



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## V. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a  
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Polimeroak sortzeko behar diren  
molekulen sintesia neurria  
egindako biokatalizatzaileak  
erabiliz**

*Ainhoa Maiz Iginitz,  
Elena Gabirondo Amenabar,  
Daniel Andres Sanz,  
Fernando Lopez Gallego  
eta Haritz Sardon Muguruza*

67-71 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.08>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## Polimeroak sortzeko behar diren molekulen sintesia neurrira egindako biokatalizatzaileak erabiliz

Ainhoa Maiz-Iginitz<sup>1</sup>, Elena Gabirondo<sup>1</sup>, Daniel Andres-Sanz<sup>2</sup>, Fernando Lopez-Gallego<sup>2</sup>, Haritz Sardon<sup>1</sup>

*1 POLYMAT, Kimikako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Manuel Lardizabal pasealekua 3, 20018, Donostia, Espainia*

*2 CIC biomaGUNE, "Center for Cooperative Research in Biomaterials", Miramon pasealekua 182, Donostia, Espainia*

*\*amaiz@cicbiomagune.es*

### Laburpena

Polimeroen industria geldialdirik gabe hazi da azken hamarkadetan, funtsezkoa bihurtu baita gure bizitzan. Ditugun polimero moten artean, polihidroxialkanoatoak propietate bikainak erakutsi dituzte, eta gainera bio-oinarrituak eta biodegradagarriak dira. Polimero hori lortzeko, proiektu honetan bide sintetiko berri bat bilatzen ari gara,  $\beta$ -zetoester batetik abiatua. Konposatu hori asimetriki erreduzitzen dute entzimek,  $\beta$ -hidroxiesterra lortzeko. Konposatu honetatik polihidroxialkanoato motako materialak ekoizteko gai izango gara.

### Abstract

Polymer industry has grown non-stop in the last decades, since it has become essential in our lives. Between the different types of polymers that we have, polyhydroxyalkanoate type polymers have shown excellent properties, and furthermore they are bio-based and biodegradable. In order to obtain this polymer, in this project we are trying a new synthetic path started from a  $\beta$ -ketoester. This compound was asymmetrically reduced by enzymes to obtain  $\beta$ -hydroxyesters. This  $\beta$ -hydroxyesters will be able to produce polyhydroxyalkanoate type materials.

### 1. Sarrera eta motibazioa

Material ezberdinen ekoizpenak eta prozesaketak onura asko ekarri dizkio gaur egungo gizarteari, eta plastikoa material horietako bat da. Gaur egun hainbat aplikaziotan erabiltzen dira plastikoak, ezinbesteko bihurtu direlarik. Plastikoa mota ezberdinak daude, eta lortu ditzakegun propietateak era askotarikoak dira. Orokorrean, plastikoa hauek petrolioa oinarritutakoak dira, beraz, ez dira material berriztagarriak. Hori aldatzeko alternatibak bilatzen ari da zientzia, hain zuzen ere polimeroen alorra. Material berriztagarriak aztertzen ari da plastikoa sintetizatzeke. Iturri berriztagarritakoak izateaz gain, material hauek, bio-oinarrituak izan daitezke. Bio-oinarritutako materiala organismo bizidunetatik eratorritako substantziekin egindako materiala da. Bio-oinarritutako polimero bat PHB-a da, poli-3-hidroxibutiratoa. Polimero hau poliester termoplastiko bat da, polihidroxialkanoatoen (PHA) taldekoa. Maurice Lemoignek aurkitu zuen PHB-a 1925ean. (Gabirondo et al., 2020)

Polimero hau sintetizatzeke metodo nagusia mikroorganismoetatik da. Horretarako, bakterio mota batzuk ingurune kontrolatu batean jartzen dira, non nitrogeno, fosforo edo oxigeno kopurua mugatua den, baina karbono iturria gehiegizkoa. Hau gertatzean, bakterio hauek PHB polimeroa sintetizatzen dute, eta zelularen barruan metatzen dituzte granulo moduan. Baina lortutako polimeroaren pisu molekularra eta propietateak kontrolatzea zaila da. (McAdam et al., 2020)

Bestalde, PHB-a biodegradagarria da, biodegradagarriak diren materialak, mikroorganismoen jardueraren ondorioz degradazio jasaten dute molekula simple edo bakunagoak bilakatuz. PHBaren kasuan 2 astetan pisuaren %60a galdu dezake. Propietate honek oso interesgarria bilakatzen du material hau. PHB-aren kasuan, polimeroa hidrolisi bidez depolimerizatu daiteke, ondorioz polimeroa bere eraikuntza-bloke molekularretan apurtzen da azido 3-hidroxibuturikoa lortuz. Horrez gain, polimero honek hesi propietate bikainak ditu, ondorioz ezaugarri hauek oso polimero interesgarrian bilakatzen dute PHB-a. Proiektu honetan,  $\beta$ -hidroxi ester bat sintetizatuko

dugu, PHB polimeroa lortzeko. Horretarako, biokatalisia eta polimeroen zientzia nahastuko ditugu, polimero jasagarri bat lortzeko. (Suzuki et al., 2021)

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan bezala, PHB polimeroaren unitate errepikakorra  $\beta$ -hidroxi azido bat da. Hauek sintetizatzekeo prozedura desberdinak erabil daitezke, baina erreakzio hauen enantioselektibitatea nabarmen alda daiteke. Aplikazio batzuetarako enantiopurutasuna oso esanguratsua da, hala nola, elikagai-osagarrietarako, farmazia-produktuetarako, kosmetikoetarako, eta beste produktu kimiko fin batzuetarako. (Nakamura et al., 2003)

$\beta$ -hidroxi azidoen sintesi kimikoa lan neketsua da, horretarako metal astunak erabiltzen dira katalizatzaile bezala, hauek toxikoak izanik. Erreakzioek baldintza gogorak behar dituzte tenperatura altuekin. Gainera, urrats askoko prozesuak dira, bitartekari eta taldea babesleak erabiltzera behartzen dutenak. Ondorioz, azpiproduktu asko sortzen dira erreakzio hauetan. Horrez gain, erreakzio hauen enantioselektibitatea ez da oso handia. (Spengler et al., 2013)

Bestalde,  $\beta$ -hidroxi azidoak sintetizatzekeo biokatalisian oinarritutako erreakzioak erabil daitezke. Honek abantaila handiak eskaintzen ditu sintesi kimikoarekin alderatuz. Biokatalisian, sistema bizidunak edo horien zatiak erabiltzen dira erreakzio kimikoak bizkortzeko, hau da katalizatzaile gisa erabiltzen dira. Entzimak oso erabiliak dira biokatalisian, beraien estrukturari esker konposatu organikoetan eraldaketa kimikoak egiteko gai direlako. Gainera, hainbat abantaila eskaintzen dizkigute; enantiopurutasun altuko produktuak lortzeko aukera ematen dute, gainera erreproduzigarriak dira eta erabili ondoren erraz deskonposa daitezke ingurunean. Horrez gain, entzimekin egindako erreakzioetan baldintza leunak erabiltzen dira eta erreaktibo arriskutsuak ez dira beharrezkoak.

Baina biokatalisiak bere alde txarrak dakartza, alde batetik eskalagarritasun zaila, kostuak altuak direla medio. Gainera, produktuen purifikazioa beharrezkoa da eta espazioa eta denboraren errendimenduak ez dira handiak. Erabiltzen diren erreaktibo kontzentrazioak baxua izan behar du eta erreakzio-denbora luzeak behar dira. Honen arrazoia entzimaren egonkortasuna da. Entzimak ingurune zehatz batzuetan ondo funtzionatzen dute, baina baldintzak aldatzean, beraien aktibitatea galtzen hasten dira. Desabantaila hau gainditzeko, entzima hauek kimikaren bidez hobetzen dira. Horretarako, entzima hauek immobilizatu egiten dira erreakzio kimikoak erabiliz edo tratamendu espezifikoaren bat egiten zaio entzimen egitura egonkortzeko. (Schmid et al 2001)

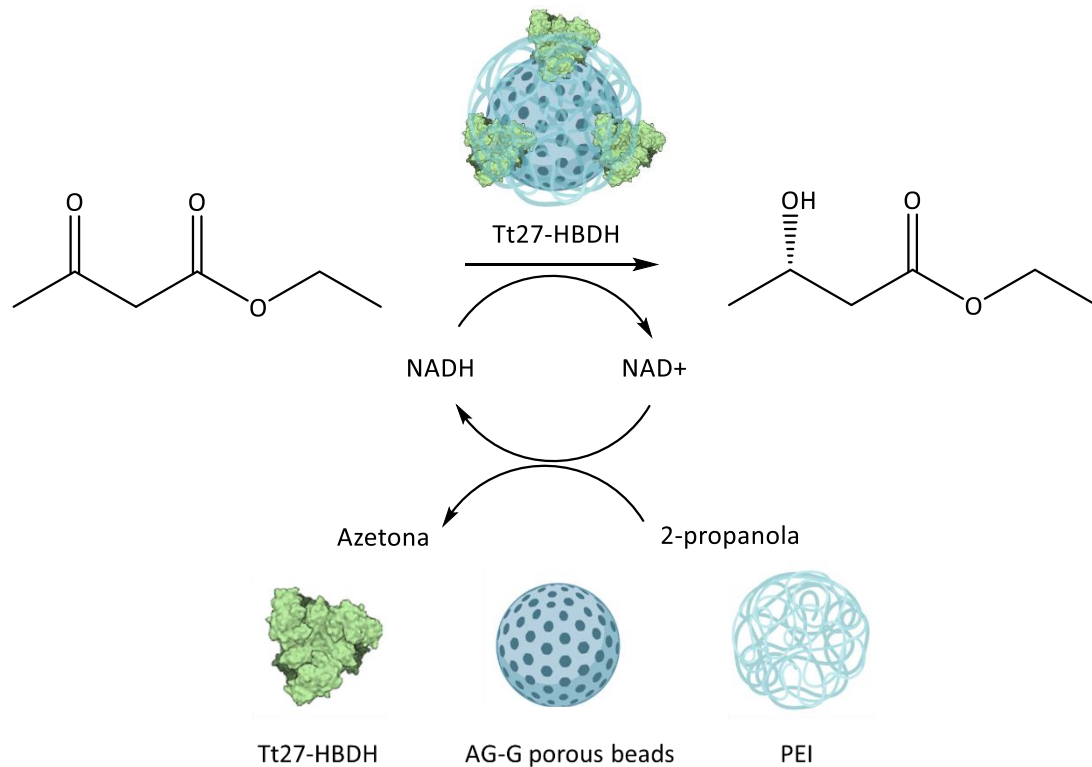
Beraz, immobilizatutako entzimak erabiliz gero, entzimen selektibitate bikainak posible egiten du monomero kiralen sintesia. Molekula kiralak interesgarriak dira polimeroen zientziarako, eman ditzazketen propietate bereziengatik. Proiektu honetan jada deskribatuta dagoen biokatalizatzaile bat erabiltzen da enantiopurua den hidroxi ester bat sintetizatzekeo. Molekula hau polimeroen zientziarako aztertzen ari gara, polihidroxialkanoatoen taldeko polimeroak lortzeko.

## 3. Ikerketaren muina

Sarreran esan bezala, interes handikoak dira hidroxi azido kiralak polimeroen zientzian. Hauen sinterirako, entzima batekin hasten gara, non  $\beta$ -zetoester bat erreduzitzen dugun  $\beta$ -hidroxiester bat lortzeko. Horretarako Tt27-HBDH entzima erabiltzen da, entzima hau thermus thermophilus taldekoa da, (S)-3-hydroxybutyryl-CoA deshidrogenasa bat. Entzima hau NAD(P)H mendekoa da, horrek esan nahi du, entzima mota honek erreakzioa egiteko NAD(PH) (nicotinamide adenine dinucleotide) molekula behar duela. Gainera, entzima honekin lortutako produktuen enantiopurutasuna oso altua da, %99 baino gehiagokoa.

Hala ere, lehen aipatu dugun bezala, entzima gehien arazoa beraien egonkortasuna da. Hau hobetzeko, entzima immobilizatu erabiliko dugu. Entzima honentzat erabiliko dugun immobilizazio-protokoloa poroak dituzten agarosa partikulekin da. Agarosa talde glioxilikoekin aktibatzen da, eta ondoren polietileniminaz estaltzen da gutzia. Tratamendu honekin oraindik eta egonkortasun handiagoa lortzen da. (Orrego et al., 2021)

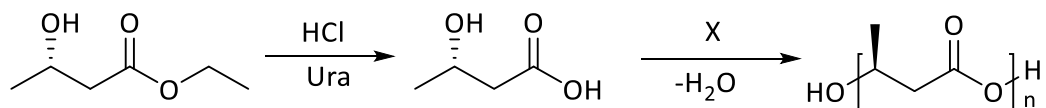
### 1. irudia. $\beta$ -zetoesterraren erredukzioa biokatalizatzailearekin



Biokatalizatzaile honekin lortutako produktua etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa da. Biokatalizatzailearen erabileraren ondorioz, produktua laborategiko eskalan lortzeko gaitasuna daukagu. Lortutako produktu honen kiralitatea ustiatu nahi dugu polimeroen kimikan. Horretarako hainbat erreakzio bide azertu ditugu.

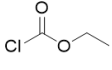
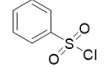
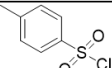
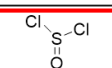
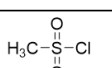
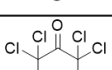
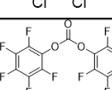
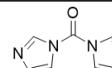
Lehenengo erreakzio bidean etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa polimerizatzeko, lehenik hidrolizatu egin genuen, hidrolisi azidoaz, hidroxi azido bat lortuz. Ondoren, polimerizatzen saiatu gara polikondentsazioz, konposatu ezberdinak probatuz. Polikondentsazioan, kondentsazio bat gertatzen da molekulen artean, molekula txikiak askatuz, adibidez ura, metanola, azido klorhidrikoa edo bestelako konposatuak askatuz. Monomeroak edo oligomeroak elkarren artean erreakzionatzen joaten dira polimero kateak eratuz.

### 2. irudia. Polimerizazio erreakzioaren eskema



Hidrolisian sortutako hidroxi azidoa beta posizioan duenez alkohol taldea, konposatu ez-egonkorra da. Alkohol talde hau eliminatzean sortzen den lotura bikoitza konjokatua baitago azidoarekin. Horren ondorioz, sortzen den produktua eliminazioz oso egonkorra da. Beraz, hau ez gertatzeko polimerizazioan konposatu oso erreaktiboak erabili genituen, polimerizazioa erraztua egoteko. Probatutako konposatu guztiak kondizio berdinetan erabili genituen, 24 orduz, 50 °C-tan eta x erreaktiboaren 1,2 ekibalente botaz. Hurrengo taulan agertzen dira aztertutako konposatuak eta lortutako etekinak H-RMN-a erabiliz.

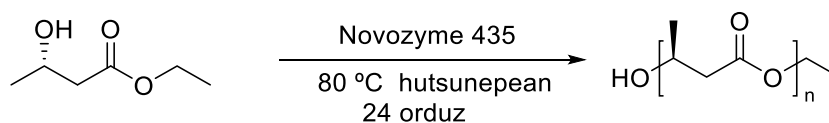
## 1. taula. Aztertutako molekulak eta lortutako etekinak

Molecule	Name	Yield (%)
	Ethyl chloroformate	45,4
	Benzenesulfonyl chloride	83,5
	Tosyl chloride	82,1
	Thionyl chloride	91,9
	Methanesulfonyl chloride	85,1
	Hexachloroacetone	24,2
	Bis(pentafluorophenyl) carbonate	18,2
	1,1'-Carbonyldiimidazole	36,3

Tionilo kloruro konposatuak ematen zituen polimeroaren sintesian etekin (yield) handienak, beraz bertan lortutako konposatua MALDI-TOF proba egiteko erabili genuen. Teknika honekin, molekulak ionizatzen dira matrize bat erabiliz, molekulen pisu molekularrak lortzeko. Tionilo kloruroarekin lortutako produktuarekin 700-900 g/mol tarteko pisu molekularrak lortu genituen. Beraz, 7-8 molekula lotzen dira elkarren artean kate bakoitzean.

Beste erreakzio bide bat ere aztertzen ari gara, non zuzenean etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa polimerizatzen saiatzen garen polikondentsazioz. Bertan, konposatu hau ez dugu hidrolizatzen, eta hidroxi esterretik hasten gara. Lehenengo saiakeran, novozyme 435 biokatalizatzaile komertziala erabili dugu polimerizaziorako. Biokatalizatzaile honek *candida antartica*-tik lortutako lipasa b entzima dauka, poli metil metakrilatozko partikuletan immobilizatuta.

## 3. irudia. Polimerizazio erreakzioaren eskema



Erreakzioa, 80 °C-tan egin zen 24 orduz hutsunepean, disolbatzailerik gabe, eta biokatalizatzailea %10 gehitu zen, erreaktiboarekin alderatuz pisutan. Bertan lortutako produktua MALDI-TOF frogaz aztertu zen, eta 600-800 g/mol tarteko pisu molekularrak lortu ziren. Oraindik polimerizazio kondizio gehiago aztertu behar dira novozyme 435 biokatalizatzailearekin, baina etorkizun ona izan dezakeela dirudi. Horrez gain, beste katalizatzaile batzuk aztertzen ari gara gaur egun, novozyme 435 biokatalizatzailearekin alderatzeko. Horretarako, katalizatzaile oso ezberdinak probatzen ari gara, entzimatiakoak, organikoak eta organometalikoak. Oraindik katalizatzaile ezberdinentzat kondizio egokienak bilatzen ari gara erreakziorako, ondoren beraien artean alderatzeko. Egin ditugun saiakeretan lortutako etekinak eta pisu molekularrak lehenengo erreakzio bidearen antzekoak dira. Lehenengo erreakzio bidean erabiltzen diren erreaktiboak arriskutsuagoak eta toxikoagoak dira, bigarren erreakzio bidearekin alderatuz. Beraz erreakzio hauek aztertzen jarraituko dugu.

#### 4. Ondorioak

Proiektu honetan, molekula kiral bat sintetizatu da, biokatalizatzaile bat erabiliz. Lortutako produktuak purutasun eta enantiopurutasun handia dauka, eta polimeroen zientzian erabiltzeko saiakerak egin dira.

Beraz, polikondentsatzen saiatu gara bi bide ezberdin erabiliz. Alde batetik, hidroxi esterra hidrolizatu eta lortutako hidroxi azidotik polimerizatzen saiatu gara. Horretarako hainbat konposatu aztertu genituen, non tionilo kloruroak eman zituen emaitzarik onenak. Erabilitako konposatuak toxikoak eta ez jasangarriak ziren.

Bestalde, hidroxi esterretik polimerizazioak aztertzen ari gara, katalizatzaile ezberdinak erabiliz. Egindako saikeretan ikusi dezakegu bi bideetatik lortutako etekina eta pisu molekularra alderagarriak direla. Beraz, bigarren erreakzio bide hau jasangarriagoa denez, katalizatzaile egokiena bilatzen saiatuko gara

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, esan bezala katalizatzaile ezberdinak aztertzen jarraituko dugu. Horretarako mota ezberdinetako katalizatzaileak aukeratzen ari gara. Katalizatzaile hauetako batzuk entzimatiakoak dira, beste batzuk organikoak, eta beste batzuk organometalikoak. Katalizatzaile mota bakoitzerako kondiziorik egokienak bilatzen ari gara erreakzio honetarako. Eta behin kondizioak izanda, katalizatzaileak beraien artean alderatuko ditugu.

#### 6. Erreferentziak

- Gabirondo, E., Sangroniz, A., Etxeberria, A., Torres-Giner, S. eta Sardon, H. (2020) Poly(hydroxy acids) derived from the self-condensation of hydroxy acids: From polymerization to end-of-life options. *Polym. Chem.* 11, 4861–4874. <https://doi.org/10.1039/D0PY00088D>
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., eta Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers.* 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. eta Harada, T. (2003) Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *TETRAHEDRON: ASYMMETRY* 14, 2659–2681. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(03\)00526-3](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(03)00526-3)
- Orrego, A. H. et al.(2021) Self-sufficient asymmetric reduction of  $\beta$ -ketoesters catalysed by a novel and robust thermophilic alcohol dehydrogenase co-immobilised with NADH. *Catal. Sci. Technol.* 11, 3217–3230. <https://doi.org/10.1039/D1CY00268F>
- Schmid, A. et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* vol. 409 258–268. <https://doi.org/10.1038/35051736>
- Spengler, J., eta Albericio, F., (2013) Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -Unsubstituted  $\beta$ -Hydroxy Acids. *Advances in Organic Synthesis.* 3-35 (33) <https://doi.org/10.2174/9781608054756113040003>
- Suzuki, M., Tachibana, Y., eta Kasuya, K. (2021) Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polym J.* 53, 47–66. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00396-5>