



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Degradación de éteres bencílicos catalizada por una peroxigenasa inespecífica de origen fúngico”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Raúl Mireles López

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Marcela Ayala Aceves  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

COMITÉ TUTOR  
Dr. Jaime Escalante García  
Centro de Investigaciones Químicas, UAEM.

Dr. Agustín López Munguía Canales  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por la asesoría, confianza y por contagiar la fascinación de estudiar el fenómeno científico que han hecho que este proyecto sea exitoso.

A los miembros del comité tutor, Dr. Jaime Escalante García y Dr. Agustín López-Munguía Canales por la retroalimentación y las aportaciones en cada reunión.

A la Biol. Rosa Román Miranda por el apoyo técnico y consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Joaquín Ramírez Ramírez por la paciencia para compartir el conocimiento *Jedi* de las UPO.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio 8 y en el grupo de investigación, especialmente a Alina y Jorge con quién compartí muchos buenos momentos.

Al Dr. Enrique Galindo por el apoyo para realizar los estudios de espectrometría de masas y a la Dra. Brenda Valderrama y al Dr. Rodolfo Valle por su asesoría en los ensayos de actividad catalasa.

Al Dr. Miguel Alcalde (CSIC, España) por facilitar las herramientas moleculares para la expresión de PaDa-I.

A los miembros del jurado Dra. Wendy Xolalpa, Dra. Liliana Pardo, Dr. Enrique Rudiño, Dr. Rafael Vázquez-Duhalt y Dr. Jorge Luis Folch por sus aportaciones durante la revisión de este documento.

A la UNAM, el IBt y su comunidad por la bondad para desarrollar personas y profesionales. Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto PAPIIT IN214619.

Al CONACyT por otorgar la beca 720927 durante los estudios de maestría.

# Índice

1. Introducción .....	10
2. Antecedentes .....	11
2.1 Historia y clasificación de las UPO .....	11
2.2 Características bioquímicas de las UPO .....	14
2.2.1 Estructura de las UPO .....	14
2.2.2 Capacidad catalítica de las UPO .....	16
2.3 Oxidación de éteres por AaeUPO.....	18
2.4 Reacciones secundarias durante la oxidación de éteres .....	22
2.4.1 Actividad tipo catalasa .....	22
2.4.2 Inactivación suicida .....	23
2.4.3 Estrategias para retardar la inactivación por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	26
3. Hipótesis .....	28
4. Objetivos .....	28
4.1 Objetivo general .....	28
4.1.1 Objetivos específicos .....	28
5. Materiales y equipo .....	29
5.1 Instrumentos .....	29
5.2 Columnas.....	29
5.3 Reactivos y medios de cultivo.....	29
6. Metodología .....	32
6.1 Metodología experimental.....	32
6.1.1 Expresión y purificación de la peroxigenasa recombinante .....	32
6.1.2 Análisis de la oxidación de éteres bencílicos .....	33
6.2 Metodología in silico .....	39
6.2.1 Cálculo de energía de disociación de enlace .....	39
6.2.2 Estudios de acoplamiento molecular flexible.....	40
7. Resultados y Discusión.....	42
7.1 Purificación de la peroxigenasa recombinante PaDa-I .....	42
7.2 Análisis de la oxidación de éteres bencílicos.....	43
7.2.1 Estudio de la relación de sustrato/co-sustrato sobre la actividad de PaDa-I .....	44
7.2.2 Efecto de la estructura de los éteres bencílicos sobre su oxidación .....	52
8. Conclusiones.....	67
9. Perspectivas .....	68
10. Referencias .....	69
11. Anexos .....	75
Anexo I .....	75
Anexo II .....	76
Anexo III .....	77
Anexo IV.....	78
Anexo V.....	79
Anexo VI.....	82

<b>Anexo VII.....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo VIII.....</b>	<b>85</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Residuos que componen el túnel de acceso al sitio activo de AaeUPO.....	15
Figura 2. A) Vista desde el solvente hacia el sitio activo. B) Sitio activo de las UPO. ....	15
Figura 3. Reacciones catalizadas por las peroxigenasas inespecíficas.....	17
Figura 4. Mecanismo propuesto para la ruptura de enlace éter como resultado de la oxidación catalizada por UPO. ....	20
Figura 5. Mecanismo propuesto para la inactivación de hemo-peroxidasas.....	26
Figura 6. Cromatograma para el análisis de alcohol bencilico, benciloxietanol, alilbenciléter, benciloxiacetaldehído y dibenciléter.....	35
Figura 7. RMSD en función del tiempo durante la simulación de dinámica molecular de PaDa-I. ....	41
Figura 8. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. ....	42
Figura 9. Posibles vías catalíticas y de inactivación de AaeUPO durante la oxidación de sustratos de baja afinidad.....	43
Figura 10. Curva de progreso de la oxidación de benciloxietanol e inactivación enzimática en función de las adiciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	45
Figura 11. Inactivación dependiente de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a diferentes concentraciones de benciloxietanol.....	46
Figura 12. A) Curva de Michaelis-Menten para actividad catalasa de PaDa-I. B) Simulación de la velocidad inicial de producción de O <sub>2</sub> en función de la concentración de benciloxietanol.. ....	48
Figura 13. Número de recambio total ( <i>TTN</i> ) determinado para de benciloxietanol y diferentes adiciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
Figura 14. Número de recambio total ( <i>TTN</i> ) para diferentes concentraciones de benciloxietanol, con adiciones de 0.2 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
Figura 15. Formación de radicales libres, precursores del hemiacetal formado en la reacción de oxidación de éteres catalizada por PaDa-I. ....	52
Figura 16. Afinidad aparente entre el éter y la proteína en función de la distancia del hierro del sitio activo a C <sub>Benz</sub> (azul) y a C <sub>R</sub> (rojo) para los diferentes éteres.....	55
Figura 17. Frecuencia en la que las posiciones C <sub>Benz</sub> y C <sub>R</sub> se encuentran cercanas al hierro del hemo ( $\leq 6\text{\AA}$ ) y su interacción con el túnel de la peroxigenasa es favorable ( $\leq -6.5$ kcal/mol). ....	57
Figura 18. Interacciones del ácido benciloxiacético con residuos del túnel de PaDa-I.. .	58
Figura 19. Interacciones de benciloxietanol con residuos del túnel de la PaDa-I. ....	58
Figura 20. Acoplamiento molecular de A) dibenciléter y B) alilbenciléter con PaDa-I.....	59
Figura 21. Posiciones favorecidas del alilbenciléter respecto al sitio activo de PaDa-I.....	59

Figura 22. A) Inactivación de PaDa-I durante reacciones en presencia de 0.7 mM de cada éter bencílico. B) Número de recambio total para cada éter bencílico. ....	60
Figura 23. Productos esperados de la oxidación de éteres bencílicos. ....	61
Figura 24. Hipótesis de las vías de oxidación del alilbenciléter. ....	62
Figura 25. A) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de la cinética de oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato. B) Ajuste de doble recíproco de la cinética de la oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato.....	64
Figura 26. Ajuste de Michaelis-Menten para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxiacetato, acetato y benciloxietanol. ....	66
Figura 27. A) Estabilidad de PaDa-I en acetonitrilo y t-butanol. B) Efecto de t-butanol sobre la inactivación durante la oxidación de benciloxietanol con adiciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ....	75
Figura 28. A) Ajuste gráfico de Dixon para inhibición competitiva. B) Ajuste gráfico de Cornish-Bowden para inhibición acompetitiva.....	76
Figura 29. A) Ajuste de Michaelis-Menten para benciloxietanol. B) Ajuste de doble recíproco para benciloxietanol. C) Gráfico de Dixon para benciloxietanol. D) Gráfico de Dixon para benciloxiacetato. ....	81

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las UPO caracterizadas experimentalmente ordenadas por familia y peso molecular.....	13
Tabla 2. Parámetros cinéticos de <i>AaeUPO</i> para diferentes sustratos.....	21
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la dismutación de peróxido para <i>AaeUPO</i> , <i>CfuCPO</i> y <i>Cat-1</i> .....	22
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la dismutación de peróxido ( $H_2O_2$ y orgánicos) para <i>AaeUPO</i> y <i>CfuCPO</i> .....	23
Tabla 5. . Éteres bencílicos utilizados en este trabajo.....	30
Tabla 6. Condiciones de análisis por cromatografía de líquidos para los éteres bencílicos.....	34
Tabla 7. Tiempo de retención para los éteres bencílicos en el análisis por cromatografía de gases.....	37
Tabla 8. Número de recambio total ( <i>TTN</i> ) y cantidad de sustrato oxidado para diferentes concentraciones iniciales de benciloxietanol, después de varias adiciones de 0.2 mM de $H_2O_2$ .....	51
Tabla 9. Energía de disociación de enlace C-H en las posiciones adyacentes al oxígeno de los éteres bencílicos.....	53
Tabla 10. Frecuencia en la que se favorecen las posiciones $C_{Benz}$ y $C_R$ en relación a la distancia al hierro del hemo.....	54
Tabla 11. Purificación de PaDa-I.....	75
Tabla 12. Parámetros cinéticos aparentes para la actividad catalasa de PaDa-I.....	76
Tabla 13. Residuos involucrados en las interacciones éter bencílico-túnel de PaDa-I...	77
Tabla 14. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato.....	79
Tabla 15. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de benciloxietanol.....	79
Tabla 16. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de acetato.....	80
Tabla 17. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxiacetato.....	82
Tabla 18. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de acetato.....	82
Tabla 19. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxietanol.....	83



## **Listado de abreviaturas**

°C	Grado centígrado
6-311++G**	Conjunto de base
Å	Ångström
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
B3LYP	Funcional híbrido
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> , por sus siglas en inglés)
cm	Centímetro
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad ( <i>Density Functional Theory</i> , por sus siglas en inglés)
E	Energía
EC	Clasificación de enzimas ( <i>Enzyme Classification</i> , por sus siglas en inglés)
g/L	Gramo por litro
Kcal	Kilocaloría
$k_{cat}$	Número de recambio
$k_{cat}/K_m$	Eficiencia catalítica
kDa	Kilodalton
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
m	Metro
M	Mol/litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol/litro
mm	Milímetro
NBD	5-nitro-1,3-benzodioxol
nM	Nanomol/litro
nm	Nanómetro
ns	Nanosegundo
PDB	Base de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> , por sus siglas en inglés)
QM	Mecánica cuántica ( <i>Quantum Mechanics</i> , por sus siglas en inglés)
RMSD	Raíz del error cuadrático medio ( <i>Root-mean-square Deviation</i> , por sus siglas en inglés)
s	Segundo
t	Tiempo
THF	Tetrahidrofurano
TTN	Número de recambio total ( <i>Total turnover number</i> , por sus siglas en inglés)
$U_{ABTS}$	Cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 $\mu$ mol de ABTS en un minuto
$U_{NBD}$	Cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 $\mu$ mol de NBD en un minuto

UV	Ultravioleta
V	Voltio
v	Volumen
ZPE	Energía en el punto cero ( <i>Zero-point Energy</i> , por sus siglas en inglés)
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromol/litro
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## 1. Introducción

El uso de moléculas con enlaces éter es muy extenso y frecuente en la vida cotidiana; estos compuestos pueden ser encontrados como ingredientes *activos* en medicamentos, pesticidas y algunos otros productos de la industria agroquímica, alimenticia y cosmética. De manera general, los éteres muestran baja reactividad química en condiciones fisiológicas; esta misma propiedad les confiere un carácter recalcitrante y, por lo tanto, pueden ser especies contaminantes si no son manipulados adecuadamente (White, Russell and Tidswell 1996).

Recientemente se ha descubierto un grupo de enzimas hemo-tiolato de origen fúngico que posee una gran versatilidad catalítica por los cientos de sustratos con los que han sido caracterizadas. Estas enzimas se han clasificado como peroxigenasas inespecíficas (*UPO*, por sus siglas en inglés) y catalizan una amplia variedad de reacciones de oxidación sobre moléculas orgánicas de diferente estructura y reactividad; esto ha atraído especial atención por sus aplicaciones potenciales en biodegradación y biorremediación.

Gran parte del interés que generan estos biocatalizadores frente a otros sistemas se debe a las características de su desempeño; son enzimas extremadamente versátiles que catalizan una gran variedad de reacciones, muestran selectividad en las oxidaciones que catalizan y además, poseen alta estabilidad en ciertos solventes orgánicos. Por otro lado, funcionan a temperatura ambiente, pH neutro y en condiciones de reacción que requieren la adición de peróxido de hidrógeno como co-sustrato y no otros co-factores costosos como ocurre con otras enzimas *redox*. En este sentido, un miembro del grupo de las *UPO* ha sido descrito como catalizador de la degradación de éteres por medio de un mecanismo y condiciones de reacción no reportadas hasta ahora: ruptura oxidativa del enlace éter (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009).

En este trabajo se utilizó una *UPO* de origen recombinante para determinar los factores moleculares que guían la oxidación de éteres bencílicos, así como las

condiciones de reacción, estructura y reactividad de los sustratos e interacción enzima-sustrato.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Historia y clasificación de las UPO**

En 1959 se describió el primer miembro del grupo de las peroxigenasas inespecíficas, la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* (*CfuCPO*) que es conocida por catalizar la halogenación de compuestos orgánicos a partir de iones cloruro, bromuro o yoduro. Puesto que sus características catalíticas no le permitían ser clasificada dentro de otras familias de hemo-tiolato proteínas como las del citocromo P450, la *CfuCPO* fue considerada un elemento aislado de las hemo-tiolato peroxidasas por los siguientes 45 años (Hager 2010).

Fue hasta 2004 cuando se descubrió al segundo miembro del grupo: la peroxigenasa de *Agrocybe aegerita*. Inicialmente se describió como una peroxigenasa aromática, debido a que la caracterización inicial se hizo con la oxidación de sustratos de esta naturaleza. Así, su nombre ha cambiado en función de las características de los compuestos sobre los que puede catalizar su oxidación. Para el 2013, el catálogo de sustratos era tan amplio que se decidió nombrar a esta enzima como **peroxigenasa inespecífica** (*AaeUPO*), dando lugar a la clasificación general del grupo (*EC* 1.11.2.1) (Hofrichter, Kellner and Pecyna, et al. 2015).

A partir del descubrimiento de *CfuCPO* y *AaeUPO*, los miembros más estudiados del grupo, se han caracterizado experimentalmente sólo 12 proteínas más (tabla 1) aunque se han predicho más de 4000 secuencias, exclusivamente en genomas de hongos (Hofrichter, Kellner and Herzog, et al. 2020).

La caracterización ha permitido dividir al grupo en dos grandes familias de UPO. La familia I está compuesta por secuencias “cortas” y a su vez, se dividen en dos subfamilias:

- Subfamilia 1. Carecen de péptido señal. Tamaño promedio de 31.9 kDa y punto isoeléctrico de 7.3.
- Subfamilia 2.- Tamaño promedio de 29.0 kDa y punto isoeléctrico de 6.4.

Por otro lado, la familia II se compone de secuencias “largas” que tienen identificado un péptido señal y un característico puente disulfuro cercano al extremo carboxilo terminal. Su tamaño y punto isoeléctrico promedio es de 44.4 kDa y 5.8, respectivamente.

Dado que aún se desconoce su función *in vivo* y por lo tanto los inductores de la expresión, estas enzimas son difíciles de obtener a partir de los hongos que las expresan. Por lo anterior, un método adecuado para el estudio de este grupo de enzimas ha sido la expresión heteróloga, 5 de las 14 secuencias caracterizadas experimentalmente se han obtenido de esta manera. De hecho, la secuencia de AaeUPO ha sido sometida a un proceso de evolución dirigida para optimizar su expresión y secreción en *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo como resultado la variante PaDa-I (Molina-Espeja, et al. 2014).

PaDa-I tiene nueve mutaciones sobre la secuencia original de AaeUPO, de las cuales cuatro están en el péptido señal y cinco sobre la proteína madura. La caracterización de esta variante ha demostrado que estas mutaciones aumentan la expresión y secreción de la enzima y no tienen efecto sobre la estructura ni la capacidad catalítica respecto a la secuencia original (Molina-Espeja, et al. 2014, Ramirez-Escudero, et al. 2018).

Tabla 1. Clasificación de las UPO caracterizadas experimentalmente ordenadas por familia y peso molecular. En negritas se indican las obtenidas por expresión heteróloga. NR- No Reportado. \*El peso molecular incluye las glicosilaciones.

Familia	Nombre	Organismo (sistema de expresión)	Tamaño (kDa)	Punto isoeléctrico	Referencia
I.1	<b>rCviUPO</b>	<i>Chaetomium virescens</i> ( <i>E. coli</i> C41 (DE3))	52 (dimérica)	7.7	(González-Benjumea, et al. 2020)
I.2	<b>rDcaUPO</b>	<i>Daldinia caldariorum</i> ( <i>E. coli</i> C41)	55 (dimérica)	6.3	(Linde, et al. 2020)
I.2	<i>CglUPO</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	36*	5.6	(Kiebist, et al. 2017)
I.2	<i>CfuCPO</i>	<i>Caldariomyces fumago</i>	42*	4.0	(Shaw and Hager 1959)
I.2	<i>MweUPO</i>	<i>Marasmius wettsteinii</i>	61* (dimérica)	5.1	(Ullrich, Poraj-Kobielska, et al. 2018)
I.2	<i>MroUPO</i>	<i>Marasmius rotula</i>	64* (dimérica)	5.0-5.3	(Gröbe, et al. 2011)
I.2	<b>rMroUPO</b>	<i>Marasmius rotula</i> ( <i>E. coli</i> BL21)	30	NR	(Carro, et al. 2019)
II	<i>ApaUPO</i>	<i>Agrocybe parasítica</i>	37-47	4.5-8.6	(Hofrichter, Kellner and Pecyna, et al. 2015)
II	<b>AnHTP</b>	<i>Apergillus niger</i> ( <i>P. pastoris</i> CBS 7435)	40.2	NR	(Dachs 2016)
II	<i>PabUPO</i>	<i>Psathyrella aberdarensis</i>	40-41	3.8-4.2	(Hofrichter, Kellner and Herzog, et al. 2020)
II	<i>CveUPO</i>	<i>Coprinopsis verticillata</i>	42	4.5-5.2	(Anh, et al. 2017)
II	<i>CraUPO</i>	<i>Coprinellus radians</i>	43-45*	3.8-4.2	(Dachs 2016)
II	<b>rCciUPO</b>	<i>Coprinopsis cinerea</i> ( <i>A. oryzae</i> )	44*	5.1-7.6	(Babot, et al. 2013)
II	<i>AaeUPO</i>	<i>Agrocybe aegerita</i>	45-46*	4.9-6.1	(Ullrich, Nüske, et al. 2004)
II	<b>PaDa-I</b>	<i>Agrocybe aegerita</i> ( <i>S. cerevisiae</i> BJ5465)	51-52*	5.5	(Molina-Espeja, et al. 2014)
ND	<b>rHinUPO</b>	<i>Humicola insolens</i> (NR)	NR	NR	(Kiebist, et al. 2017)

## **2.2 Características bioquímicas de las UPO**

### **2.2.1 Estructura de las UPO**

Las *UPO* son hemo-proteínas extracelulares que son estables en amplios intervalos de pH, temperatura y a diversos solventes orgánicos en gran medida por su alto grado de glicosilación (10-40% del peso molecular). *AaeUPO* y *CfuCPO* comparten sólo el 27% de identidad a nivel de secuencia primaria<sup>1</sup>; sin embargo, son proteínas globulares con alta similitud estructural. La estructura de ambas está compuesta por  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  cortas que forman una cavidad tipo túnel cónico que permite el acceso del sustrato al sitio activo, ubicado al interior de la proteína (figura 1). En el sitio activo, se ha observado que el grupo hemo está coordinado a la proteína a través de una interacción entre el átomo de hierro del hemo y el átomo de azufre de un residuo de cisteína (Ramirez-Escudero, et al. 2018, Sundaramoorthy, Turner and Poulos 1995).

El túnel de *AaeUPO* está formado en un 71% por residuos de naturaleza hidrofóbica que modulan la entrada y acomodan los sustratos sobre el sitio activo (figura 1).

Como se mencionó antes, el sitio activo de las *UPO* posee un grupo prostético hemo, cuyo átomo de hierro se coordina con los átomos de nitrógeno de la protoporfirina IX y el átomo de azufre de un residuo de cisteína de la proteína. En este sentido, otra característica de las *UPO* es que este residuo de cisteína se encuentra en un motivo conservado Pro-Cys-Pro. Además, se sabe que existe un par ácido/base cercano al sitio activo que es responsable de la activación del peróxido (Glu/Arg en *AaeUPO* y en Glu/His en *CfuCPO*) y un ión estructural de  $Mg^{2+}$  que interacciona con uno de los propionatos del hemo (figura 2) (Pecyna, et al. 2009, Piontek, et al. 2013, Ramirez-Escudero, et al. 2018).

---

<sup>1</sup> Alineamiento (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) de la secuencia FASTA de

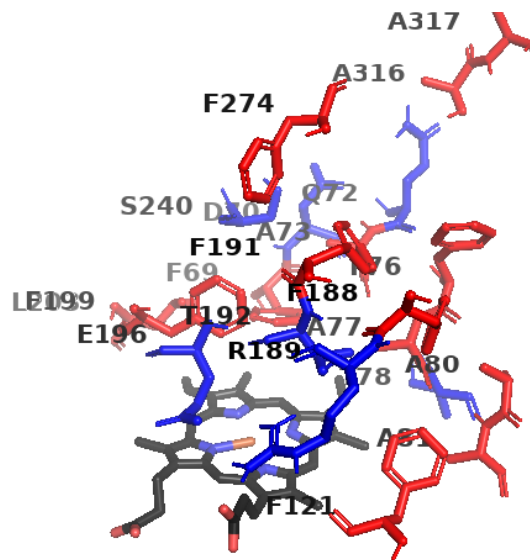


Figura 1. Residuos que componen el túnel de acceso al sitio activo de *AaeUPO*. En rojo se muestran los residuos no polares (F69, A73, F76, A77, A80, A81, F121, F188, F191, F199, L203, F274, A316, A317) y en azul los residuos polares (D70, D72, T78, R189, E196, S240). En negro se muestra el grupo hemo. (Ramírez-Ramírez, et al. 2020)

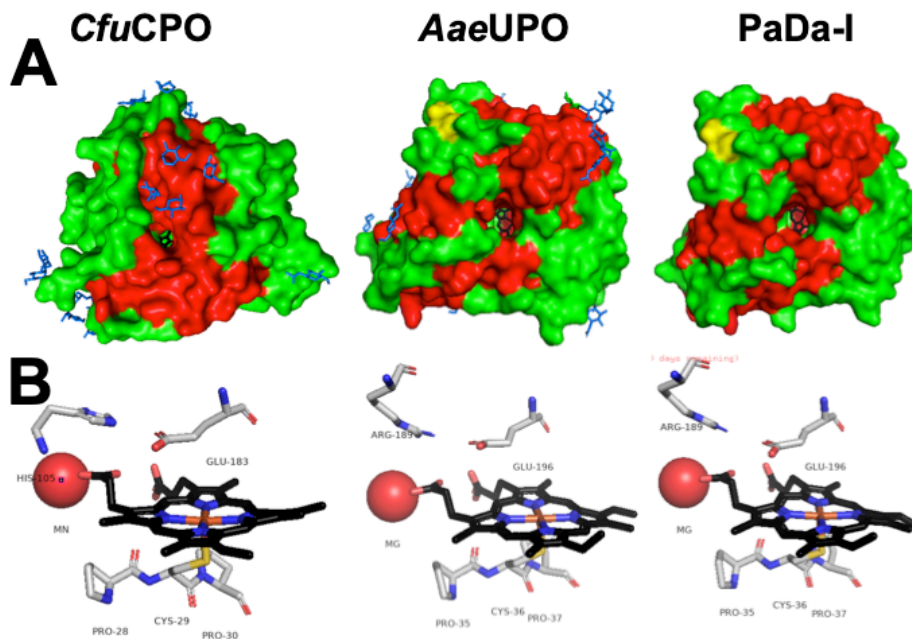


Figura 2. A) Vista desde el solvente hacia el sitio activo. En rojo se indican los residuos que pertenecen a  $\alpha$ -hélices, en amarillo los que conforman las hojas- $\beta$  y en verde los que forman *loops*. En azul se muestran algunos azúcares. B) Sitio activo de las UPO. En negro se muestra el grupo hemo; esfera roja representa al ion de magnesio.



### **2.2.2 Capacidad catalítica de las UPO**

Como se mencionó antes, AaeUPO ha recibido diferentes nombres a lo largo de su historia de acuerdo las reacciones que se han caracterizado. Cuando fue descubierta en 2004 se describió como haloperoxidasa por su capacidad halogenante y en 2007 se le nombró haloperoxidasa-peroxigenasa por la oxigenación regioselectiva del naftaleno. Posteriormente, en 2008, cambió a peroxigenasa aromática tras el reporte de la oxidación del átomo de nitrógeno en la piridina y finalmente, el catálogo de sustratos se amplió a hidrocarburos alifáticos por lo que se le nombró **peroxigenasa inespecífica** en 2013 (Hofrichter, Kellner and Pecyna, et al. 2015).

Actualmente, se han descrito más de 350 moléculas orgánicas como sustratos de las UPO y las reacciones que catalizan se pueden clasificar de acuerdo al número de electrones involucrados en la reacción de oxidación: las de un electrón (peroxidasa clásica) y las de dos electrones con transferencia de oxígeno (peroxigenasa). Ambos tipos de reacción son dependientes de la activación de las UPO por un co-sustrato que normalmente es peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o algún otro peróxido orgánico. Este mecanismo se detallará más adelante.

En la figura 3 se muestran los dos tipos de reacciones que catalizan las UPO: peroxidasa (remoción de un electrón) y peroxigenasa (oxidación de dos electrones, que involucra la transferencia de un átomo de oxígeno). Por ejemplo, sobre sustratos fenólicos normalmente las UPO catalizan reacciones tipo peroxidasa donde el producto formado es un radical libre. De manera no enzimática, este radical puede reaccionar con otro radical libre, para iniciar una polimerización. Para las reacciones de peroxigenación se han descrito una amplia variedad de sustratos y reacciones que siguen un mismo mecanismo: hidroxilación de alcanos, epoxidación de alquenos y alquinos, oxigenación de heteroátomos, N-dealquilación, oxidación de bromuro y por supuesto, ruptura de enlace éter (Hofrichter, Kellner and Herzog, et al. 2020).

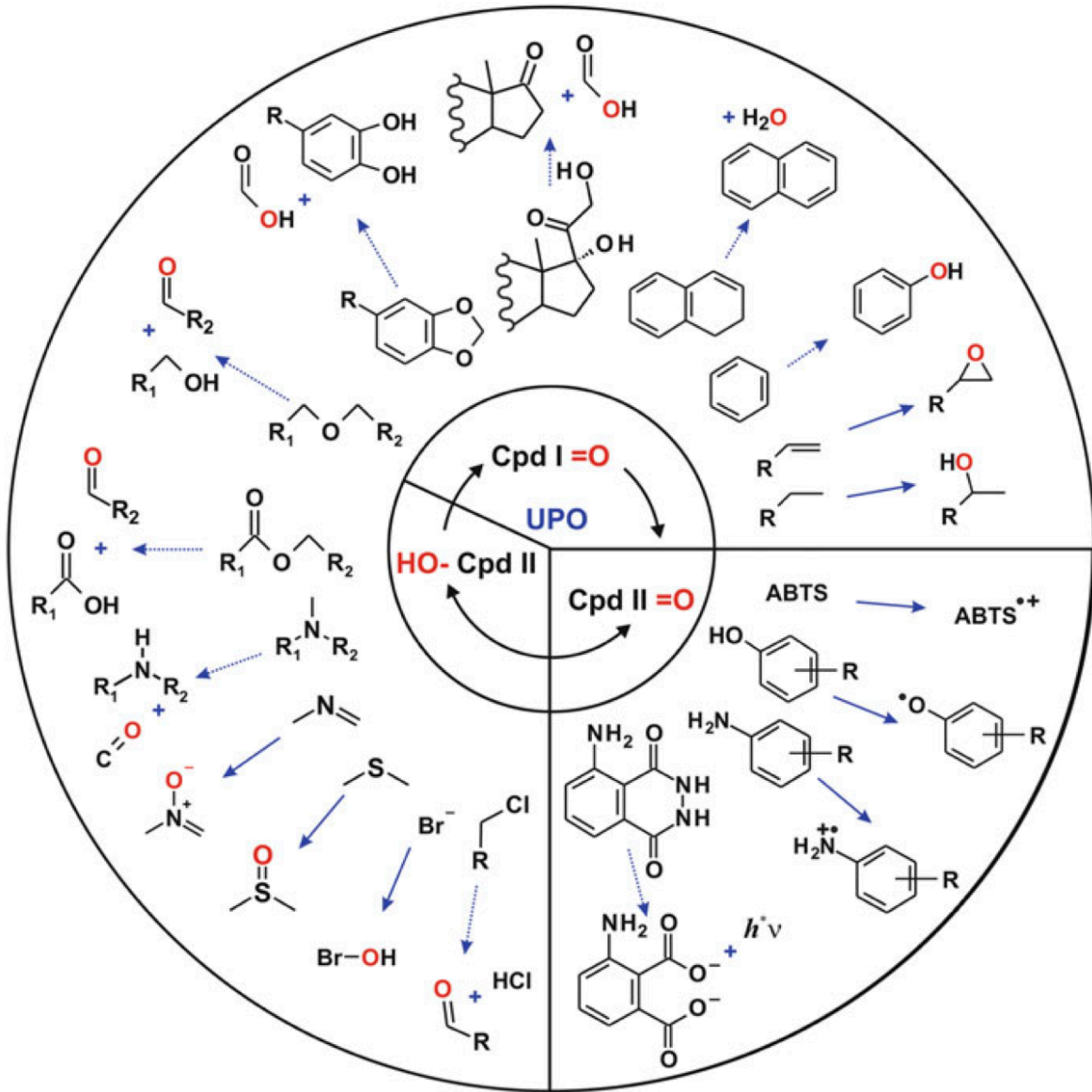


Figura 3. Reacciones catalizadas por las peroxigenasas inespecificas: en la sección inferior derecha se muestran las reacciones del tipo peroxidasa; el resto del diagrama muestra la variedad de reacciones peroxigenasa. Adaptado de Hofrichter *et al.* 2020.

## 2.3 Oxidación de éteres por AaeUPO

En 2009 se describió por primera vez la ruptura del enlace éter como consecuencia de la oxidación catalizada por AaeUPO. Esta reacción es interesante esencialmente por dos aspectos: 1) la recalcitrancia del enlace éter para ser escindido y 2) el mecanismo por el cual se da la ruptura de enlace (White, Russell and Tidswell 1996). Respecto a otros sistemas, la oxidación catalizada por AaeUPO tiene como ventajas:

- Se realiza con una enzima soluble y estable.
- No se requieren co-factores o co-sustratos como NADH o glutatión.
- Se da en condiciones de pH neutro y temperatura ambiente.

En relación al mecanismo es importante aclarar que la reacción no es una hidrólisis del enlace éter como sucede con otras enzimas caracterizadas (White, Russell and Tidswell 1996). La ruptura de enlace es espontánea y se da como consecuencia de una hidroxilación de uno de los carbonos adyacentes al oxígeno del enlace éter.

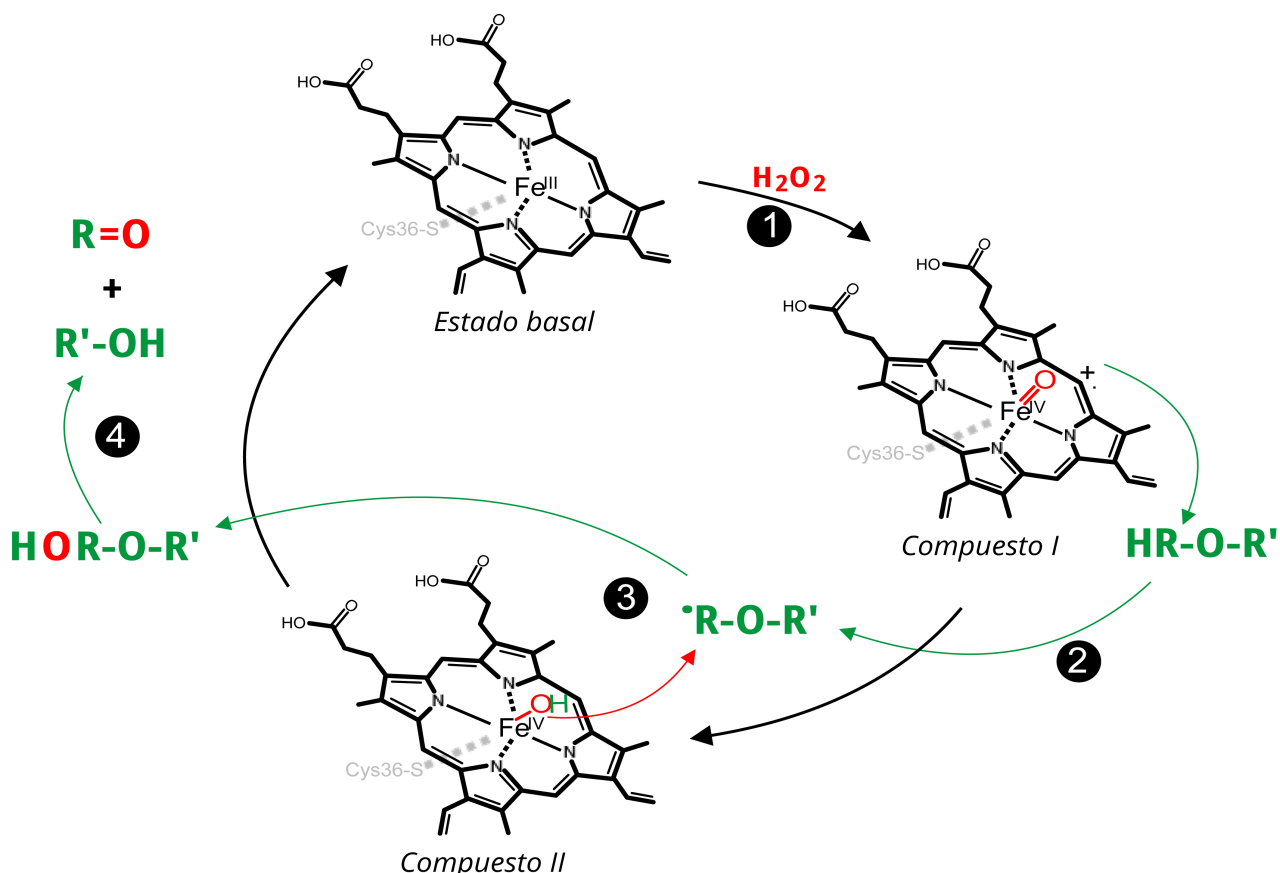
Como ocurre con las hidroxilaciones catalizadas por las UPO, la oxidación de éteres sigue un mecanismo de *ping-pong*; es decir, una molécula de co-sustrato (peróxido) entra al sitio activo para activarlo y generar la especie enzimática activada que es la responsable de oxidar a la molécula de éter una vez que ésta se acerca al sitio activo. En la figura 4 se presenta el mecanismo de reacción propuesto y que se describe a continuación (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009):

1. El ciclo catalítico comienza cuando el grupo hemo reacciona con una molécula de  $H_2O_2$  (ayudado del par ácido-base Glu-196/Arg-189 de la proteína) para formar un radical catiónico oxo-ferrilo, el **compuesto I**.
2. Se genera un radical en uno de los carbonos adyacentes del sustrato por un mecanismo de abstracción de un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos adyacentes al enlace éter. El compuesto I adquiere el protón y el electrón

sustraído del sustrato y se forma un hipotético **compuesto II**, un complejo ferril hidroxilo.

3. El radical sustrato permanece cercano al compuesto II y por un re-arreglo instantáneo se genera el producto hidroxilado (hemiacetal) y la enzima regresa a su estado basal.
4. El hemiacetal es un compuesto químicamente inestable, que se descompone sin la intervención de la enzima, para formar los productos carbonilo y alcohol correspondientes.

Aún cuando el mecanismo de la oxidación de éteres es semejante al que ocurre con sustratos de otra naturaleza química (alcanos alifáticos, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, lípidos etc.) los parámetros cinéticos muestran un comportamiento diferente entre ellos. Por ejemplo, al comparar las dos actividades de AaeUPO, peroxidasa y peroxigenasa, se observa que la eficiencia catalítica para la oxidación d ácido 2,2'-azino-bis(3-etillbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) es un orden de magnitud mayor que la oxidación de 5-nitro-1,3-benzodioxol NBD, en gran medida, por la aportación del valor de la constante de Michaelis-Menten (tabla 2).



**Figura 4. Mecanismo propuesto para la ruptura de enlace éter como resultado de la oxidación catalizada por UPO. Adaptado de Kinne, M. et al. 2009.**


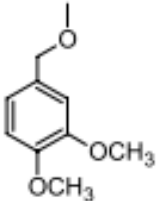
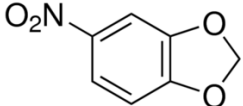
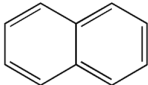
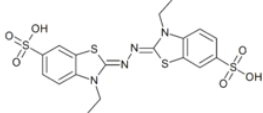
Otro ejemplo es la oxidación de naftaleno; en este caso, la eficiencia catalítica es similar a la oxidación de NBD aunque los valores de  $K_m$  difieren entre sí. Por los datos anteriores, es posible pensar que la diferencia en la eficiencia catalítica de las oxidaciones catalizadas por AaeUPO es dependiente de su afinidad por cada uno de los sustratos y por lo tanto, de su naturaleza química. Es decir, la estructura y reactividad de cada sustrato condiciona la eficiencia de su oxidación (Kinne, Ullrich, et al. 2008).

Cuando se comparan dos éteres como NBD y 3,4-dimetoxi benciléter se observan valores de  $K_m$  diferentes para cada uno. En este caso, la afinidad de AaeUPO pareciera depender del tamaño del éter; sin embargo, cuando el THF entra en la

comparación, permanece la idea de que dependerá en gran parte de la reactividad y disponibilidad del sustrato para formar un radical (Kinne, Ullrich, et al. 2008).

Los valores relativamente altos de la constante de Michaelis-Menten de AaeUPO por los éteres no sólo afecta la eficiencia catalítica de la oxidación sino también pone en evidencia la presencia de reacciones secundarias dependientes del co-sustrato: dismutación de peróxido y auto-inactivación (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009, Valderrama, Ayala and Vazquez-Duhalt 2002).

**Tabla 2. Parámetros cinéticos de AaeUPO para diferentes sustratos Para el ABTS ocurre una oxidación tipo peroxidasa.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.**

Sustrato	Estructura	Parámetros cinéticos	AaeUPO	Referencia
THF		$K_m$ (mM) $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	2.1 33 $1.6 \times 10^4$	(Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009)
3,4-dimetoxi benciléter		$K_m$ (mM) $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$1.430 \pm 0.230$ $715 \pm 115$ $5.0 \times 10^5$	(Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009)
NBD		$K_m$ (mM) $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$0.684 \pm 0.207$ $219 \pm 25$ $3.2 \times 10^5$	(Molina-Espeja, et al. 2014)
Naftaleno		$K_m$ (mM) $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	0.320 166 $5.7 \times 10^5$	(Kluge, et al. 2007)
ABTS		$K_m$ (mM) $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$0.025 \pm 0.002$ $221 \pm 6$ $8.8 \times 10^6$	(Molina-Espeja, et al. 2014)

## 2.4 Reacciones secundarias durante la oxidación de éteres

Durante la catálisis de la oxidación de cualquier sustrato existen un par de reacciones secundarias que están en competencia. Estas reacciones toman relevancia cuando hay baja afinidad hacia los sustratos o existe una alta concentración de peróxido en el medio de reacción (Shevelkova and Ryabov 1996). La actividad catalasa e inactivación *suicida* han sido caracterizadas para *AaeUPO* y *CfuCPO* y se describirán en las siguientes páginas.

### 2.4.1 Actividad tipo catalasa

La catálisis de la dismutación de peróxido también inicia con la activación del sitio activo para formar el compuesto I. Una vez formado el compuesto I, otra molécula de peróxido reacciona con él para dar como producto una molécula de O<sub>2</sub> y otra de agua, en el caso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. En relación a catalasas verdaderas, las UPO catalizan esta reacción con menor eficiencia y menor velocidad aunque con mayor afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este sentido, en la tabla 3 se muestran los parámetros cinéticos de *AaeUPO* y *CfuCPO* en comparación con la catalasa verdadera Cat-1 del hongo *Neurospora crassa*. Cuando el sustrato es un peróxido orgánico, la eficiencia de la reacción catalasa es aún menor (Díaz, et al. 2001, Manoj and Hager 2001).

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de la dismutación de peróxido para *AaeUPO*, *CfuCPO* y Cat-1.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica. (Díaz, 2001; Kinne, 2009; Manoj, 2001)**

Sustrato	Parámetros cinéticos	<i>AaeUPO</i>	<i>CfuCPO</i>	Cat-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$K_m$ (mM)	0.79 ± 0.12	20	21.7 ± 0.5
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	127	3 460	8.9 x10 <sup>6</sup>
	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.60x10 <sup>5</sup>	1.73x10 <sup>5</sup>	4.11 x10 <sup>8</sup>

Las constantes cinéticas de la dismutación de peróxido también se ven afectadas por la presencia de sustratos orgánicos. Durante la determinación de velocidad

iniciales, en presencia de alcohol veratrílico en concentraciones de saturación de la enzima, la afinidad de AaeUPO por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la actividad catalasa se reduce casi 4 veces. La velocidad de la dismutación de peróxido es más lenta pues el alcohol veratrílico compite por el compuesto I disponible y por lo tanto la eficiencia catalítica es un orden de magnitud menor (tabla 4) (Karich, Scheibner, et al. 2016).

Finalmente, la actividad catalasa puede funcionar como un mecanismo para retardar la inactivación de las UPO frente a un exceso de peróxido en el medio de reacción.

**Tabla 4. Parámetros cinéticos de la dismutación de peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y orgánicos) para AaeUPO y CfuCPO en presencia de alcohol veratrílico.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica. (Kinne, 2009; Manoj, 2001)**

Sustrato	Parámetros cinéticos	AaeUPO	CfuCPO
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + alcohol veratrílico (5 mM)	$K_m$ (mM)	3.10 ± 0.04	
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	36	-
	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.16x10 <sup>4</sup>	
Hidroperóxido de metilo	$K_m$ (mM)		213
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	-	2130
	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		1.00x10 <sup>4</sup>
Hidroperóxido de etilo	$K_m$ (mM)		145
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	-	2247
	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		1.55x10 <sup>4</sup>

#### 2.4.2 Inactivación suicida

La inactivación dependiente de peróxido, conocida también como inactivación suicida, es un fenómeno irreversible que ha sido descrito ampliamente en la familia de las hemo- peroxidasas (Valderrama, Ayala and Vazquez-Duhalt 2002).



En este sentido, se han propuesto diferentes eventos moleculares que conducen a la inactivación dependiente de  $H_2O_2$ , basados en evidencia experimental para diferentes hemo-peroxidadas. Se ha detectado que durante la inactivación se forma un intermediario conocido como el **compuesto III** y que es una de las especies inactivantes (Valderrama, Ayala and Vazquez-Duhalt 2002). Este intermediario se forma en presencia de un exceso de peróxido y/o en ausencia de un reductor, y se forma a partir del compuesto II; sin embargo, no pertenece al ciclo de la oxidación de sustrato orgánico y por lo tanto, sigue vías alternativas para su descomposición (figura 5):

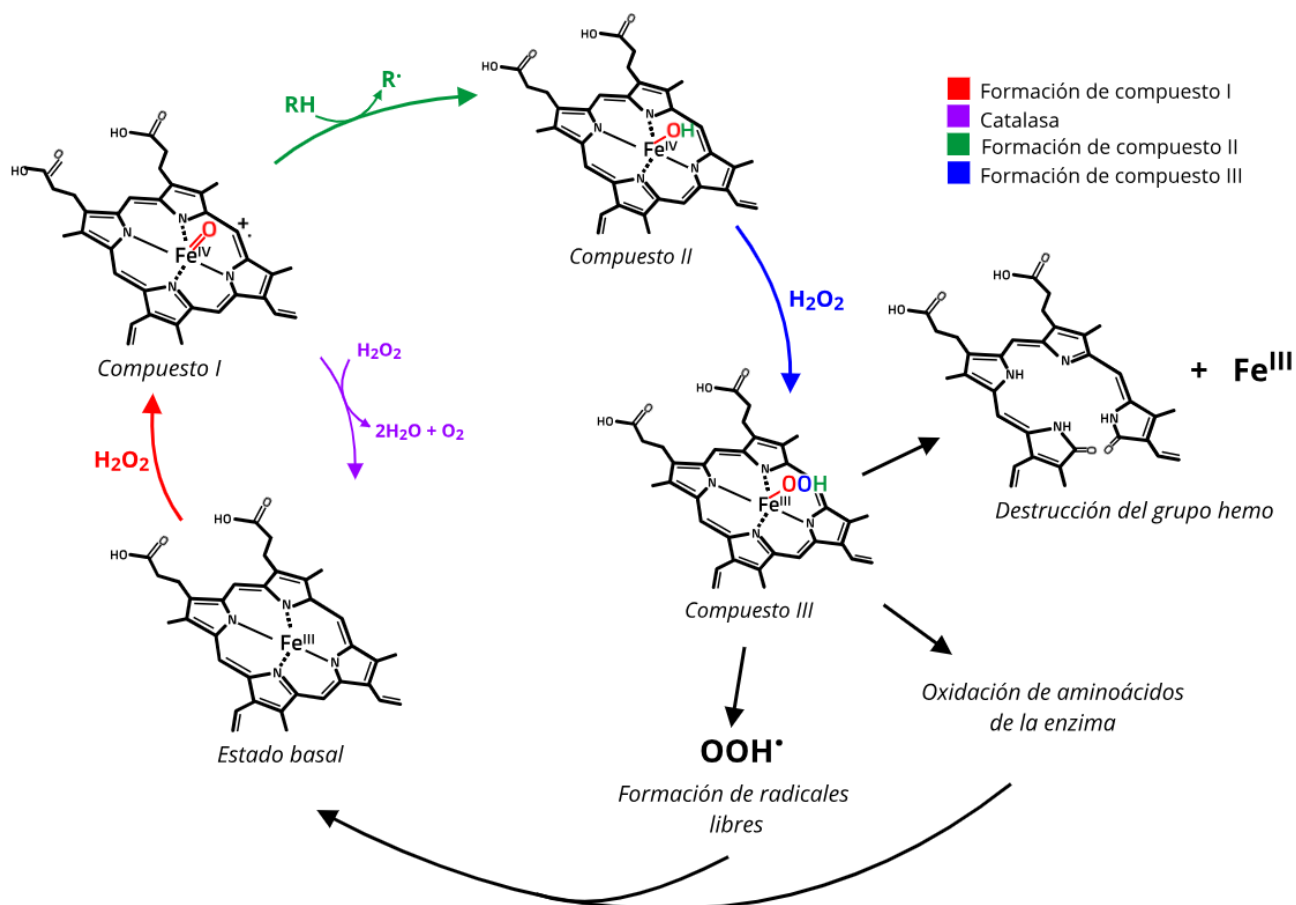
1. Auto-oxidación del grupo hemo (*bleaching*) y descoordinación del átomo de hierro.
2. Oxidación de las cadenas laterales de residuos alrededor del sitio activo.
3. Liberación de radicales libres superóxido como consecuencia del decaimiento del compuesto III.

Es conocido que la estequiometría para la inactivación de estas enzimas puede variar en cada enzima; por ejemplo, para la ascorbato peroxidasa es una relación 2:1, mientras que para la peroxidasa de rábano se requieren 265 moléculas de peróxido de hidrógeno para generar una molécula de enzima inactiva (Hiner, et al. 1995) (Hiner, et al. 2000). Para la familia de las UPO aún existe poca información al respecto, aunque la información disponible sugiere que el principal evento que conduce a la inactivación es la destrucción del grupo hemo, como se analiza a continuación.

En un estudio con uno de los miembros de la familia UPO, la *CfuCPO*, se observó que conforme se aumenta la concentración inicial de  $H_2O_2$  en una reacción de halogenación, la velocidad en la que se oxida el sustrato (monoclorodimedona) se ve disminuida hasta el punto en que la reacción se detiene. Al momento de adicionar otra alícuota de enzima la reacción vuelve a iniciar, lo que indica que la enzima añadida en un principio se inactiva durante la reacción. En este sentido, se propone que *CfuCPO* pierde capacidad catalítica de forma dependiente a la concentración

inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, especialmente a concentraciones superiores a 2.0 mM (Shevelkova and Ryabov 1996). En otro trabajo sobre esta enzima, con enfoque sobre los eventos moleculares involucrados en la inactivación se observa que la pérdida de la actividad enzimática no se debe a la desnaturalización u oxidación de residuos cercanos al sitio activo (Ayala, Batista and Vazquez-Duhalt 2011). Los datos indican que la pérdida de la actividad de *CfuCPO* ocurre principalmente por un fenómeno de blanqueamiento (*bleaching*) del grupo hemo; es decir, hay una correlación entre la pérdida de la actividad y la disminución de la señal espectroscópica del grupo hemo en estado basal, lo que sugiere una auto-oxidación tal como se ha observado para otras hemo-peroxidasas (Villegas, Mauk and Vazquez-Duhalt 2000).

En el caso de *AaeUPO*, la señal espectroscópica del compuesto III ha sido identificada en un ensayo experimental en el que posterior a su formación se detecta una disminución de la actividad enzimática y está relacionada con la presencia de biliverdina (producto de la oxidación del grupo hemo) y radicales hidroxilo (producto del decaimiento del compuesto III) en el medio de reacción (Karich, Scheibner, et al. 2016). Hasta la fecha no se ha publicado información sobre la oxidación de cadenas laterales de residuos cercanos al sitio activo de *AaeUPO* como producto de la descomposición del compuesto III.



**Figura 5. Mecanismo propuesto para la inactivación de hemo-peroxidasas. Se muestran los diferentes eventos moleculares que pueden conducir a la pérdida de actividad. Adaptado de Valderrama, et al., 2002.**

### 2.4.3 Estrategias para retardar la inactivación por $H_2O_2$

Para disminuir las consecuencias de la inactivación dependiente de  $H_2O_2$  se han propuesto diferentes estrategias que abordan el retardo de la formación del compuesto III y así favorecer la oxidación de los sustratos de interés.

La dosificación de  $H_2O_2$  parece ser la estrategia más efectiva para disminuir la inactivación de las UPO y favorecer la oxidación de sustrato. Por ejemplo, para la oxidación de isoforona se han reportado eficiencias catalíticas en el orden de  $10^4$  para las UPO de *H. insolens* y *C. globosum* en gran medida por la baja afinidad de estas enzimas por el sustrato orgánico. En estos casos, las reacciones secundarias estarían favorecidas cuando la reacción se inicia con concentraciones estándar de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aranda y colaboradores reportan una estrategia retardar la inactivación y la dismutación de peróxido a través de la adición constante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM h<sup>-1</sup>) y así favorecer la oxidación de isoforona, obteniendo la máxima conversión hasta 9 horas después de iniciar la reacción (Aranda, et al. 2019).

Lo anterior indica que ambas enzimas tolerarían una concentración de 45 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de reacción aunque se sabe que si esta concentración fuera agregada en una sola adición la inactivación se vería favorecida por completo. Por lo anterior, la dosificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> retarda la inactivación y como consecuencia hay enzima disponible para catalizar la oxidación de isoforona durante el tiempo de reacción. Bajo este sistema se logran alcanzar valores del número de recambio total (*TTN*, por sus siglas en inglés) similares a los reportados para otros sistemas con hemo-peroxidasas por lo que resulta ser una estrategia eficiente (Aranda, et al. 2019).

Otros grupos de investigación han abordado la dosificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde el diseño de reacciones acopladas para la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* a partir de otras enzimas, electrocatalizadores o fotocatalizadores (Zhang, et al. 2018, Ni, et al. 2016, Horst, et al. 2016, Jung, Streb and Hartmann 2008)

Por último, el uso de moléculas que atrapan los radicales libres producto de la descomposición del compuesto III. Estas moléculas también son conocidas como scavengers y comúnmente se utiliza t-butanol o ácido ascórbico (Kinne, Ullrich, et al. 2008, Kinne, Poraj-Kobielska and Aranda, et al. 2009, La Rotta Hernandez, et al. 2005).

### **3. Hipótesis**

La oxidación de éteres bencílicos catalizada por la peroxigenasa PaDa-I depende de factores como la reactividad de los carbonos adyacentes al enlace éter y del acceso y acomodo del sustrato en la vecindad del grupo hemo.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Estudiar los factores moleculares que influyen en la capacidad oxidante de PaDa-I durante la ruptura de éteres bencílicos con sustituyentes de diferente naturaleza química.

##### **4.1.1 Objetivos específicos**

1. Determinar la eficiencia de la oxidación de los éteres catalizada por PaDa-I.
2. Cuantificar las reacciones secundarias del sistema éter bencílico-PaDa-I.
3. Identificar el efecto de la estructura y reactividad de los sustratos sobre la de oxidación catalizada por la PaDa-I.
4. Explorar la interacción de los éteres con el túnel de acceso al sitio activo de la PaDa-I a través de métodos computacionales.

## **5. Materiales y equipo**

### **5.1 Instrumentos**

- Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* HP 6890 acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies, Inc.* modelo 5973..
- Cromatógrafo de líquidos *Agilent Technologies, Inc.* modelo 1220 *Infinity LC* acoplado a un detector UV-Visible de onda variable.
- Electrodo polarigráfico tipo *Clark* dentro de una cámara de acrílico modelo DW1 y acoplado a un oxímetro *Oxygraph* de *Hansatech Instruments Ltd.*
- Espectrofotómetro *Agilent Technologies, Inc.* modelo 8453 acoplado a un detector UV-Visible de arreglo de diodos.

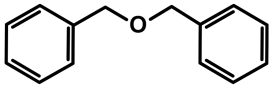
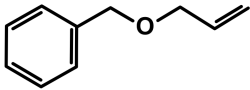
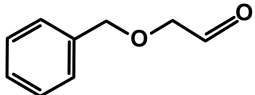
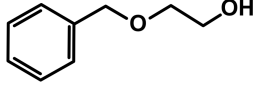
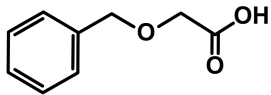
### **5.2 Columnas**

- Columna capilar para GC-MS *Agilent Technologies, Inc.* HP-5MS modelo 190915-433. 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ .
- Columna *Phenomenex* Luna para HPLC C18(2) 100Å. 150 mm x 3.0 mm; tamaño de partícula: 5  $\mu\text{m}$ .

### **5.3 Reactivos y medios de cultivo**

Los sustratos (tabla 5) alilbenciléter, ácido benciloxiacético, benciloxiacetaldehído, benciloxietanol, dibenciléter,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NBD, ABTS y los componentes de los medios de cultivo fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich Co.* Ácido cítrico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro de *JT Baker Chemical Company*; y reactivo de Bradford y BSA para medición de proteína total de *BioRad Laboratories Inc.*

**Tabla 5. . Éteres bencílicos utilizados en este trabajo.**

Nombre	Estructura	Masa molecular (g/mol)
Dibenciléter		198.26
Alilbenciléter		148.21
Benciloxiacetaldehído		150.17
Benciloxietanol		152.19
Ácido benciloxiacético		166.17

#### *Medio de cultivo para selección*

Medio sólido (agar al 2% g/L) que contiene bases nitrogenadas (*yeast nitrogen base, YNB*) (6.7 g/L), suplementos (*yeast synthetic drop-out medium supplements without uracil*) (1.92 g/L), glucosa (20 g/L), y cloranfenicol (25 mg/L).

#### *Medio de cultivo para inducción*

Medio líquido con D-(+)-rafinosa (20 g/L), *YNB* (6.7 g/L), suplementos (1.92 g/L) y cloranfenicol (25 mg/L).

### *Medio de cultivo para expresión*

Medio líquido con extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), solución amortiguadora de fosfato de potasio (60 mM, pH 6.0), galactosa (20 g/L), sulfato de magnesio (1 mM), etanol (3% v/v),  $\text{FeCl}_3$  (0.5 mM) y cloranfenicol (25 mg/L).



## **6. Metodología**

### **6.1 Metodología experimental**

#### **6.1.1 Expresión y purificación de la peroxigenasa recombinante**

La obtención y purificación de PaDa-I se realizó de acuerdo al protocolo desarrollado por Molina-Espeja, P. *et al.*, y que ha sido adaptado al laboratorio de Biocatálisis Redox del Instituto de Biotecnología, UNAM (Ramirez-Ramirez, et al. 2020, Molina-Espeja, et al. 2014).

PaDa-I se expresó en *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 a través del plásmido pJRoC30 con el *kit* de transformación de levadura de Sigma-Aldrich. Las células se inocularon en placas Petri con medio de selección por tres días a 30 °C. Se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 20 mL de medio de inducción. Este cultivo se incubó por 2 días a 30 °C y 220 rpm para posteriormente inocular 100 mL del mismo medio a una densidad óptica de 0.3. Una vez que la densidad óptica alcanzó un valor de 1.0 se colocaron los 100 mL de medio en un matraz conteniendo 900 mL de medio de cultivo de expresión. Este medio se incubó a 25 °C y 220 rpm.

Después de 3 días de incubación, el medio se centrifugó para obtener el sobrenadante. Este extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio (85% de saturación a 4°C) y se centrifugó para obtener un precipitado que fue resuspendido en solución amortiguadora de succinatos (10 mM, pH 4.3) y dializado contra la misma solución con una membrana con corte de 10 kDa por 12 horas.

El extracto dializado fue centrifugado y posteriormente se pasó por una columna de cromatografía con una resina de intercambio catiónico fuerte (Macro-Prep High S); se realizaron lavados con solución amortiguadora de succinatos (10 mM, pH 4.3) y eluida con una solución de NaCl (150 mM). Las fracciones con mayor actividad peroxidasa se colectaron, se concentraron por ultrafiltración (AMICON) con una membrana de corte con 10 kDa y la solución amortiguadora se cambió por solución

amortiguadora TRIS (10 mM, pH 7.0). La fracción obtenida se pasó por una columna con resina de intercambio aniónico fuerte (Macro-Prep High Q). Se realizaron lavados con solución amortiguadora TRIS (10 mM, pH 7.0) y la columna se eluyó con solución de NaCl (120 mM). Las fracciones con mayor actividad peroxidasa se colectaron, se concentraron por ultrafiltración (AMICON) con una membrana de corte con 10 kDa y la solución amortiguadora se cambió por solución amortiguadora fosfatos (50 mM, pH 7.0).

Para evaluar la eficacia de la purificación de PaDa-I se realizó una separación electroforética en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%. Las muestras de proteína (aproximadamente 10 µg de proteína total) fueron previamente tratadas con 10 µL de amortiguador de carga para proteínas, incubándolas a 90 °C por 10 minutos. Los geles se corrieron a 90 V por 120 minutos, se tiñeron con azul de Coomassie y se revelaron con una solución de agua/CH<sub>3</sub>OH/ácido acético glacial 5:4:1.

### **6.1.2 Análisis de la oxidación de éteres bencílicos**

#### **6.1.2.1 Análisis químico de éteres bencílicos**

Los métodos de detección de los éteres bencílicos se establecieron por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa con un flujo de la fase móvil de 0.4 mL/min, temperatura de columna de 30 °C, volumen de inyección de 20 µL y longitud de onda de detección de 210 nm. Los solventes utilizados para la fase móvil fueron filtrados con una membrana de nylon con diámetro promedio de poro de 0.45 µm *MF-Milipore*<sup>TM</sup>. La composición de la fase móvil y la proporción de solventes para cada éter bencílico se muestra en la tabla 6 y figura 6.

**Tabla 6. Condiciones de análisis por cromatografía de líquidos para los éteres bencílicos.**

Nombre	$t_R$ (min)	Condiciones de elución (%)		
		t (min)	Agua	Acetonitrilo
<b>Alcohol bencílico</b>	11.8	0	90	10
<b>Benciloxietanol</b>	12.8	5	90	10
		14	0	100
<b>Alilbenciléter</b>	17.4	18	0	100
<b>Benciloxiacetaldehído</b>	18.2	22	90	10
<b>Dibenciléter</b>	18.5	25	90	10
<b>Ácido benciloxiacético</b>	8.5	t (min)	Ácido fosfórico al 0.02% (m/V)	Acetonitrilo
		0	80	20
		2	80	20
		12	20	80
		15	20	80
		20	80	20
22	80	20		

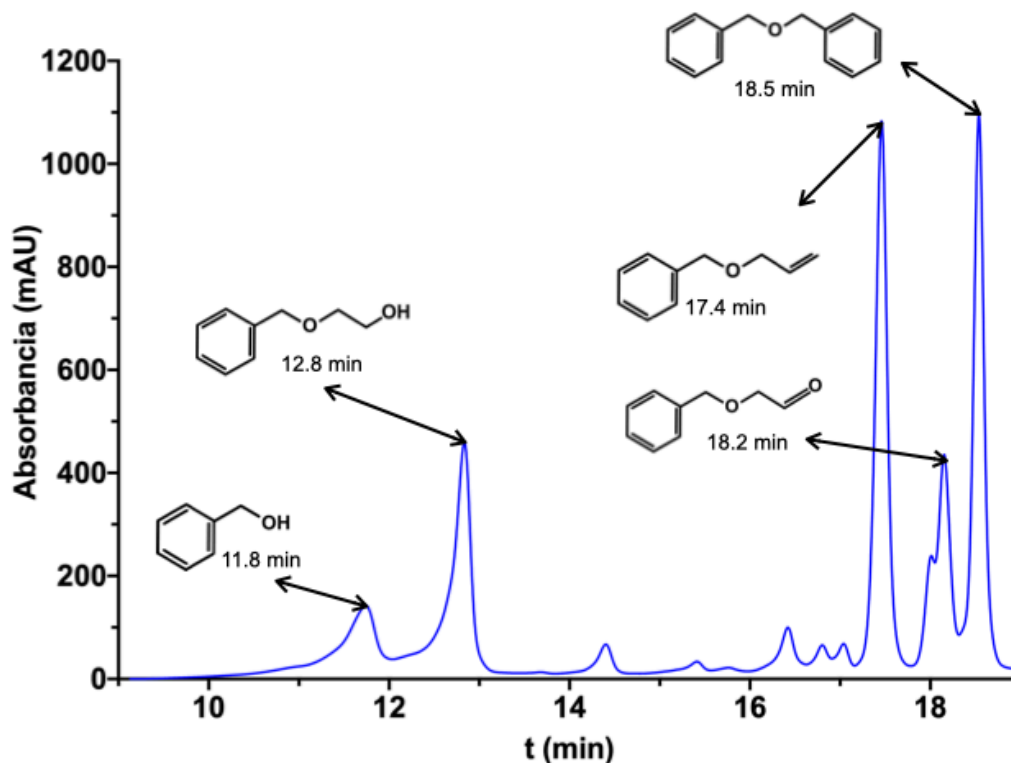


Figura 6. Cromatograma para el análisis de alcohol bencílico ( $t_R = 11.8$  min), benciloxietanol ( $t_R = 12.6$  min), alilbenciléter ( $t_R = 17.4$  min), benciloxiacetaldehído ( $t_R = 18.2$  min) y dibenciléter ( $t_R = 18.5$  min).

#### 6.1.2.2 Determinación del número total de recambio por actividad residual

En una reacción con 0.2-40 mM de éter bencílico y adiciones 0.1-1.0 mM de  $H_2O_2$  se cuantificó el sustrato en dos instancias: 1) al inicio de la reacción y 2) hasta agotar la enzima catalíticamente activa. El número de recambio total (*TTN*, por sus siglas en inglés) se calculó de acuerdo a la ecuación 1 (Bommarius and Paye 2013). Las reacciones de los éteres bencílicos se realizaron en volúmenes de uno a cuatro mL con 50 nM de PaDa-I en 80% de solución amortiguadora  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  50 mM, pH=7.0 y 20% de acetonitrilo como cosolvente.

Ecuación 1:

$$TTN = \frac{[Sustrato]_{oxidado}}{[biocatalizador]} = \frac{[Sustrato]_{inicial} - [Sustrato]_{final}}{[biocatalizador]}$$

La cantidad de enzima catalíticamente activa se estimó como la actividad volumétrica remanente respecto a la actividad volumétrica añadida al inicio de cada reacción; es decir, se tomaron alícuotas (10-100  $\mu\text{L}$ ) de la reacción de oxidación éter bencílico, antes y después de cada adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se les midió actividad peroxidasa de acuerdo al ensayo estándar de oxidación de ABTS. Para este ensayo se consideró la velocidad inicial como el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo a una longitud de onda de 418 nm ( $\epsilon_{418}=36\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La reacción se siguió por 60 segundos y las condiciones empleadas fueron ABTS a 0.4 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mM en solución amortiguadora  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ácido cítrico 100 mM, pH=4.4 (Molina-Espeja, et al. 2014).

### **6.1.2.3 Análisis de los productos de reacción**

Para analizar los productos de reacción se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 0.2 mM de éter bencílico, 50 nM de enzima y adiciones 0.2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a temperatura ambiente. La composición del medio de reacción fue 80% de solución amortiguadora  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH=7.0 y 20% acetonitrilo en un volumen de reacción de 10 mL.

La extracción de los productos de reacción se realizó adicionando dos volúmenes de 2 mL de diclorometano a la mezcla de reacción. La fase orgánica fue extraída de la mezcla, deshidratada a través de una trampa de sulfato de sodio anhidro y secada con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de diclorometano para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este procedimiento se llevo a cabo después de la primera adición equimolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se repitió, en una reacción independiente, hasta

alcanzar aproximadamente un 70% de desaparición de éter bencílico de acuerdo con la señal cuantificada por cromatografía de líquidos.

En el cromatógrafo de gases, 1  $\mu\text{L}$  de la muestra fue analizado en una corrida de 10 minutos de duración. El análisis se programó para iniciar a 70 °C por dos minutos para posteriormente entrar a un gradiente de 70 °C a 230 °C en cinco minutos y mantenerse a 230 °C por tres minutos más. En la Tabla 7 se muestra el tiempo de retención para cada éter.

**Tabla 7. Tiempo de retención para los éteres bencílicos en el análisis por cromatografía de gases.**

<b>Nombre</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>
Benciloxiacetaldehído	6.73
Dibenciléter	9.60
Alilbenciléter	6.11
Benciloxietanol	7.20

#### **6.1.2.4 Cinética de la oxidación de sustratos estándar y actividad catalasa**

La oxidación de NBD se midió en un ensayo espectrofotométrico en una reacción que se siguió por 30 segundos. A una longitud de onda de 425 nm el 4-nitrocatecol, producto indirecto de la oxidación de NBD, tiene un coeficiente de extinción molar de  $9\,700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las reacciones se realizaron en 1 mL con 5-50 nM de enzima en solución amortiguadora  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH=7.0 y 20% de acetonitrilo como

co-solvente. La velocidad inicial se calculó con la pendiente de esta curva de progreso (Poraj Kobielska, et al. 2012).

Para la oxidación de ABTS se midió la aparición del producto de la reacción en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 418 nm ( $\epsilon_{418}=36\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 60 segundos. Las reacciones se realizaron en un mL con 1-10 nM de enzima en solución amortiguadora  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /ácido cítrico 100 mM pH=4.4. Las reacciones de oxidación se iniciaron con 1.0 mM y 2.0 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para NBD y ABTS, respectivamente. La velocidad inicial se calculó con la pendiente de esta curva de progreso (Ramirez-Ramirez, et al. 2020).

La velocidad inicial de la dismutación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se midió como el cambio en el aumento en la concentración de  $\text{O}_2$  en solución por unidad de tiempo, mediante un electrodo polarográfico acoplado a un oxímetro. Las mediciones se llevaron a cabo en 500  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH=7.0 con 24-98 nM de enzima. Las soluciones para estos ensayos fueron burbujeadas con  $\text{N}_2$  por 10 minutos y la calibración del equipo se realizó con agua MiliQ degasificada.

Las soluciones de los éteres bencílicos utilizados en estos ensayos se prepararon en las soluciones amortiguadoras correspondientes. Los resultados se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y las constantes de inhibición se calcularon gráficamente de acuerdo al ajuste de Dixon y Cornish-Bowden con el programa *GraphPad Prism 8.2.1* (Dixon 1953, Cornish-Bowden 1974).

## 6.2 Metodología in silico

### 6.2.1 Cálculo de energía de disociación de enlace

Las estructuras de los éteres bencílicos se construyeron en el programa *GaussView 6.0.16* para ser optimizadas y posteriormente calcular su energía en el estado fundamental a través de métodos de mecánica cuántica (*QM*, por sus siglas en inglés) con el programa *Gaussian 16* considerando la teoría de los funcionales de la densidad (*DFT*, por sus siglas en inglés), el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-311++G\*\*. Estos cálculos se realizaron utilizando agua como solvente.

Sobre las estructuras optimizadas se generaron los radicales correspondientes para cada uno de los éteres bencílicos en *GaussView 6.0.16*. Estos radicales se construyeron sobre cada uno de los átomos adyacentes al oxígeno del grupo éter, y cuya formación, en teoría, conduciría a la oxidación que posteriormente favorecería la ruptura del enlace éter. Las estructuras también fueron optimizadas y se les calculó la energía por *QM* en *Gaussian 16* (*DFT* B3LYP/6-311++G\*\*). Los criterios para estas simulaciones fueron similares a los utilizados para la moléculas en su estado fundamental aunque a la multiplicidad se le asignó un valor igual a dos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se calculó la energía de disociación de enlace (*BDE*, por sus siglas en inglés) considerando la energía en el punto cero como corrección (ecuación 2) y la ecuación derivada de la ley de Hess (ecuación 3), tal como se ha descrito en la literatura para este tipo de estimaciones (Andersson and Anders Evertsson 2014).

Ecuación 2:

$$E_{total} = E_{e-} + ZPE$$

dónde:

$E_{e-}$  = energía electrónica del sistema

$ZPE$  = energía en el punto cero



Ecuación 3:

$$BDE = E_{total}(R) + E_{total}(H) - E_{total}(S)$$

dónde:

*BDE = energía de disociación de enlace*

*R = radical*

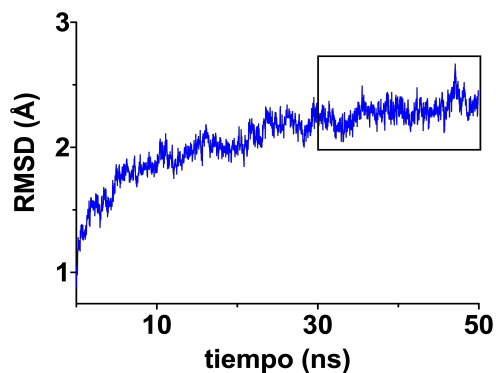
*H = átomo de hidrógeno*

*S = sustrato*

### **6.2.2 Estudios de acoplamiento molecular flexible**

A partir de estudios de dinámica molecular sobre la estructura cristalográfica de PaDa-I (*PDB*: 5OXU) que se realizaron anteriormente en el laboratorio de Biocatálisis Redox se seleccionaron 243 conformaciones y se obtuvieron sus correspondientes archivos *.pdb* (Ramirez-Ramirez, et al. 2020). Dichas conformaciones corresponden al tiempo de simulación de 30 a 50 ns, cuando la simulación ha alcanzado un estado de equilibrio (figura 7).

Para explorar la interacción entre los sustratos y las posibles conformaciones que adoptan las cadenas laterales de los residuos que componen el túnel de acceso al sitio activo de la peroxigenasa, se realizaron estudios de acoplamiento molecular. En relación a los éteres bencílicos se consideraron las estructuras optimizadas por *QM* en el apartado anterior y se prepararon con *Autodock Tools 1.5.6* permitiendo flexibilidad en ellas.



**Figura 7. RMSD en función del tiempo durante la simulación de dinámica molecular de PaDa-I. En el recuadro se muestra el intervalo de tiempo en el que fueron seleccionadas las conformaciones para los estudios de acoplamiento molecular.**

La exploración de la interacción entre los sustratos y la enzima se realizó en el túnel de acceso al sitio activo (*grid*: 12x30x14) pues se sabe que para que ocurra la hidroxilación de éteres es necesario que el sustrato se acerque al hierro activado del grupo hemo (compuesto I). Para el ácido benciloxiacético también se exploró el túnel con la especie desprotonada pues a un valor de pH=7.0, el de trabajo experimental, predominaría la base conjugada<sup>2</sup>. A cada una de las corridas del acoplamiento molecular se les asignó 10 *poses* de acoplamiento para generar 2430 simulaciones por cada éter bencílico.

Los estudios de acoplamiento molecular se corrieron en *Autodock Vina 1.1.2* y los resultados se analizaron con *LigPlot+ 2.1* y *PyMol 2.0*. Toda la metodología *in silico* se realizó en un equipo *MacBook Pro Mid 2012* con procesador *Intel Core i5 2.5 GHz* y memoria RAM de 4 GB 1600 MHz DDR3 con sistema operativo *macOS Mojave 10.14.5*.

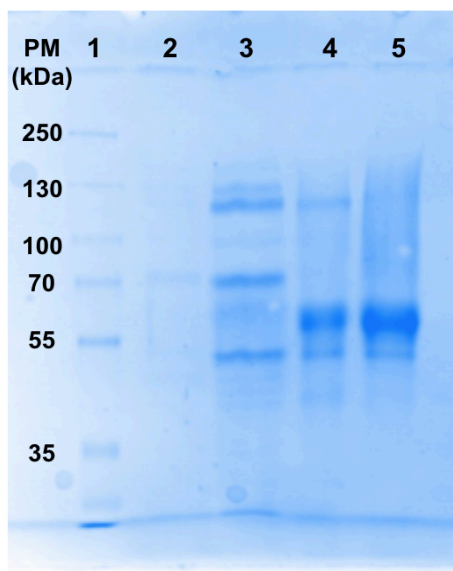
---

<sup>2</sup> pKa= 4.01 (<http://www.chemicalize.com>)

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Purificación de la peroxigenasa recombinante PaDa-I

Se obtuvo PaDa-I con una pureza electroforética de 95% y actividad específica de entre 950 a 1050 U<sub>ABTS</sub>/mg. Los resultados obtenidos de la expresión y purificación (Anexo I) coinciden con lo antes reportado (Ramirez-Ramirez, et al. 2020, Molina-Espeja, et al. 2014). En el gel de poliacrilamida (figura 8) se pueden observar dos bandas en el carril 5, correspondiente al último paso de purificación lo cual posiblemente se deba a diferentes grados de glicosilación de la proteína; otro criterio de pureza es la razón *Reinheitszahl* ( $Rz = \text{Abs}_{418} / \text{Abs}_{280}$ ) que fue de 2.1, un valor superior a lo que ha sido reportado para PaDa-I (Molina-Espeja, et al. 2014).



**Figura 8. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. 1) Marcador de peso molecular 2) Extracto crudo 3) Precipitación y diálisis 4) Cromatografía de intercambio catiónico 5) Cromatografía de intercambio aniónico.**

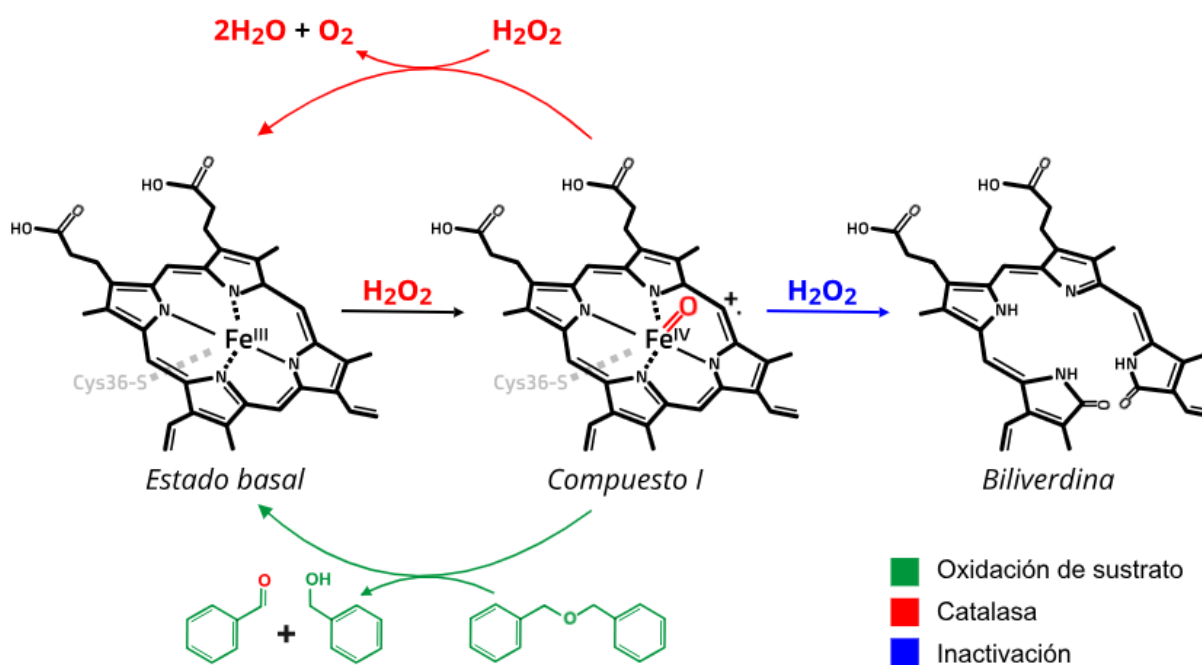
La preparación enzimática se almacenó a 4 °C a una concentración de entre 1.1 y 1.3 mg/mL en solución amortiguadora  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM a pH=7.0. En el laboratorio se ha observado que la estabilidad, en estas condiciones de almacenamiento, es de aproximadamente dos meses, sin cambios significativos en

la actividad específica. Con esta preparación se realizaron los ensayos experimentales presentados en este trabajo.

## 7.2 Análisis de la oxidación de éteres bencílicos

Anteriormente se ha descrito que durante la oxidación de sustratos de baja afinidad ( $K_m \geq 1.0$  mM) catalizada por las UPO se hacen evidentes un par de reacciones secundarias no deseadas: la dismutación de  $H_2O_2$  y la inactivación suicida (figura 9). Este par de reacciones secundarias han sido caracterizadas anteriormente y se ha reportado que su velocidad puede elevarse no sólo en casos donde la enzima presenta baja afinidad por el sustrato si no también cuando la concentración de peróxido es superior a la del sustrato orgánico (Sun, Kadima and Dunford 1994, Karich, Scheibner, et al. 2016, Kinne, Ullrich, et al. 2008).

De acuerdo a lo anterior, los resultados de este trabajo se presentan y discuten comenzando por el estudio de las tres reacciones en competencia durante la degradación de éteres bencílicos para posteriormente analizar el efecto de los diferentes grupos sustituyentes de los éteres bencílicos sobre su oxidación.



**Figura 9. Posibles vías catalíticas y de inactivación de AaeUPO durante la oxidación de sustratos de baja afinidad.**

### **7.2.1 Estudio de la relación de sustrato/co-sustrato sobre la actividad de PaDa-I**

Inicialmente este trabajo pretendía determinar los parámetros cinéticos de la oxidación de los éteres bencílicos; sin embargo, no fue posible debido a que en concentraciones estándar de  $H_2O_2$  (1-2 mM) la reacción de oxidación de los éteres bencílicos se detiene en menos de 30 segundos de haber iniciado por lo que se dificulta la medición de la velocidad inicial. Resulta evidente que la reacción se detenga de esa manera si en estas condiciones se ven favorecidas las reacciones secundarias conocidas. Una manera de abordar estos fenómenos fue estudiar el efecto que tiene la concentración y dosificación de  $H_2O_2$  y la concentración del sustrato éter bencílico sobre las tres reacciones en competencia.

Cuando en una reacción se adiciona la primera dosis de 1.0 mM de  $H_2O_2$  en presencia de 0.2 mM de benciloxietanol y 50 nM de enzima (figura 10A), PaDa-I se inactiva en un 70% y el sustrato se consume en un 50%. En contraste, cuando la adición de  $H_2O_2$  es de 0.5 mM la actividad enzimática se ve disminuida en un 30% después de la primera adición aunque el consumo de sustrato es 35%; es decir la cantidad de sustrato oxidado es menor; sin embargo, la cantidad de peroxigenasa disponible es suficiente para consumir otro 25% de benciloxietanol con una segunda adición de  $H_2O_2$  antes de inactivarse por completo (figura 10B). Así, la degradación del sustrato pasa de 50% con adiciones de 1.0 mM de  $H_2O_2$  al 70% con adiciones de 0.5 mM de  $H_2O_2$ , con las mismas concentraciones de sustrato y enzima.

Los fenómenos de retardo en la inactivación y oxidación de benciloxietanol se ven favorecidos cuando la dosificación de  $H_2O_2$  se da en concentraciones equivalentes o por debajo de la concentración de sustrato. Una adición de 0.1 mM o 0.2 mM de  $H_2O_2$  resultan en una reducción de la actividad del 10% o 20%, y en una degradación del 15% o 30% de benciloxietanol, respectivamente (figura 10C y 10D). Finalmente, la mayor degradación de sustrato (80%) se alcanza con varias adiciones de 0.2 mM de  $H_2O_2$ .

Para los cuatro ensayos presentados en la figura 10 es importante indicar que aún cuando en el medio de reacción existe enzima activa (20-30% de la actividad peroxidasa inicial) no existe mayor conversión con dosis adicionales de  $H_2O_2$ ; esto puede deberse a que los valores de actividad residual reflejan una medición indirecta de la cantidad de enzima disponible para la conversión de benciloxietanol. Mientras que la degradación de éteres requiere de la actividad peroxigenasa de la enzima, el ensayo de la oxidación de ABTS mide actividad peroxidasa y, de acuerdo a los parámetros cinéticos, PaDa-I presentaría mayor afinidad por éste último sustrato y por lo tanto es un ensayo de mayor sensibilidad. De hecho, en el laboratorio se ha calculado una equivalencia aproximada de la actividad peroxidasa:peroxigenasa, en la que  $5U_{ABTS}$  equivalen a  $1U_{NBD}$ .

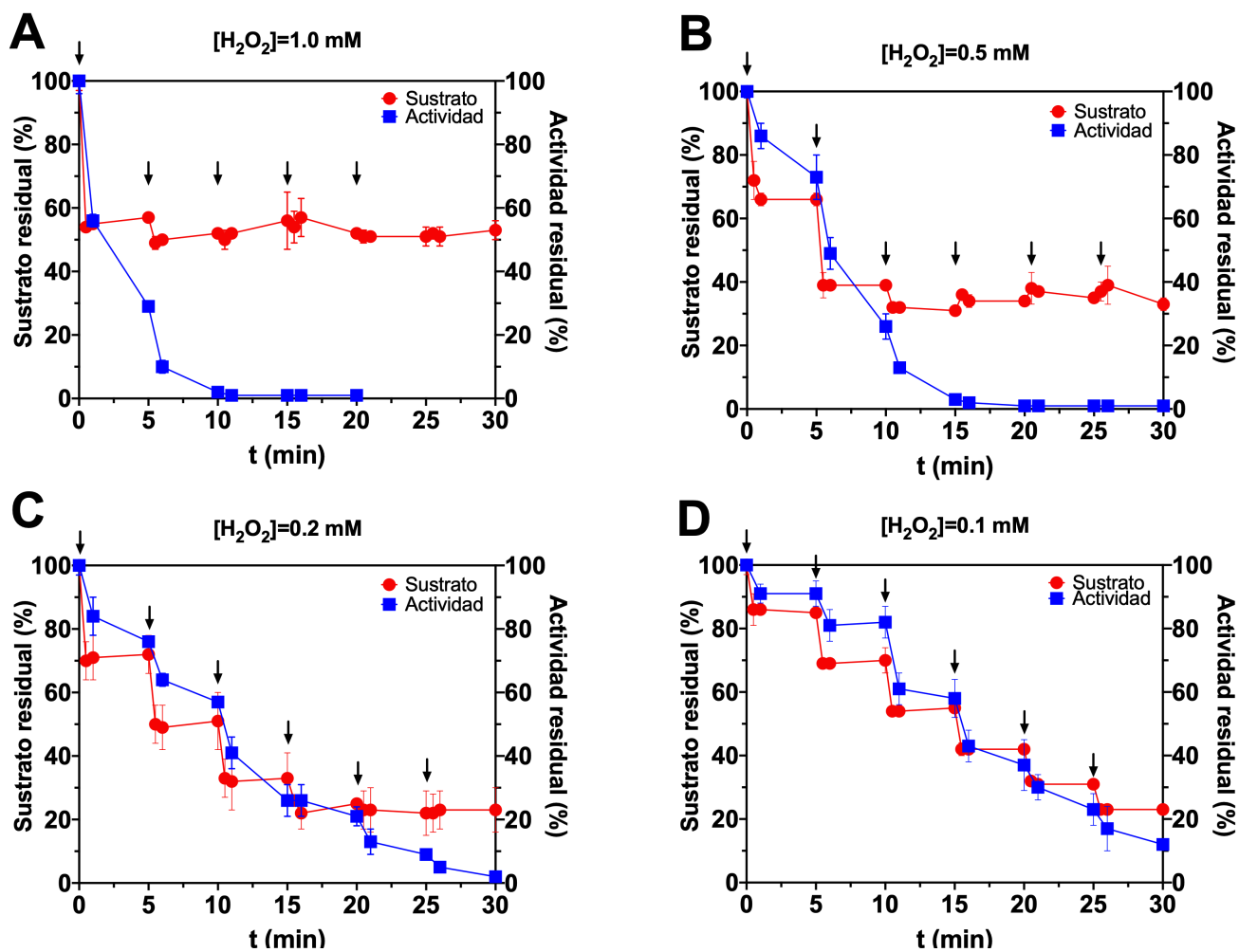


Figura 10. Curva de progreso de la oxidación de benciloxietanol (0.2 mM) e inactivación enzimática en función de las adiciones de  $H_2O_2$  (A) 1.0 mM, B) 0.5 mM, C)

0.2 mM y D) 0.1 mM) representadas por flechas. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

Utilizando las mismas condiciones del ensayo mostrado en la figura 10C se aumentó la concentración de éter bencílico. En la figura 11 se observa que a mayor concentración de sustrato la inactivación se retarda, lo que sugiere que la velocidad de la inactivación dependiente de  $H_2O_2$  disminuye.

La última estrategia que se abordó para retrasar la inactivación fue complementar el medio de reacción con moléculas conocidas por atrapadores de radicales libres que provocan la inactivación, también conocidas como *scavengers* (Anexo II) (La Rotta Hernandez, et al. 2005). En este caso no se observó un retraso de la inactivación durante la oxidación de benciloxietanol en presencia de t-butanol o ácido ascórbico. Estos datos sugieren que el principal mecanismo de inactivación es producto de la destrucción del grupo hemo, como ya ha sido descrito en otro trabajo (Karich, Scheibner, et al. 2016).

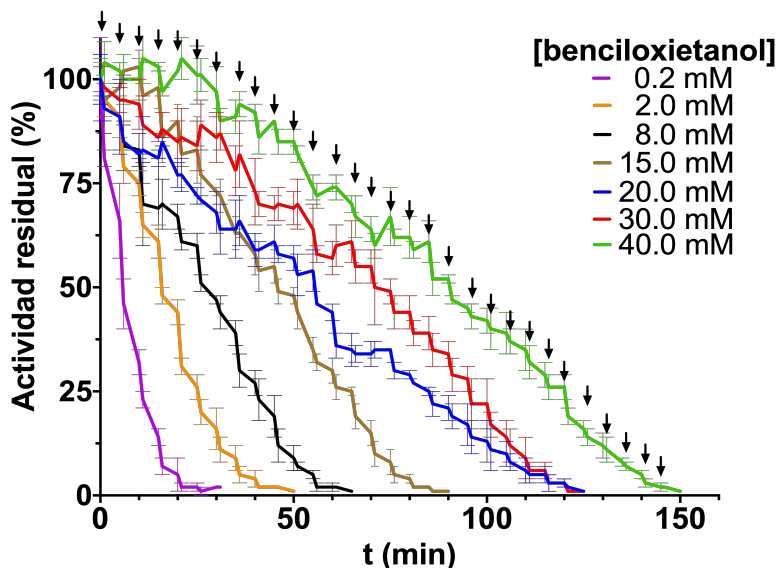


Figura 11. Inactivación dependiente de  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones de benciloxietanol. Cada una de las flechas representa una adición de 0.2 mM de  $H_2O_2$ . Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

El siguiente acercamiento al estudio de la oxidación de éteres bencílicos fue caracterizar la velocidad de la actividad catalasa, en presencia de benciloxietanol, midiendo la aparición de oxígeno disuelto en el medio de reacción. La reacción de dismutación de  $H_2O_2$  catalizada por PaDa-I se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (figura 12A); sin embargo, existen dos consideraciones relevantes durante el análisis de esta reacción: 1) los parámetros cinéticos aparentes involucrarían el mecanismo propuesto para la familia de las peroxigenasas fúngicas: la difusión de una primera molécula de  $H_2O_2$  del solvente hacia el sitio activo, su interacción con el sitio activo para formar el compuesto I, la llegada de una segunda molécula de  $H_2O_2$  al sitio activo y su interacción con el compuesto I para obtener como producto una molécula de oxígeno y dos de agua y 2) la inactivación de la enzima está presente durante la reacción, específicamente a concentraciones estándar de  $H_2O_2$  como se demostró en la sección anterior (Kluge, et al. 2007).

Si bien el benciloxietanol no es un inhibidor de la enzima como tal, éste puede ser considerado como un “inhibidor” lineal mixto de la reacción catalasa (Dixon 1953, Cornish-Bowden 1974). Cuando se incluye este compuesto en el medio de reacción, las dos reacciones entran en competencia y aumenta la  $K_m$  aparente para la actividad catalasa, provocando que la velocidad de la reacción catalasa disminuya. Puesto que el benciloxietanol es sustrato de PaDa-I, el comportamiento inhibitorio se entiende desde la perspectiva molecular como la competencia por el compuesto I entre una molécula del éter y una segunda molécula de  $H_2O_2$ .



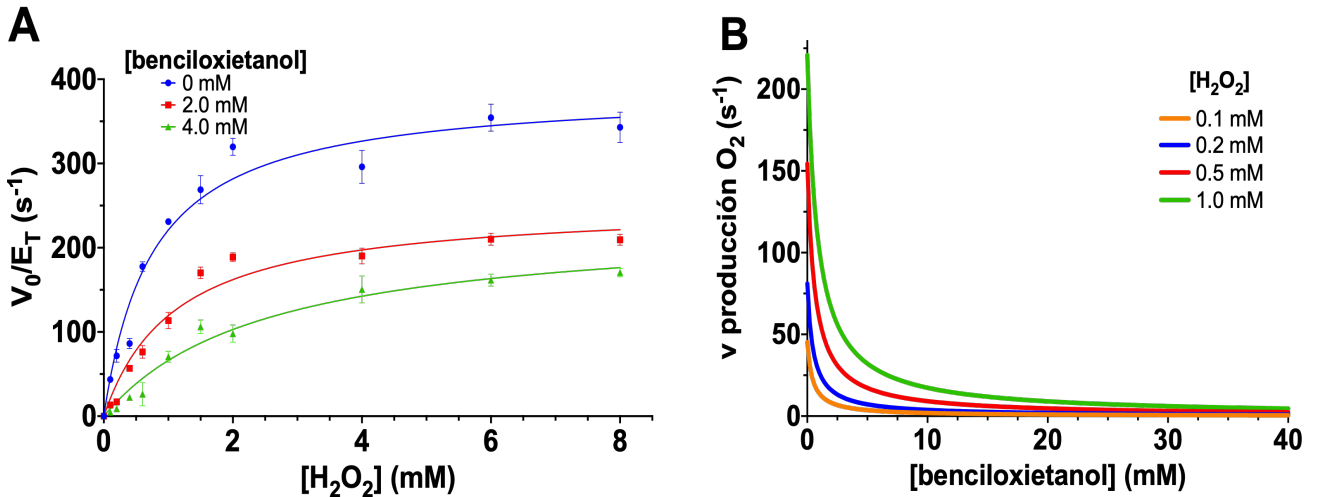


Figura 12. A) Curva de Michaelis-Menten para actividad catalasa de PaDa-I, en ausencia y en presencia de un sustrato que compite por el compuesto I.  $R^2 = 0.96$  para los tres casos. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas. B) Simulación de la velocidad inicial de producción de  $O_2$  en función de la concentración de benciloxietanol. La concentración inicial de  $H_2O_2$  es constante (0.1-1.0 mM).

En la figura 12B se presenta una simulación de la ecuación 4 y los parámetros cinéticos calculados como se indica en el Anexo II; se observa el comportamiento de la velocidad específica inicial de la producción de oxígeno en función de la concentración de benciloxietanol, con diferentes concentraciones iniciales de peróxido  $H_2O_2$ . De esta manera, se explican dos observaciones experimentales: 1) a concentraciones de benciloxietanol alrededor de 1.0 mM la velocidad inicial de la actividad catalasa es significativamente alta y 2) para una concentración constante de benciloxietanol, alrededor de 1.0 mM, la velocidad inicial de la actividad catalasa es proporcional a la concentración inicial de  $H_2O_2$ .

Ecuación 4:

$$v_{específica} = \frac{k_{cat}[H_2O_2]}{K_m \left( 1 + \frac{[benciloxietanol]}{K_{ic}} \right) + \left( 1 + \frac{[benciloxietanol]}{K_{iu}} \right) [H_2O_2]}$$

Después de evaluar el efecto de la concentración de peróxido y sustrato sobre las reacciones secundarias, se evaluaron estas condiciones sobre la eficiencia de la oxidación de los éteres bencílicos a través del número de recambio total (*TTN*, por sus siglas en inglés). El *TTN* es una medida de la estabilidad operacional de la enzima durante su ciclo de vida útil; en otras palabras, indica el número de moléculas de sustrato oxidadas por molécula de enzima activa hasta que ésta se inactiva por completo. Esta relación se ha utilizado particularmente para describir la eficiencia de las oxidaciones catalizadas por esta familia de enzimas y resulta útil para comparar procesos entre diferentes condiciones; por ejemplo, la concentración inicial y reactividad de los sustratos (Polizzi, et al. 2007, Aranda, et al. 2019).

La información mostrada en la figura 13 muestra el *TTN* determinado para 0.2 mM de benciloxietanol en función de la concentración de cada adición de  $H_2O_2$ , hasta que la enzima se inactiva por completo. Los valores más altos de *TTN* se obtienen cuando las dosificaciones de peróxido se realizan a concentraciones bajas del mismo (0.1 y 0.2 mM) lo que sugiere que la oxidación del benciloxietanol está favorecida sobre las reacciones secundarias; como ya se ha explicado, la velocidad con la que ocurren disminuye conforme disminuye la concentración de  $H_2O_2$ .

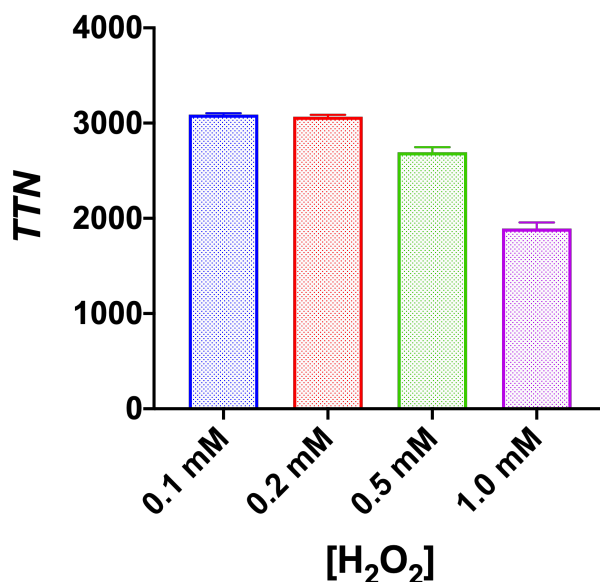


Figura 13. Número de recambio total (*TTN*) determinado para 0.2 mM de benciloxietanol y diferentes adiciones de  $H_2O_2$  (0.1-1.0 mM). Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

Por otro lado, si la concentración de benciloxietanol es mayor se observa un aumento en el valor de *TTN* (tabla 8 y figura 14). Por ejemplo, con una concentración inicial de 0.2 mM el *TTN* es de  $3\,070 \pm 20$  mol de sustrato consumido/mol de enzima, y aumenta a  $15\,640 \pm 570$  mol de sustrato consumido/mol de enzima cuando la concentración inicial de sustrato es 2.0 mM; es decir, la cantidad de moléculas oxidadas de benciloxietanol por una molécula de enzima durante su vida útil, es siete veces mayor cuando la concentración de este sustrato aumenta 10 veces. Este fenómeno no se presenta cuando la concentración de sustrato es 100 y 150 veces mayor a 0.2 mM pues el *TTN* aumenta sólo 40 ( $TTN=121\,620 \pm 11\,051$  mol de sustrato consumido/mol de enzima) y 43 veces ( $TTN=128\,612 \pm 18\,330$  mol de sustrato consumido/mol de enzima), respectivamente. De hecho, a una concentración de 40 mM, el valor calculado es menor respecto a las concentraciones de 20 y 30 mM. Esto posiblemente se deba a que, a pesar de que la inactivación se ve retardada, la peroxigenasa presenta mayor afinidad para la oxidación de los productos y la oxidación del benciloxietanol ya no es la reacción principal (Kinne, Zeisig, et al. 2010).

Tabla 8. Número de recambio total (*TTN*) y cantidad de sustrato oxidado para diferentes concentraciones iniciales de benciloxietanol, después de varias adiciones de 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

[Benciloxietanol] inicial (mM)	<i>TTN</i> (mol de sustrato consumido/mol de enzima)	[Benciloxietanol] oxidado (mM)
0.2	3 070 ± 20	0.104 ± 0.006
2.0	15 650 ± 570	0.78 ± 0.02
8.0	50 770 ± 2090	3.36 ± 1.04
15.0	59 500 ± 6 840	3.00 ± 0.30
20.0	121 620 ± 6 840	6.00 ± 0.60
30.0	128 610 ± 18 330	6.30 ± 0.30
40.0	73 520 ± 11 640	3.60 ± 0.40

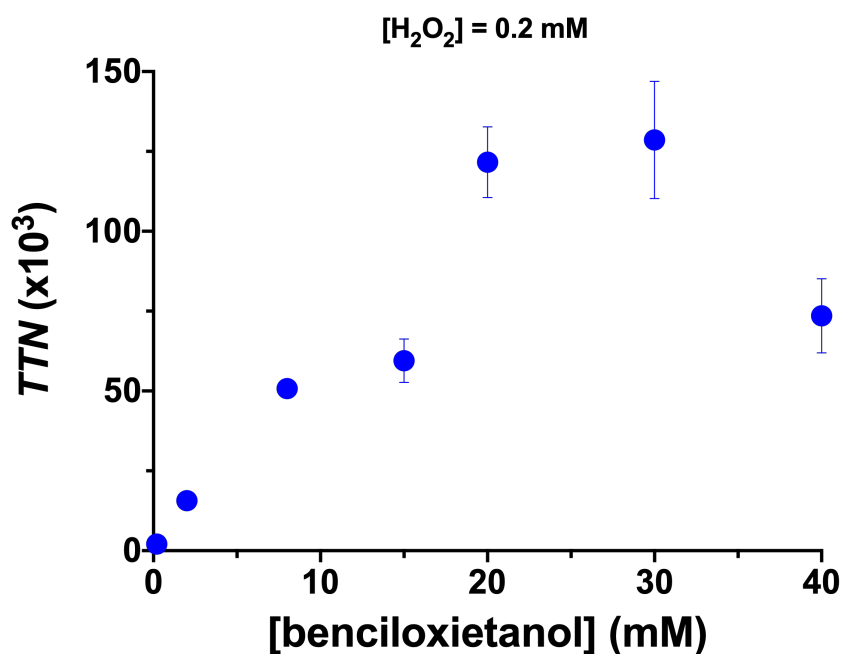


Figura 14. Número de recambio total (*TTN*) para diferentes concentraciones de benciloxietanol, con adiciones de 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

## 7.2.2 Efecto de la estructura de los éteres bencílicos sobre su oxidación

### 7.2.2.1 Estudios computacionales

Para la ruptura de enlace éter se ha propuesto un mecanismo de reacción en el que el compuesto I es capaz de generar un radical libre en uno de los carbonos adyacentes al oxígeno del enlace éter (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009). Este radical libre se forma como consecuencia de la ruptura homolítica de enlace C-H por lo que el primer acercamiento para estudiar el efecto de la estructura de los éteres bencílicos sustrato sobre su reactividad fue determinar la energía de disociación de enlace C-H,  $BDE_{C-H}$  (figura 15). Este parámetro se calculó mediante métodos de mecánica cuántica para ambos carbonos adyacentes de cada éter bencílico y los valores se denominaron  $BDE_{C_{Benz}-H}$  para el carbono bencílico y  $BDE_{C_R-H}$  para el carbono cercano a la porción variable (tabla 9).

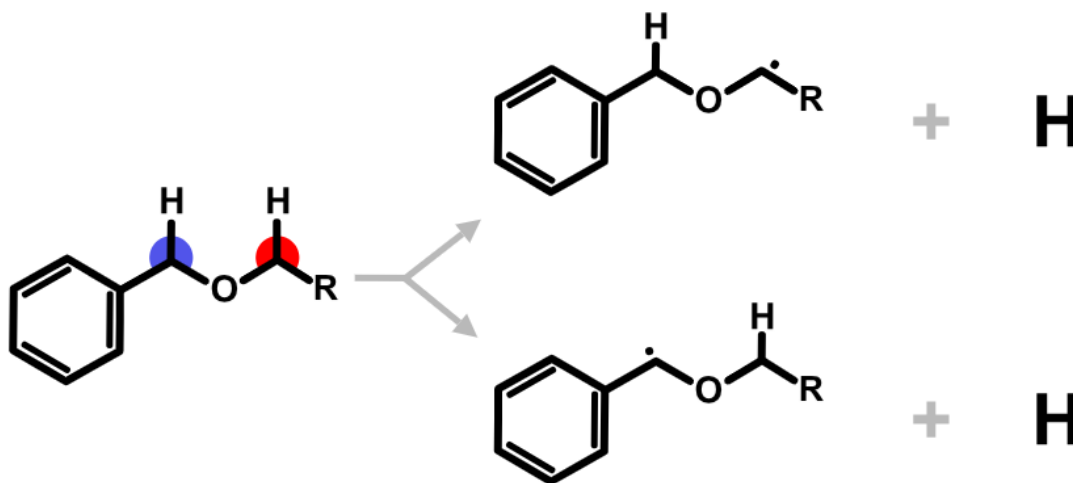


Figura 15. Formación de radicales libres, precursores del hemiacetal formado en la reacción de oxidación de éteres catalizada por PaDa-I.

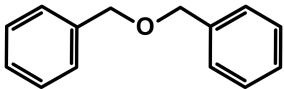
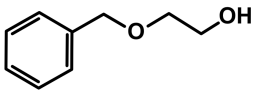
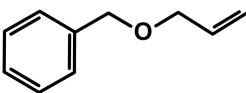
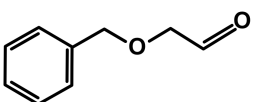
El dibenciléter presenta posiciones equivalentes y por lo tanto los valores de  $BDE_{C-H}$  calculados son iguales entre sí y similares a la estimación experimental reportada en la literatura que es de 85.8 kcal/mol. Se debe considerar que sólo las diferencias mayores a 3.0 kcal/mol son significativas, debido al nivel de teoría utilizado por el

software (Tumanov, Kromkin and Denisov 2002) (Gaussian 16 Users Reference 2018).

En el caso de los demás éteres bencílicos es posible pensar que los grupos funcionales contiguos al  $C_R$  tienen un efecto sobre la formación del radical respecto a la posición  $C_{Benz}$ . Por ejemplo, en el benciloxietanol existe una diferencia de energía de 12.3 kcal/mol entre ambas posiciones, siendo  $C_{Benz}$  la de menor energía y por lo tanto, más susceptible para oxidarse. Lo anterior explica cómo la presencia de enlaces tipo  $\pi$ , próximos a las posiciones de interés, favorecen la formación del radical; es decir, la resonancia de los electrones del anillo aromático estabilizan la formación del radical.

Este fenómeno también es observable para los éteres bencílicos que tienen enlaces tipo  $\pi$  en sus grupos funcionales variables: alilbenciléter y benciloxiacetaldehído. Los valores de  $BDE_{C-H}$  estimados en cada molécula son similares entre sí por lo que sugieren que ambas posiciones son igualmente susceptibles de ser oxidadas.

**Tabla 9. Energía de disociación de enlace C-H en las posiciones adyacentes al oxígeno de los éteres bencílicos. <sup>1</sup>Posiciones equivalentes.**

Éter bencílico	Estructura	$BDE_{C_{Benz}-H}$ (kcal/mol)	$BDE_{C_R-H}$ (kcal/mol)
Dibenciléter		77.7 <sup>1</sup>	77.7 <sup>1</sup>
Benciloxietanol		77.8	90.1
Alilbenciléter		77.6	74.8
Benciloxiacetaldehído		78.6	74.2

El siguiente acercamiento computacional se hizo con estudios de acoplamiento molecular que permiten simular la estructura del complejo peroxigenasa-éter bencílico al cual se le asigna un valor energético que, en teoría, podría reflejar la afinidad entre la enzima y el sustrato (Chaudhary and Mishra 2016). Para cada una de las estructuras del complejo que se obtuvieron del acoplamiento molecular se midió la distancia entre el átomo de hierro y cada uno de los carbonos  $C_R$  o  $C_{Benz}$ . Los resultados muestran que las interacciones de los éteres bencílicos con la peroxigenasa ocurren a lo largo de los 17 Å del túnel, aunque las más favorecidas (menor energía) se encuentran dentro de los 6 Å más próximos al grupo hemo (figura 16), como era de esperarse. Las interacciones para los éteres bencílicos muestran una distribución energética similar; sin embargo, el dibenciléter es la molécula que presenta mayor afinidad posiblemente a que su composición aromática facilita las interacciones de tipo van der Waals con residuos hidrofóbicos del túnel (Piontek, et al. 2013).

La frecuencia en la que la posición bencílica está favorecida en distancia respecto al sitio activo se aproxima a una relación de 2:1 respecto al carbono de la fracción variable. En el caso del dibenciléter la relación es 1:1 al ser posiciones equivalentes (tabla 10).

**Tabla 10. Frecuencia en la que se favorecen las posiciones  $C_{Benz}$  y  $C_R$  en relación a la distancia al hierro del hemo.**

	Frecuencia de poses (%)	
	$C_{Benz}$	$C_R$
Dibenciléter	53	47
Benciloxiacetaldehído	66	34
Alilbenciléter	65	35
Benciloxietanol	64	36
Ácido benciloxiacético	62	38
Benciloxiacetato	62	38

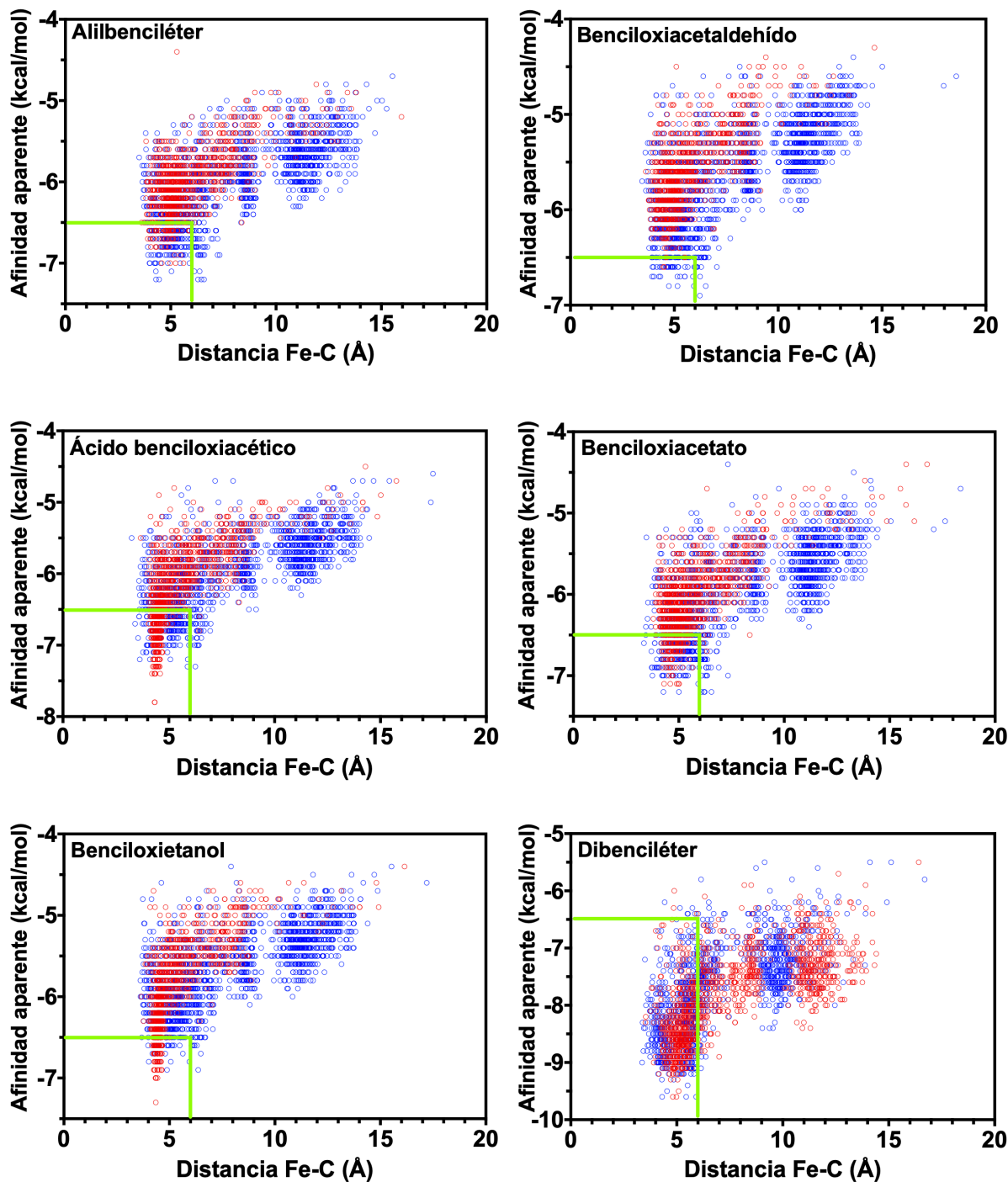


Figura 16. Afinidad aparente entre el éter y la proteína en función de la distancia del hierro del sitio activo a C<sub>Benz</sub> (azul) y a C<sub>R</sub> (rojo) para los diferentes éteres. El recuadro verde indica las poses seleccionadas por distancia ( $\leq 6$  Å) y afinidad ( $\leq -6.5$  kcal/mol).



Para todos los éteres bencílicos se observa que sólo entre el 24% y 31% del total de los complejos enzima-sustrato presentan alguna de los dos carbonos de interés dentro de una distancia menor o igual a 6.0 Å. Cuando a esta selección se le añade una restricción energética para considerar las poses de mayor afinidad ( $\leq -6.5$  kcal/mol) el número de conformaciones favorables difiere en función de la estructura de cada éter sustrato así como la frecuencia en la que se acercan al hemo los carbonos  $C_{Benz}$  o  $C_R$  (figura 17). Por ejemplo, para los sustratos de mayor polaridad, el benciloxietanol y el ácido benciloxiacético, el carbono  $C_R$  se encuentra con mayor frecuencia más cerca del grupo hemo que el carbono  $C_{Benz}$ . En una inspección visual se encontraron las cadenas laterales de T192 y S240 a distancias de puentes de hidrógeno de las regiones polares del benciloxietanol así como del residuo catalítico R189, con el que podría existir una interacción electrostática con la especie desprotonada del ácido benciloxiacético (figuras 18 y 19).

En el caso del benciloxiacetaldehído, son poco frecuentes las conformaciones en las que podría favorecerse la oxidación de la posición  $C_R$  (mayor afinidad y menor distancia), encontrándose solo 6 de 2430. Las interacciones polares con los residuos alrededor del sitio activo se ven menos favorecidas que las interacciones del anillo aromático con residuos hidrofóbicos y por lo tanto se observa que las conformaciones en las que hay mayor afinidad por el sustrato, son aquellas en las que el carbono  $C_{Benz}$  se encuentra cerca del grupo hemo. De hecho, en el análisis para el dibenciléter y el alilbenciléter se identificaron residuos hidrofóbicos que interaccionan con el anillo aromático de éstos: la triada de residuos de fenilalanina: F69, F121 y F199 y A77 (figura 20). Estos residuos han sido identificados como *orientadores* del sustrato, en trabajos donde se resuelve la estructura cristalográfica de la peroxigenasa recombinante en complejo con sustratos aromáticos como estireno y alcohol veratrílico (Ramirez-Escudero, et al. 2018, Ramirez-Ramirez, et al. 2020).

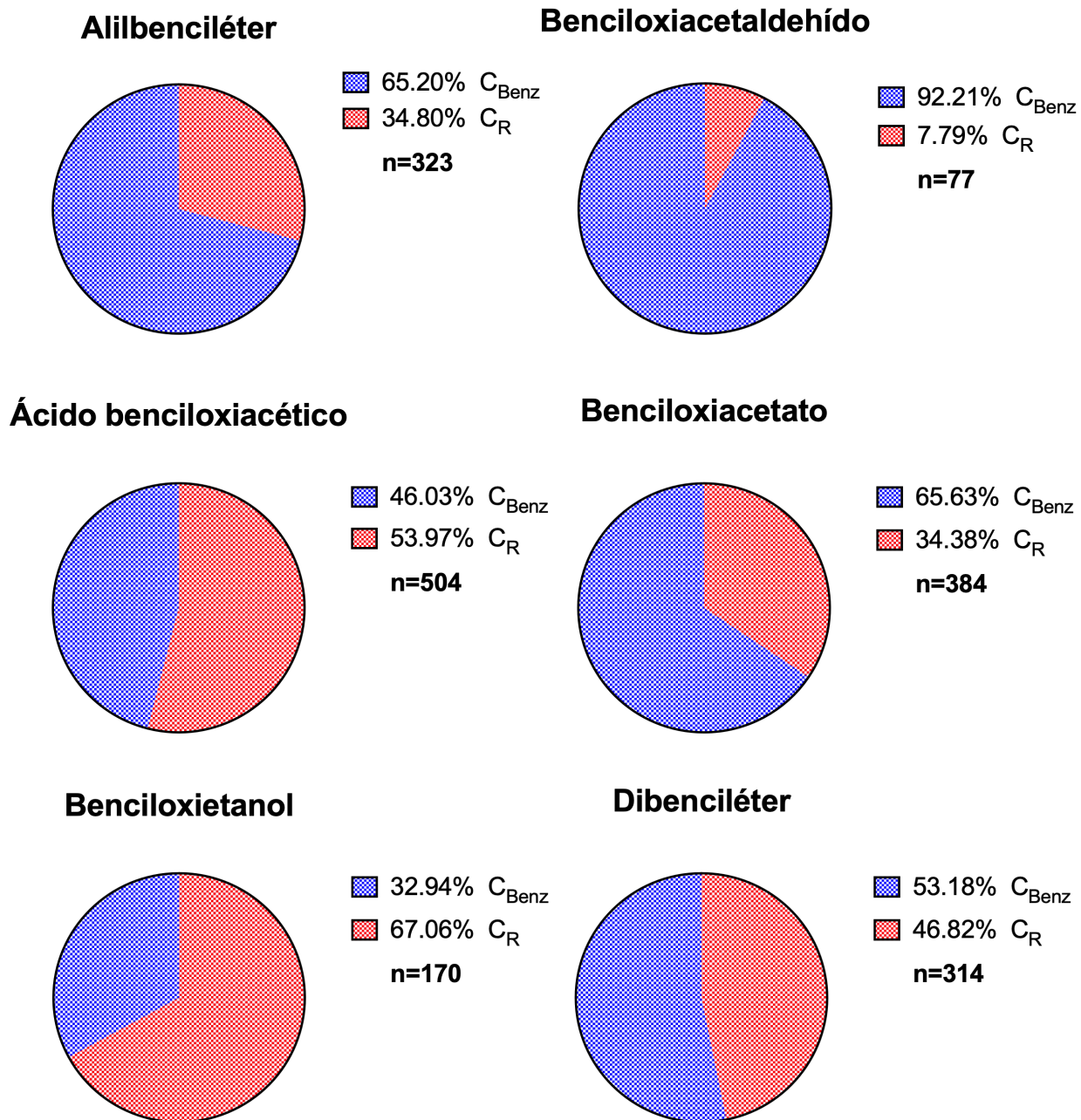


Figura 17. Frecuencia en la que las posiciones C<sub>Benz</sub> y C<sub>R</sub> se encuentran cercanas al hierro del hemo ( $\leq 6\text{\AA}$ ) y su interacción con el túnel de la peroxigenasa es favorable ( $\leq 6.5$  kcal/mol).

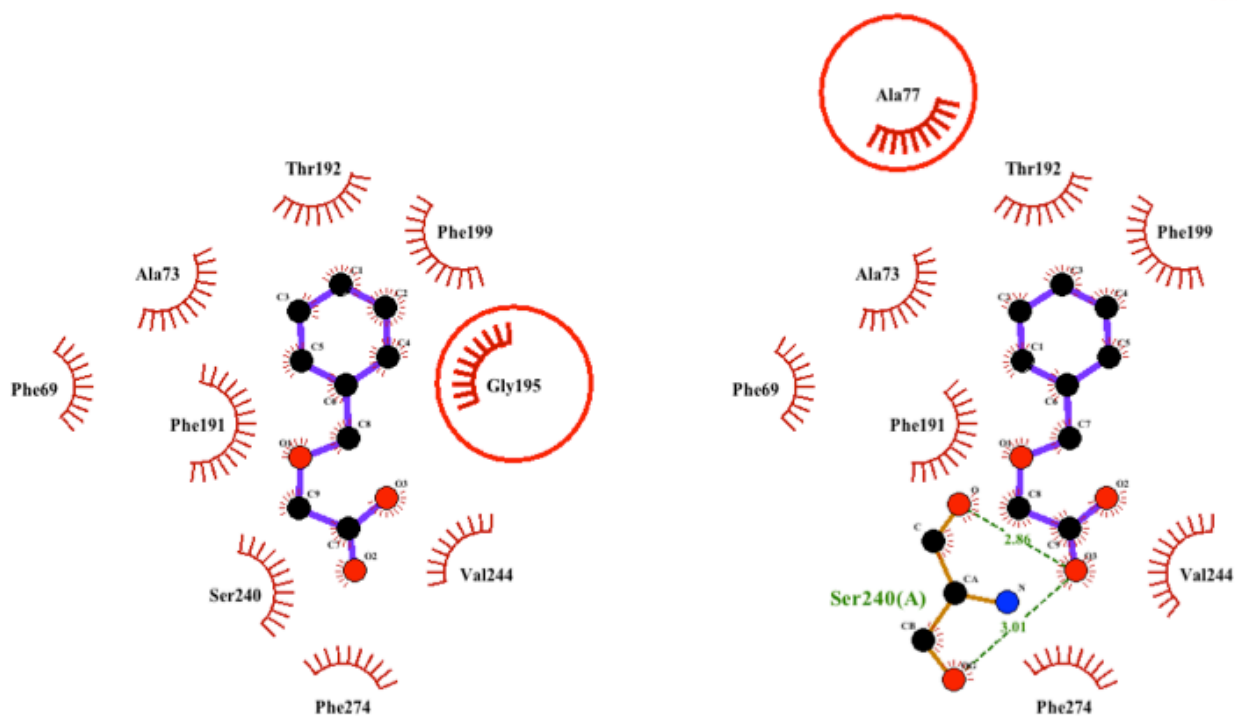


Figura 18. Interacciones del ácido benciloxiacético (en morado) con residuos del túnel de PaDa-I. Visualización en *LigPlot+ 2.1*.

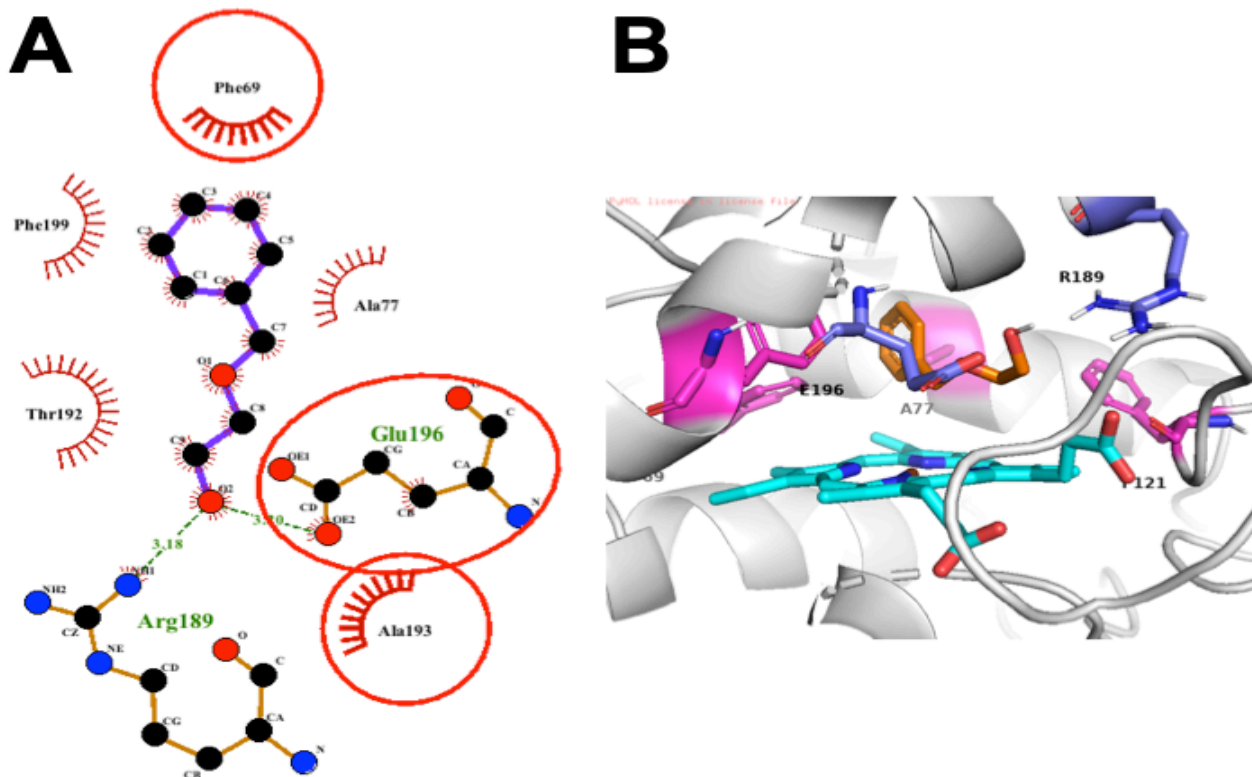


Figura 19. Interacciones de benciloxi-etanol (en naranja) con residuos del túnel de la PaDa-I. Visualización en A) *LigPlot+ 2.1* y B) *PyMol 2.0*.

En un análisis detallado sobre el acomodo de alilbenciléter en el sitio activo, con la misma restricción de energía y distancia, se observa que el número de los complejos enzima-sustrato favorecidos aumenta de 323 a 383; es decir, el acomodo del sustrato revela que otras posiciones serían susceptibles a la oxidación. Por ejemplo, en el 48% de las conformaciones los carbonos  $C_{Benz}$  y  $C_R$  son los que más se acercan al grupo hemo; sin embargo, existe un 18% de los complejos restantes donde el grupo alilo se acerca al grupo hemo. Con lo anterior se predice que es posible que ocurra la reacción de epoxidación, como se discutirá más adelante (figura 21).

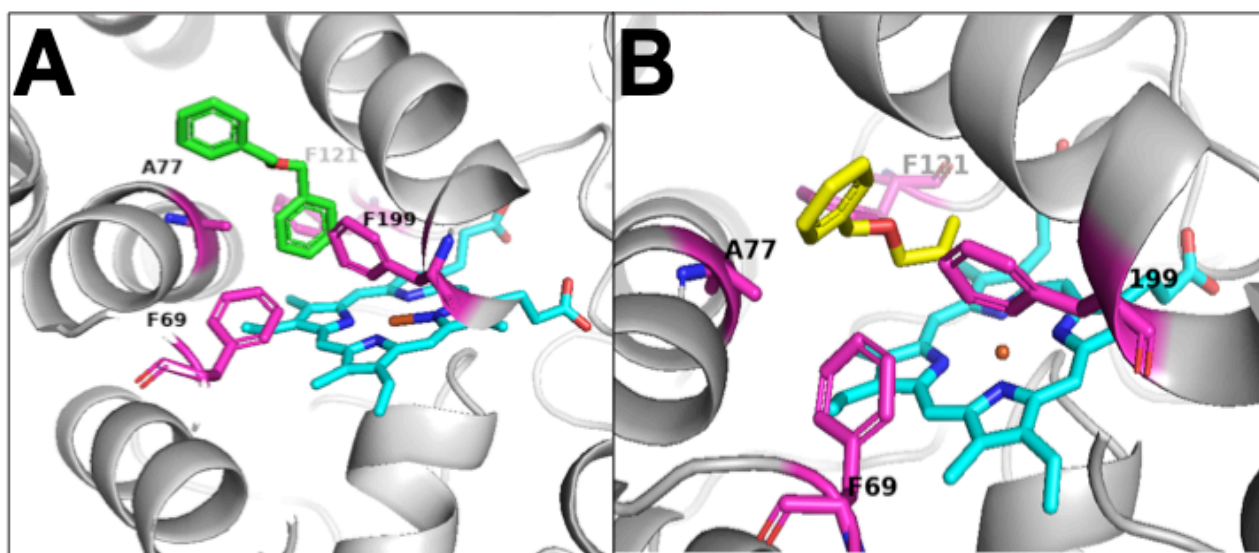


Figura 20. Acoplamiento molecular de A) dibenciléter y B) alilbenciléter con PaDa-I.

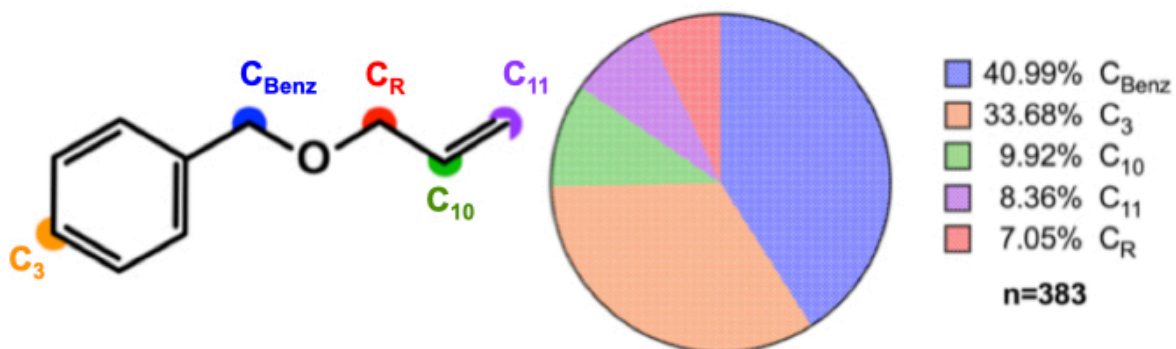


Figura 21. Posiciones favorecidas del alilbenciléter respecto al sitio activo de PaDa-I.

### 7.2.2.3 Efecto de la estructura del éter bencílico sobre el número de recambio total

Como se explicó anteriormente, el número total de recambio se calcula al término de la *vida útil* del biocatalizador. Por lo anterior se midió la actividad residual de la enzima durante la reacción de los éteres mientras el peróxido era dosificado (figura 22A). De esta manera se aprecia un comportamiento distinto de la inactivación en presencia de cada uno de los éteres bencílicos. Lo anterior parece ser una consecuencia de la afinidad de la enzima por cada uno de los sustratos; es decir, la naturaleza química de cada éter modula la velocidad de oxidación, y esto tiene un efecto sobre las reacciones secundarias, como se hipotetiza al inicio de este trabajo. Mientras que en presencia de moléculas polares como benciloxietanol o benciloxiacetaldehído la inactivación se completa alrededor de los 30 minutos, para el dibenciléter la inactivación se retrasa y toma casi el doble de tiempo para que la enzima se inactive. El comportamiento en presencia de benciloxiacetato (similar al control) y alilbenciléter (inactivación inmediata) se discutirán más adelante.

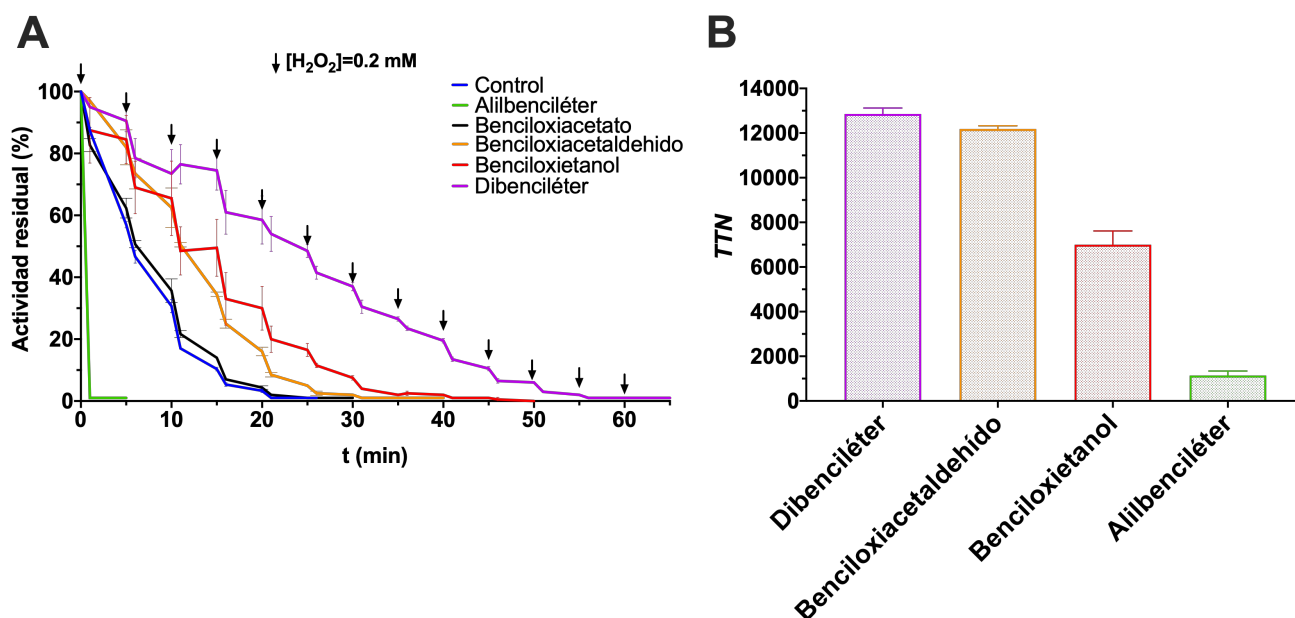
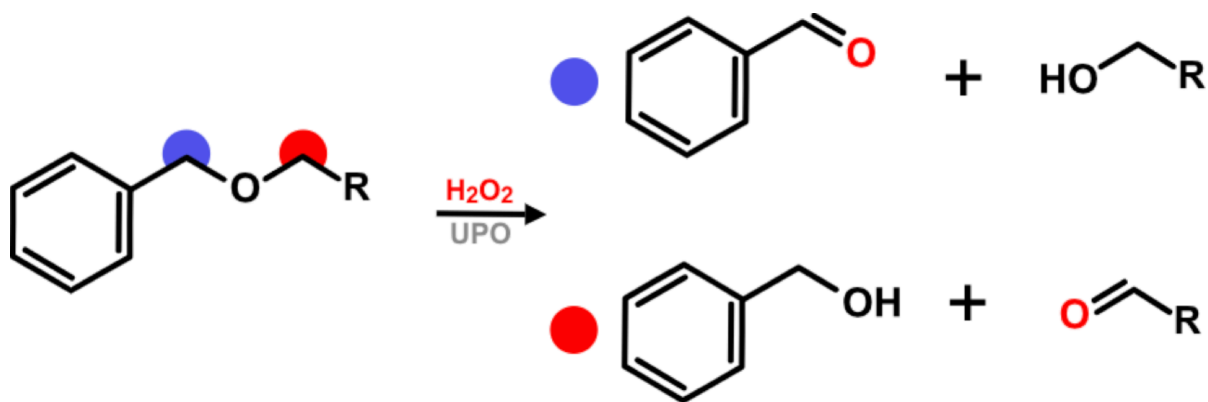


Figura 22. A) Inactivación de PaDa-I durante reacciones en presencia de 0.7 mM de cada éter bencílico. Las flechas indican adiciones de 0.2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B) Número de recambio total para cada éter bencílico. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

Así, la polaridad de cada sustrato también tiene consecuencia sobre la oxidación de éste; es decir, a menor polaridad, la magnitud del *TTN* es mayor. Lo anterior se cumple para tres de los sustratos:  $12,850 \pm 260$  para el dibenciléter,  $12,180 \pm 140$  para el benciloxiacetaldehído y  $7,000 \pm 610$  para el benciloxietanol y coincide con los valores de afinidad obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular de este trabajo.

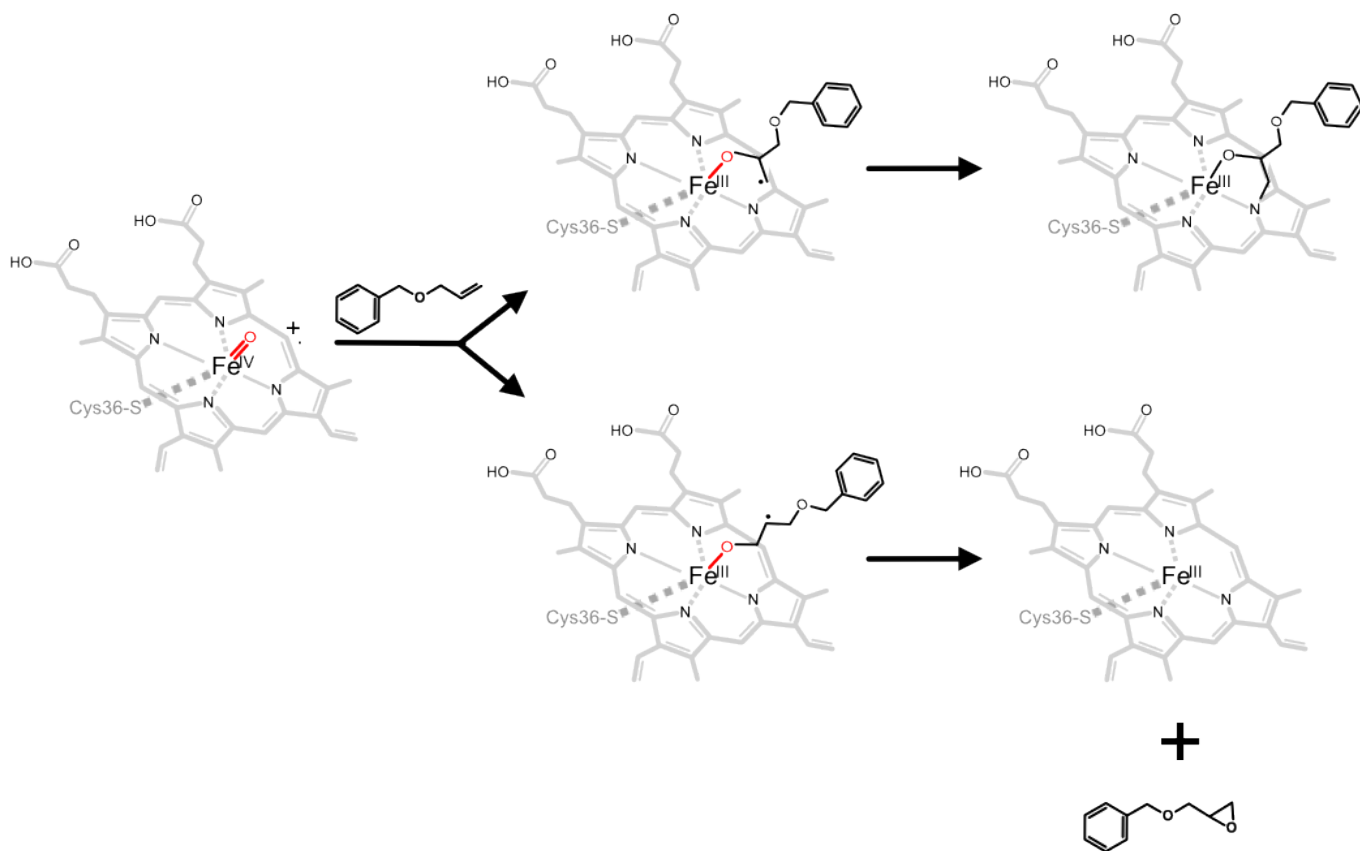
Por otro lado, en el análisis por espectrometría de masas se identificó alcohol bencílico y benzaldehído como productos en el medio de reacción cuando dibenciléter, benciloxiacetaldehído y benciloxietanol y alilbenciléter son utilizados como sustrato (figura 23) (Anexo IV). Lo anterior indica que la ruptura de enlace éter ocurre en estos sustratos; sin embargo, estos resultados indican que la oxidación se da en ambas posiciones y posiblemente no exista una regioselectividad.



**Figura 23. Productos esperados de la oxidación de éteres bencílicos. Cuando la oxidación se da en el carbono bencílico (azul) se esperaría obtener benzaldehído y el alcohol correspondiente. Si la oxidación se da en el carbono contiguo a la porción variable (rojo) se obtendría alcohol bencílico y el carbonilo correspondiente.**

A pesar de que los productos identificados indican que la ruptura de enlace éter se da en el alilbenciléter, la magnitud del *TTN* es de  $1,140 \pm 200$ ; es decir, entre 7 y 12 veces menos que para los demás éteres bencílicos sustrato. Además, se observa una inactivación casi inmediata, ya que la enzima pierde completamente su actividad después de la primera adición de  $H_2O_2$ .

Es posible que en el caso del alilbenciléter una reacción de oxidación del grupo alilo sea responsable de este comportamiento. En la literatura se ha reportado que las hemo-tiolato peroxidadas se inactivan rápidamente en presencia de olefinas terminales debido a la formación de un aducto con el grupo hemo (Dexter and Hager 1995, Peter 2013). En el mecanismo propuesto se describe que esta vía de oxidación se da por la formación de un radical en el carbono menos sustituido del doble enlace; es decir, el carbono terminal. Cuando el radical se forma en el carbono más sustituido es probable que se favorezca la reacción de epoxidación del sustrato alqueno y se obtenga como producto la especie epóxido. En el análisis de espectrometría de masas de este trabajo se encontró la especie epoxidada del alilbenciléter, el bencil glicidil éter (figura 24). Por lo anterior y con base en los estudios de acoplamiento molecular es posible hipotetizar que la inactivación de la peroxigenasa en presencia del alilbenciléter se da por la formación del aducto con el grupo hemo.



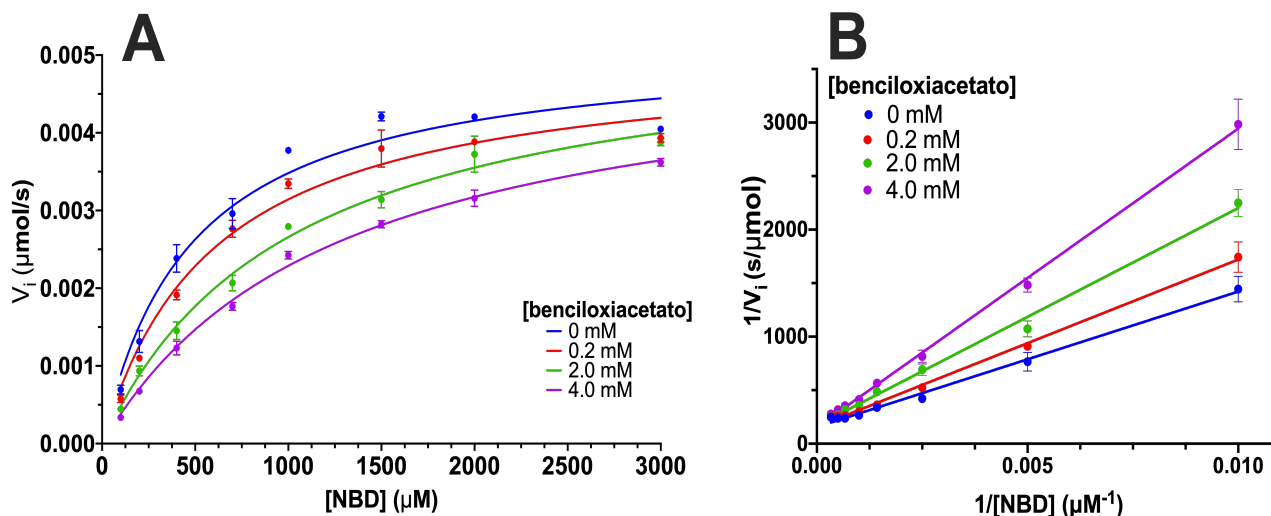
**Figura 24. Hipótesis de las vías de oxidación del alilbenciléter. Arriba se muestra la formación del aducto alilbenciléter-grupo hemo y abajo la formación del bencil glicidil éter. Adaptado de Peter S. et al 2013.**

En el caso del benciloxiacetato no se encontraron cambios durante el análisis por cromatografía para calcular el *TTN* y durante el ensayo de actividad residual se observa una inactivación similar a la del control. Este resultado sugiere que debido a su composición química no es sustrato de la peroxigenasa; es decir, esta molécula pudiera estar impedida de llegar al sitio activo por su tamaño o por su carga como consecuencia de la desprotonación.

Recientemente se reportaron dos estructuras cristalográficas de *AaeUPO* (*PDB*: 2YP1) y *PaDa-I* (*PDB*: 5OXT) en complejo con una molécula de ión acetato situada sobre el sitio activo por lo que se entiende que la carga no es un factor que impida al acetato entrar al túnel de la peroxigenasa; sin embargo, esta misma propiedad provoca un acomodo específico sobre el sitio activo que se explicará adelante (Piontek, et al. 2013, Ramirez-Escudero, et al. 2018, Babot, et al. 2013).

Para confirmar que la carga del benciloxiacetato no es una condición que impida su acceso al sitio activo se midió la cinética de oxidación de un sustrato estándar del cual se sabe que es necesario que atravesase el túnel, desde el solvente hacia el sitio activo, para ser oxidado: el NBD. Los resultados de este ensayo demuestran que el benciloxiacetato tiene un comportamiento de inhibidor competitivo pues la afinidad de la enzima por el NBD disminuye (aumenta  $K_m$ ); en otras palabras, una molécula de benciloxiacetato interacciona con el sitio activo y por lo tanto se retrasa la oxidación de NBD (figura 25). En contraste, el ión acetato no muestra un comportamiento como inhibidor, por lo que a pesar de que se ha observado (en estructuras cristalográficas) su presencia en las vecindades del grupo hemo, esta molécula no es un inhibidor de la actividad peroxigenasa (Anexo V).





**Figura 25. A) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de la cinética de oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato.  $R^2= 0.98$  para las cuatro condiciones. B) Ajuste de doble recíproco de la cinética de la oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.**

Cuando se probó el sustrato benciloxietanol como inhibidor de la oxidación de NBD se observa un comportamiento similar aunque en diferente magnitud; las constantes de inhibición competitiva ( $K_{ic}$ ) son 3.45 mM y 4.47 mM para el benciloxiacetato y benciloxietanol, respectivamente. Finalmente, es importante mencionar que las constantes cinéticas de la oxidación de NBD son constantes cinéticas globales; es decir, estos parámetros no distinguen los diferentes pasos del mecanismo (ej. formación de intermediario) y por lo tanto describen la cinética de todos ellos: la formación del compuesto I y la oxidación de NBD. Por lo anterior, podemos concluir que la oxidación de NBD se ve inhibida en distintas etapas por el benciloxiacetato y el benciloxietanol.

Para reforzar la conclusión se replicó el ensayo de inhibición utilizando ABTS como sustrato estándar en presencia de benciloxiacetato, acetato y benciloxietanol. En estos ensayos se observa diferencia en el comportamiento como inhibidor siendo el benciloxiacetato y el acetato inhibidores acompetitivos (aumento de  $K_m$  y disminución de  $k_{cat}$ ) y el benciloxietanol, inhibidor mixto lineal (disminución de  $k_{cat}$ ) (figura 26).

Para entender este comportamiento es necesario indicar que, en algunas hemoperoxidasas, se ha descrito que la reacción peroxidasa se da por la transferencia de un electrón desde el sustrato al sitio activo por un efecto de *tunneling*; es decir, no es estrictamente necesario que el sustrato entre en la cavidad de la enzima para ser oxidado y por el contrario, esta transferencia puede darse desde la superficie de la enzima (Laurynėnas, et al. 2019, Manoj and Hager 2008). Así, se explica que estas moléculas representen un comportamiento cinético de inhibidor “alostérico” sobre la oxidación de ABTS cuando no precisamente lo son (figura 26).

Dicho lo anterior, el sustrato benciloxietanol es un inhibidor mixto que podría comportarse de la siguiente forma: consume el compuesto I en la cercanía del hemo (inhibición competitiva) y como consecuencia de la ausencia del compuesto I, el ABTS no se oxida en el exterior de la enzima (inhibición acompetitiva o “alostérica”).

En el caso del benciloxiacetato y acetato se observa únicamente una inhibición acompetitiva; es decir, estas moléculas retrasan la formación del compuesto I (no lo consumen) y como consecuencia se retarda la oxidación del ABTS en el exterior de la peroxigenasa. Por lo tanto, ambos son inhibidores reversibles de la actividad peroxidasa.

La evidencia cristalográfica indica que el acetato tiene una posible interacción electrostática con el residuo catalítico R189 que está cercano al sitio activo; en los estudios de acoplamiento molecular, el benciloxiacetato mostró la misma interacción de la porción acetato con R189 y además tres interacciones del anillo aromático con la triada de fenilalaninas F69, F121 y F199. Esta información permite especular que el benciloxiacetato retarda la formación del compuesto I en el sitio activo y por lo tanto, es un inhibidor reversible de la actividad peroxidasa y peroxigenasa de PaDa-I. Para demostrar experimentalmente esta hipótesis, se debería medir la formación del compuesto I en ausencia y presencia de benciloxiacetato. Es posible hacer esas mediciones en equipos de flujo detenido (*stopped-flow*), una técnica que permite medir las cinéticas de reacciones químicas que ocurren en el orden de

milisegundos. Esta técnica suele usarse para caracterizar la reacción de formación del compuesto I, como se ha demostrado antes para ésta y otras enzimas (Wang, et al. 2012).

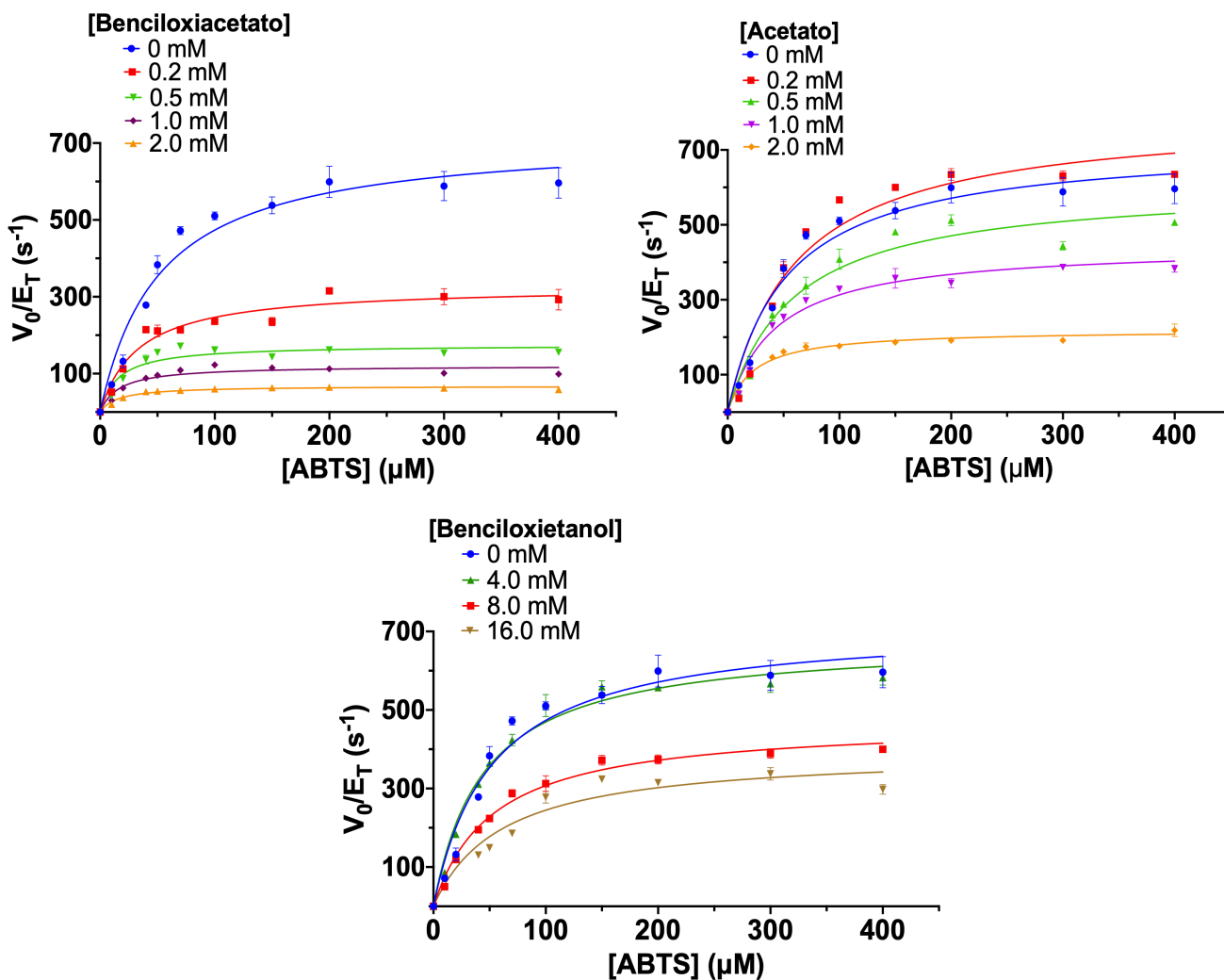


Figura 26. Ajuste de Michaelis-Menten para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxiacetato, acetato y benciloxietanol. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas. En todos los casos  $R^2 > 0.92$ .

## 8. Conclusiones

De los 5 éteres bencílicos estudiados en este trabajo, tres son sustratos, uno se comporta como sustrato suicida y otro es inhibidor.

Los éteres bencílicos son sustratos cuya oxidación catalizada por PaDa-I es poco eficiente por lo que la inactivación y la actividad catalasa compiten con esta reacción, consumiendo enzima y  $H_2O_2$  en reacciones no productivas.

A través de la cuantificación de las reacciones secundarias, fue posible manipular las condiciones de reacción para favorecer la oxidación de los éteres, por ejemplo, utilizando condiciones muy elevadas del sustrato (20-30 mM) y dosificando el  $H_2O_2$  (varias dosis de 0.1-0.2 mM).

De acuerdo con el número de recambio total (*TTN*) la oxidación depende de la polaridad de los sustituyentes de los éteres, lo que confirma la hipótesis de que la identidad química del sustituyente no aromático es un factor relevante para la oxidación de sustrato.

Para los sustratos, la reactividad y acomodo dentro del sitio activo es similar por lo que la ruptura del enlace puede ocurrir en ambas posiciones adyacentes.

## **9. *Perspectivas***

Profundizar en el comportamiento del benciloxiacetato como inhibidor, a través de medir la cinética de formación del intermediario enzimático (compuesto I) en presencia de este compuesto.

Profundizar en el comportamiento del alilbenciléter como sustrato suicida, a través de estudiar la reversibilidad de la inactivación con alilbenciléter e identificar el aducto con el grupo hemo.

Diseñar mutaciones puntuales alrededor del sitio activo que provoquen un retardo en la inactivación (por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de la peroxigenasa inespecífica.

## 10. Referencias

Agency, Environmental Protection. *Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response*. 2009. <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response> (accessed September 3, 2020).

Andersson, Thomas Broo, and Emma Anders Evertsson. "Prediction of drug candidates' sensitivity toward autoxidation: Computational estimation of C-H dissociation energies of carbon-centered radicals." 103, no. 7 (2014): 1949-1955.

Anh, Dau Hung, René Ullrich, Dirk Benndorf, Aleš Svatoš, Alexander Muck, and Martin Hofrichter. "The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation." *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 17 (2017): 5477-5485.

Aranda, Carmen, et al. "Selective synthesis of 4-hydroxyisophorone and 4-ketoisophorone by fungal peroxygenases." *Catalysis Science and Technology* 9, no. 6 (2019): 1398-1405.

Ayala, Marcela, Cesar V. Batista, and Rafael Vazquez-Duhalt. "Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16, no. 1 (2011): 63-68.

Babot, Esteban, José C. D. del Río, Lisbeth Kalum, Angel T. Martínez, and Ana Gutiérrez. "Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*." *Biotechnology and Bioengineering* 110, no. 9 (2013): 2323-2332.

Bommarius, Andreas S., and Mariétou F. Paye. "Stabilizing biocatalysts." *Chemical Society Reviews* 42, no. 15 (2013): 6534-6565.

Carro, Juan, et al. "Modulating fatty acid epoxidation vs hydroxylation in a fungal peroxygenase." *ACS Catalysis* 9, no. 7 (2019): 6234-6242.

Chaudhary, Kamal Kumar, and Nidhi Mishra. "A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery." *JSM Chem* 4, no. 3 (2016): 1-4.

Collinson, S. R., and W. Thielemans. "The catalytic oxidation of biomass to new materials focusing on starch, cellulose and lignin." *Coordination Chemistry Reviews* 254 (2010): 1854-1870.

Cornish-Bowden, A. "A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non competitive inhibitors." *Biochemical Journal* 137, no. 1 (1974): 143-144.

Dachs, Susanne. *Dissertation: Expression, purification and functional characterization of a heme-thiolate peroxygenase of *Aspergillus niger**. University of Natural Resources and Life Sciences, 2016.

Dexter, Annette F., and Lowell P. Hager. "Transient Heme N-Alkylation of Chloroperoxidase by Terminal Alkenes and Alkynes." *Journal of the American Chemical Society* 117, no. 2 (1995): 817-818.

Díaz, Adelaida, Pablo Rangel, Yésika Montes de Oca, Fernando Lledías, and Wilhelm Hansberg. "Molecular and Kinetic Study of Catalase-1, A Durable Large Catalase of *Neurospora crassa*." *Free Radical Biology & Medicine* 31, no. 11 (2001): 1323-1333.

Dixon, M. "The determination of enzyme inhibitor constants." *The Biochemical Journal* 55, no. 1 (1953): 170-171.

*Gaussian 16 Users Reference*. 2018.

González-Benjumea, Alejandro, et al. "Fatty acid epoxidation by *Collariella virescens* peroxygenase and heme-channel variants." *Catalysis Science and Technology* 10, no. 3 (2020): 717-725.

Gröbe, Glenn, et al. "High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*." *AMB Express* 1, no. 1 (2011): 1-11.

Hager, L.P. "A lifetime of playing with enzymes." *The Journal of biological chemistry* 285, no. 20 (2010): 14852-14860.

Hiner, A.N., J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, Smith A.T., M.B. Arnao, and M. Acosta. "A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid." *European Journal of Biochemistry* 234 (1995): 506-512.

Hiner, A.N.P., J.N. Rodriguez-Lopez, M.B. Arnao, E. Lloyd Raven, F. Garcia-Canovas, and M. Acosta. "Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide." *Journal of Biochemistry* 348 (2000): 321-328.

Hofrichter, Martin, et al. "Fungal Peroxygenases: A Phylogenetically Old Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions." In *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, 369-403. UNK: Springer, 2020.

Hofrichter, Martin, Harald Kellner, Marek J. Pecyna, and René Ullrich. *Fungal Unspecific Peroxygenases: Heme-Thiolate Proteins That Combine Peroxidase and Cytochrome P450 Properties*. Vol. 851, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 341-368. UNK: Springer, 2015.

Horst, A. E.W., et al. "Electro-enzymatic hydroxylation of ethylbenzene by the evolved unspecific peroxygenase of *Agrocybe aegerita*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133 (2016): S137-S142.

Jung, Dirk, Carsten Streb, and Martin Hartmann. "Oxidation of indole using chloroperoxidase and glucose oxidase immobilized on SBA-15 as tandem biocatalyst." *Microporous and Mesoporous Materials* 113, no. 1-3 (2008): 523-529.

Karich, Alexander, Katrin Scheibner, René Ullrich, and Martin Hofrichter. "Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 134 (2016): 238-246.

Karich, Alexander, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase." *Applied and Environmental Biotechnology* 75 (2007): 1473-1478.

Karich, Alexander, René Ullrich, Katrin Schneiber, and Martin Hofrichter. "Fungal Unspecific Peroxygenases Oxidize the Majority of Organic EPA Priority Pollutants." *Frontiers in Microbiology* 8 (2017): 1463.

Kiebist, Jan, et al. "A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* Catalyzes the Selective Oxygenation of Testosterone." *ChemBioChem* 18, no. 6 (2017): 563-569.

Kinne, Matthias, Christian Zeisig, René Ullrich, Gernot Kayser, Kenneth E. Hammel, and Martin Hofrichter. "Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, no. 1 (2010): 18-21.

Kinne, Matthias, et al. "Regioselective preparation of 5-hydroxypropranolol and 4'-hydroxydiclofenac with a fungal peroxygenase." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19, no. 11 (2009): 3085-3087.

Kinne, Matthias, Marzena Poraj-Kobielska, Sally A. Ralph, René Ullrich, Martin Hofrichter, and Kenneth E. Hammel. "Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 284, no. 43 (2009): 29343-29349.

Kinne, Matthias, René Ullrich, Kenneth E. Hammel, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Regioselective preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy)propionic acid with a fungal peroxygenase." *Tetrahedron Letters* 49, no. 41 (2008): 5950-5953.

Kluge, Martin G., René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase." *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, no. 6 (2007): 1473-1478.

La Rotta Hernandez, Camilo E., Stephan Lütz, Andreas Liese, and Elba P.S. Bon. "Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking." *Enzyme and Microbial Technology* 37, no. 6 (2005): 582-588.

Laurynėnas, Audrius, Marius Butkevičius, Marius Dagys, Sergey Shleev, and Juozas Kulys. "Consecutive Marcus Electron and Proton Transfer in Heme Peroxidase Compound II-Catalysed Oxidation Revealed by Arrhenius Plots." *Nature Scientific Reports* 9, no. 1 (2019): 1-11.



Linde, Dolores, et al. "Two New Unspecific Peroxygenases from Heterologous Expression of Fungal Genes in Escherichia coli." *Applied and Environmental Microbiology* 86, no. 7 (2020): 1-16.

Luo, Yan R. *Comprehensive handbook of Chemical Bond Energies*. CRC Press, 2007.

Manoj, Kelath Murali, and Lowell P. Hager. "Chloroperoxidase, a janus enzyme." *Biochemistry* 47, no. 9 (2008): 2997-3003.

Manoj, Kelath Murali, and Lowell P. Hager. "Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1547, no. 2 (2001): 408-417.

Molina-Espeja, Patricia, Eva Garcia-Ruiz, David Gonzalez-Perez, René Ullrich, Martin Hofrichter, and Miguel Alcalde. "Directed evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agroclybe aegerita*." *Applied and Environmental Microbiology* 80, no. 11 (2014): 3496–3507.

Montes-Grajales, D., M. Fennix-Agudelo, and W. Miranda-Castro. "Ocurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review." *Science of the Total Environment* 595 (2017): 601-614.

Ni, Yan, et al. "Peroxygenase-Catalyzed Oxyfunctionalization Reactions Promoted by the Complete Oxidation of Methanol." *Angewandte Chemie - International Edition* 55, no. 2 (2016): 798-801.

Pecyna, Marek J., et al. "Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agroclybe aegerita*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, no. 5 (2009): 885-897.

Peter, Sebastian. *Dissertation: Oxyfunctionalization of alkanes, alkenes and alkynes by unspecific peroxygenase (EC 1.11.2.1)*. Edited by International Graduate School of Zittau and the Faculty of Science of the TU Dresden. 2013.

Piontek, Klaus, et al. "Structural Basis of Substrate Conversion in a New Aromatic Peroxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 48 (2013): 34767-34776.

Polizzi, Karen M., Andreas S. Bommarius, James M. Broering, and Javier F. Chaparro-Riggers. "Stability of biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology* 11, no. 2 (2007): 220-225.

Poraj Kobielska, Marzena, Mathias Kinne, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "An spectrophotometrical assay for the detection of fungal peroxygenases." *Analytical Biochemistry* 421, no. 1 (2012).

Poraj-Kobielska, Marzena, et al. "Preparation of human drug metabolites using fungal peroxygenases." *Biochemical Pharmacology* 82, no. 7 (2011): 789-796.

Poraj-Kobielska, Marzena, Mathias Kinne, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "A spectrophotometrical assay for the detection of fungal peroxygenases." *Analytical Biochemistry* 421, no. 1 (2012): 327-329.

Ramirez-Escudero, Mercedes, Patricia Molina-Espeja, Patricia Gomez De Santos, Martin Hofrichter, Julia Sanz-Aparicio, and Miguel Alcalde. "Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase." *ACS Chemical Biology* 13, no. 12 (2018): 3259–3268.

Ramirez-Ramirez, Joaquin, Javier Martin-Diaz, Nina Pastor, Miguel Alcalde, and Marcela Ayala. "Exploring the Role of Phenylalanine Residues in Modulating the Flexibility and Topography of the Active Site in the Peroxygenase Variant PaDa-I." *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 5734 (2020): 1-15.

Shaw, Paul D., and Lowell P. Hager. "An Enzymatic Chlorination Reaction." *Journal of the American Chemical Society* 81, no. 4 (1959): 1011-1012.

Shevelkova, Angelina N., and Alexander D. Ryabov. "Irreversible Inactivation of *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase by Hydrogen Peroxide. A Kinetic Study in Chloride and Bromide Systems." *Biochemistry and Molecular Biology International* 39, no. 4 (1996): 665-670.

Sun, Weimei, T A Kadima, and Brian Dunford. "Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity." *Biochemistry and Cell Biology* 72, no. 7-8 (1994): 321-331.

Trott, O., and A. J. Olson. "Autodock vina: Improving the speed and accuracy of docking." *Journal of Computational Chemistry* 31 (2019): 455-461.

Tumanov, V.E., E.A. Kromkin, and E.T. Denisov. "Estimation of dissociation energies of C — H bonds in oxygen containing compounds from kinetic data for radical abstraction reactions." *Russian Chemical Bulletin* 51, no. 9 (2002): 1641-1650.

Ullrich, René, et al. "Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxygenase." *Journal of Inorganic Biochemistry* 183 (March 2018): 84-93.

Ullrich, René, Jörg Nüske, Katrin Scheibner, Jörg Spantzel, and Martin Hofrichter. "Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes." *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 8 (2004): 4575-4581.

Valderrama, Brenda, Marcela Ayala, and Rafael Vazquez-Duhalt. "Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes." *Chemistry & Biology* 9, no. 5 (2002): 555-565.

Villegas, Jose A., A. Grant Mauk, and Rafael Vazquez-Duhalt. "A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide." *Chemistry and Biology* 7, no. 4 (2000): 237-244.

Wang, Xiaoshi, Sebastian Peter, Mathias Kinne, Martin Hofrichter, and John T. Groves. "Detection and Kinetic Characterization of a Highly Reactive Heme–Thiolate Peroxygenase Compound I." *Journal of American Chemical Society* 134, no. 21 (2012): 12897–12900.

Weber, R., A. Watson, M. Forter, and F. Oliaei. "Persistent organic pollutants and landfills- A review of past experiences and future challenges." *Waste Management and Research* 29 (2011): 107-121.

White, G F, N J Russell, and E C Tidswell. "Bacterial scission of ether bonds." *Microbiological reviews* 60, no. 1 (1996): 216-232.

White, G. F., N. J. Russel, and E. C. Tidswell. "Bacterial scission of ether bonds." *Microbiology Reviews* 60 (1996): 216-232.

Zhang, Wuyuan, et al. "Selective aerobic oxidation using a combination of phtotocatalytic water oxidation and enzymatic oxyfunctionalisations." *Nature Catalysis* 1, no. 1 (2018): 55-62.

## 11. Anexos

### Anexo I

Tabla 11. Purificación de PaDa-I

	V (mL)	Actividad volumétrica (U <sub>ABTS</sub> /mL)	Proteína total (µg/mL)	Actividad específica (U <sub>ABTS</sub> /mg)	U <sub>ABTS</sub> totales	Factor de purificación
Extracto crudo	890	3.81 ± 0.12	113.53 ± 10.17	33.59	3390.9	-
Precipitación y diálisis	44	83.13 ± 4.35	893.12 ± 8.08	92.93	3671.8	2.8
Cromatografía de intercambio catiónico	10.5	227.25 ± 9.97	375.34 ± 34.10	605.45	2386.1 3	18.0
Cromatografía de intercambio aniónico	1.6	1195.04 ± 5.64	1192.33 ± 104.38	1002.2 7	1912.0 4	29.8

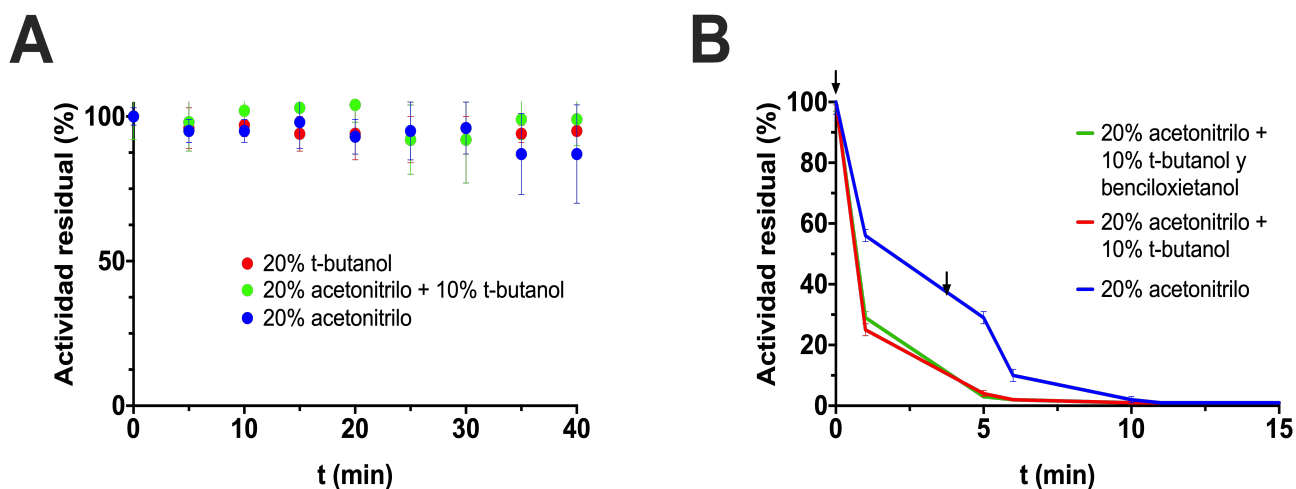


Figura 27. A) Estabilidad de PaDa-I en acetonitrilo y t-butanol. B) Efecto de t-butanol sobre la inactivación durante la oxidación de benziloxietanol (0.2 mM) con adiciones de 1.0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> marcadas por flechas. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

## Anexo II

Cinética de la actividad catalasa.

Tabla 12. Parámetros cinéticos aparentes para la actividad catalasa de PaDa-I. Los valores referencia se describen para *AaeUPO*.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.

Parámetros cinéticos aparentes	Karich, A. <i>et al.</i> (2016)	[Benciloxietanol]		
		0 mM	2 mM	4 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$790 \pm 120$	$757 \pm 84$	$1111 \pm 341$	$2498 \pm 331$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	127	$388 \pm 12$	$252 \pm 10$	$231 \pm 13$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$1.6 \times 10^5$	$5.1 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$

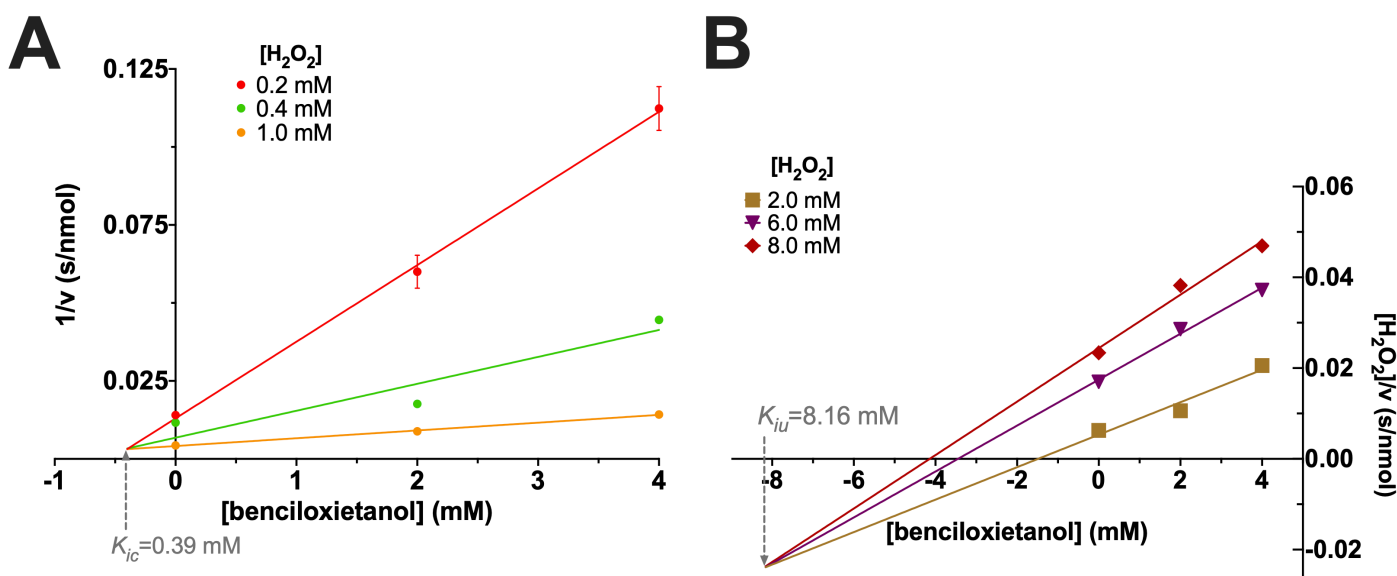


Figura 28. A) Ajuste gráfico de Dixon para inhibición competitiva. B) Ajuste gráfico de Cornish-Bowden para inhibición acompetitiva.  $K_{ic}$ - Constante de inhibición competitiva.  $K_{iu}$ - Constante de inhibición acompetitiva. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

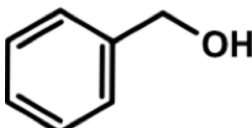
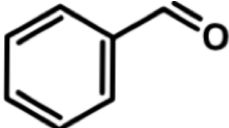
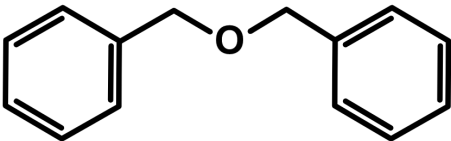
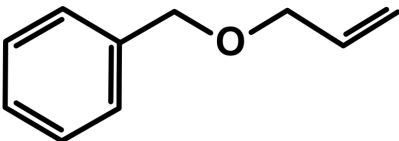
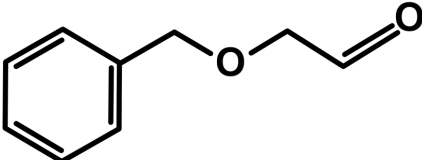
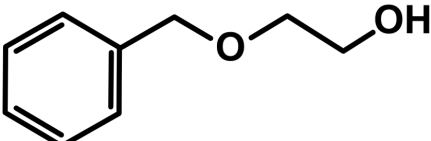
### **Anexo III**

**Tabla 13. Residuos involucrados en las interacciones éter bencílico-túnel de PaDa-I.**

<b>Éter bencílico</b>	<b>Residuos del túnel</b>
alilbenciléter	F69, A77, T120, F121, F188, R189, E196, T192, F199.
benciloxiacetaldehído	F69, Q72, A73, F76, A77, F191, T192, G195, F199, S240.
ácido benciloxiacético	F69, A73, A77, F191, T192, G195, F199, S240, V244, F274.
benciloxiacetato	F69, A73, A77, F191, T192, E196, F199, S240.
benciloxietanol	A77, F121, R189, T192, A193, E196, F199.
dibenciléter	F69, A73, F76, A77, F191, T192, G195, F199, S240, V244, F274.

## Anexo IV

Análisis cualitativo de la identificación de productos por espectrometría de masas.

	Alcohol bencílico $t_R=4.4$ min 	Benzaldehído $t_R=5.1$ min 
Dibenciléter 	Presente	Presente
Alilbenciléter 	Presente	Presente
Benciloxiacetaldehído 	Presente	Presente
Benciloxietanol 	Presente	Presente

## Anexo V

Parámetros cinéticos de la oxidación de NBD.

Tabla 14. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de benciloxiacetato.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.

Parámetros cinéticos aparentes	Molina-Espeja, <i>et al.</i> (2014)	[Benciloxiacetato]			
		0 mM	0.2 mM	2.0 mM	4.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	483 $\pm$ 95	481 $\pm$ 54	602 $\pm$ 54	1013 $\pm$ 80	1265 $\pm$ 67
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	338 $\pm$ 22	217 $\pm$ 8	212 $\pm$ 7	225 $\pm$ 8	218 $\pm$ 5
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	7.0x10 <sup>5</sup>	4.5x10 <sup>5</sup>	3.5x10 <sup>5</sup>	2.2x10 <sup>5</sup>	1.7x10 <sup>5</sup>

Tabla 15. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de benciloxietanol.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica..

Parámetros cinéticos aparentes	[Benciloxietanol]		
	0.2 mM	4.0 mM	8.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	413 $\pm$ 40	786 $\pm$ 48	959 $\pm$ 80
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	197 $\pm$ 6	208 $\pm$ 5	212 $\pm$ 7
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	4.8x10 <sup>5</sup>	2.6x10 <sup>5</sup>	2.2x10 <sup>5</sup>



Tabla 16. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de NBD en presencia de acetato.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.

Parámetros cinéticos aparentes	[Acetato]			
	0.2 mM	2.0 mM	20.0 mM	50.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$538 \pm 48$	$513 \pm 51$	$630 \pm 51$	$470 \pm 40$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$252 \pm 7$	$253 \pm 9$	$231 \pm 6$	$213 \pm 6$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$4.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^8$

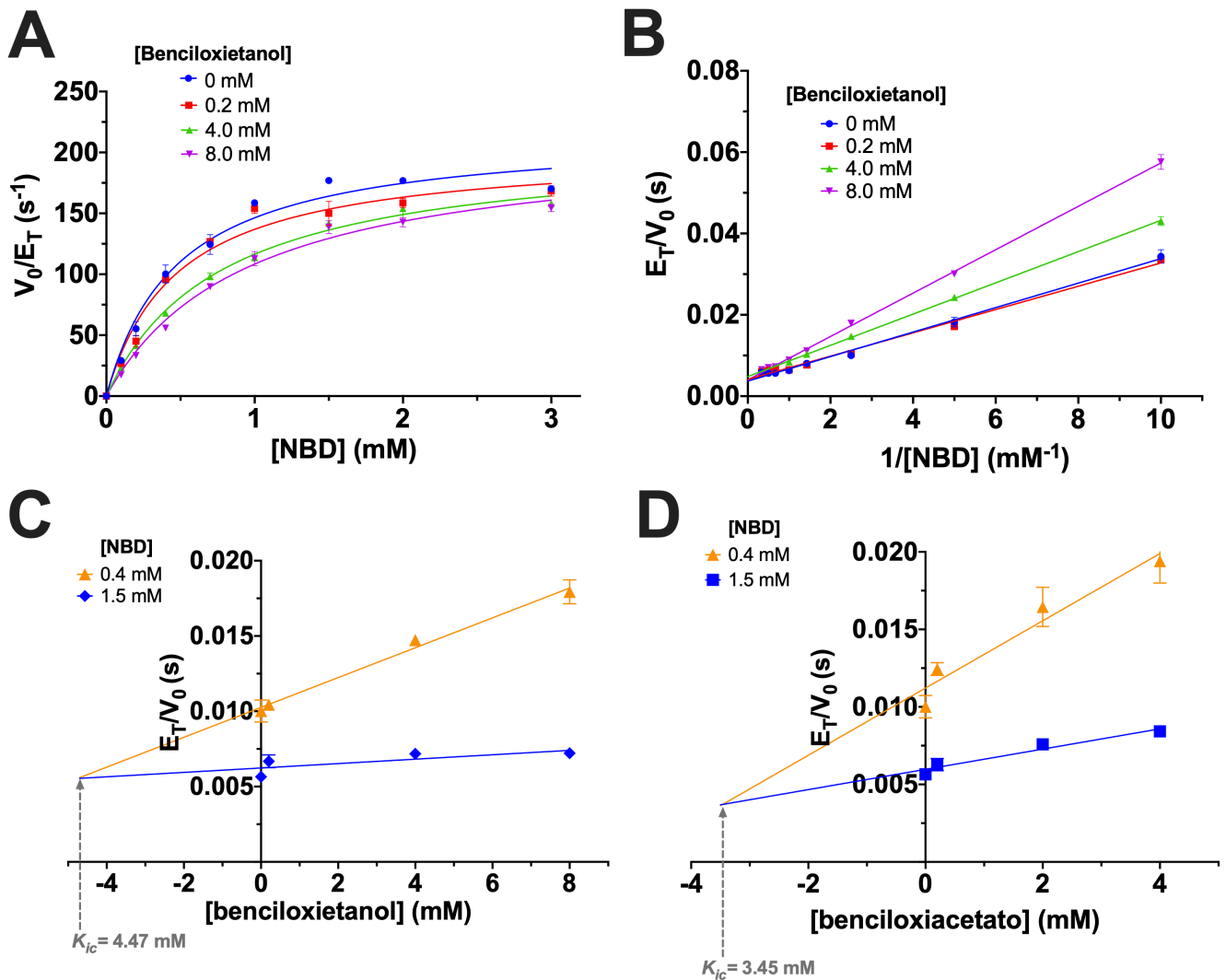


Figura 29. A) Ajuste de Michaelis-Menten para benziloxietanol. B) Ajuste de doble recíproco para benziloxietanol. C) Gráfico de Dixon para benziloxietanol. D) Gráfico de Dixon para benziloxiacetato.  $R^2 > 0.95$  para todos los casos.  $K_{ic}$ - Constante de inhibición competitiva. Los datos mostrados son el promedio de al menos 3 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas.

## Anexo VI

Parámetros cinéticos de la oxidación de ABTS.

Tabla 17. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxiacetato.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.

Parámetros cinéticos aparentes	Molina-Espeja, <i>et al.</i> (2014)	[Benciloxiacetato]				
		0 mM	0.2 mM	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$48 \pm 4$	$52 \pm 6$	$33 \pm 4$	$16 \pm 3$	$16 \pm 3$	$15 \pm 2$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$395 \pm 13$	$718 \pm 26$	$328 \pm 10$	$175 \pm 6$	$121 \pm 4$	$68 \pm 1$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$8.3 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$	$9.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$

Tabla 18. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de acetato.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.


Parámetros cinéticos aparentes	[Acetato]			
	0.2 mM	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$60 \pm 8$	$58 \pm 8$	$42 \pm 4$	$23 \pm 2$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$796 \pm 34$	$608 \pm 27$	$446 \pm 13$	$220 \pm 4$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$1.3 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$9.6 \times 10^6$

Tabla 19. Parámetros cinéticos aparentes para la oxidación de ABTS en presencia de benciloxietanol.  $K_m$ - Constante de Michaelis-Menten.  $k_{cat}$ - Número de recambio.  $k_{cat}/K_m$ - eficiencia catalítica.

[Benciloxietanol]			
Parámetros cinéticos aparentes	4.0 mM	8.0 mM	16.0 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$45 \pm 3$	$53 \pm 3$	$61 \pm 9$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$679 \pm 15$	$470 \pm 10$	$394 \pm 18$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$1.5 \times 10^7$	$8.9 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$


## Anexo VII

Parte de este trabajo se presentó como póster y mini presentación oral en el VI Latin American Protein Society Meeting. Octubre, 2019.



**VI Latin American Protein Society Meeting**

**17**



### Benzyl ethers as substrates for a recombinant unspecific peroxygenase (UPO): focus on reaction conditions for driving catalytic pathways

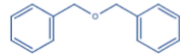
Raúl Mireles<sup>a</sup> & Marcela Ayala<sup>b</sup>. Instituto de Biotecnología, UNAM. 62210 Cuernavaca, México.  
Master's student. <sup>a</sup>raul.mireles@mail.ibt.unam.mx <sup>b</sup>maa@ibt.unam.mx

#### Introduction

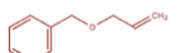
Unspecific peroxygenases (UPO) are a novel family of fungal heme-thiolate oxidoreductases discovered in the past few years. They are now considered as *dream catalysts* due to the wide range of oxidation reactions they can catalyze on more than 300 organic substrates including ether bond cleavage.<sup>1</sup> These enzymes typically work with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as co-substrate but two competitive side reactions other than organic substrate oxidation have been described specially with ether substrates: peroxide dismutation in a *catalase-like* activity and peroxide-dependent enzyme inactivation.<sup>2,3</sup> In this work, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosage was optimized for the oxidation of benzyl ethers in order to avoid side reactions and maximize substrate conversion.

#### Experimental strategy

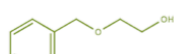
- Enzyme was heterologously expressed in *S. cerevisiae* and purified to homogeneity (98%) as described by Molina-Espeja *et al.*
- Substrate conversion was monitored through RP-HPLC. Benzyl ether substrates used in this study were:



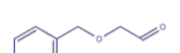
dibenzyl ether



allyl benzyl ether



2-(benzyloxy)ethanol



benzyloxy acetaldehyde

- Residual activity was measured during ether oxidation with an standard ABTS spectrophotometrical assay.
- GC-MS was used for product identification.

#### Conclusions

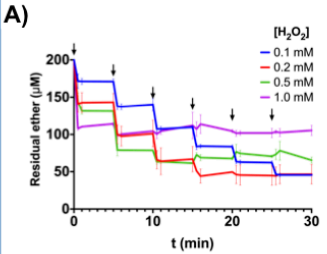
- Substrate conversion can be maximized at low [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] dosis.
- Enzyme inactivation is slowed down if peroxide is added in low concentration dosis vs. one addition at higher concentration.
- UPO catalyzes ether bond cleavage of studied aromatic ethers.

#### References

- Hofrichter, M. *et al. Adv. Exp. Med. Biol.* **851**, 341–368 (2015)
- Kinne, M. *et al. J. Biol. Chem.* **284**, 29343–29349 (2009)
- Karich, A. *et al. J. Mol. Catal. B Enzym.* **134**, 238–246 (2016)
- Molina-Espeja, P. *et al. Appl Environ. Microb.* **80**, 3496–3507 (2014)
- Peter S. *et al. Enzyme Microb. Technol.* **52**, 370–376 (2013)

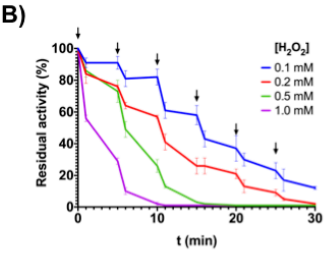
#### Results

**A)**



Residual ether (µM) vs t (min). [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] concentrations: 0.1 mM (blue), 0.2 mM (red), 0.5 mM (green), 1.0 mM (purple). Arrows indicate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions.

**B)**

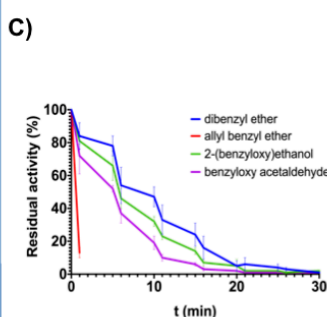


Residual activity (%) vs t (min). [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] concentrations: 0.1 mM (blue), 0.2 mM (red), 0.5 mM (green), 1.0 mM (purple). Arrows indicate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions.

A) 2-(benzyloxy)ethanol conversion requires multiple H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions (marked with arrows) due to catalase activity of UPO. A lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration favours substrate conversion.

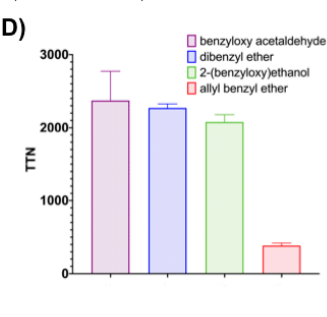
B) During 2-(benzyloxy)ethanol oxidation, the enzyme gradually inactivates. Inactivation rate depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in each dose (marked with arrows).

**C)**



Residual activity (%) vs t (min). Substrates: dibenzyl ether (blue), allyl benzyl ether (red), 2-(benzyloxy)ethanol (green), benzyloxy acetaldehyde (purple).

**D)**




TTN for substrates: benzyloxy acetaldehyde (purple), dibenzyl ether (blue), 2-(benzyloxy)ethanol (green), allyl benzyl ether (red).

C) Enzyme inactivation rate depends on the ether substrate. Allyl benzyl ether could be a suicide substrate as reported for other allyl substrates.<sup>5</sup>


D) Total turnover number (TTN) was calculated as the ratio of the total amount of converted substrate and the amount of enzyme added to the reaction.

#### Oxidation pathway...




2-(benzyloxy) ethanol

→

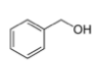


benzaldehyde

→

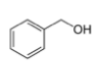


benzoic acid



benzyl alcohol

↪



benzyl alcohol

#### Acknowledgements

Authors thank Dr. Miguel Alcalde (CSIC, Spain) for providing molecular tools for enzyme expression, Rosa Román (IBT, UNAM) for technical support and UNAM-PAPIIT (ID: IN214619) for financial support. We also thank CONACYT for scholarship provided during master's studies (ID: 925281) and Latin American Protein Society for support on presenting this work.

## **Anexo VIII**

*NOTA: Este manuscrito será sometido para su publicación en una revista del área. No representa la versión final del documento.*

### **Ether oxidation by a fungal versatile peroxygenase: insights into substrate recognition and reactivity**

Raul Mireles<sup>a</sup>, Joaquin Ramirez-Ramirez<sup>a</sup>, Miguel Alcalde<sup>b</sup>, Marcela Ayala<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>b</sup>Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC, 28049 Madrid, Spain.

\*Correspondence to: Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. *e-mail: maa@ibt.unam.mx*

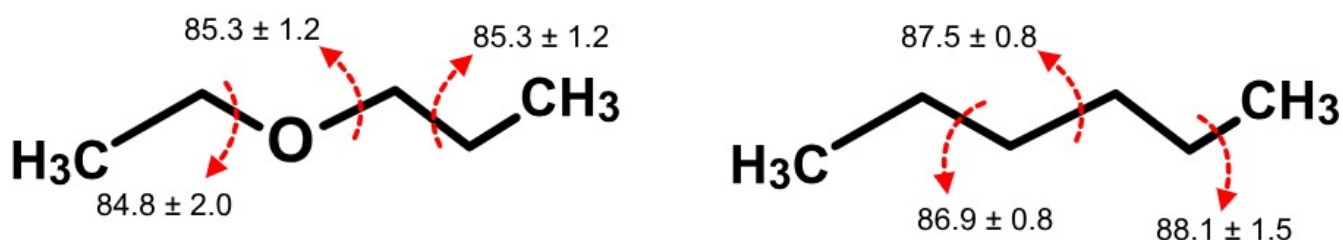
#### **Abstract**

Ethers can be found in the environment as structural, active or even pollutant molecules although their degradation is not efficient under environmental conditions. A fungal unspecific peroxygenase (UPO) was recently reported to degrade these molecules through an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidative cleavage mechanism. Here, we report the oxidation of a series of structurally related aromatic ethers, catalyzed by a laboratory-evolved UPO (PaDa-I) in order to elucidate molecular factors that could modulate the enzymatic reaction. Although some of the studied ethers were substrates of the enzyme, they are not efficiently transformed and as a consequence, secondary reactions (such as dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through catalase-like activity and suicide enzyme inactivation) become significant, affecting the oxidation efficiency. In this work, we quantified the various reactions that compete during UPO-catalyzed

ether oxidation, and propose reaction conditions that favor ether oxidation over the secondary reactions.

## Introduction

Ethers functional groups are commonly found in nature as metabolites, structural polymers, oil-derivatives or bioplastics, among others. They also can be found as active molecules in many man-made products like agrochemicals, cosmetics, detergents or drugs (White, Russel and Tidswell 1996, Collinson and Thielemans 2010). Many of these molecules have been reported to be present in water and soil as a consequence of an inappropriate handling during their life cycle (Weber, et al. 2011, Montes-Grajales, Fennix-Agudelo and Miranda-Castro 2017). Some of them can be identified as pollutants due to their characteristic capability to remain chemically intact and still active in environmental conditions (Agency 2009). This recalcitrance is mainly due to the high stability of the ether bond. For instance, energy needed for C-O bond dissociation in ethyl propyl ether is similar to that required for a C-C cleavage in the same molecule (Luo 2007) or the equivalent hydrocarbon molecule, n-hexane (Figure 1).



**Figure 1. Bond dissociation energies for ethyl propyl ether (left) and n-hexane (right). Values are shown in kcal/mol as reported in reference 6.**

Although ethers are widely spread in the environment, their degradation is not a very common reaction in living beings. In recent years, the description of a fungal heme-thiolate peroxidase has uncovered a whole family of enzymes that is known for catalyzing the oxidation of over 350 organic molecules (Hofrichter, Kellner and Herzog, et al. 2020). The unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*

(wtAaeUPO) shows preference for hydrophobic, aromatic substrates (Kluge, et al. 2007). This enzyme catalyzes the degradation of ether molecules via an indirect ether bond cleavage. In this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent mechanism, an oxygen atom is inserted to the adjacent carbon to the oxygen atom in the ether functional group; the product (an hemiacetal) is chemically unstable and leads to spontaneous ether bond breakage to generate an alcohol and an aldehyde (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009).

Evidence regarding hydrophobic aliphatic (both linear and cyclic) ether oxidation has been reported previously (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009, Karich, Ullrich and Scheibner, et al. 2007, M. Poraj-Kobielska, M. Kinne, et al. 2011, Karich, Ullrich and Schneiber, et al. 2017) but data describing the effect of substrate structure during its oxidation (and side-reactions) is lacking. In this work, a series of aromatic ethers was selected in order to dissect the consequences of substituents with different polarity during oxidation by a laboratory-evolved version of wtAaeUPO, PaDa-I.

## **Materials and methods**

### *Chemicals & reagents*

Benzyl ethers, 5-nitro-1.3-benzodioxole (NBD), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and phosphoric acid (PA) were purchased from Sigma. Acetonitrile for HPLC analysis and reagents for buffer solutions were obtained from JT Baker. Enzyme was heterologously expressed and purified (Ramirez-Ramirez, et al. 2020) to >95% of electrophoretic homogeneity and a Reinheitszahl value ( $Rz=A_{407\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) of 2.1. Culture media reagents were purchased from Difco.

### *Enzyme reactions*

Ether oxidation was monitored by liquid chromatography, using a reverse phase Phenomenex® Luna C18 column (150 mm × 3 mm, 5 μm particle size) in an Agilent 1220 Infinity HPLC (Santa Clara, CA, USA) coupled to a UV-Vis detector, set to 210 nm. Analysis was performed using the following acetonitrile-water (ACN/H<sub>2</sub>O)



gradient in %v/v: ACN:H<sub>2</sub>O 10:90 for 5 min, a 9 min-gradient to reach ACN:H<sub>2</sub>O 100:0, maintaining 4 min at 100:0. The retention times ( $t_R$ ) were 12.8 min for 2-(benzyloxy)ethanol, 17.4 min for allylbenzylether, 18.2 min for benzyloxyacetaldehyde and 18.5 min for dibenzylether. Mobile phase for benzyloxyacetate was a 10 min ACN/PA gradient set from 20:80 to 80:20. Column flow was 0.4 mL/min and the temperature was set to 30 °C.

The ether oxidation reaction mixture was composed of 0.2-40 mM substrate and 50 nM PaDa-I in a 50 mM potassium phosphate buffer solution pH 7.0 containing 20% v/v acetonitrile, in a total volume of 1 mL. Reactions were initiated by adding 0.1-1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added when the reaction (according to substrate consumption) halted. Aliquots (10-50  $\mu$ L) were taken after every H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition in order to measure residual enzyme activity. Thus, enzyme inactivation was estimated as the residual peroxidase activity in a reaction mixture containing 0.4 mM ABTS in 100 mM sodium phosphate/citrate buffer pH 4.4 and 2.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Residual activity was assayed in a 1.0 mL-quartz cuvette. ABTS oxidation was followed spectrophotometrically ( $\epsilon_{418}=36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) (Molina-Espeja, et al. 2014) in an Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Santa Clara, CA, USA).

Product identification was carried out using an HP 6890 gas chromatographer (Hewlett-Packard, Co., USA) coupled to a 5973 inert mass selective detector (Agilent Technologies, Inc., USA) using a fused silica HP-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter; 0.25  $\mu$ m film thickness). The oven was set to 70 °C (2 min) and then a linear gradient (5 min) was programmed up to 230 °C, where temperature was kept constant for 3 more minutes.

### *Enzyme kinetics*

Catalase activity, determined as oxygen production in the reaction, was measured with a Clark-type electrode calibrated with nitrogen/air and coupled to an oxygraph (Hansatech Instruments Ltd., UK). Reactions (500  $\mu$ L) were started with the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a 50 mM potassium phosphate buffer solution pH 7.0 containing 24-98 nM

PaDa-I and ether substrate when indicated. This instrument was previously calibrated with de-oxygenated MiliQ water, to which N<sub>2</sub> was bubbled for 10 minutes. Assay solutions were also bubbled with N<sub>2</sub>.

NBD oxidation rate was estimated using a colorimetric assay that follows the production of 4-nitrocatechol ( $\epsilon_{425}=9\ 700\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) (M. Poraj-Kobielska, M. Kinne, et al. 2012) in an Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Santa Clara, CA, USA). Reactions (1 mL) were initiated by the addition of 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a 50 mM potassium phosphate buffer solution pH 7.0 containing 5-50 nM PaDa-I, acetonitrile (20% v/v) and the ether substrate/inhibitor, as indicated.

Kinetic data was fitted to the Michaelis–Menten equation, or the corresponding kinetic model (Dixon 1953, Cornish-Bowden 1974) when inhibition was present. Kinetic constants were calculated from a non-linear regression using PRISM 8.2.1 (GraphPad Software, USA).

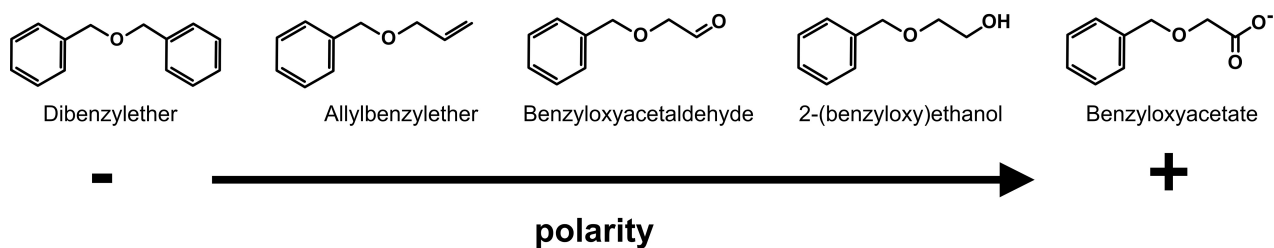
All experimental determinations in this work are the result of at least three independent experiments carried out at room temperature.

### *Molecular docking*

The PaDa-I crystallographic structure model (PDB ID: 5OXU) was used to run a 50 ns molecular dynamics simulation as previously described (Ramirez-Ramirez, et al. 2020). A total of 243 frames were extracted from the last 20 ns of the simulation, to obtain different conformations of the enzyme for the molecular docking with the substrates. The structures of the substrates were built in GaussView 6.0.16, optimized in Gaussian 16 (Gaussian, Inc., USA) through a quantum mechanics algorithm (level of theory DFT B3LYP/6-311++G\*\*) and prepared in Autodock Tools 1.5.6 enabling bond rotation. Enzyme-substrate flexible docking was performed using Autodock Vina 1.1.2 software (Trott and Olson 2019) and the search was set to be performed through the complete heme-access channel ( $x=45.318$ ,  $y=-33.470$ ,  $z=-17.149$ ; grid:12x30x14). The number of binding modes was set to 10 and graphics results were obtained in PyMol 2.3 (Schrödinger, Inc., USA).

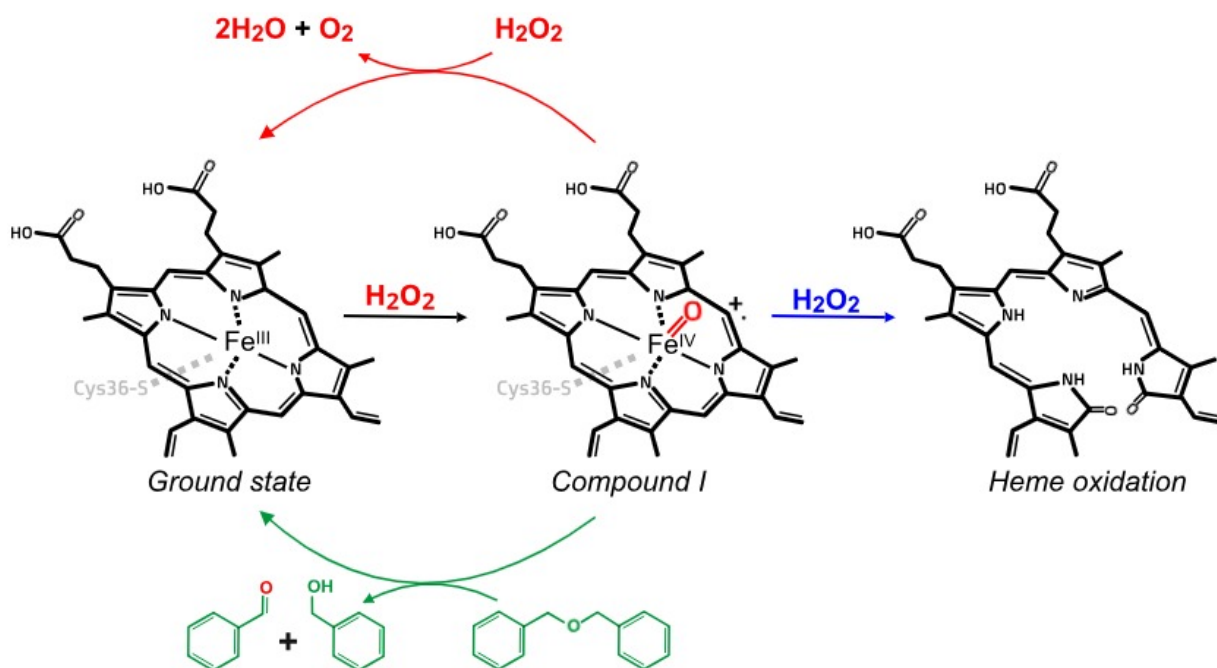
## Results and discussion

In order to study the molecular factors modulating the oxidation of aromatic ethers catalyzed by PaDa-I, a series of five compounds was selected, as shown in Figure 2. Four of the five studied compounds were substrates for the enzyme; no reaction could be detected with benzyloxyacetate. Benzaldehyde and benzyl alcohol were identified as products of the enzyme-catalyzed reaction, confirming that ether bond cleavage occurred (data not shown).



**Figure 2. Selected benzyl ethers for this study, bearing substituents with different polarity.**

Kinetic constants for ether oxidation could not be obtained, as the initial reaction rate could not be accurately measured because the reaction halted a few seconds after it started. Although the enzyme concentration was varied, it resulted impossible to obtain several points in order to accurately measure the initial rate of oxidation. This behavior has been noticed by others (Kinne, Poraj-Kobielska and Ralph, et al. 2009) and we hypothesized it is related to side events occurring in the reaction mixture, mainly peroxide dismutation and *suicide* inactivation of PaDa-I (Figure 3). In order to dissect these events, oxygen production (catalase activity) and residual activity (enzyme inactivation) was monitored, concomitantly with ether oxidation.



**Figure 3. Different reactions occurring during PaDa-I-catalyzed oxidation of ethers. Suicide inactivation (blue) and catalase activity (red) are present during ether oxidation (green).**

Using 2-(benzyloxy)ethanol as model, we observed that enzyme inactivation occurred along the reaction of ether oxidation. Moreover, both reactions halted and were only reinitiated if  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added (Figure 4A and 4B). Following the assumption that enzyme was quickly inactivated due to an excess of hydrogen peroxide, we evaluated the effect of dosing the  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the reaction, and also the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration of the doses, on enzyme inactivation and substrate conversion. As expected, as the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  doses decreased, the ether consumption increased and enzyme inactivation was slowed down. However, eventually the enzyme became completely inactivated. Thus, efficiency of ether oxidation was measured as the total turnover number (TTN), the moles of substrate that is converted per mol of enzyme, until enzyme is completely inactive. TTN for 2-(benzyloxy)ethanol oxidation could be increased by adding  $\text{H}_2\text{O}_2$  in small doses (0.1-0.2 mM) (Figure 4C). The benefits of controlling  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in terms of increasing the half-life time of the enzyme in the reaction mixture has been reported before for heme-peroxidases (Aranda, et al. 2019). Moreover, suicide inactivation in

other heme-proteins is known to occur combining one or more molecular events such as heme degradation, the oxidation of aminoacid residues, crosslinking, etc (Valderrama, Ayala and Vazquez-Duhalt 2002). Although the information for enzymes belonging to the UPO family is still scarce, it has been reported that for CPO and wtAaeUPO the main inactivating event is heme bleaching (Karich, Scheibner, et al. 2016, Ayala, Batista and Vazquez-Duhalt 2011).

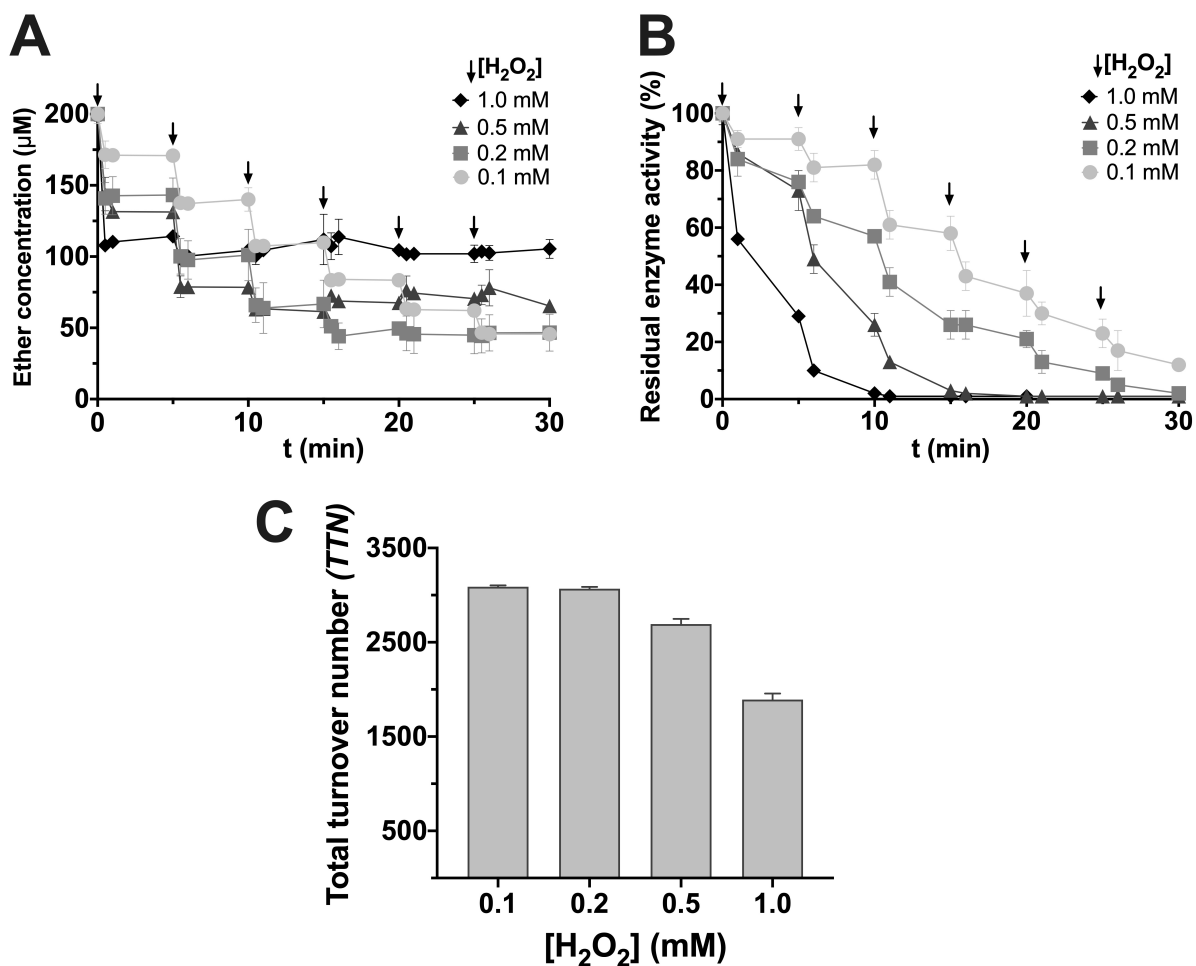


Figure 4. A) 2-(benzyloxy)ethanol consumption. B) Enzyme inactivation in the presence of 0.2 mM substrate and different additions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Arrows indicate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions to the reaction mixture. C) Total turnover number (TTN) for the oxidation of 2-(benzyloxy)ethanol, at different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosage (initial concentration of substrate, 0.2 mM).

On the other hand, it is known that some heme-peroxidases show catalase activity in the presence of hydrogen peroxide. As some others UPO family members, PaDa-I showed a marginal catalase activity with a turnover ratio of  $388 \pm 12 \text{ s}^{-1}$  and  $K_m$  value of  $0.757 \pm 0.084 \text{ mM}$  which is consistent with the values reported for wtAaeUPO (Karich, Scheibner, et al. 2016). In order to quantify the competition between the  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutation and ether oxidation reactions, the apparent kinetic constants for the catalase activity were determined in the presence of 2-(benzyloxy)ethanol, as shown in Table 1.

**Table 1. Apparent kinetic constants estimated for catalase activity of PaDa-I in presence of 2-(benzyloxy)ethanol, determined by oxygen production in the reaction.**

Kinetic constants	[2-(benzyloxy)ethanol]		
	0 mM	2 mM	4 mM
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$757 \pm 84$	$1111 \pm 341$	$2498 \pm 331$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$388 \pm 12$	$252 \pm 10$	$231 \pm 13$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$5.1 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$

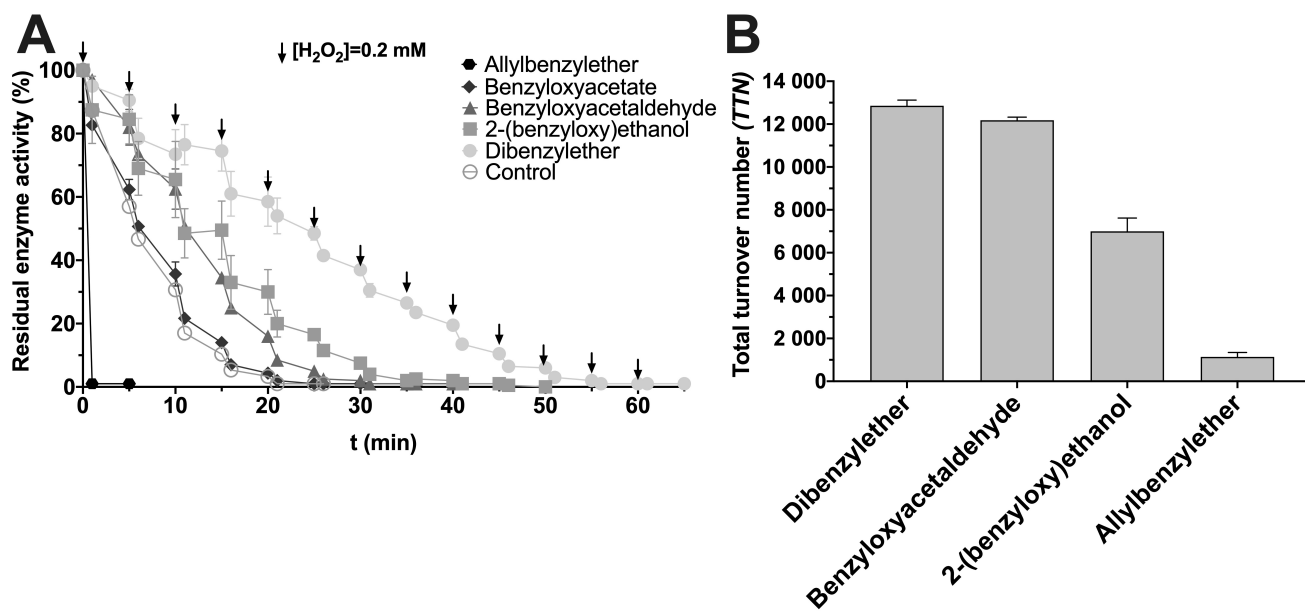
In the presence of the selected ether, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutation rate decreases, reflecting the competition for enzyme intermediates. In fact, upon analysis of the apparent kinetic constants our data suggest that this ether acts as a linear mixed inhibitor of  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutation, with a  $K_{ic}$  and  $K_{iu}$  of 0.39 and 8.16 mM, respectively (Equation 1). Thus, it is very likely that catalase activity competes with organic substrate oxidation particularly if the latter are not efficiently oxidized by the enzyme (i.e. display high  $K_m$ ).

$$v_{O_2} = \frac{k_{cat} [E_0] [H_2O_2]}{K_m \left(1 + \frac{[(benzyloxy)ethanol]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[(benzyloxy)ethanol]}{K_{iu}}\right) [H_2O_2]}$$

**Equation 1. Kinetic approach to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutation inhibition by 2-(benzyloxy)ethanol.  $v_{O_2}$ - O<sub>2</sub> production rate.  $k_{cat}$ - turnover number.  $[E_0]$ - total enzyme concentration.  $K_m$ - Michaelis-Menten constant.  $K_{ic}$ - competitive inhibition constant.  $K_{iu}$ - uncompetitive inhibition constant.**

Residual enzyme activity was monitored for all of the studied ethers (Figure 5A). We observed that enzyme inactivation was reduced for more hydrophobic substrates, which could reflect the affinity of the enzyme for non-polar compounds (Ramirez-Ramirez, et al. 2020). TTN was determined for the ethers and it could be observed that, accordingly with the observations for the inactivation profile, the more hydrophobic substrate (dibenzylether) was the most efficiently converted (Figure 5B).

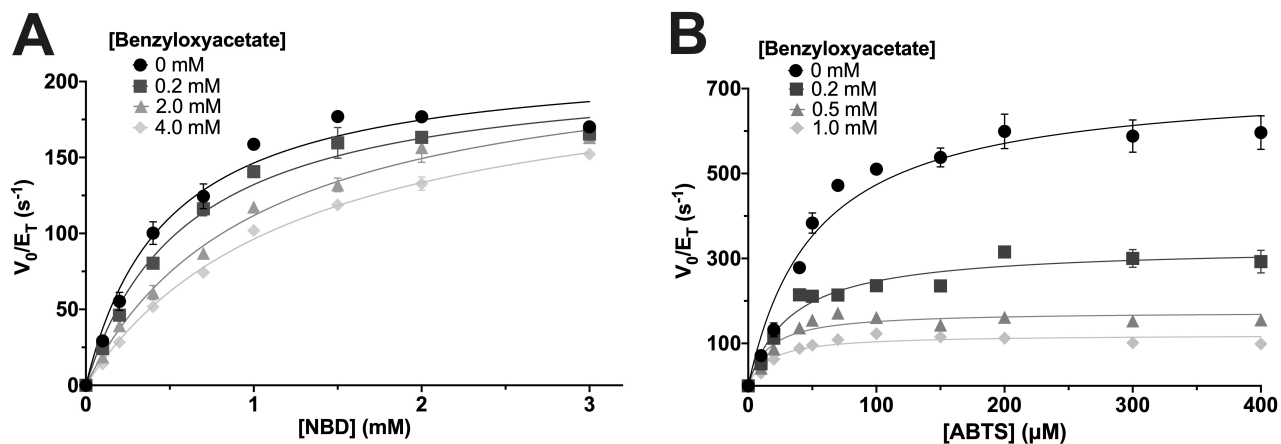
For two of the ether compounds, an unexpected behavior was observed. In the case of allylbenzylether, the enzyme rapidly inactivated after the first H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, leading to a low substrate consumption and therefore low TTN value. Apart from benzaldehyde and benzyl alcohol, MS analysis of the reaction mixture with allylbenzylether revealed the presence of an epoxide, which confirms that not only the oxidation of the ether moiety but also olefin oxygenation occurs during the reaction (Peter 2013). In fact, a previous study with CPO and compounds containing terminal olefins reported the formation of an inactivating heme-adduct when carbon atoms in the terminal double bond are oxidized (Dexter and Hager 1995). The formation of this adduct could explain the swift enzyme inactivation, as the heme group would become unable to engage in a productive catalytic cycle for ether oxidation.



**Figure 5. A) Residual activity for PaDa-I in the presence of selected ethers. B) TTN for selected ether compounds. These assays were performed at the maximum substrate solubility (0.7 mM) with 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions.**

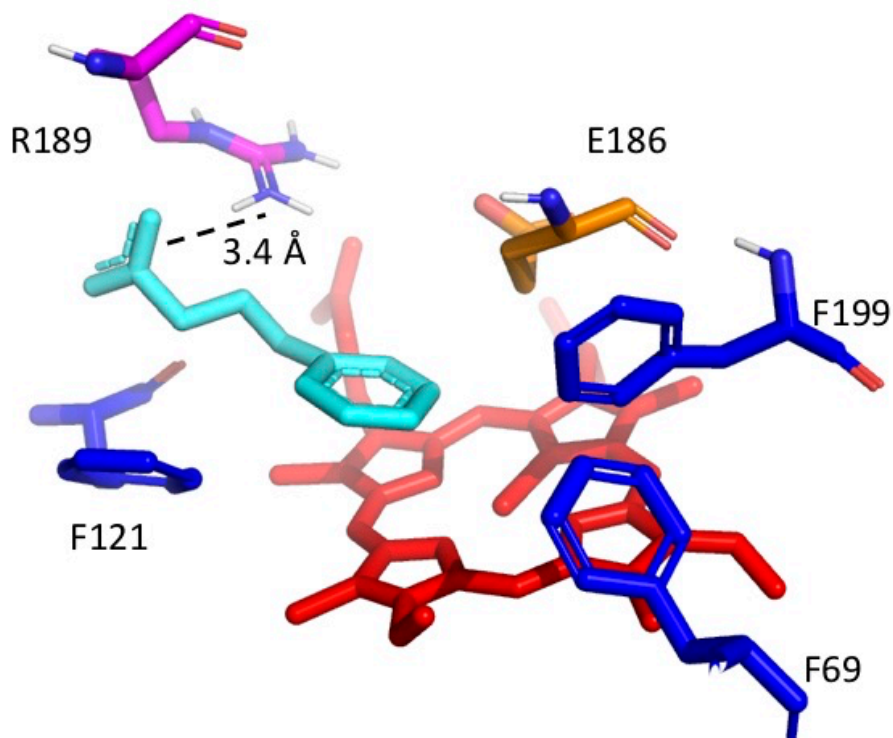
In the case of benzyloxyacetate, no reaction could be detected. A visual inspection of the crystallographic structure of PaDa-I showed that an acetate molecule binds near the iron atom of the heme group (Ramirez-Escudero, et al. 2018). In order to test if the acetate moiety could be an inhibitor of the enzyme, NBD peroxygenation reactions were performed in the absence and presence of either sodium acetate or benzyloxyacetate. Whereas sodium acetate had no effect on the oxidation of NBD (concentrations in the range of 2-50 mM), benzyloxyacetate behaved as a competitive inhibitor, with  $K_i = 3.45$  mM (Figure 6A). When analyzing the effect of benzyloxyacetate on ABTS peroxidation, an uncompetitive inhibitor behavior was observed, confirming that benzyloxyacetate binds in the heme vicinity, but does not compete with ABTS as the binding site for peroxidative substrates has been proposed to be on the surface of the enzyme (Manoj and Hager 2008) (Figure 6B).





**Figure 6. Michaelis-Menten plots for A) NBD peroxygenation and B) ABTS peroxidation with benzyloxyacetate as reversible inhibitor.**

Molecular docking studies indicate that 15% of the poses (384 out of 2430) fulfill two conditions: one of the adjacent carbon atoms to the ether oxygen group is at less than 6 Å away from the iron heme group; and the score energy is less than -6.5 kcal/mol. In 66% of these 384 poses, it is observed that the aromatic moiety of benzyloxyacetate points towards the heme group, surrounded by the phenylalanine triad (F69, F121 and F199), while the acetate moiety points towards the guanidine group in R189, probably establishing electrostatic interactions (as an example of these poses, see Figure 7). Residue R189 is known to be an auxiliary residue during compound I formation (Ramirez-Escudero, et al. 2018). However, enzyme inactivation data in the absence and presence of benzyloxyacetate are very similar, thus suggesting that Compound I formation is not hampered by benzyloxyacetate (Figure 5A). The reason why benzyloxyacetate is not a substrate for the enzyme still needs to be elucidated, as the compound is able to introduce itself in the catalytic cavity (as inferred from its competitive inhibitor behavior) and even at least the aromatic moiety could be oxidized, given the molecule could approach the activated heme group in Compound I, as suggested by the docking results.



**Figure 7. Benzyloxyacetate (cyan) positioned above heme group (red), showing the acetate moiety pointing towards R189 (pink). Surrounding phenylalanine residues (blue) and the catalytic glutamate residue (orange) are also depicted.**

## Conclusions

Catalytic events and molecular factors during ether oxidation by a recombinant peroxygenase member were studied. Data shows that reaction conditions, specifically the dosage of  $H_2O_2$  at low concentration, can be controlled in order to enhance the ether transformation efficiency and reduce the rate of side reactions. More hydrophobic ethers tend to be oxidized more efficiently, strengthening the idea that the *wtAaeUPO* and its variant PaDa-I are specialized on the hydroxylation of aromatic compounds. Synergetic inactivation and low substrate oxidation suggests a suicidal substrate behavior for allylbenzylether, which may involve the blockage of the heme group through adduct formation, as was previously reported for a related enzyme. The only compound that was not substrate for the enzyme carried the most polar substituent (an acetate group) and according to kinetic and molecular docking,

benzyloxyacetate is a compound able to interact with key residues in the active site cavity, and behaves as a reversible inhibitor for peroxygenation reactions.

### **Funding**

This work was supported by UNAM PAPIIT IN214619. R. M. was granted the scholarship 720927 awarded by CONACYT-Mexico for his master studies.

### **Acknowledgments**

Authors thank Rosa Román (IBt) for their technical support and Rodolfo Valle (IBt) for helping with the oxygen measurements.

## References

Agency, Environmental Protection. *Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response*. 2009. <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response> (accessed September 3, 2020).

Andersson, Thomas Broo, and Emma Anders Evertsson. "Prediction of drug candidates' sensitivity toward autoxidation: Computational estimation of C-H dissociation energies of carbon-centered radicals." 103, no. 7 (2014): 1949-1955.

Anh, Dau Hung, René Ullrich, Dirk Benndorf, Aleś Svatoš, Alexander Muck, and Martin Hofrichter. "The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation." *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 17 (2017): 5477-5485.

Aranda, Carmen, et al. "Selective synthesis of 4-hydroxyisophorone and 4-ketoisophorone by fungal peroxygenases." *Catalysis Science and Technology* 9, no. 6 (2019): 1398-1405.

Ayala, Marcela, Cesar V. Batista, and Rafael Vazquez-Duhalt. "Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16, no. 1 (2011): 63-68.

Babot, Esteban, José C. D. del Río, Lisbeth Kalum, Angel T. Martínez, and Ana Gutiérrez. "Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*." *Biotechnology and Bioengineering* 110, no. 9 (2013): 2323-2332.

Bommarius, Andreas S., and Mariétou F. Paye. "Stabilizing biocatalysts." *Chemical Society Reviews* 42, no. 15 (2013): 6534-6565.

Carro, Juan, et al. "Modulating fatty acid epoxidation vs hydroxylation in a fungal peroxygenase." *ACS Catalysis* 9, no. 7 (2019): 6234-6242.

Chaudhary, Kamal Kumar, and Nidhi Mishra. "A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery." *JSM Chem* 4, no. 3 (2016): 1-4.

Collinson, S. R., and W. Thielemans. "The catalytic oxidation of biomass to new materials focusing on starch, cellulose and lignin." *Coordination Chemistry Reviews* 254 (2010): 1854-1870.

Cornish-Bowden, A. "A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non competitive inhibitors." *Biochemical Journal* 137, no. 1 (1974): 143-144.

Dachs, Susanne. *Dissertation: Expression, purification and functional characterization of a heme-thiolate peroxygenase of *Aspergillus niger**. University of Natural Resources and Life Sciences, 2016.

Dexter, Annette F., and Lowell P. Hager. "Transient Heme N-Alkylation of Chloroperoxidase by Terminal Alkenes and Alkynes." *Journal of the American Chemical Society* 117, no. 2 (1995): 817-818.

Díaz, Adelaida, Pablo Rangel, Yésika Montes de Oca, Fernando Lledías, and Wilhelm Hansberg. "Molecular and Kinetic Study of Catalase-1, A Durable Large Catalase of *Neurospora crassa*." *Free Radical Biology & Medicine* 31, no. 11 (2001): 1323-1333.

Dixon, M. "The determination of enzyme inhibitor constants." *The Biochemical Journal* 55, no. 1 (1953): 170-171.

*Gaussian 16 Users Reference*. 2018.

González-Benjumea, Alejandro, et al. "Fatty acid epoxidation by *Collariella virescens* peroxygenase and heme-channel variants." *Catalysis Science and Technology* 10, no. 3 (2020): 717-725.

Gröbe, Glenn, et al. "High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*." *AMB Express* 1, no. 1 (2011): 1-11.

Hager, L.P. "A lifetime of playing with enzymes." *The Journal of biological chemistry* 285, no. 20 (2010): 14852-14860.

Hiner, A.N., J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, Smith A.T., M.B. Arnao, and M. Acosta. "A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid." *European Journal of Biochemistry* 234 (1995): 506-512.

Hiner, A.N.P., J.N. Rodriguez-Lopez, M.B. Arnao, E. Lloyd Raven, F. Garcia-Canovas, and M. Acosta. "Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide." *Journal of Biochemistry* 348 (2000): 321-328.

Hofrichter, Martin, et al. "Fungal Peroxygenases: A Phylogenetically Old Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions." In *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, 369-403. UNK: Springer, 2020.

Hofrichter, Martin, Harald Kellner, Marek J. Pecyna, and René Ullrich. *Fungal Unspecific Peroxygenases: Heme-Thiolate Proteins That Combine Peroxidase and Cytochrome P450 Properties*. Vol. 851, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 341-368. UNK: Springer, 2015.

Horst, A. E.W., et al. "Electro-enzymatic hydroxylation of ethylbenzene by the evolved unspecific peroxygenase of *Agroclybe aegerita*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133 (2016): S137-S142.

Jung, Dirk, Carsten Streb, and Martin Hartmann. "Oxidation of indole using chloroperoxidase and glucose oxidase immobilized on SBA-15 as tandem biocatalyst." *Microporous and Mesoporous Materials* 113, no. 1-3 (2008): 523-529.

Karich, Alexander, Katrin Scheibner, René Ullrich, and Martin Hofrichter. "Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 134 (2016): 238-246.

Karich, Alexander, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase." *Applied and Environmental Biotechnology* 75 (2007): 1473-1478.

Karich, Alexander, René Ullrich, Katrin Schneiber, and Martin Hofrichter. "Fungal Unspecific Peroxygenases Oxidize the Majority of Organic EPA Priority Pollutants." *Frontiers in Microbiology* 8 (2017): 1463.

Kiebist, Jan, et al. "A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* Catalyzes the Selective Oxygenation of Testosterone." *ChemBioChem* 18, no. 6 (2017): 563-569.

Kinne, Matthias, Christian Zeisig, René Ullrich, Gernot Kayser, Kenneth E. Hammel, and Martin Hofrichter. "Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, no. 1 (2010): 18-21.

Kinne, Matthias, et al. "Regioselective preparation of 5-hydroxypropranolol and 4'-hydroxydiclofenac with a fungal peroxygenase." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19, no. 11 (2009): 3085-3087.

Kinne, Matthias, Marzena Poraj-Kobielska, Sally A. Ralph, René Ullrich, Martin Hofrichter, and Kenneth E. Hammel. "Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 284, no. 43 (2009): 29343-29349.

Kinne, Matthias, René Ullrich, Kenneth E. Hammel, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Regioselective preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy)propionic acid with a fungal peroxygenase." *Tetrahedron Letters* 49, no. 41 (2008): 5950-5953.

Kluge, Martin G., René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase." *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, no. 6 (2007): 1473-1478.

La Rotta Hernandez, Camilo E., Stephan Lütz, Andreas Liese, and Elba P.S. Bon. "Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking." *Enzyme and Microbial Technology* 37, no. 6 (2005): 582-588.

Laurynėnas, Audrius, Marius Butkevičius, Marius Dagys, Sergey Shleev, and Juozas Kulys. "Consecutive Marcus Electron and Proton Transfer in Heme Peroxidase Compound II-Catalysed Oxidation Revealed by Arrhenius Plots." *Nature Scientific Reports* 9, no. 1 (2019): 1-11.

Linde, Dolores, et al. "Two New Unspecific Peroxygenases from Heterologous Expression of Fungal Genes in Escherichia coli." *Applied and Environmental Microbiology* 86, no. 7 (2020): 1-16.

Luo, Yan R. *Comprehensive handbook of Chemical Bond Energies*. CRC Press, 2007.

Manoj, Kelath Murali, and Lowell P. Hager. "Chloroperoxidase, a janus enzyme." *Biochemistry* 47, no. 9 (2008): 2997-3003.

Manoj, Kelath Murali, and Lowell P. Hager. "Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1547, no. 2 (2001): 408-417.

Molina-Espeja, Patricia, Eva Garcia-Ruiz, David Gonzalez-Perez, René Ullrich, Martin Hofrichter, and Miguel Alcalde. "Directed evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agroclybe aegerita*." *Applied and Environmental Microbiology* 80, no. 11 (2014): 3496–3507.

Montes-Grajales, D., M. Fennix-Agudelo, and W. Miranda-Castro. "Ocurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review." *Science of the Total Environment* 595 (2017): 601-614.

Ni, Yan, et al. "Peroxygenase-Catalyzed Oxyfunctionalization Reactions Promoted by the Complete Oxidation of Methanol." *Angewandte Chemie - International Edition* 55, no. 2 (2016): 798-801.

Pecyna, Marek J., et al. "Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agroclybe aegerita*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, no. 5 (2009): 885-897.

Peter, Sebastian. *Dissertation: Oxyfunctionalization of alkanes, alkenes and alkynes by unspecific peroxygenase (EC 1.11.2.1)*. Edited by International Graduate School of Zittau and the Faculty of Science of the TU Dresden. 2013.

Piontek, Klaus, et al. "Structural Basis of Substrate Conversion in a New Aromatic Peroxygenase." *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 48 (2013): 34767-34776.

Polizzi, Karen M., Andreas S. Bommarius, James M. Broering, and Javier F. Chaparro-Riggers. "Stability of biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology* 11, no. 2 (2007): 220-225.

Poraj Kobielska, Marzena, Mathias Kinne, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "An spectrophotometrical assay for the detection of fungal peroxygenases." *Analytical Biochemistry* 421, no. 1 (2012).

Poraj-Kobielska, Marzena, et al. "Preparation of human drug metabolites using fungal peroxygenases." *Biochemical Pharmacology* 82, no. 7 (2011): 789-796.

Poraj-Kobielska, Marzena, Mathias Kinne, René Ullrich, Katrin Scheibner, and Martin Hofrichter. "A spectrophotometrical assay for the detection of fungal peroxygenases." *Analytical Biochemistry* 421, no. 1 (2012): 327-329.

Ramirez-Escudero, Mercedes, Patricia Molina-Espeja, Patricia Gomez De Santos, Martin Hofrichter, Julia Sanz-Aparicio, and Miguel Alcalde. "Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase." *ACS Chemical Biology* 13, no. 12 (2018): 3259–3268.

Ramirez-Ramirez, Joaquin, Javier Martin-Diaz, Nina Pastor, Miguel Alcalde, and Marcela Ayala. "Exploring the Role of Phenylalanine Residues in Modulating the Flexibility and Topography of the Active Site in the Peroxygenase Variant PaDa-I." *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 5734 (2020): 1-15.

Shaw, Paul D., and Lowell P. Hager. "An Enzymatic Chlorination Reaction." *Journal of the American Chemical Society* 81, no. 4 (1959): 1011-1012.

Shevelkova, Angelina N., and Alexander D. Ryabov. "Irreversible Inactivation of *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase by Hydrogen Peroxide. A Kinetic Study in Chloride and Bromide Systems." *Biochemistry and Molecular Biology International* 39, no. 4 (1996): 665-670.

Sun, Weimei, T A Kadima, and Brian Dunford. "Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity." *Biochemistry and Cell Biology* 72, no. 7-8 (1994): 321-331.

Trott, O., and A. J. Olson. "Autodock vina: Improving the speed and accuracy of docking." *Journal of Computational Chemistry* 31 (2019): 455-461.

Tumanov, V.E., E.A. Kromkin, and E.T. Denisov. "Estimation of dissociation energies of C — H bonds in oxygen containing compounds from kinetic data for radical abstraction reactions." *Russian Chemical Bulletin* 51, no. 9 (2002): 1641-1650.

Ullrich, René, et al. "Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxygenase." *Journal of Inorganic Biochemistry* 183 (March 2018): 84-93.

Ullrich, René, Jörg Nüske, Katrin Scheibner, Jörg Spantzel, and Martin Hofrichter. "Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes." *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 8 (2004): 4575-4581.

Valderrama, Brenda, Marcela Ayala, and Rafael Vazquez-Duhalt. "Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes." *Chemistry & Biology* 9, no. 5 (2002): 555-565.

Villegas, Jose A., A. Grant Mauk, and Rafael Vazquez-Duhalt. "A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide." *Chemistry and Biology* 7, no. 4 (2000): 237-244.



Wang, Xiaoshi, Sebastian Peter, Mathias Kinne, Martin Hofrichter, and John T. Groves. "Detection and Kinetic Characterization of a Highly Reactive Heme–Thiolate Peroxygenase Compound I." *Journal of American Chemical Society* 134, no. 21 (2012): 12897–12900.

Weber, R., A. Watson, M. Forter, and F. Oliaei. "Persistent organic pollutants and landfills- A review of past experiences and future challenges." *Waste Management and Research* 29 (2011): 107-121.

White, G F, N J Russell, and E C Tidswell. "Bacterial scission of ether bonds." *Microbiological reviews* 60, no. 1 (1996): 216-232.

White, G. F., N. J. Russel, and E. C. Tidswell. "Bacterial scission of ether bonds." *Microbiology Reviews* 60 (1996): 216-232.

Zhang, Wuyuan, et al. "Selective aerobic oxidation using a combination of phtotocatalytic water oxidation and enzymatic oxyfunctionalisations." *Nature Catalysis* 1, no. 1 (2018): 55-62.