]}{+ h_4 k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q] [b]} \right) - \left(\frac{h_{-4} k_3 k_4 (k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3}) [B] [q]}{+ h_{-4} k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3}) (h_4 + h_{-3}) [P] [q]} + \frac{[E]_T}{d} [q] \right) \right) \quad (36)$$

In Eq. (36), the terms in $[B][q]$ simplify and the terms in $[P][q]$ simplify

$$\frac{d[q]}{dt} = \left(\left(\frac{h_4 k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3}) [A][b]}{+h_4 k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2) [Q][b]} \right) - \left(\frac{h_{-4} k_3 k_4 h_{-3} (k_2 + k_{-1}) [B][q]}{+h_{-4} k_{-1} k_{-2} h_{-3} (k_4 + k_{-3}) [P][q]} \right) \right) \frac{[E]_T}{d} \quad (37)$$

The terms in Eq. (37) can be rearranged to give

$$\frac{d[q]}{dt} = ((k_4 + k_{-3})(k_1 k_2 h_3 h_4 [A][b] - k_{-1} k_{-2} h_{-3} h_{-4} [P][q]) + (k_2 + k_{-1})(k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q])) \frac{[E]_T}{d} \quad (38)$$

The numerator and denominator of Eq. (38) can be divided by $(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})$

$$\frac{d[q]}{dt} = \frac{\left(\frac{(k_4 + k_{-3})(k_1 k_2 h_3 h_4 [A][b] - k_{-1} k_{-2} h_{-3} h_{-4} [P][q])}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{(k_2 + k_{-1})(k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q])}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) [E]_T}{\frac{d}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (39)$$

The common factors within the fractions in the numerator of Eq. (39) can be canceled

$$\frac{d[q]}{dt} = \frac{\left(\frac{k_1 k_2 h_3 h_4 [A][b] - k_{-1} k_{-2} h_{-3} h_{-4} [P][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})} + \frac{k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b] - k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) [E]_T}{\frac{d}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (40)$$

The fractions in the numerator of Eq. (40) can be further separated

$$\frac{d[q]}{dt} = \frac{\left(\left(\frac{k_1 k_2 h_3 h_4 [A][b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})} - \frac{k_{-1} k_{-2} h_{-3} h_{-4} [P][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})} \right) + \left(\frac{k_{-3} k_{-4} h_3 h_4 [Q][b]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} - \frac{k_3 k_4 h_{-3} h_{-4} [B][q]}{(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \right) \right) [E]_T}{\frac{d}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}} \quad (41)$$

By inspection, k_A , k_B , k_P , k_Q , h_b and h_q can be identified (see Table 1), such that the equation can be rewritten as

$$\frac{d[q]}{dt} = \frac{\left((k_A k_B [A][b] - k_P h_q [P][q]) + (k_Q h_B [Q][b] - k_B h_q [B][q]) \right) [E]_T}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \quad (42)$$

ANEXO 4

Deduction of an expression for the denominator of the rate equations

The denominator of the rate equations, denoted d , is given by the sum of the numerators of all the enzyme forms, namely E, EA, E*, EQ and Eq. In other words, d is given by the sum of the numerators of Eqs. (8), (11), (14), (17) and (20) in Annexes 2 above:

$$d = \left(\begin{array}{l} k_3 k_4 (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B] \\ + k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[P] \\ + h_3 h_4 (k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[b] \end{array} \right) + \left(\begin{array}{l} k_1 k_3 k_4 (h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_1 k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A][P] \\ + k_{-2} k_{-3} k_{-4} (h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_1 h_3 h_4 (k_{-3} + k_4)[A][b] \\ + k_{-2} h_{-3} h_{-4} (k_4 + k_{-3})[P][q] \end{array} \right) + \left(\begin{array}{l} k_1 k_2 (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A] \\ + k_{-3} k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[Q] \\ + h_{-3} h_{-4} (k_2 + k_{-1})(k_{-3} + k_4)[q] \end{array} \right) \quad (43)$$

$$+ \left(\begin{array}{l} k_1 k_2 k_3 (h_4 + h_{-3})[A][B] \\ + k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B][Q] \\ + k_{-1} k_{-2} k_{-4} (h_4 + h_{-3})[P][Q] \\ + k_3 h_{-3} h_{-4} (k_{-1} + k_2)[B][q] \\ + k_{-4} h_3 h_4 (k_2 + k_{-1})[Q][b] \end{array} \right) + \left(\begin{array}{l} k_1 k_2 h_3 (k_4 + k_{-3})[A][b] \\ + k_3 k_4 h_{-4} (k_2 + k_{-1})[B][q] \\ + k_{-1} k_{-2} h_{-4} (k_4 + k_{-3})[P][q] \\ + k_{-3} k_{-4} h_3 (k_{-1} + k_2)[Q][b] \\ + h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)[b][q] \end{array} \right)$$

Terms in the same reaction species or combinations of reaction species can be grouped together

$d =$

$$\begin{aligned}
& k_1 k_2 (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A] + k_{-3} k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[Q] + (h_{-3} h_{-4} (k_2 + k_{-1})(k_{-3} + k_4)[q]) \\
& + k_3 k_4 (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B] + k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[P] + h_3 h_4 (k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[b] \\
& + k_1 k_3 (k_4 + k_2)(h_4 + h_{-3})[A][B] + k_1 k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A][P] \\
& + k_{-2} k_{-4} (k_{-3} + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[P][Q] + k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B][Q] \\
& k_1 h_3 (h_4 + k_2)(k_{-3} + k_4)[A][b] + k_{-2} h_{-4} (h_{-3} + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[P][q] \\
& + k_3 h_{-4} (h_{-3} + k_4)(k_{-1} + k_2)[B][q] + k_{-4} h_3 (h_4 + k_{-3})(k_2 + k_{-1})[Q][b] + h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)[b][q]
\end{aligned} \tag{44}$$

The left-hand side and the right-hand side of Eq. (44) can be divided by $(k_2+k_{-1})(h_4+h_{-3})(k_4+k_{-3})$, with the result being defined as D :

$$\begin{aligned}
D = & \frac{d}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} = \\
& \frac{k_1 k_2 (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-3} k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_{-3} h_{-4} (k_2 + k_{-1})(k_{-3} + k_4)[q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_3 k_4 (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[P]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_3 h_4 (k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_1 k_3 (k_4 + k_2)(h_4 + h_{-3})[A][B]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_1 k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A][P]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_{-2} k_{-4} (k_{-3} + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[P][Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B][Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_1 h_3 (h_4 + k_2)(k_{-3} + k_4)[A][b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-2} h_{-4} (h_{-3} + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[P][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_3 h_{-4} (h_{-3} + k_4)(k_{-1} + k_2)[B][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-4} h_3 (h_4 + k_{-3})(k_2 + k_{-1})[Q][b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)[b][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}
\end{aligned} \tag{45}$$

In Eq. (45), common factors in the numerators and denominators of the terms can be identified

$D =$

$$\begin{aligned}
& \frac{k_1 k_2 (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-3} k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_{-3} h_{-4} (k_2 + k_{-1})(k_{-3} + k_4)[q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_3 k_4 (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-1} k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[P]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_3 h_4 (k_2 + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_1 k_3 (k_4 + k_2)(h_4 + h_{-3})[A][B]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_1 k_{-2} (k_4 + k_{-3})(h_4 + h_{-3})[A][P]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_{-2} k_{-4} (k_{-3} + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[P][Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_3 k_{-4} (k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})[B][Q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_1 h_3 (h_4 + k_2)(k_{-3} + k_4)[A][b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-2} h_{-4} (h_{-3} + k_{-1})(k_4 + k_{-3})[P][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} \\
& + \frac{k_3 h_{-4} (h_{-3} + k_4)(k_{-1} + k_2)[B][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-4} h_3 (h_4 + k_{-3})(k_2 + k_{-1})[Q][b]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_3 h_{-4} (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)[b][q]}{(k_2 + k_{-1})(h_4 + h_{-3})(k_4 + k_{-3})}
\end{aligned} \tag{46}$$

Canceling out the common factors from Eq. (46) and also introducing new factors that are equal to 1 into some of the terms gives

$D =$

$$\begin{aligned}
& \frac{k_1 k_2 [A]}{(k_2 + k_{-1})} + \frac{k_{-3} k_{-4} [Q]}{(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_{-3} h_{-4} [q]}{(h_4 + h_{-3})} \\
& + \frac{k_3 k_4 [B]}{(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-1} k_{-2} [P]}{(k_2 + k_{-1})} + \frac{h_3 h_4 [b]}{(h_4 + h_{-3})} \\
& + \frac{k_1 k_3 (k_4 + k_2) [A] [B]}{(k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_2}{k_2} + \frac{k_1 k_{-2} [A] [P] k_2}{(k_2 + k_{-1}) k_2} \\
& + \frac{k_{-2} k_{-4} (k_{-3} + k_{-1}) [P] [Q]}{(k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} + \frac{k_3 k_{-4} [B] [Q]}{(k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} \\
& + \frac{k_1 h_3 (h_4 + k_2) [A] [b]}{(k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3})} \frac{k_2}{k_2} + \frac{k_{-2} h_{-4} (h_{-3} + k_{-1}) [P] [q]}{(k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}} \\
& + \frac{k_3 h_{-4} (h_{-3} + k_4) [B] [q]}{(h_4 + h_{-3}) (k_4 + k_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}} + \frac{k_{-4} h_3 (h_4 + k_{-3}) [Q] [b]}{(h_4 + h_{-3}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} + \frac{h_3 h_{-4} [b] [q]}{(h_4 + h_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}}
\end{aligned} \tag{47}$$

Within Eq. (47), combinations of fundamental rate constants can be identified that correspond to the specificity constants k_A , k_B , k_P , k_Q , h_b and h_q and the reciprocals of the inhibition constants K_{IP} , K_{IB} and H_{ib} listed in Table 1:

$$D =$$

$$\begin{aligned}
& \frac{k_1 k_2 [A]}{(k_2 + k_{-1})} + \frac{k_{-3} k_{-4} [Q]}{(k_4 + k_{-3})} + \frac{h_{-3} h_{-4} [q]}{(h_4 + h_{-3})} \\
& + \frac{k_3 k_4 [B]}{(k_4 + k_{-3})} + \frac{k_{-1} k_{-2} [P]}{(k_2 + k_{-1})} + \frac{h_3 h_4 [b]}{(h_4 + h_{-3})} \\
& + \frac{k_1 k_3 (k_4 + k_2) [A] [B]}{(k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_2}{k_2} + \frac{k_1 k_{-2} [A] [P]}{(k_2 + k_{-1})} \frac{k_2}{k_2} \\
& + \frac{k_{-2} k_{-4} (k_{-3} + k_{-1}) [P] [Q]}{(k_2 + k_{-1}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} + \frac{k_3 k_{-4} [B] [Q]}{(k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} \\
& + \frac{k_1 h_3 (h_4 + k_2) [A] [b]}{(k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3})} \frac{k_2}{k_2} + \frac{k_{-2} h_{-4} (h_{-3} + k_{-1}) [P] [q]}{(k_2 + k_{-1}) (h_4 + h_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}} \\
& + \frac{k_3 h_{-4} (h_{-3} + k_4) [B] [q]}{(h_4 + h_{-3}) (k_4 + k_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}} + \frac{k_{-4} h_3 (h_4 + k_{-3}) [Q] [b]}{(h_4 + h_{-3}) (k_4 + k_{-3})} \frac{k_{-3}}{k_{-3}} + \frac{h_3 h_{-4} [b] [q]}{(h_4 + h_{-3})} \frac{h_{-3}}{h_{-3}}
\end{aligned}
\tag{48}$$

The combinations of fundamental rate constants in Eq. (48) can be replaced with the corresponding specificity and inhibition constants:

$D =$

$$\begin{aligned}
& k_A[A] + k_Q[Q] + h_q[q] \\
& + k_B[B] + k_P[P] + h_b[b] \\
& + k_A[A] \frac{k_3(k_4 + k_2)[B]}{(k_4 + k_{-3})k_2} + k_A[A] \frac{[P]}{K_{IP}} \\
& + k_Q[Q] \frac{k_{-2}(k_{-3} + k_{-1})[P]}{(k_2 + k_{-1})k_{-3}} + k_Q[Q] \frac{[B]}{K_{IB}} \\
& + k_A[A] \frac{h_3(h_4 + k_2)[b]}{(h_4 + h_{-3})k_2} + h_q[q] \frac{k_{-2}(h_{-3} + k_{-1})[P]}{(k_2 + k_{-1})h_{-3}} \\
& + h_q[q] \frac{k_3(h_{-3} + k_4)[B]}{(k_4 + k_{-3})h_{-3}} + k_Q[Q] \frac{h_3(h_4 + k_{-3})[b]}{(h_4 + h_{-3})k_{-3}} + h_q[q] \frac{[b]}{H_{ib}}
\end{aligned}
\tag{49}$$

The remaining combinations of fundamental rate constants in Eq. (49) can be identified as reciprocals of K_M values:

$$D =$$

$$\begin{aligned}
& k_A[A] + k_Q[Q] + h_q[q] \\
& + k_B[B] + k_P[P] + h_b[b] \\
& + k_A[A] \frac{k_3(k_4 + k_2)[B]}{(k_4 + k_{-3})k_2} + k_A[A] \frac{[P]}{K_{IP}} \\
& + k_Q[Q] \frac{k_{-2}(k_{-3} + k_{-1})[P]}{(k_2 + k_{-1})k_{-3}} + k_Q[Q] \frac{[B]}{K_{IB}} \\
& + k_A[A] \frac{h_3(h_4 + k_2)[b]}{(h_4 + h_{-3})k_2} + h_q[q] \frac{k_{-2}(h_{-3} + k_{-1})[P]}{(k_2 + k_{-1})h_{-3}} \\
& + h_q[q] \frac{k_3(h_{-3} + k_4)[B]}{(k_4 + k_{-3})h_{-3}} + k_Q[Q] \frac{h_3(h_4 + k_{-3})[b]}{(h_4 + h_{-3})k_{-3}} + h_q[q] \frac{[b]}{H_{ib}}
\end{aligned} \tag{50}$$

where

- K_{MB} is the K_M for B as the second substrate in the reaction $A + B \rightarrow P + Q$
- H_{MB} is the K_M for B as the second substrate in the reaction $q + B \rightarrow b + Q$
- K_{MP} is the K_M for P as the second substrate in the reaction $Q + P \rightarrow B + A$
- H_{MP} is the K_M for P as the second substrate in the reaction $q + P \rightarrow b + A$
- K_{Mb} is the K_M for b as the second substrate in the reaction $A + b \rightarrow P + q$
- H_{Mb} is the K_M for b as the second substrate in the reaction $Q + b \rightarrow B + q$

Substituting these K_M values into Eq. (50) gives:

$$D =$$

$$\begin{aligned}
 & k_A[A] + k_Q[Q] + h_q[q] \\
 & + k_B[B] + k_P[P] + h_b[b] \\
 & + k_A[A] \frac{[B]}{K_{MB}} + k_A[A] \frac{[P]}{K_{IP}} \\
 & + k_Q[Q] \frac{[P]}{K_{MP}} + k_Q[Q] \frac{[B]}{K_{IB}} \\
 & + k_A[A] \frac{[b]}{K_{Mb}} + h_q[q] \frac{[P]}{H_{MP}} \\
 & + h_q[q] \frac{[B]}{H_{MB}} + k_Q[Q] \frac{[b]}{H_{Mb}} + h_q[q] \frac{[b]}{H_{ib}}
 \end{aligned}$$

(51)

The terms on the right-hand side of Eq. (51) can be rearranged to give:

$$D =$$

$$\begin{aligned}
& k_A[A] + k_A[A] \frac{[P]}{K_{IP}} + k_A[A] \frac{[B]}{K_{MB}} + k_A[A] \frac{[b]}{K_{Mb}} \\
& + k_Q[Q] + k_Q[Q] \frac{[B]}{K_{IB}} + k_Q[Q] \frac{[P]}{K_{MP}} + k_Q[Q] \frac{[b]}{H_{Mb}} \\
& + h_q[q] + h_q[q] \frac{[b]}{H_{ib}} + h_q[q] \frac{[P]}{H_{MP}} + h_q[q] \frac{[B]}{H_{MB}} \\
& + k_B[B] + k_P[P] + h_b[b]
\end{aligned} \tag{52}$$

The right-hand side of Eq. (52) can be rewritten as:

$$D = k_A[A] \left(1 + \frac{[P]}{K_{IP}} + \frac{[B]}{K_{MB}} + \frac{[b]}{K_{Mb}} \right) + k_Q[Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} + \frac{[P]}{K_{MP}} + \frac{[b]}{H_{Mb}} \right) + h_q[q] \left(1 + \frac{[b]}{H_{ib}} + \frac{[P]}{H_{MP}} + \frac{[B]}{H_{MB}} \right) + k_B[B] + k_P[P] + h_b[b] \tag{53}$$

Final equations

Substituting Eq. (53) into the denominators of Eqs. (33) and (42) gives

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{\left((k_A k_B [A][B] - k_P k_Q [P][Q]) - (k_Q h_b [Q][b] - k_B h_q [B][q]) \right) [E]_T}{k_A [A] \left(1 + \frac{[P]}{K_{IP}} + \frac{[B]}{K_{MB}} + \frac{[b]}{K_{Mb}} \right) + k_Q [Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} + \frac{[P]}{K_{MP}} + \frac{[b]}{H_{Mb}} \right) + h_q [q] \left(1 + \frac{[b]}{H_{ib}} + \frac{[P]}{H_{MP}} + \frac{[B]}{H_{MB}} \right) + k_B [B] + k_P [P] + h_b [b]} \quad (54a)$$

$$\frac{d[q]}{dt} = \frac{\left((k_A k_B [A][b] - k_P h_q [P][q]) + (k_Q h_B [Q][b] - k_B h_q [B][q]) \right) [E]_T}{k_A [A] \left(1 + \frac{[P]}{K_{IP}} + \frac{[B]}{K_{MB}} + \frac{[b]}{K_{Mb}} \right) + k_Q [Q] \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} + \frac{[P]}{K_{MP}} + \frac{[b]}{H_{Mb}} \right) + h_q [q] \left(1 + \frac{[b]}{H_{ib}} + \frac{[P]}{H_{MP}} + \frac{[B]}{H_{MB}} \right) + k_B [B] + k_P [P] + h_b [b]} \quad (54b)$$

ANEXO 5

A model for transglycosylation in terms of percentage consumption of the donor

The kinetic equations developed in the previous sections are used to develop a model for transglycosylation in terms of the percentage consumption of the donor molecule. Figure 9 shows the transglycosylation system, while Table 2 indicates the identity of the moieties involved in the three reactions " $A + B \rightleftharpoons P + Q$ ", " $A + b \rightleftharpoons P + q$ " and " $Q + b \rightleftharpoons B + q$ ".

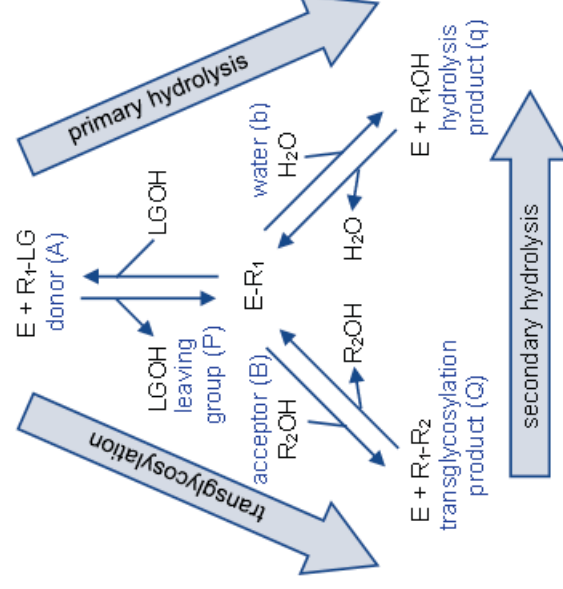


Figure 9: Transglycosylases and retaining glycosidases catalyze three competing reactions through the Ping Pong bi bi mechanism, with the three reactions having a common glycosyl-enzyme intermediate ($E-R_1$).

Table 2: Moieties involved in the transglycosylation, primary hydrolysis and secondary hydrolysis reactions, indicating the corresponding letters used in development of the kinetic equations in Annexess 1 to 2.

Reaction	First substrate (donor)		Second substrate (acceptor)		First product (leaving group)	Second product (reaction product)
Transglycosylation Letter code Moieties involved	A R ₁ -LG	+	B R ₂ OH	≇	P LGOH	Q R ₁ -R ₂
Primary hydrolysis Letter code Moieties involved	A R ₁ -LG	+	b H ₂ O	≇	P LGOH	q R ₁ OH
Secondary hydrolysis Letter code Moieties involved	Q R ₁ -R ₂	+	b H ₂ O	≇	B R ₂ OH	q R ₁ OH

In the numerators of Eqs (54a) and (54b),

- “ $k_A k_B [A][B] - k_P k_Q [P][Q]$ ” is related to the transglycosylation reaction $A + B \rightleftharpoons P + Q$
- “ $k_A k_b [A][b] - k_P k_q [P][q]$ ” is related to the primary hydrolysis reaction $A + b \rightleftharpoons P + q$
- “ $k_Q k_b [Q][b] - k_B k_q [B][q]$ ” is related to the secondary hydrolysis reaction $Q + b \rightleftharpoons B + q$

One can therefore write the following equations for the velocities of the transglycosylation reaction (r_T), the primary hydrolysis reaction (r_{PH}) and the secondary hydrolysis reaction (r_{SH}):

$$r_T = (k_A [A] k_B [B] - k_P [P] k_Q [Q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (55a)$$

$$r_{PH} = (k_A [A] k_b [b] - k_P [P] k_q [q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (55b)$$

$$r_{SH} = (k_Q [Q] k_b [b] - k_B [B] k_q [q]) \frac{[E]_T}{D} \quad (55c)$$

In these equations, k_X is the specificity constant of the enzyme for the species indicated by the subscript X, $[E]_T$ is the total concentration of the enzyme and D is a denominator that is the same for all three equations, given by Eq. (53).

For the scheme given in Figure 9, the following set of balance equations can be written

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_T - r_{PH} \quad (56a)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -r_T + r_{SH} \quad (56b)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = r_T + r_{PH} \quad (56c)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = r_T - r_{SH} \quad (56d)$$

$$\frac{d[b]}{dt} = -r_{PH} - r_{SH} \quad (56e)$$

$$\frac{d[q]}{dt} = r_{PH} + r_{SH} \quad (56f)$$

In the analysis, the yield of the transglycosylation product Q is plotted as a function of the percentage consumption of the original donor molecule A. This percentage consumption (c) is given by

$$c = \frac{[A]_o - [A]}{[A]_o} \times 100 = 100 - 100 \frac{[A]}{[A]_o} \quad (57)$$

Therefore,

$$\frac{dc}{dt} = 0 - \frac{100}{[A]_o} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{100}{[A]_o} (-r_T - r_{PH}) = \frac{100}{[A]_o} (r_T + r_{PH}) \quad (58)$$

The independent variable of Eqs. (56a) to (56f) is changed from time to c using the fact that, for any species X:

$$\frac{\left(\frac{d[X]}{dt}\right)}{\left(\frac{dc}{dt}\right)} = \frac{d[X]}{dc} \quad (59)$$

Additionally, the concentrations of the species are normalized by expressing them as percentages of the initial concentration of the donor A. For any species X, the percentage normalized concentration is represented by X (i.e. in italic font) and is given by

$$X = \frac{[X]}{[A]_o} \times 100 \quad (60)$$

Given Eqs. (58), (59) and (60), Eqs. (56a) to (56f) can be rewritten as

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-r_T - r_{PH}}{(r_T + r_{PH})} = -1 \quad (61a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-r_T + r_{SH}}{(r_T + r_{PH})} \quad (61b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{r_T + r_{PH}}{(r_T + r_{PH})} = 1 \quad (61c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{r_T - r_{SH}}{(r_T + r_{PH})} \quad (61d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-r_{PH} - r_{SH}}{(r_T + r_{PH})} \quad (61e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{r_{PH} + r_{SH}}{(r_T + r_{PH})} \quad (61f)$$

and Eqs. (55a) to (55c) can be rewritten as

$$r_T = (k_A A k_B B - k_P P k_Q Q) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (62a)$$

$$r_{PH} = (k_A A k_b b - k_P P k_q q) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (62b)$$

$$r_{SH} = (k_Q Q k_b b - k_B B k_q q) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (62c)$$

In Eqs (62a) to (62c), each term within the parentheses contains the product of two specificity constants. These constants are not estimated individually, rather their product is estimated. We refer to these products as combined specificity constants. They are given by

$$k_{AB} = k_A k_B \quad (63a)$$

$$k_{Ab} = k_A k_b \quad (63b)$$

$$k_{Qb} = k_Q k_b \quad (63c)$$

$$k_{PQ} = k_P k_Q \quad (63d)$$

$$k_{Pq} = k_P k_q \quad (63e)$$

$$k_{Bq} = k_B k_q \quad (63f)$$

Equations (62a) to (62c) can therefore be rewritten in terms of these combined specificity constants

$$r_T = (k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (64a)$$

$$r_{PH} = (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (64b)$$

$$r_{SH} = (k_{Qb}Qb - k_{Bq}Bq) \frac{[A]_o^2 [E]_T}{100^2 D} \quad (64c)$$

Equations (64a) to (64c) can be substituted into Eqs. (61a) to (61f). When this is done, the factor $([A]_o^2/100^2)([E]_T/D)$ that appears in Eqs. (64a) to (64c) cancels out, giving the following set of equations:

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) - (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} = -1 \quad (65a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Qb}Qb - k_{Bq}Bq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} \quad (65b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} = 1 \quad (65c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) - (k_{Qb}Qb - k_{Bq}Bq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} \quad (65d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-(k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq) - (k_{Qb}Qb - k_{Bq}Bq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} \quad (65e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{(k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq) + (k_{Qb}Qb - k_{Bq}Bq)}{(k_{AB}AB - k_{PQ}PQ) + (k_{Ab}Ab - k_{Pq}Pq)} \quad (65f)$$

Since each term in the numerator and denominator of the right-hand sides of Eqs. (65a) to (65f) contains a combined specificity constant, it is not possible to determine the absolute values of these constants by adjusting the model to reaction profiles. It is only possible to determine their relative values. Relative combined specificity constants are then defined as

$$R_{AB} = \frac{k_{AB}}{k_{AB}} = 1 \quad (66a)$$

$$R_{Ab} = \frac{k_{Ab}}{k_{AB}} \quad (66b)$$

$$R_{Qb} = \frac{k_{Qb}}{k_{AB}} \quad (66c)$$

$$R_{PQ} = \frac{k_{PQ}}{k_{AB}} \quad (66d)$$

$$R_{Pq} = \frac{k_{Pq}}{k_{AB}} \quad (66e)$$

$$R_{Bq} = \frac{k_{Bq}}{k_{AB}} \quad (66f)$$

In other words, taking as a base the preference of the enzyme for catalyzing the transglycosylation reaction in the forward direction, R_{PQ} is the relative preference for catalyzing the reaction in the reverse direction, R_{Ab} is the relative preference for catalyzing the primary hydrolysis reaction and R_{Qb} is the relative preference for catalyzing the secondary hydrolysis reaction.

Substituting Eqs. (66a) to (66f) into Eqs. (65a) to (65f) gives

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) - (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} = -1 \quad (67a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Qb}Qb - R_{Bq}Bq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} \quad (67b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} = 1 \quad (67c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) - (R_{Qb}Qb - R_{Bq}Bq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} \quad (67d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-(R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq) - (R_{Qb}Qb - R_{Bq}Bq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} \quad (67e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{(R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq) + (R_{Qb}Qb - R_{Bq}Bq)}{(AB - R_{PQ}PQ) + (R_{Ab}Ab - R_{Pq}Pq)} \quad (67f)$$

If the hydrolysis reactions can be assumed to be irreversible, then R_{Bq} and R_{Pq} can be set to zero, such that Eqs. (67a) to (67f) can be written as

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) - R_{Ab}Ab}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} = -1 \quad (68a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (68b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} = 1 \quad (68c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{(AB - R_{PQ}PQ) - R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (68d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-R_{Ab}Ab - R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (68e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{R_{Ab}Ab + R_{Qb}Qb}{(AB - R_{PQ}PQ) + R_{Ab}Ab} \quad (68f)$$

This set of equations represents the model that is fitted to the experimental results.

ANEXO 6

Case Study 1

The data for the first case study were taken from Fig. 2 of the article of Teze et al.. (2021) using WebPlotDigitizer (<https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>). This figure of Teze et al.. (2021) is a plot of the percentage normalized concentration of the transglycosylation product Q (α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc) as a function of the percentage consumption of the donor molecule A (2-chloro-4-nitrophenyl α -L-fucopyranoside). The data are shown in Table 3.

For all three experiments, the initial values are set at $[A] = 20$ mM, $[B] = 20$ mM, $[P] = 0$ mM, $[Q] = 0.5$ mM, $[q] = 0$ mM and $[b] = 55000$ mM. These correspond to initial percentage normalized concentrations of $A = 100$, $B = 100$, $P = 0$, $Q = 2.5$, $q = 0$ and $b = 277500$. The initial value of $Q = 2.5$ is obtained by extrapolating the experimental curves of Teze et al.. (2021) back to the ordinate.

Table 4 shows the values of the parameters that gave the best fit of the model to the data of Teze et al.. (2021) and the 95% confidence intervals of these estimates.

Table 3: Data obtained from Teze et al.. (2021) for Case Study 1.

Wild-type AlfB		Mutant W130H		Mutant H80F		Mutant H80Fcontinued	
<i>c</i>	<i>Q</i>	<i>c</i>	<i>Q</i>	<i>c</i>	<i>Q</i>	<i>c</i>	<i>Q</i>
2.8802	2.4975	5.0691	4.8731	0.9217	4.0203	57.6037	40.5685
4.9539	2.9239	7.4885	6.1523	1.3825	4.6904	58.9862	41.0558
6.7972	3.2893	10.2535	7.0660	3.2258	5.6650	60.3687	41.7868
8.5253	3.7157	13.1336	8.1624	4.6083	6.8223	61.2903	42.4569
10.0230	4.7513	16.1290	9.1980	5.9908	7.7360	62.4424	43.0660
12.4424	4.9949	19.1244	10.4162	7.6037	8.8934	63.5945	43.6751
14.6313	5.4822	22.5806	11.5736	9.1014	9.9289	64.7465	44.3452
17.0507	6.3350	25.9217	12.7310	10.1382	10.7817	66.5899	45.1980
19.8157	6.7614	29.7235	13.9492	11.2903	11.4518	67.1659	46.3553
22.9263	7.6142	33.5253	15.2284	12.9032	12.5482	68.6636	46.4772
26.2673	8.4670	37.3272	16.6294	14.2857	13.4619	69.8157	47.1472
30.2995	9.0152	41.4747	17.8477	15.4378	14.2538	70.7373	47.5736
34.7926	9.9289	45.6221	19.0660	16.7051	15.1066	71.8894	47.9391
39.8618	10.9645	49.7696	20.4670	17.7419	15.8376	73.0415	48.4873
45.9677	12.1827	54.0323	21.6244	19.1244	16.8122	73.9631	48.9137
53.4562	13.7056	58.2949	22.9036	20.5069	17.7259	74.6544	49.7665
63.4793	15.1066	62.4424	24.1827	22.1198	18.8223	76.0369	49.8883
76.0369	17.1168	66.4747	25.4010	23.5023	19.9188	76.2673	50.7411
90.7834	18.1523	70.7373	26.1929	25.1152	20.8934	77.6498	50.8629
98.7327	15.7766	74.1935	27.2284	26.4977	21.9898	78.5714	51.8376
99.4240	11.6954	77.5346	28.3249	27.7650	22.6599	80.2995	52.3858
99.5392	8.4061	80.5300	28.9949	29.0323	23.2690	81.5668	51.9594
		83.4101	29.7868	29.9539	23.8782	81.6820	53.1777
		85.9447	30.2741	31.5668	24.4873	82.9493	53.2995
		88.0184	30.8832	33.0645	25.4010	84.5622	54.0305
		89.8618	31.1878	34.1014	26.0711	86.1751	54.7005
		91.4747	31.3706	35.0230	26.8629	88.0184	55.3096
		92.8571	31.4315	36.1751	27.5939	90.0922	55.9797
		93.7788	31.4315	37.2120	28.2640	92.6267	56.1624
		94.9309	31.3706	38.4793	28.9340	94.9309	56.1015
		95.8525	31.1878	39.4009	29.9695	96.5438	55.4315
		97.4654	30.3959	40.8986	30.5178	97.8111	54.4569
		98.3871	28.8122	42.1659	31.2487	98.2719	53.4213
		98.8479	27.3503	43.5484	32.0406	98.8479	51.5939
		99.0783	26.0102	44.4700	32.7107	98.9631	50.2538
		99.0783	25.0355	45.3917	33.9289	99.0783	49.0964
				47.0046	34.1117	99.0783	47.5127
				48.1567	35.0863	99.0783	46.1117
				49.4240	35.6954	99.1935	44.2843
				50.6912	36.3046	99.1935	42.8223
				51.7281	37.0964	99.1935	41.4213
				52.9954	37.8274	99.1935	39.8985
				54.3779	38.4365	99.3088	38.1929
				55.5300	39.1675	99.3088	36.8528
				56.4516	39.8985	99.3088	35.5127

Table 4: Parameter estimates and 95% confidence intervals obtained by fitting the model to the data of Teze et al.. (2021).

Fitted parameter	Fitted value	Uncertainty	95% confidence interval		Parameter of interest	Estimated value ^a	95% confidence interval	
			Lower limit	Upper limit			Lower limit ^b	Upper limit ^c
R_{PQ}	0.0179304	0.0004882	0.017442	0.018419	$K_{EQ(T)}$	55.77	54.29	57.33
Wild-type AlfB								
R_{Ab}	0.0011212	0.0000956	0.001026	0.001217	$S_{T.PH}$	892	822	975
R_{Qb}	0.0002471	0.0000302	0.000217	0.000277	$S_{T.SH}$	4047	3606	4610
W130H								
R_{Ab}	0.0005282	0.000022	0.000506 2	0.000550 2	$S_{T.PH}$	1893	1818	1976
R_{Qb}	0.0000642	0.0000075	0.000056 7	0.000071 7	$S_{T.SH}$	15576	13947	17637
H80F								
R_{Ab}	0.0001407	0.0000036	0.000137 1	0.000144 3	$S_{T.PH}$	7107	6930	7294
R_{Qb}	0.0000108	0.0000016	0.000009 2	0.000012 4	$S_{T.SH}$	92593	80645	108696

^a The parameters of interest that are reported in the paper are the reciprocals of the fitted parameters.

^b The lower limit of the 95% confidence interval for the parameter of interest is calculated as the reciprocal of the upper limit for the corresponding fitted parameter.

^c The upper limit of the 95% confidence interval for the parameter of interest is calculated as the reciprocal of the lower limit for the corresponding fitted parameter.

REFERENCES

TEZE, D.; ZHAO, J., WIEMANN, M., KAZI, Z.G.A., LUPO, R.; ZEUNER, B.; VUILLEMIN, M.; RØNNE, M.E.; CARLSTRÖM, G.; DUUS, J.Ø.; SANEJOUAND, Y.-H.; O'DONOHUE, M.J.; KARLSSON, E.N.; FAURÉ, R.; STÅLBRAND, H.; SVENSSON, B. Rational enzyme design without structural knowledge: A sequence-based approach for efficient generation of transglycosylases, **Chemistry - A European Journal**. 27 (2021) 10323-10334.
<https://doi.org/10.1002/chem.202100110>.

ANEXO 7

Case Study 2

The data for the second case study were taken from Fig. 3. of “Chapter II – Part I” of the thesis of Bissaro (2014) using WebPlotDigitizer (<https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>). This figure of Bissaro (2014) is a plot of the percentage normalized concentration of the transglycosylation product Q (Bn- β -D-Galf-(1,2)- α -D-Xylp) as a function of the percentage consumption of the donor molecule A (pNP- β -D-Galf). The data are shown in Table 5.

For all experiments, the initial values are set at $[A] = 5$ mM, $[B] = 5$ mM, $[P] = 0$ mM, $[q] = 0$ mM and $[b] = 55000$ mM. These correspond to initial percentage normalized concentrations of $A = 100$, $B = 100$, $P = 0$, $q = 0$ and $b = 1100000$. Different initial concentrations of Q were obtained by extrapolating the experimental curves of Bissaro (2014) back to the ordinate: $[Q] = 0$ mM for wild-type TxAbf, mutant W99A and mutant W99F; $[Q] = 0.1$ mM (which corresponds to a percentage normalized concentration of 2) for mutant H98A, mutant H98F and mutant H98AW99A; and 0.05 mM (which corresponds to a percentage normalized concentration of 1) for mutant H98FW99F.

Table 6 shows the values of the parameters that gave the best fit of the model to the data of Bissaro (2014) and the 95% confidence intervals of these estimates.

Table 5: Data obtained from Bissaro (2014) for Case Study 2.

Wild-type TxAbf		mutant H98A		mutant H98F		mutant W99A		mutant W99F		mutant H98AW99A		mutant H98FW99F	
c	Q	c	Q	c	Q	c	Q	c	Q	c	Q	c	Q
0.0000	0.0000	0.0000	0.0248	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0248	0.0000	0.0000
24.941	10.420												
5	8	16.8355	6.9059	21.3562	11.5347	10.6781	1.8069	15.0429	2.5990	4.8324	3.1683	12.3149	5.2475
32.813	15.024												
7	8	24.2401	8.6634	29.3843	14.4307	25.3313	3.8366	40.6080	6.6337	9.0413	3.5396	34.7623	10.8168
40.062	17.054												
4	5	30.9431	10.2723	36.3991	16.8564	33.6711	5.2475	57.2876	9.1089	13.4061	4.1584	50.6625	14.0347
46.063	18.193												
9	1	36.8667	11.5347	42.5565	18.6634	45.2065	6.1139	68.5892	10.0743	17.5370	4.7030	62.1200	15.6931
50.896	18.811												
3	9	42.0889	12.8713	47.8566	20.2228	51.1302	6.9059	72.4864	10.0248	21.5121	5.4455	65.7833	16.1386
55.806	19.108												
7	9	50.9743	14.5050	56.6641	21.6337	63.6009	7.8960	74.3570	10.1980	33.5931	6.9554	67.4981	16.1881
59.625	19.505												
9	0	54.6376	15.1485	60.6391	21.3861	73.0320	8.4158	75.9158	10.2475	40.8418	7.6733	68.9010	16.3366
66.562	19.282												
7	2	58.2229	15.6436	63.9127	21.2871	76.8511	9.0347	77.1629	10.3218	52.9228	9.1089	70.5378	16.2129
72.096	18.267												
6	3	61.2627	16.1881	66.8745	21.2871	79.3453	9.0594	79.1894	10.2228	62.1980	9.9257	73.1878	16.3366
81.060	15.866												
0	3	64.3804	16.2624	69.6025	21.2624	81.8394	9.0347	83.0086	9.6535	69.5246	10.5446	76.6952	16.1634
86.126	13.564												
3	4	66.9525	16.2624	74.0452	20.7673	84.2557	8.9851	86.5939	9.5050	75.1364	10.7178	79.5012	15.9158
89.633	11.485												
7	1	69.6804	16.2376	79.3453	19.3564	87.9189	8.2178	89.4778	9.2327	79.5791	10.8168	81.2159	15.6436
91.816													
1	8.4406	71.8628	16.3366	85.0351	16.8317	90.2572	7.8465	91.5822	8.1683	81.4497	10.9406	84.4895	14.9010
93.141													
1	6.6337	73.7334	16.2624	88.3866	14.6782	95.7132	6.1139	92.9072	7.7723	82.4630	10.9653	86.9057	14.2822
93.452													
8	5.7921	75.3702	16.2871	90.3352	12.3267	96.3367	4.7030	95.2455	6.3861	83.2424	10.9406	89.0101	13.3911
94.076													
4	5.4208	78.4100	16.1386	91.3484	10.9653	96.8044	3.5644	96.1029	5.0000	84.0998	10.9406	90.2572	12.3515

Table 6: Parameter estimates and 95% confidence intervals obtained by fitting the model to the data of Bissaro (2014).

Fitted parameter	Fitted value	Uncertainty	95% confidence interval		Parameter of interest	Estimated value ^a	95% confidence interval	
			Lower limit	Upper limit			Lower limit ^b	Upper limit ^c
R_{PQ}	1.1339592	0.1538986	0.9800606	1.2878578	$K_{EQ(T)}$	0.881866	1.0203451	0.776483
Wild-type TxAbf								
R_{Ab}	0.0000948	0.0000081	0.0000867	0.0001029	$S_{T,PH}$	10549	11534	9718
R_{Qb}	0.0000689	0.0000142	0.0000547	0.0000831	$S_{T,SH}$	14514	18282	12034
Mutant H98A								
R_{Ab}	0.0002187	0.0000133	0.0002054	0.0002320	$S_{T,PH}$	4572	4869	4310
R_{Qb}	0.0000521	0.0000144	0.0000377	0.0000665	$S_{T,SH}$	19194	26525	15038
Mutant H98F								
R_{Ab}	0.0001065	0.0000092	0.0000973	0.0001157	$S_{T,PH}$	9390	10277	8643
R_{Qb}	0.0000467	0.0000138	0.0000329	0.0000605	$S_{T,SH}$	21413	30395	16529
Mutant W99A								
R_{Ab}	0.0003826	0.0000324	0.0003502	0.0004150	$S_{T,PH}$	2614	2856	2410
R_{Qb}	0.0001991	0.0000224	0.0001767	0.0002215	$S_{T,SH}$	5023	5659	4515
Mutant W99F								
R_{Ab}	0.0003438	0.0000283	0.0003155	0.0003721	$S_{T,PH}$	2909	3170	2687
R_{Qb}	0.0001361	0.0000193	0.0001168	0.0001554	$S_{T,SH}$	7348	8562	6435
Mutant H98AW99A								
R_{Ab}	0.0004335	0.0000407	0.0003928	0.0004742	$S_{T,PH}$	2307	2546	2109
R_{Qb}	0.0001053	0.0000200	0.0000853	0.0001253	$S_{T,SH}$	9497	11723	7981
Mutant H98FW99F								
R_{Ab}	0.0001954	0.0000131	0.0001823	0.0002085	$S_{T,PH}$	5118	5485	4796
R_{Qb}	0.0000579	0.0000147	0.0000432	0.0000726	$S_{T,SH}$	17271	23148	13774

^a The parameters of interest that are reported in the paper are the reciprocals of the fitted parameters.

^b The lower limit of the 95% confidence interval for the parameter of interest is calculated as the reciprocal of the upper limit for the corresponding fitted parameter.

^c The upper limit of the 95% confidence interval for the parameter of interest is calculated as the reciprocal of the lower limit for the corresponding fitted parameter.

REFERENCES

BISSARO, B. **La partition Hydrolyse / Transglycosylation chez les Glycoside Hydrolases: Proposition d'une hypothèse de synthèse à travers l'évolution moléculaire d'une α -L-arabinofuranosidase de la famille GH51 vers les premières transarabinofuranosylases de type non-Leloir.** Biochimie, Biologie Moléculaire. INSA de Toulouse, 2014. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-150901423847>.

ANEXO 8

A model for transglycosylation in terms of percentage consumption of the donor that assumes that all three reactions are irreversible, including transglycosylation

In Case Study 1 of this dissertation, a relatively high value of 55.8 was obtained for the equilibrium constant of the transglycosylation reaction. A model that assumes that all three reactions are irreversible (i.e. not only the two hydrolysis reactions but also the transglycosylation reaction) was therefore fitted to the data. This model is obtained by setting R_{PQ} in Eqs. (68a) to (68f) to zero, giving

$$\frac{dA}{dc} = \frac{-AB - R_{Ab}Ab}{AB + R_{Ab}Ab} = -1 \quad (69a)$$

$$\frac{dB}{dc} = \frac{-AB + R_{Qb}Qb}{AB + R_{Ab}Ab} \quad (69b)$$

$$\frac{dP}{dc} = \frac{AB + R_{Ab}Ab}{AB + R_{Ab}Ab} = 1 \quad (69c)$$

$$\frac{dQ}{dc} = \frac{AB - R_{Qb}Qb}{AB + R_{Ab}Ab} \quad (69d)$$

$$\frac{db}{dc} = \frac{-R_{Ab}Ab - R_{Qb}Qb}{AB + R_{Ab}Ab} \quad (69e)$$

$$\frac{dq}{dc} = \frac{R_{Ab}Ab + R_{Qb}Qb}{AB + R_{Ab}Ab} \quad (69f)$$

This model was applied to the data of Case Study 1 of this dissertation. However, it gave a minimum value of the objective function (Eq. (12) of these Annexes) of 475.0, which is over 4-fold higher than the value of 110.5 obtained with the model represented by Eqs. (68a) to (68f). Interestingly, the fitted profiles for the wild-type AlfB and mutant W130H are very similar for the two models, but the fitted profile for the mutant H80F is different near the peak yield of the transglycosylation product (compare Figure 10 with Figure 3 of these Annexes).

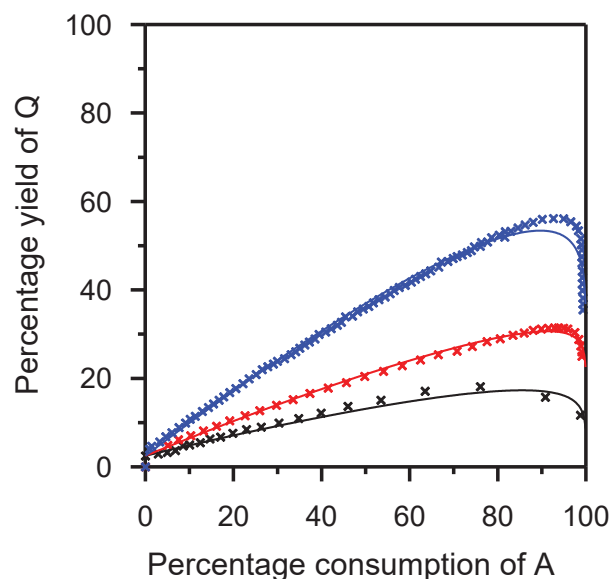


Figure 10: Fitting of the model that assumes all three reactions are irreversible (i.e. not only primary and secondary hydrolysis, but also transglycosylation) to the data of Teze et al.. (2021) for wild type AlfB from *Lactobacillus casei*. Profiles are plotted for the percentage normalized concentration of the transglycosylation product α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc as a function of the percentage consumption of the original donor α -L-FucpOCNP. Key: Wild-type AlfB (x) and the mutants W130H (x) and H80F (x). The solid lines represent the fitted curves. Details of other reaction species and the initial concentrations used in the assays are given in the dissertation.

REFERENCES

TEZE, D.; ZHAO, J., WIEMANN, M., KAZI, Z.G.A., LUPO, R.; ZEUNER, B.; VUILLEMIN, M.; RØNNE, M.E.; CARLSTRÖM, G.; DUUS, J.Ø.; SANEJOUAND, Y.-H.; O'DONOHUE, M.J.; KARLSSON, E.N.; FAURÉ, R.; STÅLBRAND, H.; SVENSSON, B. Rational enzyme design without structural knowledge: A sequence-based approach for efficient generation of transglycosylases, **Chemistry - A European Journal**. 27 (2021) 10323-10334.
<https://doi.org/10.1002/chem.202100110>.