



## **Universidad Nacional Autónoma de México**

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Modificaciones químicas y genéticas para mejorar la estabilidad de una peroxigenasa inespecífica fúngica”

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

#### **PRESENTA:**

LBT Karla Yareli Guerrero Muñoz

#### **TUTOR PRINCIPAL:**

Dra. Marcela Ayala Aceves  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

#### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dra. Carmina Montiel Pacheco  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**CUERNAVACA, MORELOS, JUNIO DE 2023**



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 por la inspiración y guía que ha sido durante este proyecto y el mundo de la ciencia.

A la Dra. Carmina Montiel y el Dr. Luis Caspeta por sus acertados comentarios para la construcción de este proyecto.

Al Dr. Miguel Alcalde por proporcionar el sistema de producción heteróloga, basada en *S. cerevisiae*, de PaDa-I.

Agradezco el apoyo técnico para la realización de este trabajo de la Biol. Rosa Román Miranda.

A los miembros del jurado: Dra. Paloma Gil, Dr. Eduardo Torres, Dr. Edmundo Castillo, Dr. Gerardo Corzo, y Dr. Ismael Bustos por sus oportunos comentarios para la edición de esta tesis.

Al proyecto PAPIIT IN214619 por el financiamiento para la realización de este proyecto.

# Índice

## Contenido

Introducción .....	5
Antecedentes .....	6
Historia .....	6
Clasificación.....	7
Estructura y mecanismo de catálisis .....	8
Reacciones catalizadas por UPOs.....	9
Interés biotecnológico.....	10
UPOs caracterizadas experimentalmente.....	12
Expresión recombinante de las UPOs .....	14
Estrategias para estabilizar a PaDa-I .....	15
Estabilidad ante peróxido de hidrógeno .....	15
Estabilidad ante temperatura y solventes orgánicos.....	20
Justificación .....	25
Hipótesis:.....	26
Objetivo general:.....	26
Objetivos específicos:.....	26
Estrategia experimental .....	27
Modificaciones genéticas.....	27
Modificaciones químicas.....	28
Metodología .....	30
Expresión y purificación de PaDa-I.....	30
Preparación de células competentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
Transformación por choque térmico de <i>S. cerevisiae</i> .....	30
Selección de colonias y expresión.....	31
Purificación de PaDa-I .....	32
Cinética de la oxidación de sustratos estándar.....	33
Actividad peroxigenasa .....	33
Actividad peroxidasa .....	33
Reemplazo de residuos oxidables en la vecindad del hemo.....	33
Mutación sitio dirigida de PaDa-I .....	34

Producción y purificación de variantes de PaDa-I.....	34
Transformación en <i>E. coli</i> : plásmidos con las variantes M127L, Y194S y Y160F.....	34
Purificación de plásmidos de las variantes.....	34
Transformación y producción de variantes en <i>S. cerevisiae</i> .....	34
Purificación de las variantes de PaDa-I. ....	35
Estabilidad ante peróxido de hidrógeno .....	35
Modificaciones químicas.....	35
Modificación con polietilenglicol .....	35
Activación del polietilenglicol con cloruro cianúrico .....	35
Modificación de PaDa-I con polietilenglicol activado .....	36
Modificación con quitosano.....	36
Modificación de PaDa-I con quitosano y glutaraldehído .....	36
Modificación de PaDa-I con quitosano y carbodiimida.....	36
Termoestabilidad .....	37
Estabilidad ante solventes orgánicos.....	37
Análisis estadísticos.....	37
Resultados y discusión .....	38
1.-Producción y purificación de PaDa-I .....	38
2.-Detección de actividad peroxigenasa de mutantes en cultivos de levadura.....	40
2.1-Estabilidad ante peróxido de hidrógeno de las variantes.....	43
3.-Modificaciones químicas de PaDa-I .....	46
3.1.-Modificación química con polietilenglicol y caracterización .....	46
3.1.1-Termoestabilidad de PaDa-I modificada con PEG.....	49
3.1.2-Estabilidad ante solventes de PaDa-I modificada con PEG.....	50
3.2.-Modificación de PaDa-I con quitosano utilizando carbodiimida y su caracterización .....	53
3.2.1-Termoestabilidad de PaDa-I con quitosano-carbodiimida .....	55
3.3.-Modificación de PaDa-I con quitosano-glutaraldehído. ....	58
Conclusiones .....	62
Bibliografía .....	64

## Resumen

Las peroxigenasas inespecíficas fúngicas (UPOs) son enzimas de hongos que se describieron por primera vez hace menos de dos décadas; son capaces de catalizar diversas reacciones de interés biotecnológico. PaDa-I es una recombinante expresada en levadura de AaeUPO, la primera enzima descrita de esta familia con características bioquímicas muy similares. Como muchas otras enzimas, PaDa-I es susceptible a inactivarse en ciertas condiciones, debido al potencial biotecnológico de estas enzimas como biocatalizadores y a que, históricamente, la estabilidad de las hemo-enzimas ha sido un obstáculo para sus aplicaciones, el propósito de este proyecto fue mejorar la estabilidad de PaDa-I, utilizando estrategias que han demostrado ser efectivas para estabilizar otras enzimas, como lo son la mutagénesis sitio dirigida y las modificaciones químicas y físicas. La importancia de probar estas estrategias es que cada enzima es única; asimismo estas estrategias incrementan nuestro conocimiento de esta familia de proteínas.

A través de modificaciones genéticas donde se reemplazaban residuos oxidables cerca del sitio activo en PaDa-I se obtuvieron tres mutantes, ninguna de ellas más estable ante peróxido de hidrógeno que PaDa-I; se sugieren estrategias como la evolución dirigida para incrementar la estabilidad de PaDa-I.

Las modificaciones químicas se realizaron con polietilenglicol (PEG) y quitosano utilizando tres diferentes estrategias de modificación; dos de ellas exitosas. PaDa-I fue modificada activando PEG con cloruro cianúrico para posteriormente conjugar el polímero con PaDa-I sobre los residuos de lisina. Esta modificación no mejoró su estabilidad ante ninguno de los factores mencionados. La modificación con quitosano utilizando como agente entrecruzante al glutaraldehído produjo un entrecruzado no soluble en el que se retiene la enzima que se propone caracterizar en un sistema de catálisis heterogéneo. Adicionalmente se encontró que el quitosano actúa como un agente estabilizador ante temperatura de PaDa-I al estar presente en solución.

## Introducción

Las peroxigenasas inespecíficas (UPOs) son enzimas extracelulares que catalizan reacciones de oxidación utilizando el peróxido de hidrógeno como donador de oxígeno y aceptor de electrones. Estructuralmente, se sabe que son proteínas hemo-tioladas, es decir, que tienen un residuo cisteína como ligando axial del grupo hemo. Se sabe que son producidas exclusivamente por hongos, y fueron reportadas por primera vez por Ullrich et al., 2004, la primera de estas enzimas reportada (AaeUPO) la produce el basidiomiceto *Agrocybe aegerita*. Las reacciones catalizadas por estas enzimas son muy diversas: catalizan hidroxilación de alcanos y compuestos aromáticos, epoxidación de olefinas, oxigenación de heteroátomos, ruptura del enlace éter, oxidación de bromuro y cloruro y compuestos de naturaleza fenólica. Además, el tipo de sustratos que puede reconocer es muy diverso, aproximadamente 400 compuestos han demostrado ser sustratos de las UPOs (Hofrichter et al., 2020), por lo que se le atribuye una elevada versatilidad y por eso se les ha denominado “inespecíficas”.

Se ha comprobado que estas enzimas pueden ser usadas en la síntesis de fármacos, pesticidas y en la transformación de contaminantes ambientales, convirtiéndolas en catalizadores de gran interés para diversas aplicaciones biotecnológicas; sin embargo, el rol natural de las enzimas aún es incierto y por esta razón se ha obstaculizado su expresión nativa al desconocerse los inductores. Por tanto, una alternativa para estudiarles es la expresión recombinante. PaDa-I es una variante recombinante de AaeUPO, que se obtuvo por evolución dirigida y tiene características bioquímicas y catalíticas muy similares a la enzima nativa, con la ventaja de que se puede producir fácilmente en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

## Antecedentes

### Historia

En 2004 se reportó en el basidiomiceto *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) a la primera enzima del grupo de las peroxigenasas inespecíficas (unspecific peroxygenase, UPOs) fúngicas. Inicialmente se consideró una peroxigenasa aromática (APO) por su capacidad de hidroxilar compuestos aromáticos, sin embargo, después de que se demostró su actividad con una amplia variedad de compuestos, su nombre cambio a peroxigenasa inespecífica (Hofrichter et al., 2020).

En 2011 AaeUPO se reconoció como el primer miembro de una subclase de oxidoreductasas (EC 1.11.2.1), que se consideran enzimas híbridas debido a que combinan los atributos catalíticos de las hemo-peroxidasas clásicas y de las enzimas tipo citocromo p450 (Ramirez-Escudero et al., 2018a) (Gröbe et al., 2011).

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, que se incluyó en este grupo de UPOs, se ha estudiado desde hace décadas, pero se había considerado un caso especial de las hemo-peroxidases; esta enzima cataliza halogenaciones y su función fisiológica es participar en la síntesis de un antimicrobiano. Era la única enzima conocida de esta familia hasta que se descubrió a AaeUPO, siendo estas dos enzimas las más estudiadas a la fecha y sobre las que se tiene más información (Sigmund & Poelarends, 2020).

Como se mencionaba, otro tipo de enzima con la que comúnmente se compara a las peroxigenasas inespecíficas es el citocromo p450, debido a que es capaz de hidroxilar enlaces C-H no activados (oxifuncionalización), una reacción valiosa principalmente en síntesis orgánica. Los citocromos p450 son similares a las UPOs debido a su reconocimiento de sustratos de muy diversa naturaleza química; a que el hierro está coordinado por un átomo de azufre de una cisteína; y a que se forma un compuesto altamente oxidante que es el que cataliza la oxigenación de un sustrato. Sin embargo, las UPOs presentan ventajas por ser extracelulares y solubles, lo que las hace más estables; además de no requerir de cofactores costosos, simplificando el sistema a implementar para sus posibles aplicaciones.

## Clasificación

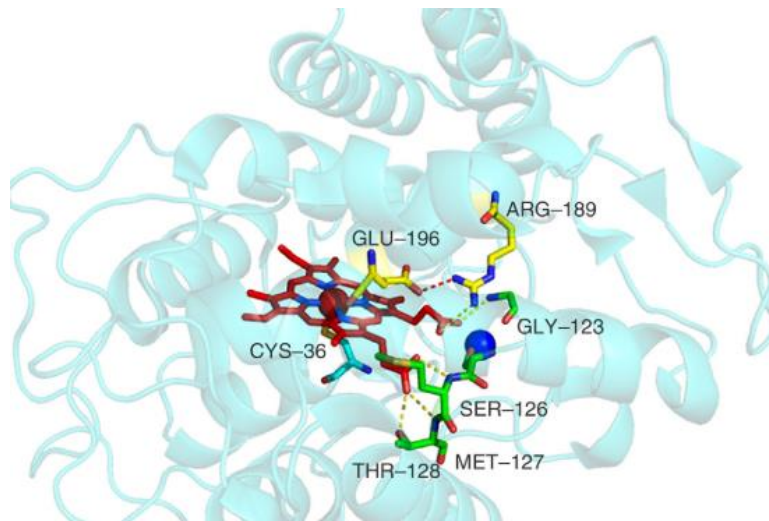
Filogenéticamente en las UPOs existen dos familias de proteínas, la familia I compuesta por secuencias cortas y presente en los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mucoromycotina*, *Glomeromycotina*, *Zoopagomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota* y *Bacillariophyta* y puede subdividirse en dos subfamilias, la subfamilia I.1 con 296 secuencias hipotéticas de UPOs con tamaño promedio de 31.9 kDa y pl de 7.3, y la subfamilia I.2; algo característico de esta familia de UPOs es que la mayoría carece de péptido señal. Esta subfamilia incluye secuencias hipotéticas de UPOs con un tamaño promedio de 29 kDa y un pl de 6.4; en esta familia se encuentran las UPOs nativas caracterizadas de *Chaetomium globosum* (CglUPO), *Marasmius rotula* (MroUPO) y *Marasmius wettsteinii* (MweUPO) y de la CPO de *Caldariomyces fumago* (Hofrichter et al., 2020).

La familia II es de UPOs con secuencias largas, con un tamaño promedio de 44.4 kDa y un punto isoeléctrico promedio de 5.8, la mayoría de ellas contienen un C-terminal con un puente disulfuro y se predicen secuencias que si contienen péptido señal; un representante de este grupo es la caracterizada AaeUPO, y también están la UPO recombinante de *Coprinopsis cinerea* (rCciUPO) y las enzimas nativas de *Coprinopsis verticillata* (CveUPO), *Coprinellus radians* (CraUPO) y *Psathyrella aberdarensis* (PabUPO), así como decenas de secuencias predichas en basidiomicetos. La familia II también la podemos dividir en dos grupos, el primer grupo comprende las enzimas mencionadas y en el segundo solo hay secuencias hipotéticas donde ninguna proteína ha sido caracterizada hasta ahora (Hofrichter et al., 2020). Con esta información solo es posible reafirmar lo mucho que hay por descubrir de estas enzimas.



## Estructura y mecanismo de catálisis

Las UPO contienen al grupo hemo (hierro protoporfirina IX) en su sitio activo, que está coordinado con un átomo de azufre de un residuo de cisteína, siendo este su ligando axial (Hofrichter et al., 2020). La región de unión al hemo contiene un motivo PCP (Pro-Cys-Pro) que permite que el grupo sulfhidrilo de la cisteína interactúe con el hemo, este motivo está altamente conservado en UPOs; además en el sitio catalítico se encuentra presente un par ácido-base (Glu196-Arg186 en AaeUPO) involucrado en la ruptura del peróxido de hidrógeno (Hofrichter & Ullrich, 2014). La estructura del sitio activo de AaeUPO se muestra en la Figura 1. Las enzimas de esta familia están altamente glicosiladas (entre 10 y 40% de su peso). Como en otras hemo-peroxidasaas fúngicas extracelulares, el rol de la glicosilación es mejorar la solubilidad y estabilidad de las enzimas, sin afectar su actividad catalítica.

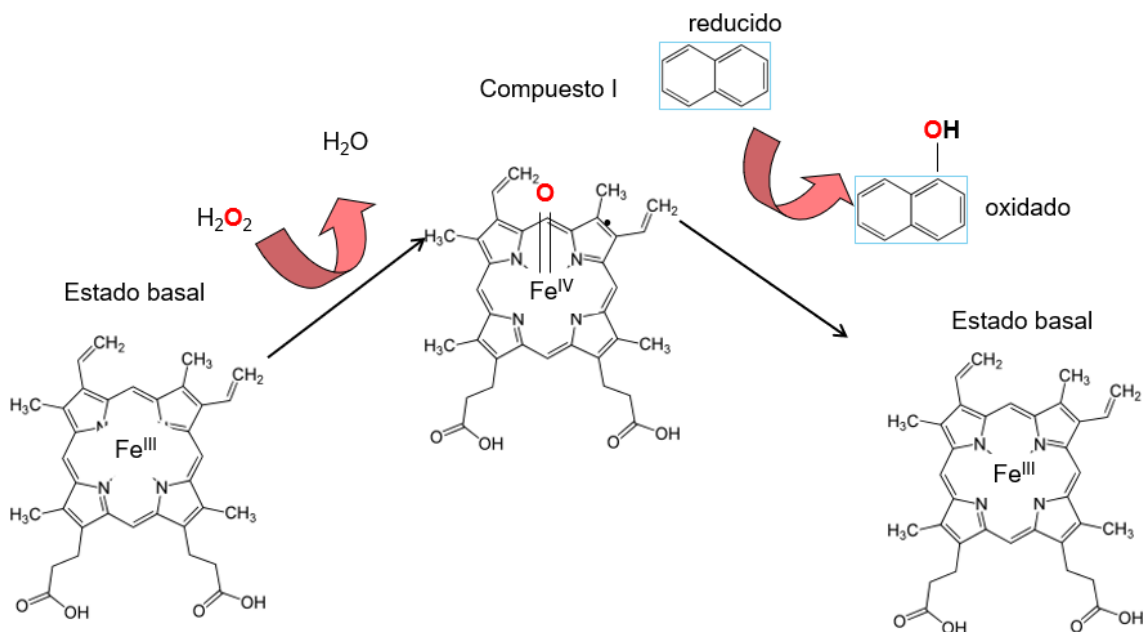


**Figura 1. Sitio activo de AaeUPO (PDB: 2YOR).** Se muestra el grupo hemo en rojo; la cisteína que coordina al hemo en azul y el par ácido-base en amarillo.

Se han determinado pocas estructuras tridimensionales experimentalmente, a continuación, su nombre y su código del Protein Data Bank:

La estructura de la cloroperoxidasa: 1CPO (Sundaramoorthy et al., 1995), AaeUPO: 2YOR (Piontek et al., 2013); MroUPO:5FUK (no publicado), PaDa-I:5OXU (Ramirez-Escudero et al., 2018b), HspUPO: 7O1R (Rotilio et al., 2021) y rCviUPO: 7ZCL (Linde et al., 2022). En general, se puede observar que las UPO en su estructura contienen principalmente alfas hélices y betas plegadas que forman un túnel que conecta el seno de la solución con la cavidad del grupo hemo, y que seguramente es por donde ingresan los sustratos. El tamaño del túnel y su forma varía dependiendo de la enzima, además de los residuos que lo componen, lo que puede estar relacionado con las diferencias de especificidad de estas enzimas (Ramirez-Ramirez et al., 2020a).

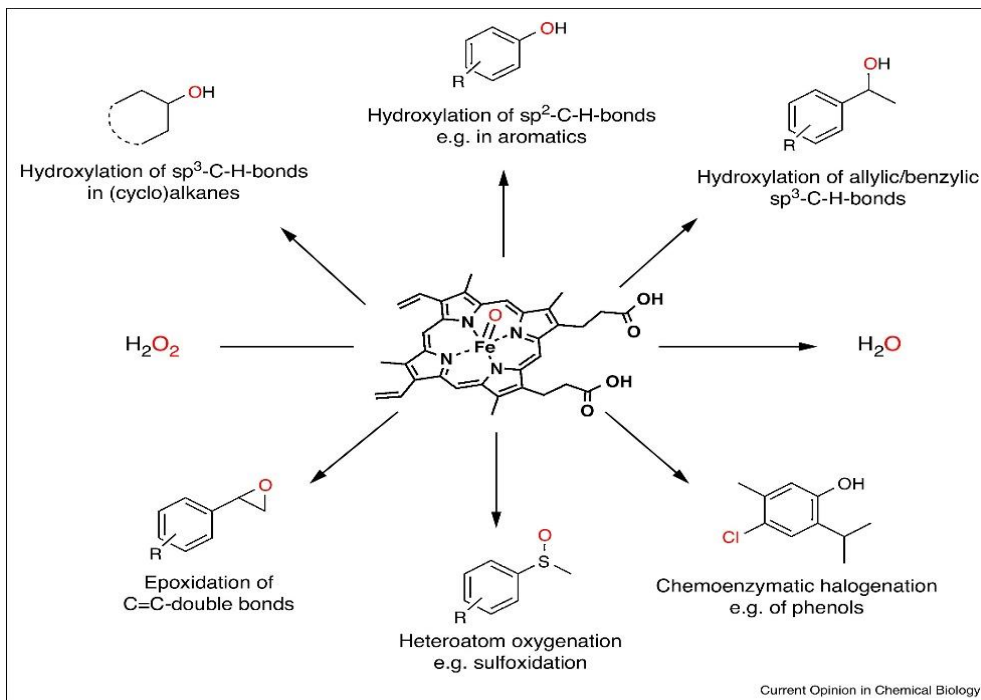
El mecanismo de catálisis general que utilizan estas enzimas inicia cuando entra el peróxido de hidrógeno por el túnel e interactúa con el grupo hemo, resultando en un peroxo-complejo que se desprotona y facilita la ruptura de la unión O-O generando un oxoferril-hemo como la especie oxidante (llamada Compuesto I). Esta especie interactúa con el sustrato y es la responsable de transferir el átomo de oxígeno al sustrato (Wang et al., 2017a) como podemos ver en la Figura 2. Este es el mecanismo que le permite a las UPOs catalizar una diversidad de reacciones.



**Figura 2.** Mecanismo de catálisis simplificado de las UPOs (Hofrichter et al., 2015).

## Reacciones catalizadas por UPOs

La diversidad de reacciones catalizadas por estas enzimas es una de sus principales características. Estas reacciones usualmente pueden dividirse en dos tipos, con base en el número de electrones involucrados en la reacción: las oxidaciones de un electrón (tipo peroxidasa) y las oxidaciones de dos electrones, que involucran la transferencia de oxígeno (peroxigenasa). La posibilidad de usar estas dos vías contribuye a que esta familia de enzimas sea capaz de catalizar reacciones muy diversas (Figura 3). Particularmente, las hidroxilaciones y epoxidaciones son reacciones muy importantes debido a que es posible convertir compuestos alifáticos (ácidos grasos, alcoholes, alcanos terpenos y esteroides) que son termodinámicamente muy estables, en materias primas de industrias químicas y farmacéuticas, aumentando el interés en las UPOs por sus potenciales aplicaciones (Hofrichter & Ullrich, 2014) (Wang et al., 2017b).



**Figura 3.** Ejemplos de reacciones catalizadas por UPOs (Wang et al., 2017b).

### Interés biotecnológico

Por muchos años las enzimas se han considerado alternativas en procesos industriales que típicamente se basan en síntesis y catalizadores químicos, ya que los procesos enzimáticos tienen ventajas ambientales y de simplicidad frente a la síntesis química, además de que generalmente necesitan condiciones suaves para la catálisis.

De manera general las enzimas fúngicas representan al menos el 50% de biocatalizadores aplicados a nivel industria por ser solubles, robustas y por su elevado poder catalítico, características que poseen las UPOs y que, sumadas a su elevada versatilidad, a que no requieren cofactores y a que las reacciones catalizadas por estas enzimas pueden ser altamente regio y enantioselectivas, han convertido a las UPO en enzimas de gran interés para la biotecnología, principalmente en las reacciones de peroxigenación como se mencionaba anteriormente.

De entre los 400 compuestos que han demostrado ser sustrato de las UPOs es posible destacar algunos de ellos donde las UPO tienen aplicaciones potenciales como biocatalizadores, por ejemplo, en la síntesis de fármacos como el diclofenaco, el paracetamol y el 4,4'-dihidroxi-trans-estilbeno (Hofrichter et al., 2020), un análogo del resveratrol que se ha investigado en los últimos años por su potencial

anticancerígeno y anti neurodegenerativo (Aranda et al., 2019). También es posible utilizarlo en síntesis química como “building block” como en el caso del 1-naftol, un químico del que se usan 40,000 toneladas por año para producir herbicidas, insecticidas, compuestos farmacéuticos y tintes; el 1-naftol se puede obtener a partir de naftaleno en una reacción de oxidación catalizada por UPOs. Otra aplicación potencial es en la producción de hidroxivitamina-D-25 como suplemento alimenticio usado para animales de granja, reacción catalizada por la recombinante de la UPO de *Coprinopsis cinerea* y cuya patente posee Novozymes (Lucas et al., 2016) (Martínez et al., 2017).

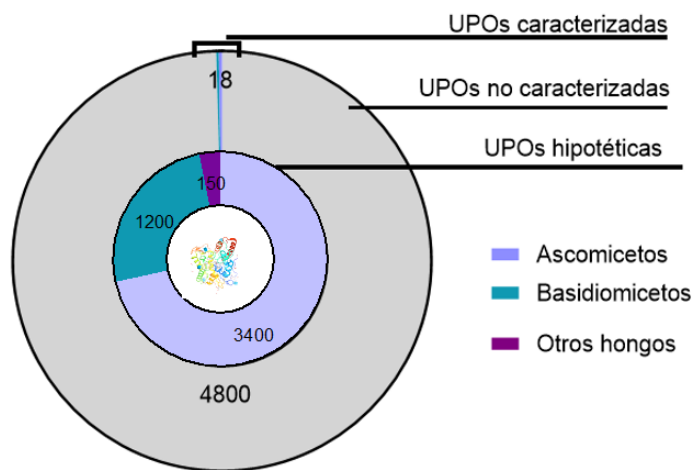
Asimismo la UPO es capaz de catalizar la oxidación de contaminantes ambientales; de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (con un total de 126 contaminantes) las UPOs pueden usar a 41 de estos compuestos como sustrato, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos, bencenos clorados y compuestos nitroaromáticos, todos compuestos altamente recalcitrantes que por otros métodos es difícil oxidar (Karich et al., 2017) (Wang et al., 2017b).

En el trabajo realizado por (Karich et al., 2017) se demostró que 35 de 40 de estos contaminantes prioritarios eran sustrato de las UPOs, utilizando para estos ensayos solamente a la UPO de *Marasmius rotula* MroUPO y a la UPO de *Agrocybe aegerita* AaeUPO; por lo que el rango real de contaminantes que las UPOs pueden oxidar aún está por descubrirse. Y no solo de contaminantes, como ejemplo tenemos a la testosterona. Compuesto que no es oxidado ni por AaeUPO ni por MroUPO pero si es oxidado por CglUPO, una UPO de *Chaetomium globosum* (Kiebish et al., 2017). Añadiendo esta reacción a las de interés biotecnológico catalizadas por las UPOs.

Diferentes UPOs tienen diferentes túneles, (en tamaño, forma y composición de aminoácidos) estas diferencias hacen posible el reconocimiento y la oxidación de diferentes sustratos; es necesario aumentar el número de UPOs caracterizadas y sus estructuras para tener un mayor entendimiento de la relación entre estos factores relevantes en el túnel y la especificidad de estas enzimas (Ramirez-Ramirez et al., 2020a). El reciente análisis de la estructura cristalográfica de HspUPO (Rotilio et al., 2021) nos confirma que ligAaeUPO y HspUPO tienen una conformación similar, el estrecho túnel de HspUPO podría explicar su preferencia por sustratos aromáticos con sustituyentes pequeños. Así que lo más probable es que el número de sustratos de interés siga en aumento entre más de estas UPOs se puedan caracterizar.

## UPOs caracterizadas experimentalmente

Se han reportado hasta ahora más de 4,000 secuencias hipotéticas de peroxigenasas en genomas de diferentes hongos pero se han caracterizado solamente 18 UPOs hasta la fecha: 10 provenientes de ascomicetos (CglUPO, CPO, rHinUPO, entre otros) y 8 de basidiomicetos (AaeUPO, MroUPO, CraUPO, entre otros) (Kinner et al., 2021) (Hofrichter et al., 2015). Este hecho convierte a las UPOs en enzimas de las que tenemos todo por aprender. En la Figura 4 podemos ver esto reflejado gráficamente, mostrándonos el bajo porcentaje de UPOs caracterizadas respecto a las que se predicen en genomas de hongos, señalando las secuencias hipotéticas que corresponden a basidiomicetos, ascomicetos y otros hongos.



**Figura 4.** Caracterización de las UPOs. (Adaptado de (Kinner et al., 2021)).

Las 18 UPOs caracterizadas se han expresado homóloga o heterológamente (Tabla 1); la expresión homóloga se ha visto obstaculizada debido a que se desconoce el rol de estas enzimas en la naturaleza (aunque se sugieren roles de detoxificación, degradación de lignina o síntesis de metabolitos) (Hobisch et al., 2020) y por tanto se desconocen sus inductores. Por tanto, y como se puede ver reflejado en la Tabla 1, aproximadamente la mitad de estas enzimas se ha expresado heterológamente, principalmente en organismos modelo como *Sacharomyces cerevisiae*. Este organismo ya se ha usado anteriormente para producir heterológamente otras enzimas de hongos (lacasas y peroxidasas) y además su maquinaria de recombinación homóloga *in vivo* puede utilizarse para enriquecer las librerías genéticas.

Otro modelo donde se han expresado UPOs exitosamente es *Escherichia coli* (Linde et al., 2020), aunque su expresión es menor en comparación con los hospederos eucariotes (Püllmann et al., 2021).

Organismo	Enzima	Enzima recombinante, Organismo	Masa molecular (kDa)	Referencias
<i>Caldariomyces fumago</i>	LfuCPO	rLfuCPO, <i>A. niger</i>	42	Dunford (1999) and Kellner et al. (2016)
<i>Agrocybe aegerita</i>	AaeUPO	rAaeUPO, <i>S. cerevisiae</i> PaDa-I, <i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	45-46 52	(Ullrich et al., 2004) and Gupta et al. (2018). Molina- Espeja et al. (2014, 2015, 2016)
<i>Coprinellus radians</i>	CraUPO		43-45	(Dau et al., 2007)
<i>Coprinopsis verticillata</i>	CveUPO		42	(Dau et al., 2007)
<i>Marasmius rotula</i>	MroUPO	rMroUPO, <i>E. coli</i> & <i>S. cerevisiae</i> & <i>P. pastoris</i>	32 27*	(Gröbe et al., 2011) & (Ullrich et al., 2018) (Carro et al., 2019)
<i>Chaetomium globosum</i>	CglUPO	rCglUPO, <i>S. cerevisiae</i> & <i>Pichia pastoris</i>	36	(Kiebig et al., 2017) & (Püllmann et al., 2021)
<i>Marasmius wettsteinii</i>	MweUPO	rMweUPO, <i>S. cerevisiae</i>	61	(Ullrich et al., 2018) (Püllmann et al., 2021)
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	PabUPO		40-41	(Kimani, 2019)
<i>Coprinopsis cinérea</i>		rCciUPOb, <i>A. oryzae</i>	44	(Babot et al., 2013)
<i>Humicola insolens</i>		rHinUPO, <i>A. oryzae</i>	36	(Kiebig et al., 2017)
<i>Daldinia caldariorum</i>		rDcaUPO, <i>E. coli</i>	27*	(Linde et al., 2020)
<i>Chaetomium virescens</i>		rCviUPO, <i>E. coli</i>	24*	(Linde et al., 2020)
<i>Thielavia terrestris</i>		rTteUPO, <i>S. cerevisiae</i> & <i>Pichia pastoris</i>	27-35	(Püllmann & Weissenborn, 2021)
<i>Galerina marginata</i>		rGmaUPO, <i>S. cerevisiae</i>	39*	(Püllmann et al., 2021)
<i>Myceliophthora hinnulea</i>		rMhiUPO, <i>P. pastoris</i>	28*	(Püllmann & Weissenborn, 2021)
<i>Myceliophthora thermophila</i>		rMthUPO, <i>S. cerevisiae</i>	38*	(Püllmann et al., 2021)
<i>Myceliophthora fergusi</i>		rMfeUPO, <i>P. pastoris</i>	28*	(Püllmann & Weissenborn, 2021)
<i>Hypoxyylon sp.</i>		HspUPO, <i>P. pastoris</i>	55	(Rotilio et al., 2021)

**Tabla 1. UPOs caracterizadas** hasta la fecha, resaltadas en color rosa se muestran las que se han logrado expresar homológamente (y heterológamente) y en verde las que solo se han logrado expresar heterológamente.

\* masa molecular sin glicosilar

## Expresión recombinante de las UPOs

Uno de los principales obstáculos para el estudio e ingeniería de las UPOs es su baja expresión. Como podemos ver en la Tabla 1 los esfuerzos de producir estas enzimas en los últimos años se han centrado en la expresión heteróloga. Entre las dificultades para ésta se encuentran las modificaciones post-transcripcionales, los diferentes usos de codones y la unión del grupo prostético hemo, mismas que han afectado a las hemo-proteínas con anterioridad. Sin embargo, para la UPO de *A. aegerita* (AaeUPO), este obstáculo fue superado por Molina-Espeja, 2016 que mediante evolución dirigida expresó esta enzima en *P. pastoris* y *S. cerevisiae*, siendo este el caso más exitoso en ingeniería de UPOs hasta la fecha (Hobisch et al., 2020) mejorando la expresión de la enzima 3,200 veces.

La estrategia empleada fue inicialmente fusionar distintos péptido señal a la secuencia de la proteína y posteriormente someterlas a rondas de mutagénesis aleatoria y recombinación de ADN. Se obtuvieron librerías génicas y se evaluaron las mutantes con un cribado de alta capacidad o alto rendimiento (high-throughput screening) que permite evaluar simultáneamente las actividades peroxidasa y peroxigenasa, permitiendo seleccionar a las mutantes más eficientes en cuanto a expresión en cada ronda (Molina-Espeja et al., 2014). El resultado fue la obtención de la mutante PaDa-I, con propiedades espectroscópicas, bioquímicas y catalíticas muy similares a AaeUPO, pero con una expresión en levadura órdenes de magnitud mayor a la enzima parental y con actividad catalítica mejorada (mejoró 18 veces la eficiencia catalítica de la oxidación de NBD comparado con AaeUPO), abriendo la posibilidad de diseñar y aplicar mutantes UPO para diversos procesos biotecnológicos.

PaDa-I posee 9 mutaciones en comparación con la enzima parental AaeUPO, 4 de ellas en el péptido señal y 5 en la proteína madura, todas ellas lejos el sitio activo. Se ha especulado que la mejora en la eficiencia catalítica puede deberse a una mutación que causa que el canal de acceso al hemo sea más amplio (Molina-Espeja, 2016). PaDa-I tiene una masa ligeramente mayor en comparación con AaeUPO, relacionado con su mayor nivel de glicosilación, 22% para AaeUPO y 30% para PaDa-I. La sustitución de aminoácidos no introdujo nuevos sitios de glicosilación, más bien se sabe que *S. cerevisiae* tiende a hiperglicosilar. Sin embargo, a pesar de que la glicosilación generalmente confiere cierta estabilidad, PaDa-I y AaeUPO tienen estabilidad ante temperatura muy similar, aunque en la variante PaDa-I sí aumentó ligeramente la estabilidad ante solventes orgánicos (Molina-Espeja et al., 2014).

A la fecha solo conocemos las estructuras cristalográficas de 5 UPOs: CPO, AaeUPO, MroUPO y HspUPO, y de esta variante de AaeUPO: PaDa-I. Tener acceso a esta estructura nos permite tener la información estructural pertinente para el diseño racional de mutantes de esta enzima, con el fin de modificar ciertas propiedades que podrían ser de interés para sus aplicaciones potenciales.

Es común que, para poder usar las enzimas como catalizadores en cualquier proceso, sea necesario mejorar ciertas propiedades: estabilidad ante temperatura, pH, actividad en presencia de altas concentraciones de sustrato/producto, tolerancia a solventes orgánicos o enantioselectividad, entre otras.

PaDa-I posee muchas características para ser un biocatalizador prometedor, sin embargo, aún es necesario mejorar algunas propiedades para que sea posible su uso fuera de los laboratorios de investigación. Entre los objetivos más importantes en la ingeniería de las UPOs y específicamente de PaDa-I se encuentran: convertirla en una peroxigenasa enantioselectiva, lograr una mejora de su estabilidad en presencia de solventes y mejorar su estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno (Molina-Espeja, 2016). Las UPO han mostrado enantioselectividad en reacciones como sulfoxidaciones, epoxidaciones e hidroxilaciones de enlaces  $sp^3$  C-H. Y en la actualidad, a pesar de estar en una fase temprana de desarrollo, estas enzimas alcanzan niveles suficientes de síntesis para darles una aplicación en un medio de reacción optimizado (Bormann et al., 2015).

Por lo que en este proyecto nos enfocaremos en la mejora de PaDa-I en relación con su estabilidad, abordando los últimos dos objetivos que se mencionan en el párrafo anterior, y agregando termoestabilidad, una característica importante a considerar en los procesos a escala industrial.

### **Estrategias para estabilizar a PaDa-I**

Para empezar a entender las estrategias para estabilizar a las enzimas, es necesario entender por qué las enzimas se inactivan y cómo las estrategias que se plantean para PaDa-I evitarían su inactivación.

Dados los objetivos de este trabajo se abordarán las razones por las que estas enzimas se inactivan en presencia de peróxido de hidrógeno, altas temperaturas y la presencia de solventes, y posteriormente las diversas estrategias que para otras enzimas similares a PaDa-I (lacasas, citocromo C y peroxidasas) han funcionado para conferirles mayor estabilidad.

#### **Estabilidad ante peróxido de hidrógeno**

Todas las hemo-proteínas se inactivan en presencia de su co-sustrato, el peróxido de hidrógeno, limitando la estabilidad de las enzimas y por tanto la velocidad, la conversión y la eficiencia (medida como catalizador consumido) de la reacción.

Para plantear una estrategia es necesario recordar que en la inactivación por peróxido de hidrógeno el Compuesto I (el responsable de transferir el átomo de oxígeno hacia el sustrato) puede seguir diferentes vías de descomposición que resultan en la inactivación de la enzima; de forma general, se han descrito dos mecanismos:



- Blanqueamiento del hemo: el grupo hemo es oxidado y degradado, liberando el átomo de hierro.
- Oxidación de residuos de la enzima: las especies reactivas pueden oxidar residuos tanto en la superficie de la enzima como en la vecindad del hemo, generalmente residuos con un bajo potencial redox (Cys, Met, Trp, Tyr); estos residuos se muestran ordenados de acuerdo con su potencial redox (incluyendo algunas otras reacciones) en la Tabla 2.

Redox Reaction	$E_m$ (mV)
$\text{HO}\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	2200
$\text{Mn (III)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Mn (II)}$	1540
$\text{Met}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Met}$	1500
$\text{HOO}\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	1480
$\text{VA}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{VA}$	1400
$\text{Trp}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Trp}$	1200
$\text{TyrO}\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{TyrOH}$	930
$\text{CysS}\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CysS}$	900

**Tabla 2.** Potencial redox de algunas reacciones involucradas en la inactivación oxidativa de las peroxidasas/peroxigenasas. Tomada de Valderrama et al., 2002.

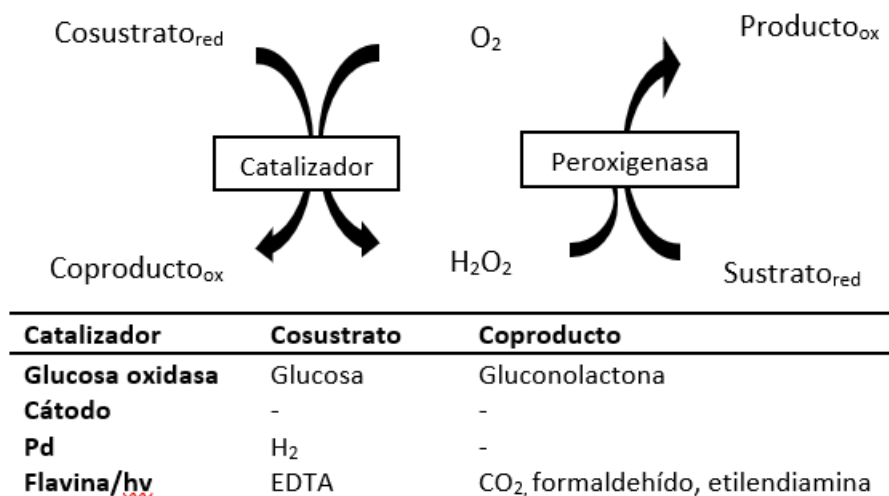
Para PaDa-I se sabe que la destrucción del hemo es el principal mecanismo de la inactivación y que esta inactivación ocurre en pocos minutos aún utilizando concentraciones estequiométricas de peróxido de hidrógeno. En el trabajo de Karich et al. 2016 se realizaron experimentos donde por HPLC evaluaban la degradación del grupo hemo de AaeUPO (enzima nativa, bioquímicamente igual a PaDa-I). El ensayo se realizó agregando peróxido de hidrógeno hasta que no quedaba actividad (99% de inactivación) y se observó que el grupo hemo estaba degradado. En nuestro laboratorio se realizaron más estudios que confirman que el principal mecanismo de inactivación para PaDa-I es la destrucción del hemo; en el estudio se complementó el medio de reacción con moléculas conocidas como atrapadores de radicales libres que provocan la inactivación (scavengers) y no se observó un retraso de la inactivación por peróxido de hidrógeno en PaDa-I (Mireles Raúl, 2020).

Se han utilizado diversas estrategias para resolver este problema y las podemos clasificar en tres:

- Dosificación de peróxido en el medio de reacción

Desde este enfoque se intenta mantener la concentración de peróxido de hidrógeno en niveles que le permitan a la enzima realizar la catálisis sin inactivarla. Para la generación de peróxido de hidrógeno *in situ* se han utilizado estrategias donde un catalizador (Ej. Glucosa oxidasa) oxida a un sustrato y como consecuencia de esta reacción se produce peróxido de hidrógeno que la

peroxigenasa usara ahora para oxidar a su sustrato. Las estrategias más relevantes que se han empleado se muestran en la Tabla 3.



**Tabla 3.** Algunos ejemplos de métodos de generación *in situ* de peróxido de hidrógeno, acoplados a reacciones mediadas por peroxigenasas. En la parte inferior de la Tabla se ejemplifican los catalizadores que se han utilizado, con los respectivos cosustratos que se tienen que utilizar en las reacciones y el coproducto que se genera. Tomado de (Holtmann et al., 2014).

Cada método tiene sus ventajas y desventajas, entre sus ventajas encontramos la simplicidad, y entre las desventajas podemos destacar el requerir equipo especializado, la generación de subproductos y el impacto de la generación del peróxido de hidrógeno otros componentes del solvente (ej. pH). Además, con estas estrategias aún se tiene que establecer un diseño específico para cada reacción de peroxigenación debido a que la eficiencia en el uso del peróxido dependerá de qué tan bien compite la reacción de interés con la reacción secundaria de inactivación (Holtmann et al., 2014).

- Unión a un soporte

El efecto de la inactivación por peróxido de hidrógeno se minimiza reduciendo la exposición de los grupos que tienden a ser oxidados en la superficie o evitando modificación química de la enzima (Hernandez et al., 2012), esto se logra uniendo en el exterior de la enzima un soporte adecuado que evite esta exposición. En el trabajo realizado por (Fernández-Lafuente et al., 1999) se mejoró 20 veces la estabilidad de la D-aminoácido oxidasa (DAAO) a peróxido de hidrógeno a través de la modificación química con glioxil-agarosa y su post-inmovilización con dextrano-aldehído. Estas modificaciones obstaculizan el acceso a los grupos sensibles a ser oxidados por el peróxido de hidrógeno, aumentando así su

estabilidad. Sin embargo, se perdió aproximadamente un 20% de la actividad enzimática después de la modificación y la post-inmovilización.

- Ingeniería de proteínas

El enfoque de esta estrategia es aumentar la estabilidad de las enzimas ante peróxido de hidrógeno haciendo mutaciones específicas, principalmente en residuos de bajo potencial redox como metionina, cisteína, triptófano e histidina.

Estas estrategias no son excluyentes entre sí, por lo que la optimización de las enzimas respecto a su tolerancia a peróxido de hidrógeno se puede lograr combinando todos estos enfoques, sin embargo, y aunque cada estrategia presenta sus ventajas, la ingeniería de proteínas nos permite una solución más directa por que involucra solo modificaciones en la proteína que posteriormente se pueden sumar a las estrategias de inmovilización y dosificación de peróxido de hidrógeno (Zhao et al., 2019). Además de que, a través de la ingeniería de proteínas aprendemos más acerca del papel que juega cada aminoácido en la estructura de la enzima que se modifique.

El reemplazo de residuos se ha realizado principalmente en la vecindad del hemo. En esta estrategia se pueden reemplazar directamente los residuos de bajo potencial redox alrededor del sitio activo, alterando las vías de transferencia de electrones y así retardar o suprimir la inactivación (Valderrama et al., 2002).

En el trabajo realizado por Karich et al, 2016 se analizó la destrucción del hemo en AaeUPO, MroUPO y rCciUPO, permitiéndonos comparar la inactivación por peróxido de hidrógeno entre estas enzimas. Destaca el hecho de que se necesita una concentración de aproximadamente 3 veces más peróxido de hidrógeno para alcanzar la destrucción del hemo en MroUPO y rCciUPO comparadas con AaeUPO. Para realizar una propuesta de los aminoácidos que se deben reemplazar en PaDa-I, se analizará la estructura tridimensional y la ubicación de los residuos oxidables en estas enzimas.

Otra estrategia de la ingeniería de proteínas es la evolución dirigida. A diferencia de la mutagénesis sitio dirigida, basada en un análisis racional de la vecindad del hemo, con la evolución dirigida se han obtenido variantes hasta 100 veces más estables en presencia de peróxido de hidrógeno. Los ejemplos más representativos se muestran en la Tabla 4.

Enzima	Mejora en la estabilidad H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (half-life)	Mutaciones	Referencia
Manganeso peroxidasa	4.4x en 1 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 9x en 0.1 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Las mutantes contienen 3 sustituciones (elegidas previamente) en residuos de la esfera del hemo. Sustitución común: L83I. El residuo A79 se cambió por E o S, y el residuo N81 por S o L en todas las mutantes. La mejora en la estabilidad oxidativa se dio por un mejor arreglo local alrededor del sitio de unión a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Miyazaki-Imamura et al., 2003)
Peroxidasa de <i>Coprinus cinereus</i> (CiP)	100x en 0.2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Se acumularon 7 mutaciones: I49S, V53A, T121A, M166F, E239G, M242I, Y272F. Mutaciones lejos del sitio activo, se compactó la estructura de la enzima. Se presume que el hemo está más protegido por un contacto más estrecho entre las hélices que forman a la peroxidasa.	(Cherry et al., 1999)
Peroxidasa versátil	5.3x en una relación molar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /enzima de 4000:1	Se acumularon 4 mutaciones silenciosas: <b>E37K</b> , V160A, T184M y Q202L. El nuevo residuo K37 establece un puente de hidrógeno con la Asp30 adyacente de la hélice A. Causando que estas dos hélices estén más cercanas. Este posible cambio en la posición de la hélice B (donde se encuentran los residuos catalíticos) puede afectar la unión a peróxido de hidrógeno.	(García-Ruiz et al., 2012)
Peroxidasa versátil	12x en 3000 equivalentes molares de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Se acumularon 8 mutaciones: N11D, <b>G35K</b> , <b>E40K</b> , <b>T45A</b> , <b>S86R</b> , <b>P141A</b> , F186L, T323I. La mutación P141A permite una modificación en un loop cercano al hemo y las mutaciones S86R y T45A cambian la posición de la hélice conteniendo los residuos catalíticos. Estas mutaciones pueden afectar la unión a peróxido de hidrógeno. Las mutaciones G35K, E40K impiden la unión a Mn relajando el estrés oxidativo de la enzima.	(Gonzalez-Perez et al., 2014)

Lignina peroxidasa	6x en la afinidad ( <b>Km</b> ) ante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Se acumularon 5 mutaciones: P106R, <b>Q210H</b> , L211V, <b>A243R</b> , F255L. La mutación A243R está en la superficie, pero está cerca de W171 y del grupo hemo. La mutación Q210H parece favorecer el paso del estado basal al activado de la enzima. La histidina se encuentra comúnmente en el sitio activo de enzimas similares.	(Ryu et al., 2008)
--------------------	--	---	--------------------

**Tabla 4. Mutantes de peroxidasa obtenidas por evolución dirigida donde se aumentó la estabilidad oxidativa.**

#### Estabilidad ante temperatura y solventes orgánicos

Otro de los parámetros cruciales para considerar a una enzima apta para una aplicación dada es la termoestabilidad; esta propiedad les confiere a las enzimas estabilidad cinética lo que se traduce en que la enzima se puede usar en condiciones industriales que pueden ser consideradas agresivas para los biocatalizadores, impactando en su capacidad de reutilización y como consecuencia en los costos. Además de que una elevación en la temperatura acelera las reacciones y contribuye a la solubilidad del sustrato (Xu et al., 2020). PaDa-I no es particularmente una enzima susceptible a la temperatura, su termoestabilidad, en términos de T<sub>50</sub> °C (temperatura a la que PaDa-I pierde 50% de su actividad inicial después de una incubación durante 10 min) es de 55 °C, sin embargo, un incremento en la termoestabilidad supondría una mejora en el proceso, esta generalidad le aplica a PaDa-I como biocatalizador potencial.

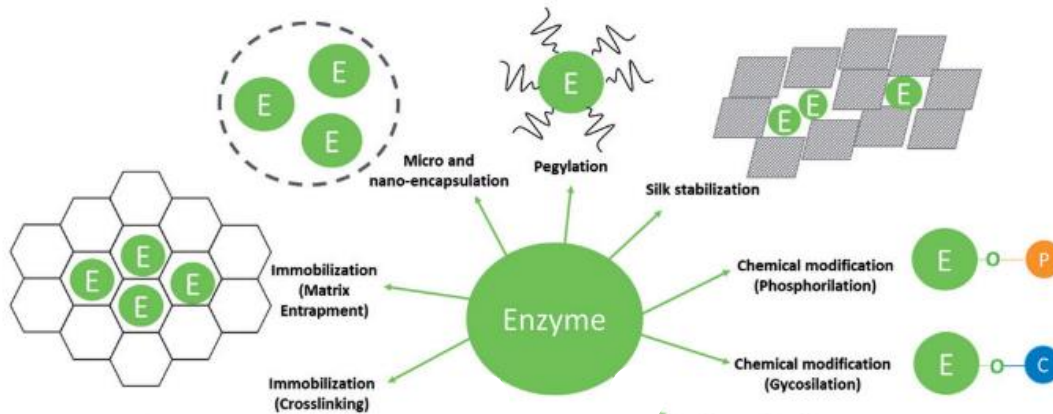
La estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos es relevante dado que a veces es necesario solubilizar los sustratos hidrofóbicos en ellos, favorecer ciertas reacciones o evitar otras. PaDa-I es capaz de catalizar reacciones de interés con sustratos hidrofóbicos (como los hidrocarburos policíclicos aromáticos), por lo que la optimización de su estabilidad ante solventes orgánicos es de importancia para diversas potenciales aplicaciones, así PaDa-I se podría usar en un disolvente que permita solubilizar adecuadamente a algún sustrato de interés sin desestabilizar su conformación y sin afectar su elevada actividad enzimática (Martin-Diaz et al., 2021). Se espera que estas optimizaciones no solo nos permitan incrementar el potencial de los procesos enzimáticos en su aplicación industrial, si no también explorar áreas que se habían excluido por la inestabilidad de las enzimas ante estas condiciones (Zhang Tong et al., 2010). Actualmente, PaDa-I pierde más del 50% de su actividad en un medio con 10% de acetonitrilo (Molina-Espeja et al., 2019), este disolvente al 10% es comúnmente utilizado para solubilizar 5-nitro-1,3-benzodioxol, sustrato estándar de PaDa-I (Poraj-Kobielska et al., 2012).

Para utilizar a las enzimas a un nivel industrial se ha considerado la estabilidad ante temperatura y solventes orgánicos como una de las características más relevantes, dadas las condiciones de un proceso industrial, y en muchos casos estas dos propiedades están relacionadas (Choi et al., 2015).

La estructura tridimensional plegada de una enzima depende de sus interacciones covalentes y no covalentes, tanto entre los residuos de la proteína como de su interacción con el solvente. Estas interacciones están estrechamente relacionadas con la estabilidad estructural de las enzimas, y de manera muy directa con la termoestabilidad de éstas. La inactivación por temperatura generalmente se da dado que, al aumentar la temperatura la energía libre de Gibbs se reduce hasta que eventualmente se vuelve menor que 0 y el estado desplegado tiene menor energía libre, por lo que la proteína se despliega. Las estrategias que se utilizan para evitar el desplegamiento tienden a aumentar las interacciones o a proteger a la enzima de su entorno (Cieplak & Sułkowska, 2005).

La inactivación de enzimas por solventes orgánicos miscibles en agua (y en general para las proteínas) ocurre porque las enzimas en solución acuosa tienen una capa formada por moléculas de agua unidas a la superficie de la proteína por puentes de hidrógeno, que es esencial para darle estructura a la proteína y para las funciones enzimáticas. Cuando se agrega un solvente miscible en agua éste desplaza algunas moléculas de agua de la superficie de la proteína causando que la estructura conformacional se desestabilice y la proteína se desnaturalice (Plou & Ballesteros, 1999). Adicionalmente, algo similar ocurre en el sitio activo de varias enzimas; muchas enzimas tienen un sitio activo hidrofóbico, por lo que la interacción con sustratos hidrofóbicos se ve favorecida sobre la interacción sustrato-agua (en el medio de reacción), cuando en el medio de reacción el agua es reemplazada con algunas moléculas del solvente orgánico, los sustratos hidrofóbicos son termodinámicamente más estables en el solvente orgánico que en el agua, se altera la termodinámica de la reacción resultando en una disminución de la actividad enzimática (Doukyu & Ogino, 2010).

Con esto podemos asumir que las proteínas tenderán a desnaturalizarse menos si ese escudo de agua se une más fuerte a los grupos funcionales en la superficie de la proteína, por lo que introducir grupos polares o cargados por modificación covalente incrementará la afinidad de la proteína por el agua. Otra estrategia es crear un microambiente donde la enzima esté más protegida de estos factores externos. Con este objetivo se han explorado estrategias muy diversas para estabilizar a las enzimas que podemos ver representadas en la Figura 5.



**Figura 5. Estrategias para estabilizar enzimas.** Tomado de Silva et al., 2018.

Ante factores inactivantes como alta temperatura y presencia de solventes orgánicos, la modificación química con polietilenglicol (PEG) ha dado buenos resultados. El PEG un polímero estabilizante, biodegradable y capaz de preservar la capacidad catalítica de una enzima. Esto se debe a los efectos que causa el confinamiento, el impedimento estérico y las preferencias de hidratación de la proteína en presencia de PEG, ya que es un polímero polar; se ha observado que el efecto protector es mejor cuando se utiliza PEG de alto peso molecular ( $\geq 5$  kDa) (Jain et al., 2020).

Esta estrategia ha sido usada en enzimas como la peroxidasa de rábano, el citocromo c y la cloroperoxidasa, logrando mejorar la eficiencia catalítica en diversos solventes, aumentar el rango de sustrato y mejorar drásticamente la termoestabilidad (Jeng & Lin, 2006) (Tinoco & Vázquez-Duhalt, 1998) (Zhi et al. 2007). Estas mejoras en las propiedades se resumen en la Tabla 5.

Proteína	Propiedad	Libre (actividad residual)	Con PEG (actividad residual)	Referencia
Peroxidasa de rábano	Estabilidad ante acetoneitrilo >40%	Inactivación	70 %	(Jeng & Lin, 2006)
Citocromo C	Rango de sustrato	8 PAH (de 20)	17 PAH (de 20)	(Tinoco & Vázquez-Duhalt, 1998)
Cloroperoxidasa	Termoestabilidad 50 min a 60 °C	Inactivación	26%	(Zhi et al. 2007)

**Tabla 5. Enzimas modificadas con polietilenglicol.** Las enzimas modificadas e información respecto a la propiedad mejorada por la modificación.

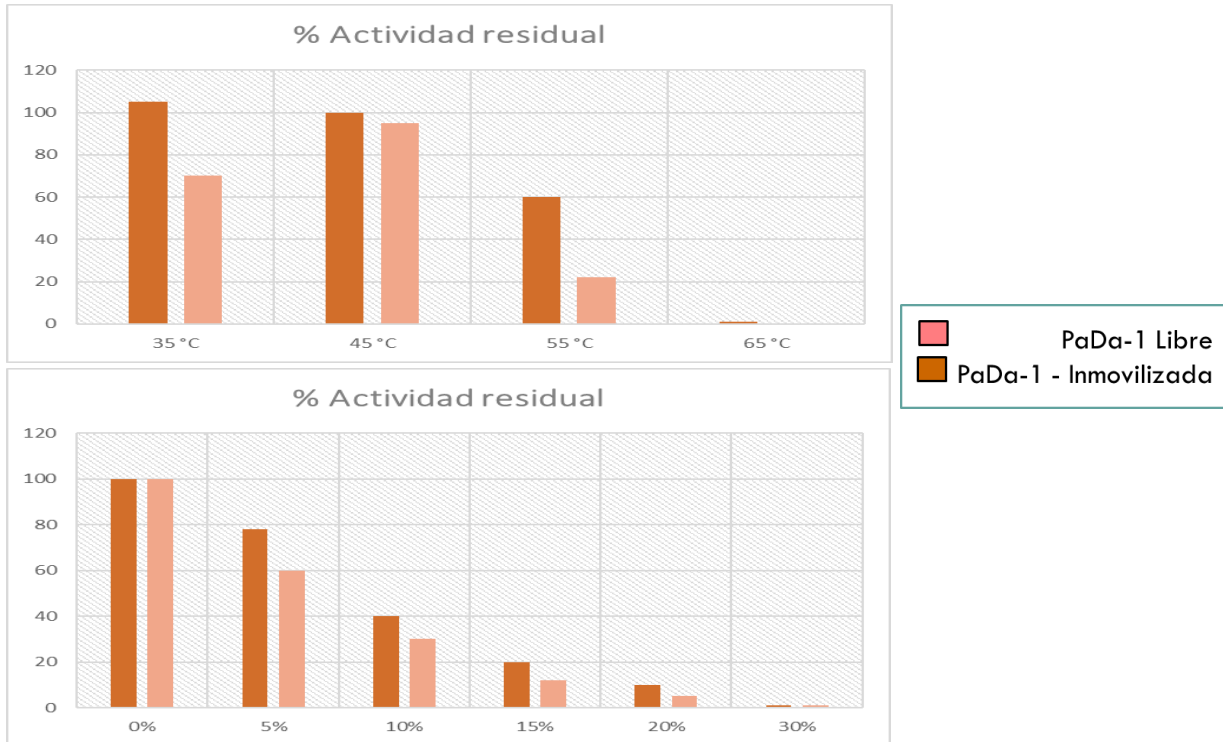
Otro polímero empleado comúnmente para modificar a las enzimas es el quitosano, con diversos grupos funcionales presentes naturalmente que le confieren polaridad y permiten la interacción (covalente y no covalente) entre éste y la enzima. Además de ser biodegradable, con resistencia a la degradación química y abundante en la naturaleza, ha demostrado que confiere a las proteínas estabilidad ante solventes orgánicos y temperatura. Ejemplo de esto son los trabajos realizados por Mohamed et al. 2013 y Zhang et al. 2009, donde se modificó la peroxidasa de rábano y la cloroperoxidasa con quitosano, creando interacciones proteína-soporte del tipo no covalente que ayudan a mantener la conformación de la enzima. Como podemos observar en la Tabla 6 se mejoró la tolerancia a solventes orgánicos y la termoestabilidad respectivamente.

Enzima	Propiedad	Libre (actividad residual)	Quitosano (actividad residual)	Referencia
Peroxidasa de rábano	Tolerancia a solventes (Butanol 10%, 1h)	55%	85%	(Mohamed et al. 2013)
Cloroperoxidasa	Termoestabilidad (50 min, 50°)	Inactivación	40%	(Zhang et al. 2009)

**Tabla 6. Enzimas modificadas con quitosano.** Ejemplos de enzimas modificadas e información respecto a la propiedad mejorada por la modificación.

La estabilidad ante temperatura y solventes orgánicos en PaDa-I se ha determinado para la enzima inmovilizada. En el trabajo realizado por Molina-Espeja et al., (2019) se inmovilizó a PaDa-I con una estrategia de directed unique-point covalent immobilization (DUCI, por sus siglas en inglés) controlando la orientación de la enzima en un soporte comercial de tiol sefarosa, reemplazando una serina por una cisteína, para llevar a cabo la modificación química (inmovilización) sobre este residuo. Se midió la actividad residual de PaDa-I por ensayos colorimétricos después de ser incubada en un medio con solventes orgánicos (0 a 30% de acetonitrilo) y a diferentes temperaturas (35 a 65 °C) por una hora y se comparó con la enzima inmovilizada. El solvente orgánico utilizado fue el acetonitrilo y respecto a esta propiedad la actividad residual de la enzima inmovilizada es solo ligeramente más elevada (menos de 20%). Algo similar ocurre en el caso de la termoestabilidad donde sólo a 55 °C hay una mejora y se retiene 3 veces más actividad residual con la enzima inmovilizada, como se muestra en la Figura 6.





**Figura 6. Actividad residual de PaDa-I.** Ensayos de % de actividad residual de PaDa-I después de 1 h de incubación a diferentes temperaturas (A) y diferentes concentraciones de acetonitrilo en el medio (B) de PaDa-I libre e inmovilizada, datos adaptados de Patricia Molina-Espeja et al., 2019.

Además de que la unión a un soporte les confiere a las enzimas estabilidad ante ciertas condiciones, también hace posible que la enzima sea reutilizada. La reutilización de enzimas permite reducir los costos de un proceso y contribuye a que el uso de enzimas se considere una tecnología rentable.

En el trabajo de Molina-Espeja et al., 2019 también se probó la capacidad de reutilización de la enzima unida al soporte. Sin embargo, debido a la inactivación por peróxido de hidrógeno, la enzima se inactivó después de dos ciclos. Más investigación para conferirle a PaDa-I resistencia a peróxido de hidrógeno podría favorecer capacidad de su reutilización de esta enzima. Pese a que en este trabajo se demostró que la inmovilización mejoró ligeramente la estabilidad de PaDa-I, esta técnica no está enfocada en mejorar la estabilidad de la enzima, ya que la unión al soporte no la protege directamente (la interacción con el soporte es solo sobre una pequeña parte de la superficie de la enzima, al ser solo un residuo el que se utilizó para la unión enzima-soporte). Es necesario explorar más técnicas que le proporcionen a PaDa-I la estabilidad deseada, además de resolver el problema de la inactivación por peróxido de hidrógeno.

La estabilidad de PaDa-I se probará ante solventes orgánicos que no son sustratos de PaDa-I, con un impacto ambiental de bajo a moderado (Capello et al., 2007) y que ya se hayan utilizado en otros trabajos (Martin-Diaz et al., 2021) para poder realizar una comparación con la bibliografía (por ejemplo el acetonitrilo, la acetona y el DMSO).

## **Justificación**

Las peroxigenasas inespecíficas son enzimas novedosas, con características muy prometedoras como biocatalizadores por la versatilidad en las reacciones que catalizan y por su regio y enantioselectividad. Hasta ahora se han podido estudiar pocas de ellas. Sin embargo, se han reportado cientos de secuencias hipotéticas en genomas de hongos, por lo que con su amplio rango de sustrato y todas las enzimas que faltan por caracterizar, estas enzimas representan una herramienta muy valiosa en diferentes ámbitos.

Resolviendo los problemas de estabilidad que presentan estas enzimas, las peroxigenasas podrían ser aplicadas en una amplia variedad de procesos (Püllmann et al., 2021). Por tanto, el propósito de este proyecto es realizar modificaciones químicas y genéticas de la variante PaDa-I con el fin de mejorar su estabilidad ante temperatura, solventes orgánicos e inactivación por peróxido de hidrógeno.

Finalmente, es importante mencionar que una de las alternativas más empleadas para generar un catalizador más adecuado para los procesos es usar ingeniería de proteínas, comúnmente acompañado de un proceso que posteriormente le da más estabilidad a la enzima como sería la unión de la enzima a un soporte para hacerla más robusta (Singh et al., 2013). En esta tesis se probarán ambas estrategias para intentar obtener un biocatalizador más estable.

## **Hipótesis:**

La estabilidad de PaDa-I ante diversos agentes puede mejorarse a través de modificaciones químicas en la superficie o a través de modificaciones genéticas que reduzcan la susceptibilidad de la enzima a oxidarse

## **Objetivo general:**

Evaluar el efecto de modificaciones químicas y genéticas llevadas a cabo en PaDa-I con el fin de mejorar su estabilidad a temperatura, solventes orgánicos e inactivación por peróxido de hidrógeno.

## **Objetivos específicos:**

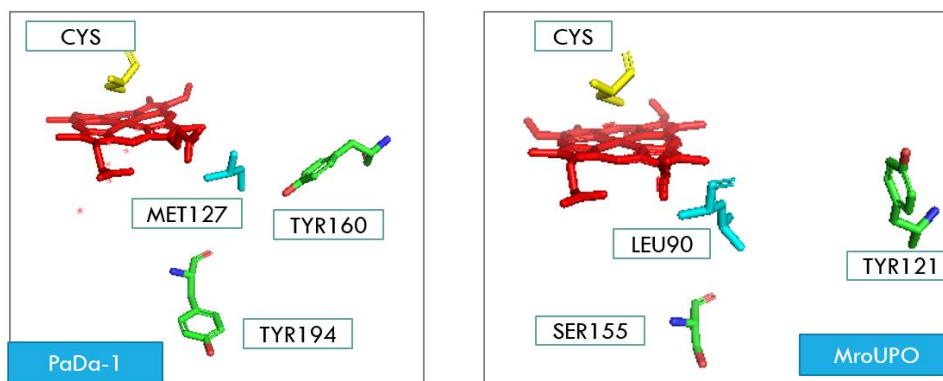
- Obtener por mutagénesis sitio dirigida variantes de PaDa-I en las cuales se reemplacen residuos oxidables en la vecindad del hemo, por residuos menos oxidables
- Evaluar la estabilidad y actividad ante peróxido de hidrógeno de las variantes de PaDa-I
- Realizar modificaciones químicas en la superficie de PaDa-I con quitosano utilizando la química de la carbodiimida o del glutaraldehído
- Realizar modificaciones químicas en la superficie de PaDa-I con polietilenglicol 5000
- Evaluar la actividad y estabilidad de PaDa-I modificada químicamente

## Estrategia experimental.

### Modificaciones genéticas.

La información que tenemos del trabajo de Karich et al. 2016 respecto a la mayor tolerancia de MroUPO y rCciUPO a peróxido de hidrógeno nos llevó a plantearnos usar ambas enzimas como modelo. La estructura cristalográfica de rCciUPO no está disponible por lo que se utilizó su secuencia para realizar un modelado por homología y obtener una estructura. Sin embargo, los residuos oxidables en PaDa-I y en rCciUPO son los mismos en las posiciones equivalentes dado el modelo. Por lo que solo se utilizó a MroUPO como modelo.

Se analizaron los residuos oxidables en la vecindad del hemo de PaDa-I, a menos de 13 Å solo encontramos metioninas y tirosinas (Met, Tyr) y se realizó el mismo análisis en MroUPO. Con un alineamiento los residuos oxidables de PaDa-I se compararon con los residuos correspondientes en MroUPO como se muestra en la Figura 7 y se propone realizar las siguientes mutaciones:



**Figura 7. Comparación de residuos oxidables.** Residuos oxidables en la vecindad del hemo de PaDa-I comparados con los residuos correspondientes en MroUPO.

MET 127 por LEU (90)

La metionina presente en PaDa-I está muy cercana al grupo hemo (a 4.3 Å), por lo que se sugiere modificarla por leucina, que sería el aminoácido equivalente presente en MroUPO y se conservaría la hidrofobicidad.

TYR 194 – SER (154)

Como podemos ver en la Figura 7, la tirosina 194 está a una distancia de 7 Å del grupo hemo, por lo que podría ser oxidada, se propone modificarla por una serina, el residuo equivalente en MroUPO, que tiene propiedades similares, en específico el grupo hidroxilo.

TYR 160 – PHE

La tirosina 160 también es un residuo oxidable, sin embargo, este residuo está también presente en MroUPO. Como podemos ver en la Figura 7 el grupo OH de la

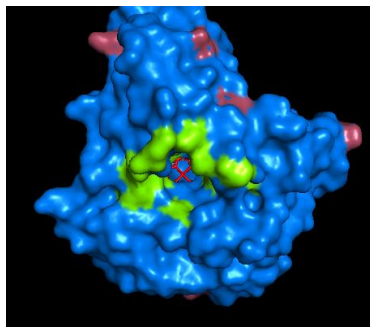
tirosina 160 está cerca del sitio activo y es susceptible a ser oxidado, por lo que su sustitución con fenilalanina evitaría la presencia del grupo OH.

El propósito de esta estrategia donde se conservan residuos similares en cuanto a cargas y tamaños es para afectar en la menor medida posible las interacciones de las cadenas laterales. Las modificaciones que se realizarán se presentan en la Figura 10.

### Modificaciones químicas.

Existen dos características importantes a considerar en PaDa-I para su modificación química o física, su elevado nivel de glicosilación y el túnel que le permite al sustrato interactuar con el sitio activo.

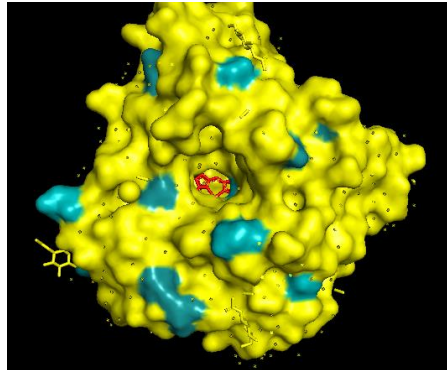
Las modificaciones químicas que se realizarán serán las modificaciones con los polímeros activados de polietilenglicol y quitosano, mediante la modificación específica de las lisinas presentes en el exterior de PaDa-I, con la intención de mantener el ambiente del túnel intacto como se muestra en la Figura 8. La modificación química más común para unir el PEG y una enzima es sobre los  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, a través de alquilación o acilación (Veronese y Mero, 2008) que se favorece a valores altos de pH ( $> 8$ ). Se utilizarán como agentes entrecruzante el cloruro cianúrico para la modificación con PEG y el glutaraldehído para la modificación con quitosano, esto lo podemos ver resumido en la Figura 10.



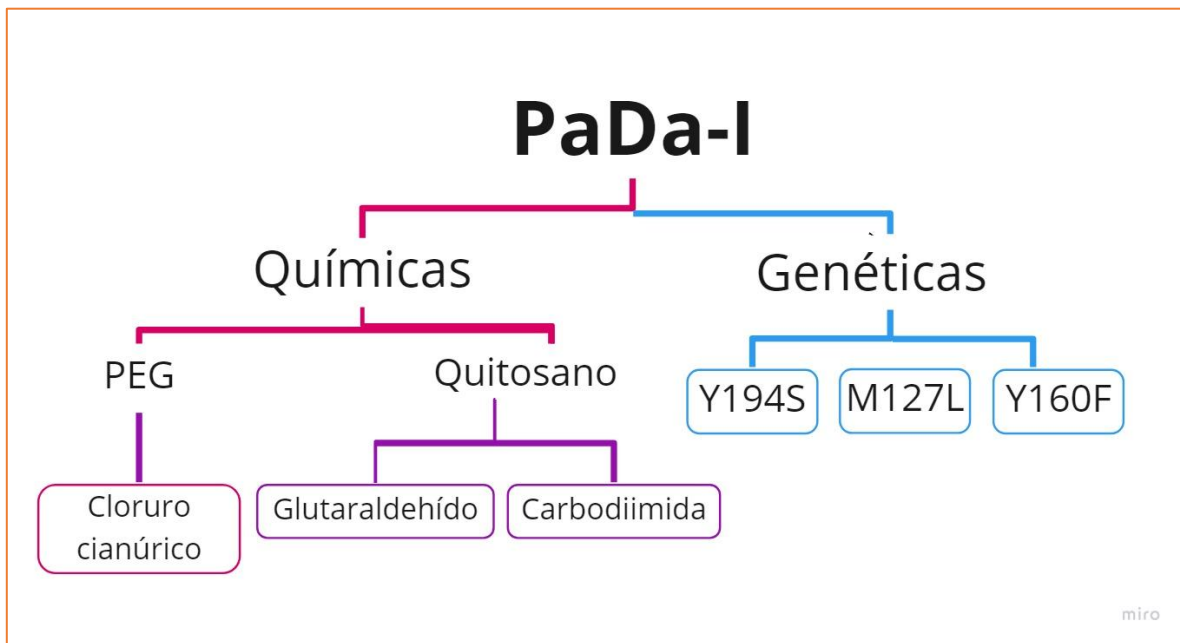
**Figura 8. Lisinas en la superficie de PaDa-I.** Las 11 lisinas de la superficie mostradas en color magenta se encuentran lejos de la entrada del túnel (verde) que permite la entrada del peróxido de hidrógeno y del sustrato al grupo hemo (en rojo) en el sitio activo.

La modificación química con quitosano también se llevará a cabo sobre los ácidos carboxílicos de la superficie de PaDa-I, de los cuales se pueden contabilizar 20. En este caso el ambiente del túnel podría verse afectado y es posible que la actividad

enzimática se vea disminuida. Como podemos ver en la Figura 10 se utilizará a la carbodiimida como entrecruzante.



**Figura 9. Ácidos carboxílicos en la superficie de PaDa-I.** Los ácidos carboxílicos de la superficie mostrados en color azul se encuentran distribuidos uniformemente sobre la superficie de PaDa-I.



**Figura 10. Estrategias experimentales para modificar a PaDa-I.**

## Metodología

### Expresión y purificación de PaDa-I

La obtención y purificación de PaDa-I se realizó de acuerdo al protocolo desarrollado por Molina-Espeja et al. 2014, y que ha sido adaptado al laboratorio de Biocatálisis Redox por Ramirez-Ramirez et al., 2020.

#### Preparación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*

En 20 mL de medio YDP (glucosa, extracto de levadura y bactopectona) con cloranfenicol a 25 mg/mL se colocó un cultivo de *S. cerevisiae* BJ5465 a 30°C con agitación de 200 rpm durante dos días.

El cultivo se refrescó en el mismo medio a una densidad óptica (600 nm) de 0.2, después de aproximadamente 6 h al alcanzar una densidad óptica de 1-1.2, se centrifugan las células a 5,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces más con agua MiliQ estéril. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de amortiguador de transformación del kit de transformación de levadura de Sigma-Aldrich.

#### Transformación por choque térmico de *S. cerevisiae*

Se colocó un tubo de 1.5 mL estéril con 10 µL de DNA de testículos de salmón (kit de transformación de levadura de Sigma-Aldrich), 100 ng del plásmido pJRoC30 con el gen de PaDa-I, 100 µL de las células competentes obtenidas y 600 µL del amortiguador de plaqueo del mismo kit. Se incubó el tubo a 30 °C durante 30 min en agitación a 700 rpm. Se añadieron 71 µL de dimetilsulfóxido y se incubó el tubo a 42 °C durante 15 min; al finalizar este tiempo el tubo se pone en hielo durante 2-3 min. Se centrifugaron los tubos 2 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de agua MiliQ estéril. Se plaquearon 100 µL de las células transformadas en placas Petri en un medio de selección SC (synthetic complete) deficiente de uracilo, con glucosa como fuente de carbono por dos días a 30 °C. Las células capaces de crecer serán únicamente las transformadas, ya que el plásmido pJRoC30 les permite a las levaduras sintetizar uracilo.

Componente	Concentración de stock	Volumen	Concentración final
YNB	67 g/L	20 mL	6.7 g/L
AA sin uracilo	19.2 g/L	20 mL	1.9 g/L
Glucosa	20% p/v	20 mL	2 %
Clorafenicol	25 mg/mL	200 µL	25 µg/mL
Bactogar	26 g/L	140 mL	18 g/L

**Tabla 7. Componentes del medio SC-glucosa** en un volumen de 200 mL para crecer las células transformadas de *S. cerevisiae*. **Los componentes de este medio se esterilizan por filtración excepto el agar.**

## Selección de colonias y expresión

Se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 20 mL de medio SC-rafinosa, se utiliza rafinosa en lugar de glucosa para no inhibir la entrada del inductor (galactosa). 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 0.1.

Componente	Concentración del stock	Volumen	Concentración final
YNB	67 g/L	20 mL	6.7 g/L
AA sin uracilo	19.2 g/L	20 mL	1.92 g/L
Rafinosa	20% p/v	20 mL	2 %
Clorafenicol	25 mg/mL	200 µL	25 µg/mL
Agua		140 mL	

**Tabla 8. Componentes del medio SC-rafinosa** en un volumen de 200 mL para crecer las células transformadas de *S. cerevisiae* antes de pasar al medio de expresión. **Los componentes de este medio se esterilizan por filtración excepto el agua.**

Una vez que la densidad óptica alcanzó un valor de 1-1.2 asegurándonos que las células están en su fase exponencial, se colocaron 100 mL del cultivo en un matraz con 900 mL de medio de cultivo de expresión (los componentes se describen en las Tablas 9 y 10) que contiene a la galactosa como fuente de carbono e inductor del gen de PaDa-I. Este medio se incubó a 26-28 °C y 220 rpm, se monitoreo por 72 h el crecimiento por densidad óptica, así como la expresión de la enzima por ensayos de actividad peroxidasa. Después de las 72 h de incubación, el medio se centrifugó a 9,000 rpm a 4 °C durante 20 min y se recuperó el sobrenadante.

Esterilización en autoclave	
Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Fosfato de potasio monobásico	7.62
Fosfato de potasio dibásico	0.69
Sulfato de magnesio	0.246
Agua	764 mL

**Tabla 9. Componentes esterilizados en autoclave del medio de expresión de galactosa para 1 L de cultivo de *S. cerevisiae***



Esterilización por filtración			
Componente	Concentración del stock	Volumen	Concentración final
Galactosa	20% p/v	100 mL	2%
FeCl <sub>3</sub>	16.2 g/L	5 mL	100 mM
Etanol	-	30 mL	3%
Clorafenicol	25 mg/mL	1 mL	25 µg/mL

**Tabla 10. Componentes esterilizados por filtración del medio de expresión de galactosa para 1 L de cultivo de *S. cerevisiae*.**

#### Purificación de PaDa-I

Este extracto crudo se precipitó mediante “salting out” con sulfato de amonio (85% de saturación a 4 °C). Terminado de disolver el sulfato de amonio, se dejó reposar 1 h, se centrifugó (9,000 rpm durante 20 min a 4 °C) para obtener un precipitado que fue resuspendido en 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 7). Posteriormente, fue dializado contra la misma solución con una membrana con corte de 12 kDa por 16 h.

El extracto dializado se centrifugó una vez más (10,000 rpm durante 20 min a 4°C) y se cambió a una solución amortiguadora de succinatos (10 mM, pH 4.3) en un volumen de aproximadamente 15 mL. El extracto se pasó por una columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte (Macro-Prep High S), se realizaron lavados con solución amortiguadora de succinatos y la enzima fue eluida con una solución del amortiguador de succinatos con NaCl (150 mM). Las fracciones con mayor actividad peroxigenasa específica (oxidación de NDB) se colectaron, se concentraron por ultrafiltración (AMICON) con una membrana de corte de 30 kDa y la solución amortiguadora se cambió por solución amortiguadora TRIS (10 mM, pH 7.0) en un volumen de 5 mL.

La muestra obtenida se pasó por una columna 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 del amortiguador adicionado con NaCl 120 mM. Las fracciones con mayor actividad peroxigenasa específica se colectaron, se concentraron por ultrafiltración (AMICON) con una membrana de corte de 10 kDa y la solución amortiguadora se cambió por solución amortiguadora fosfatos (50 mM, pH 7.0) para su almacenamiento. PaDa-I se almacenó a una concentración de 2-3 mg/mL, para evitar su inactivación.

PaDa-I se analizó bajo condiciones desnaturalizantes mediante un SDS-PAGE en las diversas etapas de purificación descritas.

## Cinética de la oxidación de sustratos estándar

### Actividad peroxigenasa

La oxidación de NBD se midió en un ensayo espectrofotométrico en una reacción que se siguió por 60 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 250-500 nM de enzima en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH=7.0 y 20% de acetonitrilo para solubilizar al NBD. La reacción contiene  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), NBD (0.5 mM) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH= 7.

### Actividad peroxidasa

La oxidación del ABTS se midió en un ensayo espectrofotométrico en una reacción que se siguió por 60 segundos. A una longitud de onda de 418 nm el radical catiónico del ABTS, producto de la oxidación del ABTS, tiene un coeficiente de extinción molar de  $36,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las reacciones se realizaron en 1 mL con 5-50 nM de enzima en solución amortiguadora de citrato de sodio y fosfato de sodio 100 mM, pH=4.4,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM), ABTS (2 mM).

## Reemplazo de residuos oxidables en la vecindad del hemo

Se descargaron del PDB (Protein Data Bank) las estructuras cristalográficas de PaDa-I (PDB: 5OXU), AaeUPO (PDB: 2YP1) y MroUPO (PDB:5FUK). Se utilizó el programa SwissModel (Expassy) para proponer un modelo generado por homología para rCciUPO, tomando como referencia la estructura de la UPO de *A. aegerita*.

Se utilizó el programa Pymol para realizar el análisis de las estructuras de PaDa-I, MroUPO y rCciUPO (modelo). Se analizaron los residuos oxidables alrededor del grupo hemo de PaDa-I, respecto a la esfera que corresponde a 15 Å. Se identificaron los residuos oxidables: M127, Y194 y Y160.

En los modelos de MroUPO y rCciUPO se identificaron los residuos correspondientes en un alineamiento de secuencia a los residuos oxidables mencionados. En rCciUPO, los residuos oxidables son los mismos. En MroUPO los residuos M127 Y Y194 corresponden a una leucina y una serina, el residuo Y160 también corresponde a una tirosina en MroUPO.

Observando el alineamiento de las estructuras, es evidente que pese a ser el mismo residuo la orientación es distinta, el grupo hidroxilo de Y194 en PaDa-I está más

cerca del grupo hemo (7.3 Å) comparado con el grupo hidroxilo Y121 en MroUPO (12.3 Å). Se decidió reemplazar este residuo por el equivalente sin el grupo hidroxilo: una fenilalanina.

### Mutación sitio dirigida de PaDa-I

PaDa-I en el plásmido pJR0C30 se envió a la compañía “Catálisis” para sintetizar las mutantes sencillas M127L, Y194S y Y160F. Para poder transformar y producir las variantes en *S. cerevisiae*, se propagó el plásmido conteniendo las variantes en *E. coli*.

### Producción y purificación de variantes de PaDa-I

Transformación en *E. coli*: plásmidos con las variantes M127L, Y194S y Y160F.

Protocolo adaptado de Gonzales et al., 2013.

En 5 mL de medio líquido LB (triptona, extracto de levadura y NaCl) se inocularon células DH5 $\alpha$  y se incubó a 37 °C a 200 rpm por una noche. Se pusieron 100  $\mu$ L de este cultivo en agar LB y se incubó durante 6 h o hasta obtener una capa visible de células, y se siguió el procedimiento descrito paso a paso a continuación.

- 1.- Con un asa estéril recoger 2 mm de esta capa 3 veces y depositar en un tubo de 1.5 mL con 1 mL de agua estéril a 4°C.
- 2.- Centrifugar 5 min a 9,000 rpm a 4 °C, descartar el sobrenadante y realizar dos lavados más.
- 3.- Resuspender en 40  $\mu$ L de agua estéril.
- 4.- Agregar 100 ng de plásmido, mezclar y electroporar.
- 5.- Resuspender las células transformadas en 1 mL de medio LB con ampicilina 25 mg/mL.
- 6.- Incubar las células a 37 °C con 200 rpm por 30 min.
- 7.- Plaquear en agar LB 100  $\mu$ L de cultivo. Incubar a 37°C sin agitación.
- 8.- Finalmente seleccionar una colonia y ponerla en 2 mL de caldo LB con ampicilina e incubar a 37 °C toda la noche.

### Purificación de plásmidos de las variantes

Se purificaron los plásmidos mediante el kit Zyppy Plasmid Miniprep de Zymo Research. La concentración de los plásmidos fue evaluada en un equipo Nanodrop.

### Transformación y producción de variantes en *S. cerevisiae*

La obtención de las variantes de PaDa-I con las mutaciones M127L, Y194S y Y160F se realizó con el mismo procedimiento descrito anteriormente para PaDa-I,

monitoreando el crecimiento y la expresión de la enzima por ensayos de actividad peroxidasa, la incubación se llevó a cabo por 7 días en el ensayo preliminar para ver si había expresión de las variantes.

### Purificación de las variantes de PaDa-I.

Las variantes se purificaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para PaDa-I, con la diferencia de que las variantes no tenían actividad enzimática suficiente para ser detectadas durante la purificación. Se tomaron exactamente las mismas fracciones (de mayor actividad peroxigenasa específica) que al purificar PaDa-I eluían de ambas columnas. Estas muestras solo pudieron ser concentradas hasta 0.2-0.6 mg/mL.

### Estabilidad ante peróxido de hidrógeno

La estabilidad de la enzima se determinó realizando ensayos de actividad residual, en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7) a 1 mM de peróxido de hidrógeno y 25 °C. La cantidad de proteína se ajustó para obtener en las reacciones un cambio de absorbancia entre 0.1 y 1, a lo largo de 1 min.

Para los ensayos de PaDa-I, M127L y Y160F se utilizaron 0.075, 1.5 y 4.5 µg de proteína respectivamente. Se incubaron las enzimas por 2 min, se tomaron alícuotas cada 30 s para medir la actividad residual por oxidación de ABTS y finalmente, los datos se ajustaron a un modelo de inactivación de primer orden para determinar el tiempo de vida media de la enzima.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Modificaciones químicas

#### Modificación con polietilenglicol

#### Activación del polietilenglicol con cloruro cianúrico

La activación del polietilenglicol 5000 Da se realizó de acuerdo con lo reportado por (Abuchowski et al., 1977). Las muestras de PEG (10 mmoles) se disolvieron en 40 mL de tolueno seco conteniendo 1 g de carbonato de sodio, enseguida se agregaron 30 mmoles de cloruro cianúrico y la mezcla se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y en agitación suave.

La solución resultante se filtró por precipitación en frío con éter de petróleo (80 mL), se filtró para recuperar el precipitado, y se lavó con más éter de petróleo hasta que el lavado no contenía cloruro cianúrico (determinado espectrofotométricamente). El grado de activación del PEG se determinó cuantificando los átomos de cloro en

muestras de 0.125 g de PEG activado después de hidrolizar las muestras toda la noche en amortiguador de boratos (pH 10, 40 mM) seguido por una titulación con nitrato de plata, el precipitado formado se secó y pesó para realizar una curva de calibración para el cálculo de cloruros por mol de PEG.

#### Modificación de PaDa-I con polietilenglicol activado

Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo reportado por García-Arellano et al., 2002: 0.6 mg de PaDa-I se disolvieron en 300  $\mu$ L de amortiguador de boratos (pH 10, 40 mM) y se agregó 0.05 g de polietilenglicol activado, con un exceso molar de 10 sobre los 11 residuos de lisina en la superficie de la enzima, se dejó a 4 °C toda la noche en agitación suave.

Para evaluar la modificación se realizó un gel SDS-PAGE y posteriormente se separó la enzima modificada de la libre por ultrafiltración con una membrana de 100 kDa. El cálculo de la actividad específica se determinó restando la proteína libre (determinada por Bradford) de la proteína inicial en la reacción.

#### Modificación con quitosano

Para la solución de quitosano se pesaron 0.01 g de quitosano (50-190 kDa) y se disolvieron en 1 mL de ácido acético 1%.

La determinación de proteína de los siguientes conjugados se llevó a cabo por la técnica de Lowry.

#### Modificación de PaDa-I con quitosano y glutaraldehído

A 500  $\mu$ L de la solución de quitosano (peso molecular: 50-190 kDa; presente en un exceso molar de 8 sobre los residuos de lisina en la superficie de PaDa-I, que por el número de monómeros del quitosano resulta en un exceso de 216 respecto a las lisinas) se le agregaron 500  $\mu$ L de amortiguador fosfatos pH 7 0.4 M, se agregó glutaraldehído al 1%, además de 1 mg de PaDa-I y se dejó a 4 °C toda la noche en agitación suave. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 500  $\mu$ L más de amortiguador, se agitó y centrifugó nuevamente, se realizaron un total de 3 lavados. Para evaluar la modificación se realizó un gel SDS-PAGE.

#### Modificación de PaDa-I con quitosano y carbodiimida

Es importante recordar que esta reacción se lleva a cabo sobre los ácidos carboxílicos, PaDa-I en la superficie tiene 20, aunque algunos de estos residuos si están cerca del túnel por lo que podrían afectar su actividad.

A 400  $\mu$ L de amortiguador MES pH 5 500 mM se agrega 0.2 mg de PaDa-I y carbodiimida en un exceso molar de 1000, se agita, y enseguida se agregan 100  $\mu$ L de la solución de quitosano, dando un exceso molar de 4; se dejó reaccionar en agitación suave y a temperatura ambiente por 2 h.

Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 500 µL más de amortiguador, se agitó y centrifugó nuevamente, se realizaron un total de 3 lavados. Para evaluar la modificación se realizó un gel SDS-PAGE.

### **Termoestabilidad**

La termoestabilidad de la enzima se determinó realizando ensayos de actividad residual, a temperaturas de 30, 40, 50 y 60 °C. Se incubó a la enzima a cierta temperatura por 1 h, se tomaron alícuotas cada 10 minutos para medir la actividad residual por oxidación de ABTS, y finalmente, se construyó una gráfica que se ajustó a un modelo de inactivación de primer orden para determinar el tiempo de vida media de la enzima de acuerdo con su constante de inactivación.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado

### **Estabilidad ante solventes orgánicos**

La estabilidad a solventes orgánicos se determinó seleccionando entre disolventes que ya se habían probado para PaDa-I en la literatura para tener un punto de comparación (Molina-Espeja et al., 2014; Martin-Diaz et al., 2019).

La estabilidad ante DMSO se determinó realizando ensayos de actividad residual a 60% de DMSO. Se incubó a la enzima durante 30 h a temperatura ambiente en amortiguador de fosfatos pH 7, 50 mM y a 60% de DMSO v/v. La actividad residual se determinó por oxidación de ABTS y finalmente se construyó una gráfica para determinar la constante de inactivación.

La estabilidad ante acetona se determinó realizando ensayos de actividad residual a 60% de acetona. Se incubó a la enzima durante 25 h a temperatura ambiente en amortiguador fosfatos pH 7, 50 mM y a 60% de acetona v/v. La actividad residual se determinó por oxidación de ABTS a las 0 y 25 h.

### **Análisis estadísticos**

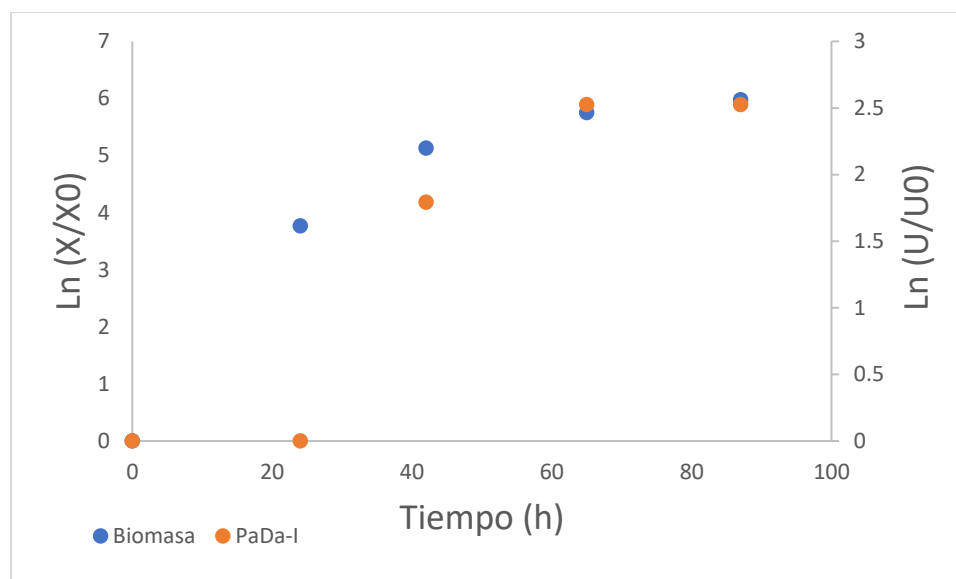
Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para los análisis estadísticos se utilizó el software Prism. Se realizaron pruebas t (T de student) de las muestras suponiendo varianzas iguales para determinar si había una diferencia estadísticamente significativa (P value < 0.05) entre los datos de actividad residual.

## Resultados y discusión

### 1.-Producción y purificación de PaDa-I

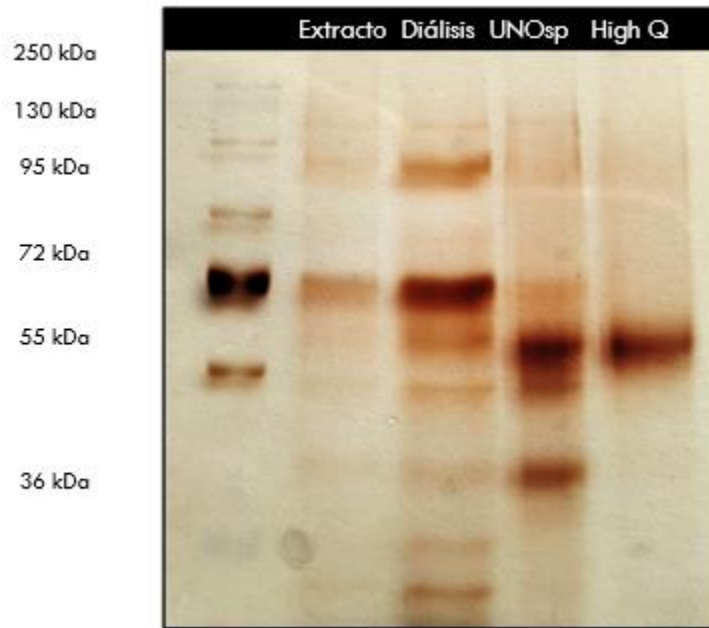
Los resultados obtenidos de la producción de PaDa-I por el cultivo de *S. cerevisiae* son consistentes con lo ya reportado respecto a valores de actividad enzimática y proteína (mg) por litro (Molina-Espeja, 2016). El crecimiento de PaDa-I monitoreado durante 72 h nos da como resultado los valores de crecimiento presentados en la Figura 11, en conjunto con los valores de expresión de PaDa-I en unidades de actividad volumétrica (U/mL) con el sustrato ABTS.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento de las levaduras y de producción de PaDa-I.

Una vez tratada la muestra con el protocolo de purificación previamente descrito por nuestro grupo (Ramírez, 2021), para evaluar la pureza electroforética de PaDa-I se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y se encontró que estaba presente la banda con un peso molecular que corresponde a 52 kDa (Fig. 12). Con una pureza electroforética de 91.8% determinado mediante el software ImageJ.

El valor de Rz (el cociente de la absorbancia del pico Soret y 280 nm) de PaDa-I purificada fue de 1.9, también corresponde con el característico de la enzima pura (Rz=2) (Molina-Espeja, 2016).



**Figura 12. Gel SDS-PAGE con las etapas de purificación de PaDa-I.** El peso molecular de PaDa-I es de 52 kDa, en el extracto no podemos identificar claramente la banda correspondiente, debido a la presencia de otras proteínas presentes en mayor proporción, es hasta la purificación con la primera columna que la banda se puede apreciar claramente, sin embargo, solo vemos la banda correspondiente a PaDa-I al final de la purificación. La tinción se realizó con plata.

La purificación de PaDa-I se llevó a cabo exitosamente, como podemos ver en la Tabla 11, con un rendimiento final del 69% y un factor de purificación de 286 en 3 pasos de purificación.

<b>Purificación PaDa-I</b>							
	Volumen	Actividad volumétrica	Proteína	Actividad específica	Actividad total	Factor de purificación	Rendimiento
	mL	U/mL	µg/mL	U/mg	U		%
<b>Extracto</b>	2750	2.61	506.6	5.15	7177.5	1	100
<b>Diálisis</b>	72	117.5	1820	64.56	8460	12.5	118
<b>High S</b>	10	481.4	1022	471.115	4814.8	91.4	67
<b>High Q</b>	1.1	4555.5	5376	847.375	5011.05	164.4	69

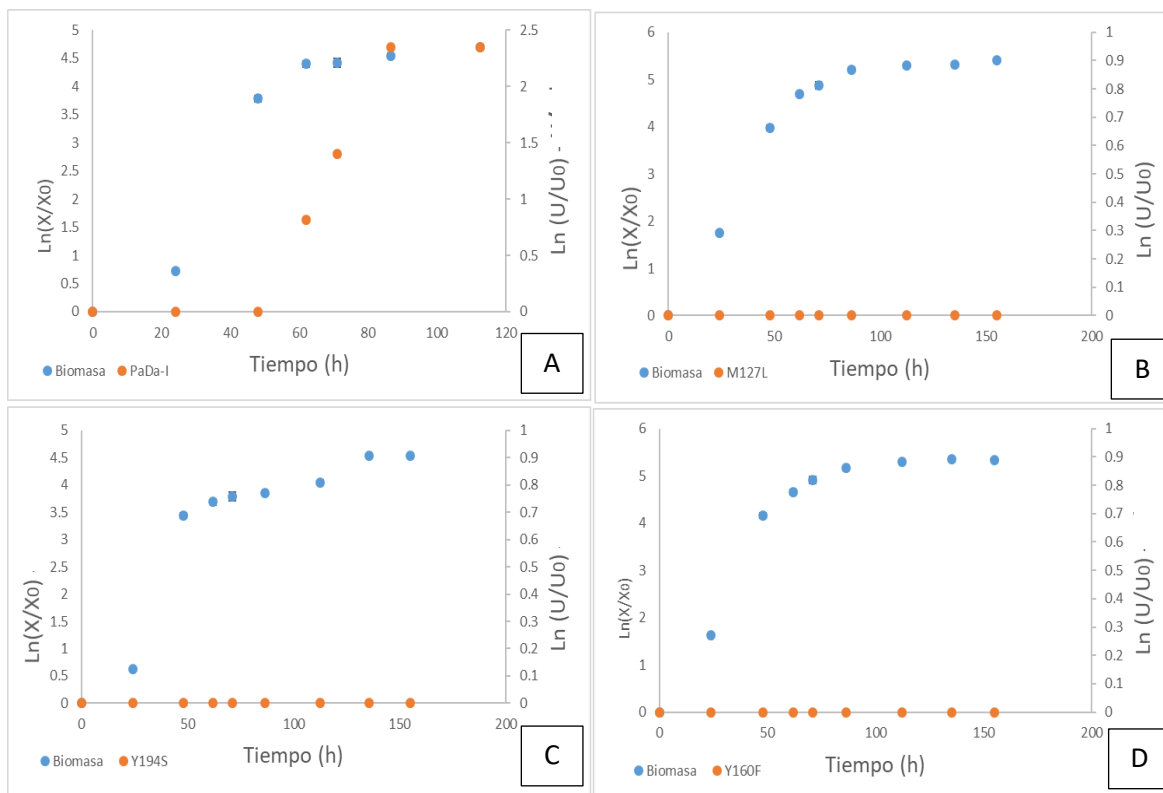
**Tabla 11. Purificación de PaDa-I** de acuerdo con el protocolo descrito en trabajos previos.



## 2.-Detección de actividad peroxigenasa de mutantes en cultivos de levadura

El crecimiento de los cultivos de levadura transformadas con los genes de las mutantes sencillas de PaDa-I fue monitoreado durante 7 días (Fig. 13); como comparación se muestran los valores de expresión de enzima para cada una de las mutantes en unidades de actividad volumétrica (U/mL) con el sustrato ABTS y con PaDa-I como control positivo.

Las condiciones de expresión utilizadas para PaDa-I y las mutantes son las mismas. El cultivo se extendió hasta 7 días. Como podemos observar en la Figura 13, el crecimiento de las levaduras expresando PaDa-I y las levaduras transformadas con los genes de las variantes es similar. Sin embargo, no fue posible detectar por el ensayo de actividad enzimática con ABTS la presencia de la actividad correspondiente en ningún cultivo de las mutantes sencillas.

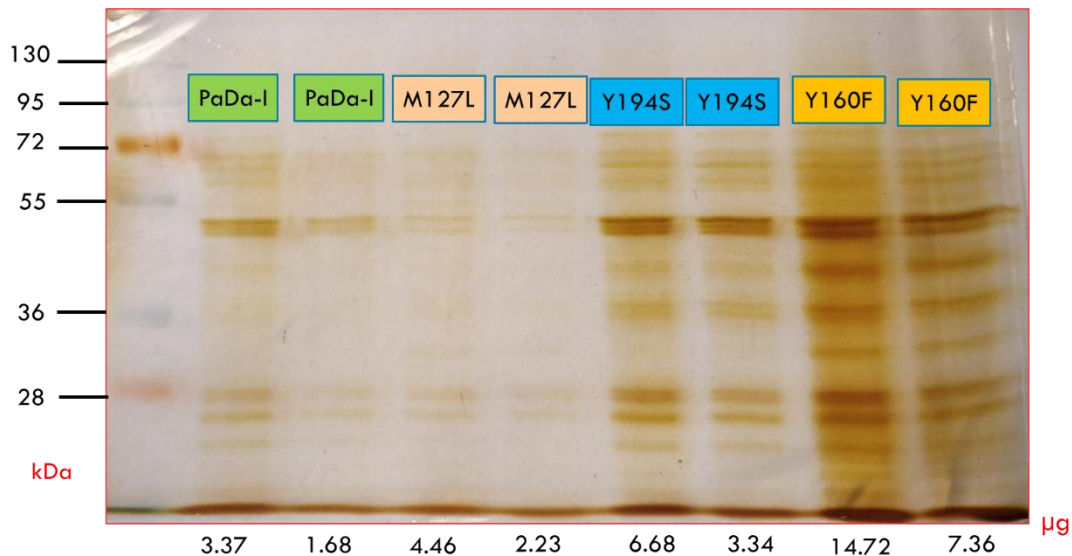


**Figura 13. Cinética de crecimiento de las levaduras y de actividad enzimática para PaDa-I (A) y las mutantes M127L (B), Y194S (C) y Y160F (D).**

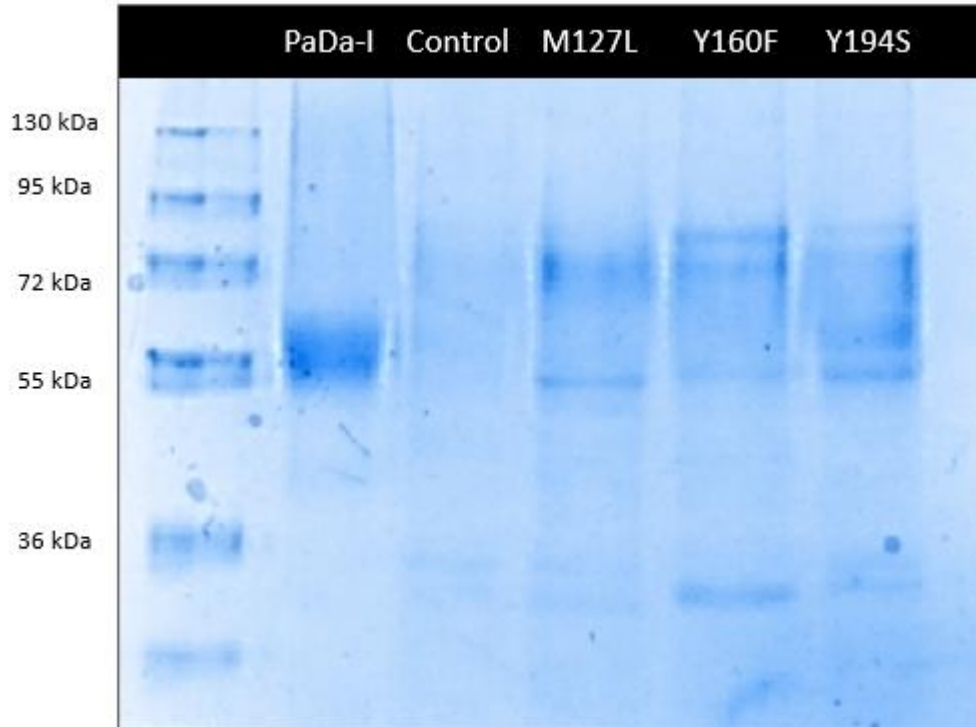
Comparando los valores de crecimiento (todos muy similares) podemos pensar que las variantes de PaDa-I no se están produciendo. La otra posibilidad es que, sí se están produciendo, pero no son activas o su actividad es muy baja. Para tener más

información respecto a la presencia o ausencia de actividad se procedió a concentrar el extracto crudo 100 veces.

El extracto concentrado se analizó por electroforesis (Figura 14). El SDS-PAGE se tiñó con plata para asegurar la visualización de las proteínas poco concentradas en el extracto. Podemos ver bandas para PaDa-I y las mutantes a aproximadamente 52 kDa. Aunque esto es un indicio de que se están produciendo las mutantes, se decidió realizar un par de pasos de enriquecimiento, por la falta de certeza al haber tantas proteínas en el extracto. Se realizó el tratamiento de purificación a las muestras de los cultivos de las mutantes, de acuerdo con el procedimiento descrito en la metodología. Podemos observar en la Figura 15 a PaDa-I y señales que podrían corresponder a las variantes en un peso correspondiente cercano a 52 kDa. Esta banda está presente al enriquecer las muestras (realizar un par de pasos de purificación) para las tres variantes, aunque en menor cantidad para M127L.

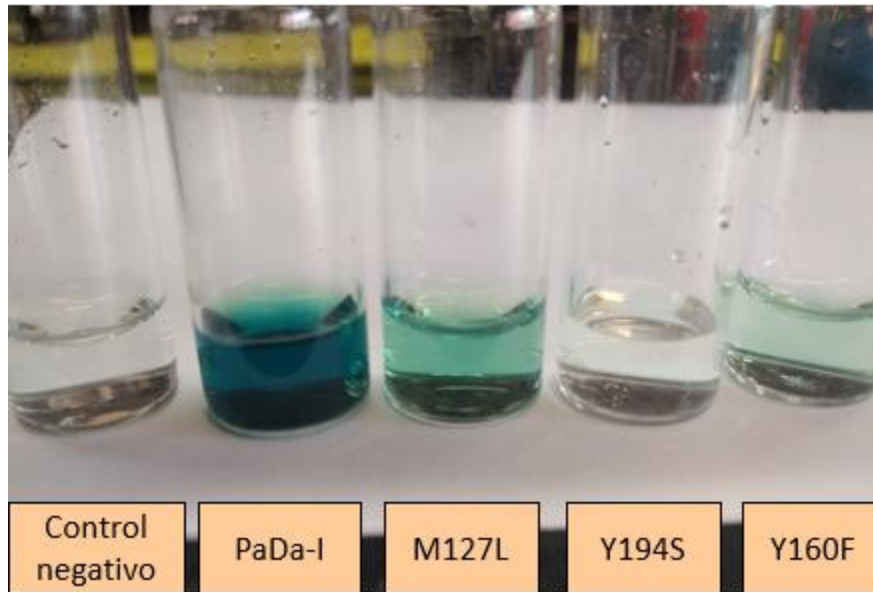


**Figura 14. SDS-PAGE de los extractos concentrados de PaDa-I, M127L, Y194S y Y160F. La concentración de proteína es distinta en cada uno de los carriles.**



**Figura 15. Gel SDS con las muestras enriquecidas según el protocolo de purificación de PaDa-I. M127L, Y160F, Y194S y el control de la levadura sin el gen de PaDa-I. Se usaron 15  $\mu$ g de las muestras enriquecidas.**

Con estas muestras enriquecidas se realizó un ensayo cualitativo para ver si las mutantes tenían actividad. Podemos ver una imagen de este ensayo en la Figura 16.



**Figura 16. Ensayos cualitativos de actividad peroxidasa en los extractos enriquecidos.** Se probaron los extractos de los cultivos de levaduras produciendo PaDa-I y las variantes M127L, Y104S y Y160F, el control negativo no contiene extracto enzimático.

Las mutantes M127L y Y160F sí tienen actividad, mientras que la variante Y194S no parece tener actividad o si la tiene es tan baja que no se puede ver. Se continuó analizando a las mutantes M127L y Y160F en términos de su actividad y su constante de inactivación ante  $H_2O_2$

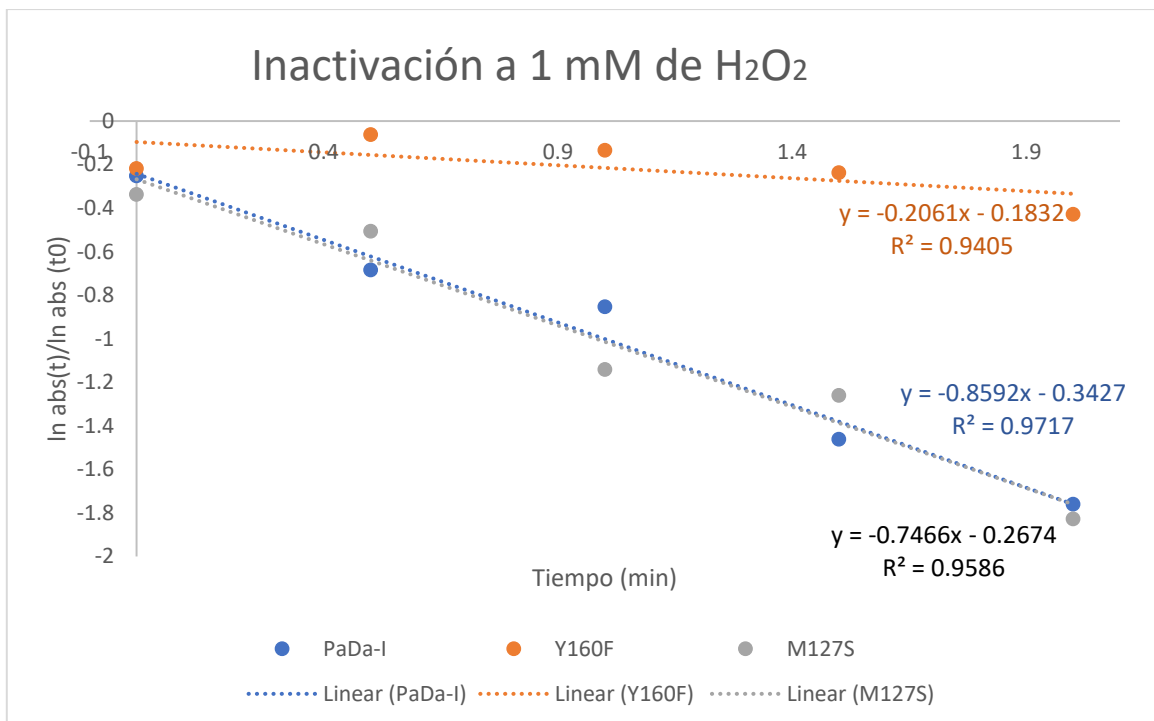
### 2.1-Estabilidad ante peróxido de hidrógeno de las variantes

La estabilidad ante peróxido de hidrógeno de las mutantes y PaDa-I se ve reflejada en los datos ajustados a un modelo de primer orden; al graficar el logaritmo natural de la actividad residual vs tiempo, se obtiene una recta cuya pendiente que corresponde a  $-k_i$  (constante de inactivación). Una constante mayor, es un reflejo de una inactivación más rápida, y es inversamente proporcional al tiempo de vida media.

Para PaDa-I el tiempo de vida media en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno es de 0.85 min. Mientras que la variante M127L tiene un tiempo de vida media muy similar de 0.78 min y la variante Y160F tiene un tiempo de vida media mayor, que corresponde a 2.3 min (Figura 17).

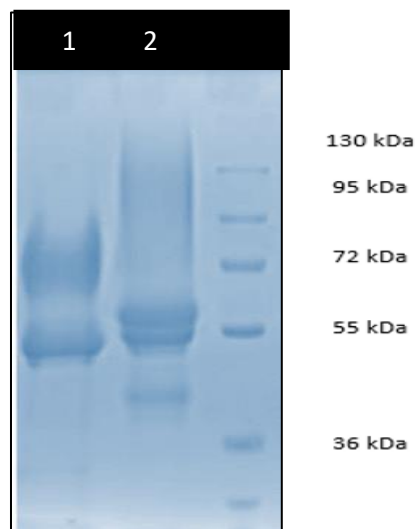
La mutante M127L tiene una actividad enzimática muy baja en comparación con PaDa-I y no aumentó su estabilidad oxidativa. Por estos motivos M127L no se siguió analizando en este proyecto. Y160F es aparentemente más estable a peróxido de hidrógeno en comparación con PaDa-I. Esta comparación no está hecha con la

Y160F pura, según el SDS-PAGE (Figura 15) Y160F tiene un 3.7% de pureza electroforética mientras que PaDa-I tiene 22.61 %.



**Figura 17. Ajuste a un modelo de primer orden de la actividad residual ante 1 mM de peróxido de hidrógeno de PaDa-I y las mutantes Y160F y M127S.**

Con el propósito de obtener datos confiables se decidió incrementar la pureza de Y160F como se muestra en el siguiente SDS-PAGE (Figura 18).



**Figura 18. SDS-PAGE de la mutante Y160F. 1.- Mutante Y160, 2.- PaDa-I.**

En estas muestras, la actividad enzimática por mg de proteína de Y160F resultó ser de 0.59 U/mg. Comparada con PaDa-I cuya actividad es de 500 U/mg, la variante Y160F tiene muy poca actividad, aproximadamente 100 veces menos que la enzima parental PaDa-I.

Finalmente, se repitieron los ensayos de estabilidad ante 1 mM de peróxido de hidrógeno con las muestras más puras de PaDa-I y Y160F. La mutante Y160F pierde 90% de actividad en 60 segundos. Mientras que PaDa-I pierde 57% de actividad en 60 segundos. El aumento en la estabilidad que se había visto en los ensayos preliminares no se confirmó; a pesar de que la constante de inactivación se considera independiente de la cantidad de proteína puesta en la reacción, la presencia de otras proteínas podría ser un factor involucrado en la estabilidad oxidativa que se observó para Y160F. En otros trabajos, hemos observado que la presencia de proteínas no relacionadas incrementa la estabilidad oxidativa de las metaloproteínas (Ramírez, 2021) (Torres, 2021) (Avelar, 2017), probablemente este incremento se deba a la oxidación de estas proteínas no relacionadas en su superficie; lo que retrasa la oxidación del grupo hemo en PaDa-I (o sus variantes).

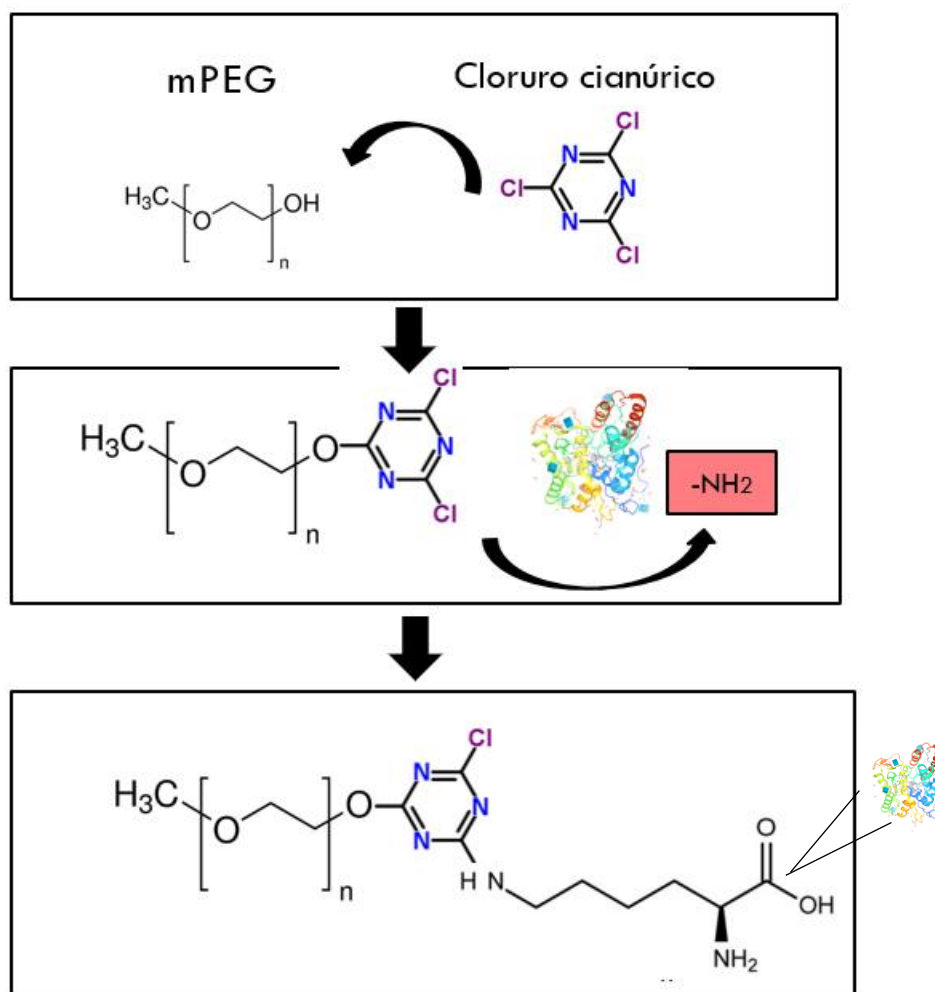
A pesar de que la modificación racional de residuos alrededor del sitio activo ha dado resultados para algunas enzimas, no ha funcionado en otros casos. Incluso, no todos los reemplazos pueden ser efectivos para la misma enzima. En el trabajo realizado por (Bao et al., 2014) se modificaron 4 metioninas alrededor del sitio activo y se reemplazaron por leucina o fenilalanina. Dos de estos reemplazos aumentaron considerablemente la estabilidad oxidativa de la enzima (10 veces) mientras que los otros dos reemplazos no modificaron esta estabilidad. En el trabajo realizado por (Ogola et al., 2010) se modificaron metioninas cerca del sitio activo. Se reemplazaron por los residuos L, I y F. El reemplazo en la posición 401 por fenilalanina aumento la estabilidad oxidativa mientras que la sustitución en los otros dos aminoácidos no; probablemente debido a una reducción en tamaño de la cavidad del grupo hemo. Para la posición 451, se aumentó la termoestabilidad únicamente con la sustitución de Isoleucina. Se especula que ambas mutaciones dieron como resultado una alteración en el efecto “tunneling” suprimiendo o retrasando el proceso de inactivación.

Por estas razones el reemplazo de aminoácidos de bajo potencial redox en cualquier parte de la secuencia de la proteína es específico para cada enzima. La pérdida de la actividad enzimática puede ocurrir cuando se reemplazan los aminoácidos oxidables por otros inertes (Sáez-Jiménez et al., 2015) (Ogola et al., 2010). Se considera que existe un balance entre actividad y estabilidad de las enzimas (ante peróxido de hidrógeno, solventes o temperatura) y PaDa-I no es la excepción (Martin-Diaz et al., 2021). Otra estrategia para mejorar la estabilidad oxidativa de las hemoproteínas es la evolución dirigida; en estos casos no es evidente por qué las mutaciones acumuladas pudieran mejorar la estabilidad, sin embargo, podría ser una opción para aumentar la estabilidad de PaDa-I (ver Tabla 4).

### 3.-Modificaciones químicas de PaDa-I

#### 3.1.-Modificación química con polietilenglicol y caracterización

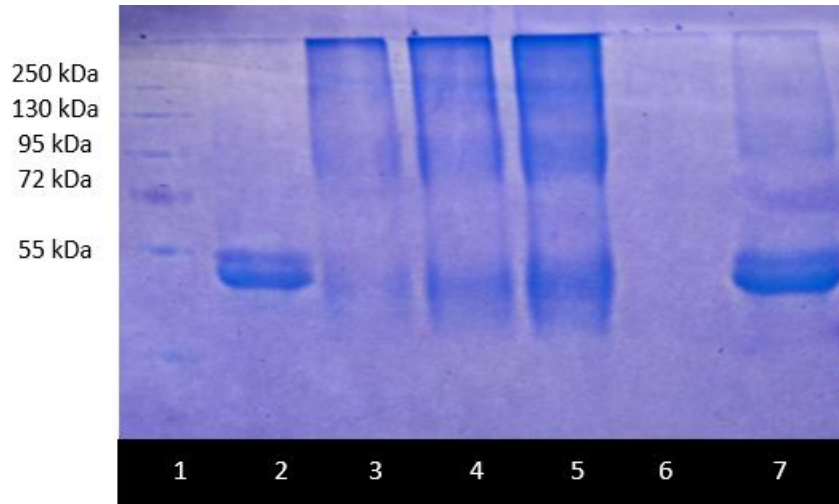
Como se describe en la sección experimental, el metoxipolietilenglicol se activó con cloruro cianúrico y se procedió a realizar la modificación, como podemos ver en la Figura 19.



**Figura 19. Reacción de modificación de PaDa-I con PEG.** El mPEG activado se obtiene porque el extremo hidroxilo del mPEG realiza un ataque nucleofílico y desplaza a uno de los átomos de cloro del cloruro cianúrico. En la reacción de modificación con el PEG activado, este se une a PaDa-I mediante una reacción de alquilación que involucra a uno de los átomos de cloro restantes (Faber, 2017).

Se ensayaron dos concentraciones diferentes de la enzima para esta modificación. En el primer ensayo PaDa-I estaba a una concentración de  $17 \mu\text{M}$  y no observamos en un gel SDS-PAGE una banda de mayor peso molecular, que se observaría de haberse modificado químicamente la enzima. Puesto que hay 11 lisinas expuestas

y libres para reaccionar en la superficie de PaDa-I, en caso de haberse modificado cada una con una molécula de PEG de 5000 Da, el peso molecular del conjugado sería de más de 100 kDa (52kDa de PaDa-I y 55 kDa de las moléculas de PEG en los 11 residuos de lisinas expuestos). Puesto que uno de los factores que podría estar afectando es la concentración de los reactantes, principalmente de la enzima, se realizó un control positivo con la cloroperoxidasa, una enzima de la familia de las UPO, a una concentración 40  $\mu$ M y pudimos ver bandas de mayor peso molecular (Figura 20) confirmando la modificación.

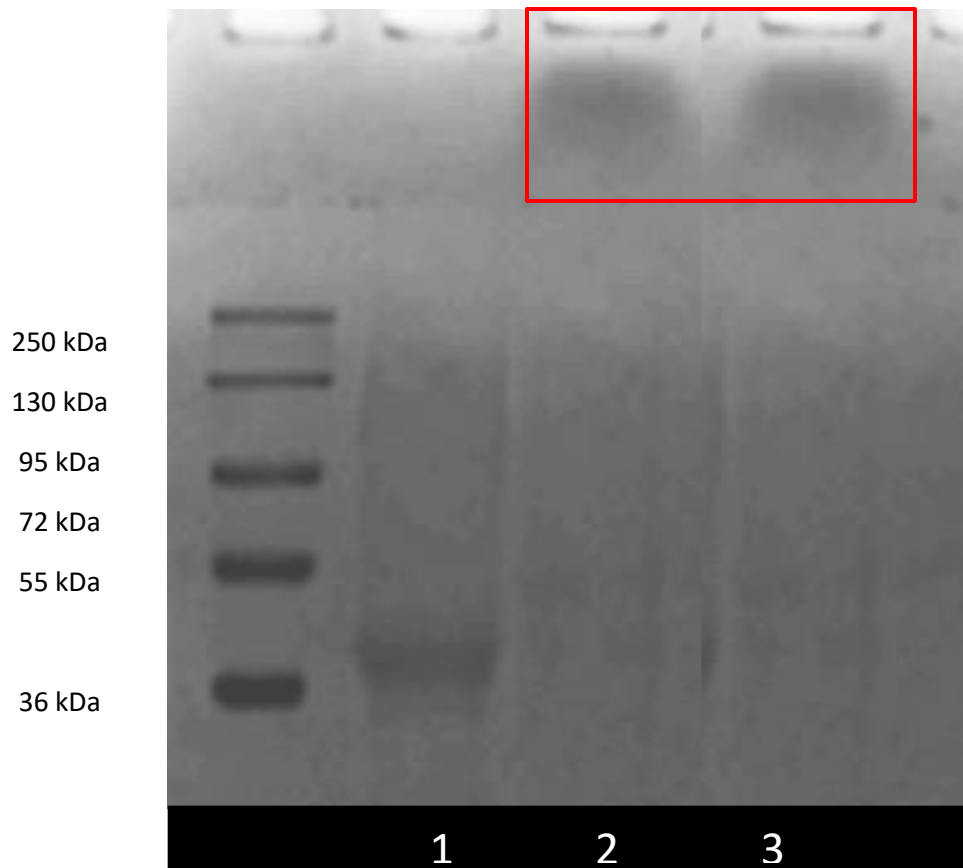


**Figura 20. Gel SDS-PAGE de reacciones de modificación de CPO con PEG-Cl.** 1- Marcador de P.M; 2- CPO; 3 a 5-CPO modificada con PEG; 6.-Control PEG; 7- CPO + PEG.

En la Figura 20 podemos ver a la cloroperoxidasa en la región correspondiente a su peso molecular (42 kDa). CPO posee solo 3 residuos de lisina que podrían unirse al PEG, por lo que su peso aumentaría solo hasta 57 kDa; sin embargo, hay bandas de peso molecular aparentemente mayor. Es posible que la modificación resulte en una migración aberrante de la proteína; posiblemente porque la geometría de la unión del PEG a la proteína altera la masa molecular aparente.

Con esta información procedimos a realizar un segundo ensayo con PaDa-I donde la concentración de la enzima fue de 42  $\mu$ M. La reacción de modificación se analizó por SDS-PAGE y los resultados se muestran en la Figura 21.





**Figura 21. Gel SDS-PAGE de reacción de modificación de PaDa-I con PEG-Cl.** 1- PaDa-I (30µg), 2.-PaDa-I modificada con PEG (30µg en el carril), 3.- PaDa-I modificada con PEG (40 µg en el carril)

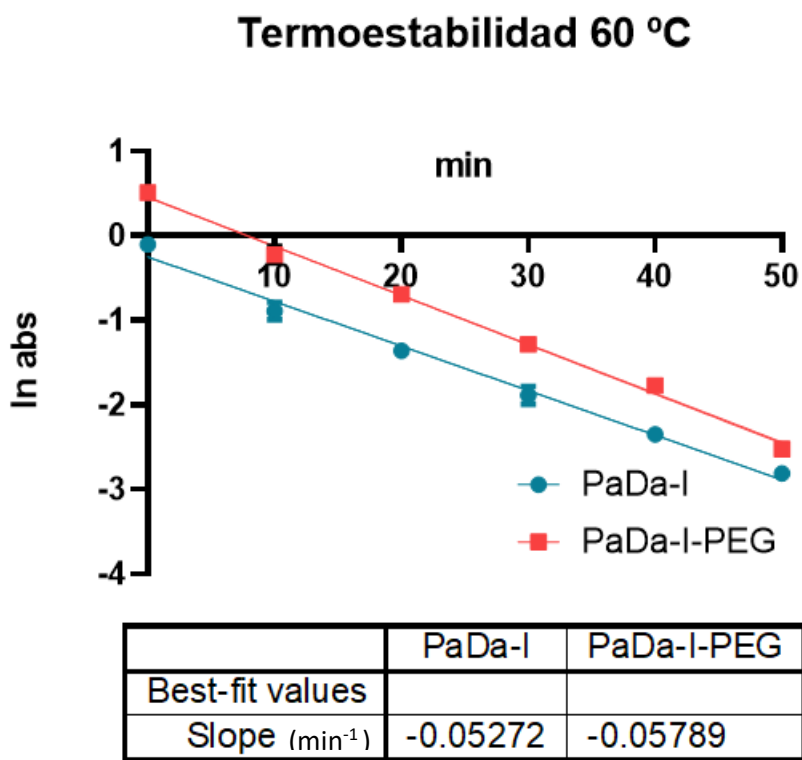
Como se observa en la Figura 21, se puede confirmar que la enzima sí está modificada, y su peso aumentó a más de 250 kDa, dado que la podemos observar en el gel concentrador. Para separar PaDa-I-PEG de PaDa-I no modificada, se utilizó la técnica de ultrafiltración con una membrana de corte de 100 kDa. Con este procedimiento, se pudo recuperar en el filtrado PaDa-I no modificada, mientras que en el retenido se recuperó a PaDa-I-PEG.

Respecto a la actividad enzimática residual, no se pudo cuantificar proteína por las técnicas ni de Bradford ni de Lowry de la enzima modificada. En el primer caso porque la técnica es sensible al número de residuos básicos de la proteína y como consecuencia de la modificación gran parte de ellos quedan bloqueados; y en el segundo por los nuevos enlaces formados (tipo amida). La actividad específica se determinó midiendo proteína en el sobrenadante, y restando la enzima que no se modificó (presente en el sobrenadante después de la ultrafiltración) de la enzima que se puso inicialmente en la reacción. Ambas medidas por la técnica de Bradford. El porcentaje de modificación (% de enzima modificada del total en reacción) fue de 89%.

Con esta manera de cuantificar proteína, se encontró que la actividad específica PaDa-I-PEG es de 261 U/mg, mientras que la de PaDa-I sin modificar es de 800 U/mg, por lo que concluimos que se retuvo el 33% de su actividad. Sabiendo que PaDa-I se modificó exitosamente, se procedió a evaluar su termoestabilidad.

### 3.1.1-Termoestabilidad de PaDa-I modificada con PEG

Los datos de actividad residual de PaDa-I y de PaDa-I-PEG después de ser expuesta a 60 ° C durante diferentes tiempos de incubación se ajustaron a un modelo de primer orden, que se muestra en la Figura 22.



**Figura 22. Termoestabilidad a 60 °C de PaDa-I y PaDa-I modificada con PEG.** Ajuste a un modelo de inactivación de primer orden. La pendiente (slope) corresponde a la  $-k_{inactivación}$ .

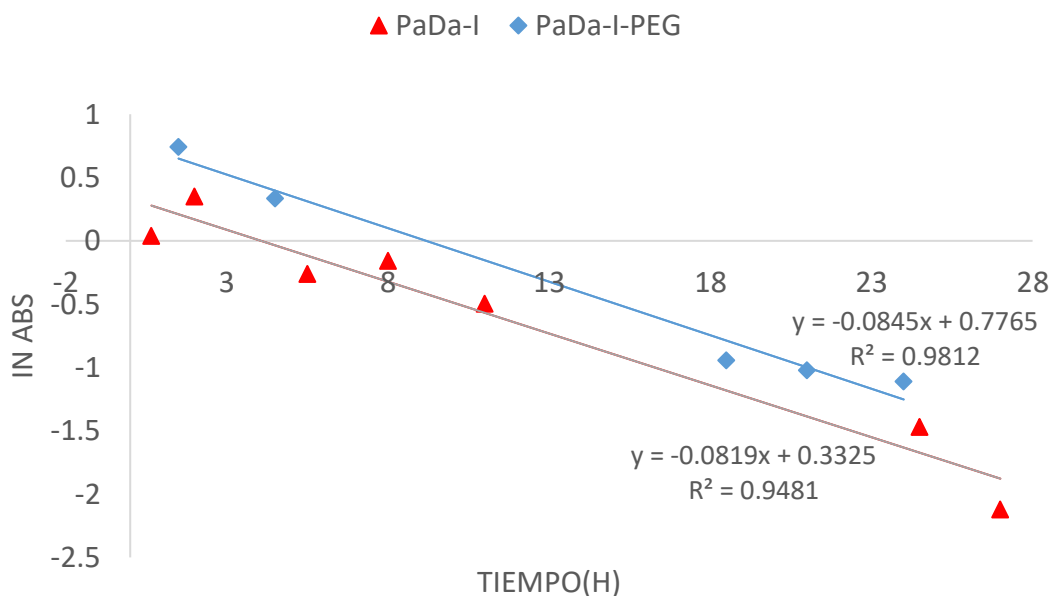
La diferencia entre las pendientes no es estadísticamente significativa, por lo que podemos concluir que la modificación con PEG no le confiere a PaDa-I termoestabilidad a 60 °C. El tiempo de vida media de ambas preparaciones es de 12.6 min, como se muestra en la Tabla 11.

	PaDa-I	PaDa-I-PEG
<b>Termoestabilidad <math>t_{1/2}</math> (min)</b>	12.6	12.61
<b>Actividad específica (U/mg)</b>	800	261

**Tabla 11. Actividad específica y tiempo de vida media a 60 °C de PaDa-I y PaDa-I-PEG.**

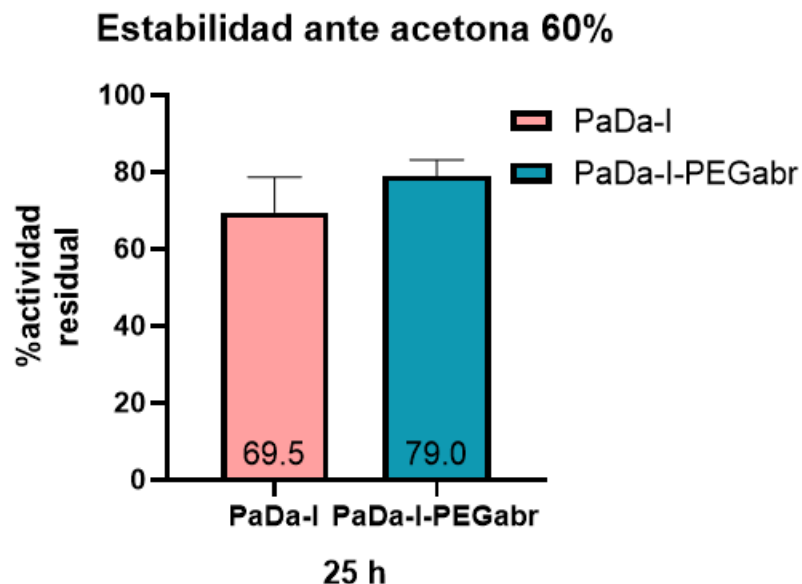
### 3.1.2-Estabilidad ante solventes de PaDa-I modificada con PEG

Se evaluó también la estabilidad ante solventes utilizando acetona y DMSO. Estos solventes se seleccionaron para tener un punto de comparación con la literatura. Se realizaron los ensayos de estabilidad en presencia de 60% DMSO y los datos de actividad residual a diferentes tiempos de incubación se ajustaron a un modelo de primer orden. Podemos ver en la Figura 23 que en DMSO 60% la constante de inactivación es muy similar entre PaDa-I y PaDa-I-PEG, con un tiempo de vida media de 8.4 h para PaDa-I y de 8.2 h para PaDa-I modificada. Estos datos nos permiten concluir que no hay aumento en la tolerancia a 60% DMSO.



**Figura 23. Estabilidad ante 60% de DMSO de PaDa-I-PEG. Ajuste a un modelo de inactivación de primer orden.**

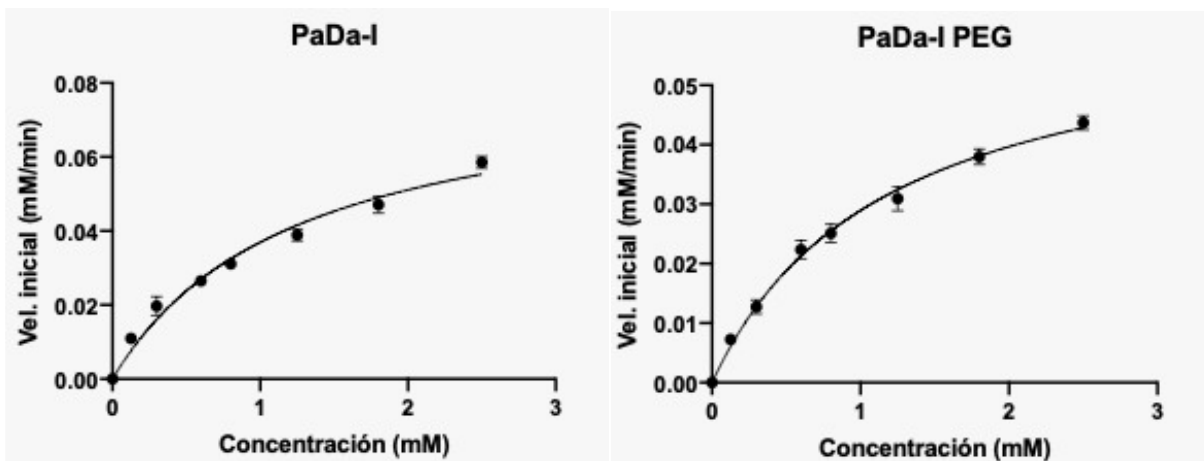
La estabilidad ante acetona solo se muestra como actividad residual después de incubar por 25 h. Podemos ver en la Figura 24 que PaDa-I retiene 69.5% de actividad, mientras que PaDa-I-PEG retiene 79% de su actividad.



**Figura 24. Estabilidad ante 60% de acetona de PaDa-I-PEG.** Reportado como % de actividad residual después de 25 h.

Para confirmar si hay diferencia significativa entre estos dos valores, se realizó un análisis estadístico (T test) y encontramos que la estabilidad es la misma, por lo que podemos concluir que la modificación química con PEG tampoco influyó en la estabilidad de PaDa-I en presencia de acetona.

Finalmente se determinó la  $K_m$  con el propósito de ver si este parámetro cinético había cambiado con la modificación química. Como se muestra en la Figura 25, la constante  $K_m$  es muy similar en ambos casos.



	<b>PaDa-I</b>	<b>PaDa-I-PEG</b>
<b>Km (mM)</b>	0.083 ± 0.015	0.063 ± 0.005
<b>V<sub>máx</sub> (mM/min)</b>	1.24 ± 0.4	1.18 ± 0.2

**Figura 25. Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de PaDa-I y PaDa-I-PEG.** Determinación de Km y V<sub>máx</sub> utilizando NBD como sustrato (peroxigenación).

La modificación de PaDa-I con PEG 5000 no modificó ni la termoestabilidad, ni la tolerancia a solventes orgánicos, ni su V<sub>máx</sub>, aunque si modifico ligeramente la Km para una reacción modelo de peroxigenación, como podemos ver en la Figura 25. Y aparentemente también disminuyó su actividad específica medida con ABTS como sustrato (reacción de peroxidación) como se ve en la Tabla 11. Para explicar estos resultados planteamos dos hipótesis:

Es probable que la unión del polietilenglicol a PaDa-I no se llevara a cabo únicamente sobre los residuos de lisina de la superficie, dado el aumento en el peso molecular de PaDa-I modificada (más de 250 kDa); aunque es más probable que este aparente aumento se deba a la migración aberrante en el gel al estar modificada, por la forma en que el SDS se une ahora a la enzima modificada, o incluso que haya más de una molécula de PEG unida por residuo de Lisina. No nos fue posible determinar el peso de PaDa-I modificada a pesar de diversos intentos realizados mediante la técnica SDS-PAGE; la modificación de otros residuos (por ejemplo, aquellos con carácter nucleofílico como arginina e incluso histidina) podría resultar en una deformación o pérdida parcial de estructura, lo cual explicaría la disminución en actividad específica de PaDa-I-PEG y el nulo efecto de la modificación sobre la estabilidad ante temperatura y disolventes.

Por otro lado, también es posible que la actividad específica de una enzima disminuya cuando esta se somete a un proceso de inmovilización; en el trabajo realizado por (Poraj-Kobielska et al., 2015) AaeUPO fue sometida a un proceso

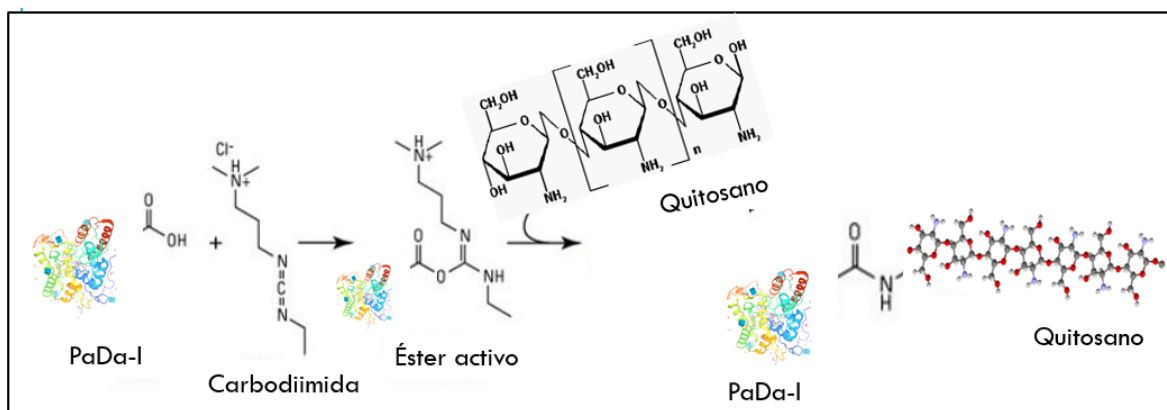
encapsulación en un gel de polivinil alcohol/polietilenglicol donde retuvo 60% de su actividad inicial. Sin embargo, las constantes cinéticas con diferentes sustratos estándar son muy similares, por lo que se asume que la pérdida de actividad enzimática se relaciona con un proceso de difusión. En nuestro caso, la  $K_m$  con el sustrato estándar NBD de ambas preparaciones es similar, por lo que la menor actividad específica de PaDa-I-PEG podría deberse también a una difusión menos eficiente del sustrato hacia el seno de la solución.

Las interacciones que se formaron entre el PEG y PaDa-I en su superficie no fueron suficientes para conferir estabilidad. A pesar de que esta estrategia ha funcionado con otras enzimas similares a PaDa-I, es necesario probar cada caso para comprobar que se produce una enzima modificada con estabilidad mejorada.

### 3.2.-Modificación de PaDa-I con quitosano utilizando carbodiimida y su caracterización

Después de la reacción entre la enzima y quitosano, usando como entrecruzante a una carbodiimida como se ve en la Figura 26, observamos la formación de un precipitado en la reacción.

Se midió actividad en el sobrenadante; la actividad específica en la fracción soluble fue de 113 U/mg, comparado con la de PaDa-I (800 U/mg), por lo que después de la reacción solo se retuvo un 16% de actividad. Se realizaron también lavados (5) del precipitado; adicionando amortiguador, agitando y centrifugando. Los lavados tenían actividad enzimática que fue disminuyendo conforme aumentaban los lavados hasta que solo quedo el precipitado sin actividad enzimática. Toda la actividad enzimática estaba en el sobrenadante.

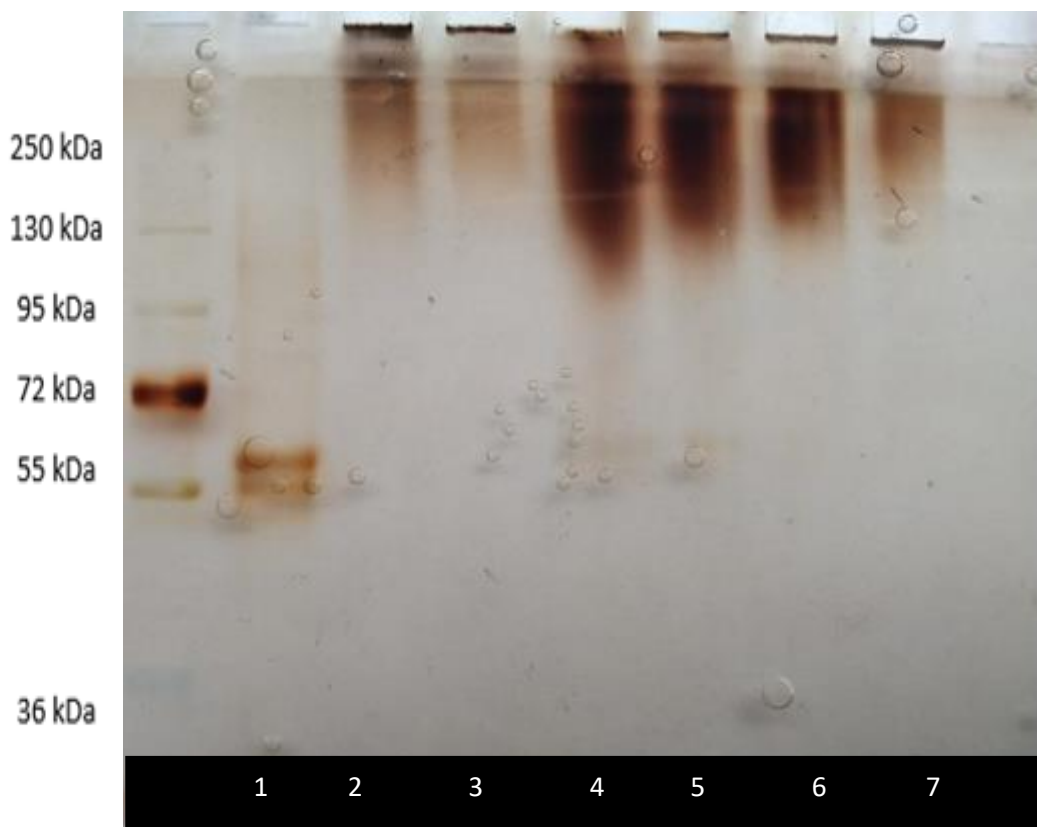


**Figura 26. Reacción de modificación de PaDa-I con quitosano utilizando carbodiimida.** Inicialmente el grupo carboxilo de PaDa-I y la carbodiimida forman un intermediario éster activo, este intermediario reacciona con las aminas primarias

del quitosano para generar una amida y obtenerse así el entrecruzamiento entre PaDa-I y el quitosano.

Se procedió a realizar un SDS-PAGE (Figura 27) con el sobrenadante, los lavados y una fracción del precipitado para confirmar que la reacción había modificado a PaDa-I con quitosano e identificar en qué parte de la reacción (soluble o insoluble) se encontraban las especies modificadas. No se identificaron bandas únicas de las especies de mayor peso molecular en un SDS-PAGE, que corresponderían a la enzima modificada; muy probablemente el barrido observado en el gel es consecuencia del quitosano y sus distintos pesos moleculares presentes en el reactivo que se utilizó (50-190 kDa).

En la Figura 27 también podemos observar a PaDa-I en su peso correspondiente en el control de PaDa-I, el sobrenadante y en el primer lavado, en los lavados siguientes PaDa-I no puede verse, seguramente esto es debido a la baja concentración de proteína. Sin embargo, en la parte superior del SDS-PAGE en los carriles del 1 al 7 vemos bandas muy anchas que parecen corresponder al quitosano en solución, debido a que se ven muy similares a este control. Por lo que se concluye que la técnica de SDS-PAGE no es la adecuada para confirmar la modificación de la enzima.

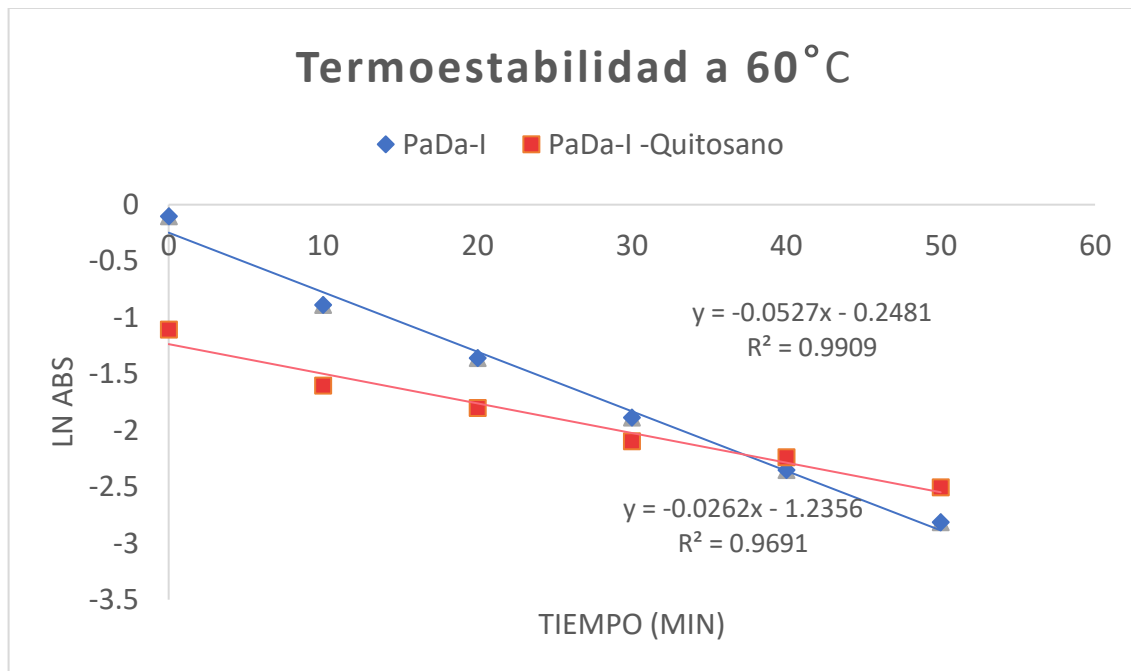


**Figura 27. Gel SDS-PAGE de PaDa-I modificada con quitosano y carbodiimida.** 1.-PaDa-I, 2.- Control de quitosano (50-190 kDa) en solución 3.- Lavado del precipitado, 4.-Sobrenadante de la reacción, 5.-Lavado 1 del precipitado, 6.- Lavado 2 del precipitado, 7.- Lavado 3 del precipitado.

Se decidió explorar otras técnicas que pudieran darnos más información respecto a la modificación de PaDa-I. Una de ellas consistió en analizar si existía un cambio en la termoestabilidad, porque de haberse modificado PaDa-I se espera una modificación en su termoestabilidad también.

### 3.2.1-Termoestabilidad de PaDa-I con quitosano-carbodiimida

Se determinó la termoestabilidad de PaDa-I y PaDa-I después de la reacción de modificación(la enzima soluble en el sobrenadante de la reacción) a 60 °C, midiendo la actividad residual a diferentes tiempos de incubación; los datos se ajustaron a un modelo de inactivación de primer orden como se muestra en la Figura 28; observamos que la enzima libre se inactiva más rápido, siendo el tiempo de vida media de PaDa-I de 13.15 min, mientras que para la enzima soluble en el sobrenadante de la reacción se observó un tiempo de vida media de 26.4 min. Estos cambios en la actividad específica y la termoestabilidad se muestran en la Tabla 13.



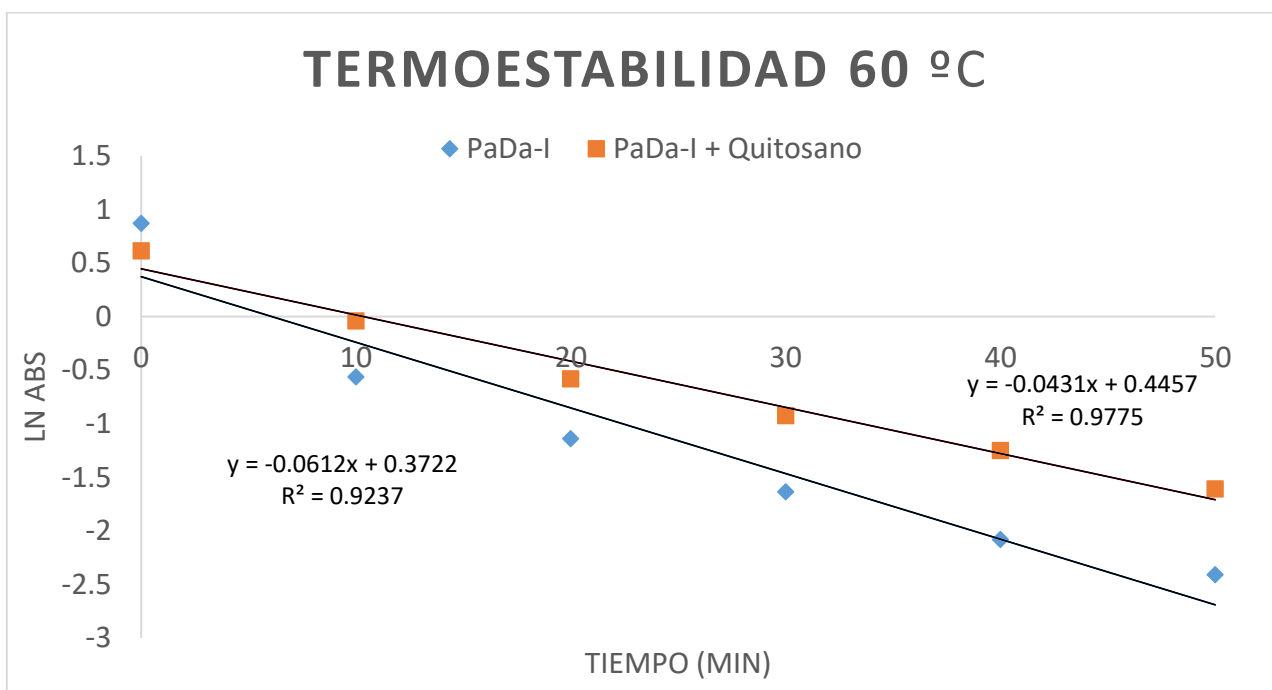
**Figura 28. Termoestabilidad de PaDa-I y PaDa-I -Quitosaño 60 °C.** Ajuste a un modelo de inactivación de primer orden.



		PaDa-I	PaDa-I- Quitosano
<b>Termoestabilidad (min)</b>	$t_{1/2}$	13.1	26.4
<b>Actividad específica (U/mg)</b>		800	113

**Tabla 13. Actividad específica y tiempo de vida media en incubación a 60 °C de PaDa-I y sobrenadante de reacción PaDa-I-quitosano.**

Un control de la enzima en presencia de quitosano (sin carbodiimida) muestra que también es posible aumentar la termoestabilidad de la enzima sin necesidad de una modificación química, solo añadiendo quitosano. Es decir, el quitosano puede actuar como aditivo estabilizante, formando interacciones iónicas entre las cargas positivas del quitosano y las cargas negativas en la superficie de la proteína. La constante de inactivación obtenida se puede ver en la Figura 29.



**Figura 29. Termoestabilidad de PaDa-I y PaDa-I +Quitosano 60 °C. Ajuste a un modelo de inactivación de primer orden.**

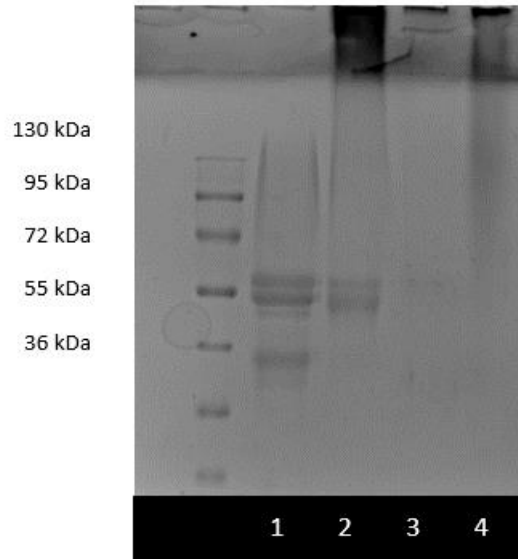
Se comprobó que el quitosano en solución le confiere estabilidad a PaDa-I ante la temperatura. Respecto a su vida media, hubo una mejora de 1.5 veces.

Este efecto termoestabilizador se ha reportado en otros trabajos. En el trabajo realizado por (Zhi et al., 2007) se probaron como aditivos en solución varios polihidroxilados como: dextrano, glucosa, fructosa, galactosa, glicina y polietilenglicol, entre otros. Se demostró que hay un efecto dramático sobre la estabilidad, al mejorarla en presencia de los aditivos (20 veces más). El efecto estabilizador que se reporta es diferente en cada caso; podemos decir que es consecuencia de interacciones electroestáticas favorables para mantener la rigidez de la proteína. Aunque no se haya experimentado directamente con el quitosano como aditivo y alguna enzima cercana a PaDa-I, las interacciones entre el quitosano y la cloroperoxidasa aumentan la termoestabilidad como se ha mencionado en este trabajo. Un ejemplo más es el trabajo realizado por (De Matteis et al., 2015) donde se evaluaron distintos polímeros para encapsular a la cloroperoxidasa como: quitosano, alginato, y dextrano para estabilizar a la cloroperoxidasa. Se encontró que el quitosano era el mejor de ellos.

Para determinar inequívocamente si la enzima estaba modificada o no, se llevaron a cabo dos pruebas:

A) Cromatografía de intercambio catiónico a pH 6, ya que, de haberse modificado la enzima, cambiaría su pKa por la introducción de un gran número de grupos amino presentes en el quitosano. El pKa de PaDa-I libre es de 5.5 y el quitosano tiene un pKa de 6.5, por lo que al realizar la cromatografía a pH 6 el quitosano estaría cargado positivamente y la enzima negativamente; la resina de carga negativa uniría a la enzima modificada. Sin embargo, esto no ocurrió, la enzima no se unió lo que es una evidencia de que la modificación no se llevó a cabo. Se intentó una técnica distinta dado que son valores de pKa cercanos.

B) Separar PaDa-I modificada (en caso de existir) mediante ultrafiltración (membrana de 100 kDa). A pesar de que se retuvo en la membrana una fracción de la actividad, no se observaron especies de alto peso molecular en un SDS-PAGE (Fig. 30). De haberse formado especies modificadas, estarían covalentemente unidas por un enlace amida, que no se rompería en un SDS-PAGE. Se pensó que interacciones electroestáticas podrían estar causando que la enzima se retuviera en el filtro sin estar modificada covalentemente, por lo tanto, se aumentó el pH de la muestra de tal manera que el quitosano estuviera neutro y desaparecieran dichas interacciones, de existir. Al aumentar el pH, desapareció la enzima en el retenido, lo cual sugiere que las interacciones entre quitosano y la enzima solo eran electrostáticas. Confirmando así, que no existen especies modificadas covalentemente en esta reacción.



**Figura 30. Gel SDS-PAGE de PaDa-I modificada (en caso de existir) con quitosano y carbodiimida.** 1.-PaDa-I, 2.-Retenido 3.-Filtrado, 4.- Control de quitosano en solución.

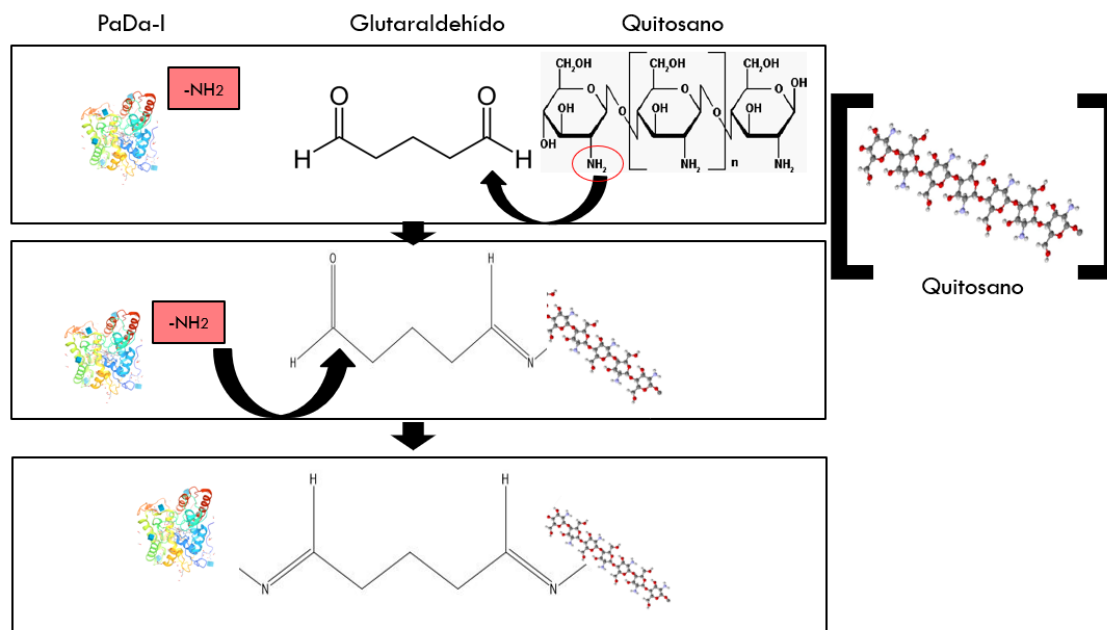
Existen diversas variables que tienen impacto en la reacción de modificación con carbodiimida: concentración de reactantes, tiempo de reacción, pH, o la exposición de los ácidos carboxílicos. Para esta estrategia de modificación se intentó aumentar la concentración de los reactantes, principalmente de PaDa-I (el quitosano y la carbodiimida están en exceso) de 19  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  y no se observó modificación química de PaDa-I.

Otra posibilidad es que la reacción no esté llevando a cabo debido a los altos niveles de glicosilación de PaDa-I y/o al gran tamaño de quitosano (entre 50 y 120 kDa). Este tipo de modificaciones (con carbodiimida) se ha llevado a cabo exitosamente sobre enzimas como la CPO (La et al., 2005) con un nivel de glicosilación que podríamos considerar similar a PaDa-I. Sin embargo, la glicosilación de la CPO corresponde a 19% de su peso molecular (Sundaramoorthy et al., 1995) y de PaDa-I corresponde a 30%. (Ramirez-Escudero et al., 2018a) por lo que la comparación no es confiable. Para explorar esta posibilidad se realizó un control con la CPO y quitosano, y tampoco se observó enzima modificada. Es probable que el tamaño del quitosano genere especies insolubles de alto peso molecular y no se observen especies enzimáticas solubles y modificadas covalentemente.

### 3.3.-Modificación de PaDa-I con quitosano-glutaraldehído.

El glutaraldehído es un compuesto bifuncional con el que se pueden formar enlaces covalentes en presencia de grupos amino; por lo que es común utilizarlos para

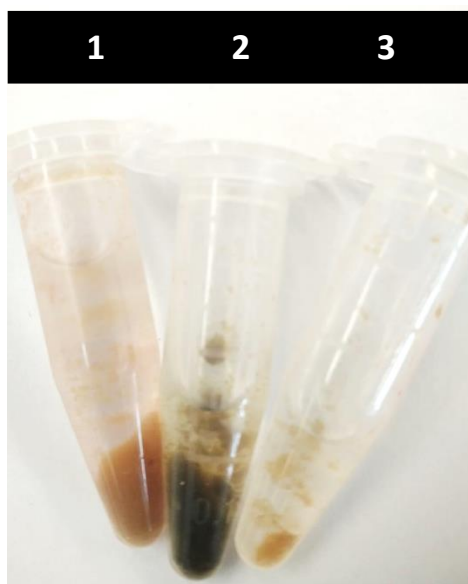
modificar proteínas y polímeros donde abundan los grupos amino, como el quitosano. La reacción se muestra en la Figura 31.



**Figura 31. Reacción de modificación de PaDa-I con quitosano, utilizando el glutaraldehído como entrecruzante.** Los extremos amino tanto del quitosano como de PaDa-I son capaces de reaccionar con el glutaraldehído. Mediante intermediarios de base de Schiff PaDa-I y el quitosano se unen al glutaraldehído y forman un enlace covalente imina, obteniendo así un entrecruzado enzima-glutaraldehído-quitosano.

Al realizar la reacción como se describe en la metodología, se formó un precipitado, por lo que se separó del sobrenadante y se realizaron lavados. El precipitado tiene coloración rojiza (el color característico de PaDa-I), lo que sugiere que PaDa-I queda unida covalentemente en ese precipitado. Por la naturaleza del entrecruzado (insoluble) no se pudo analizar mediante SDS-PAGE.

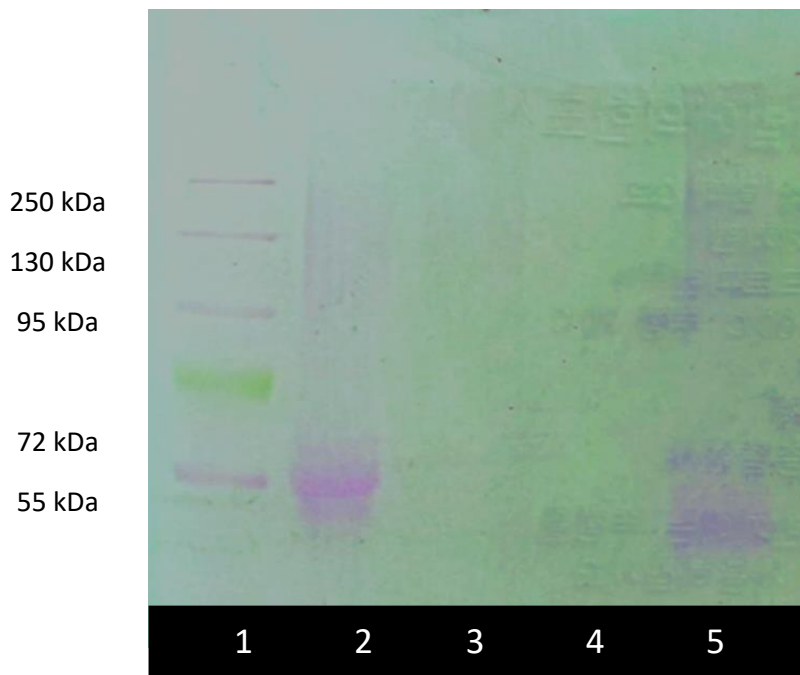
Para comprobar que PaDa-I estaba en el precipitado se realizó un control con la cloroperoxidasa. No fue posible ver bandas de mayor peso molecular en un gel SDS-PAGE en el sobrenadante de la reacción; sin embargo, con este ensayo nos dimos cuenta de que la enzima queda atrapada en el precipitado, ya que la cloroperoxidasa (el control) se inactiva en el pH de la reacción y adquiere una coloración verde como podemos ver en la Figura 32. Asumimos que lo mismo está ocurriendo con PaDa-I. El control realizado solo con quitosano y glutaraldehído formó un precipitado similar, pero sin la coloración.



**Figura 32. Precipitados enzima-glutaraldehído-quitosano.** 1-PaDa-I con quitosano-glutaraldehído, 2-CPO con quitosano-glutaraldehído, y 3-quitosano-glutaraldehído.

En este ensayo no fue posible medir proteína en la fracción soluble por dos técnicas, debido a interferencias: en el ensayo de Bradford interfiere con la reacción la presencia de quitosano y en el ensayo de Lowry también se obtiene una señal mayor a la esperada probablemente por la formación de nuevos enlaces (imida) entre la proteína y el quitosano.

La comparación en el gel SDS-PAGE se obtuvo cargando las mismas unidades enzimáticas como podemos ver en la Figura 33. Se puede observar que no aparecen bandas donde cargamos al sobrenadante, aunque si hay actividad enzimática, esto podría deberse a que toda la enzima está en la fracción insoluble, entrecruzada con el glutaraldehído-quitosano.



**Figura 33. Gel SDS-PAGE de PaDa-I modificada con quitosano y glutaraldehído**

1-Marcador, 2-PaDa-I (20 U enzimáticas), 3-Sobrenadante (20 U enzimáticas), 4-Lavado, 5-PaDa-I + Quitosano

Como se mencionó, el glutaraldehído actúa sobre grupos amino formando intermediarios base de Schiff que se estabilizan para formar en enlace imina. El glutaraldehído puede reaccionar con los grupos amino presentes en el quitosano. Por tanto, existe la posibilidad de reacciones proteína-quitosano, proteína-proteína o quitosano-quitosano: porque es posible que por esta inespecificidad nos haya dado como resultado un conjugado insoluble como podemos observar en la Figura 33.

Se realizarán ensayos posteriores para determinar las propiedades de este conjugado. No se incluye en los alcances de esta tesis debido a que no tenemos establecido para PaDa-I un sistema de catálisis heterogéneo; y para cumplir en tiempo este proyecto se decidió no caracterizar este conjugado.

Se probó que el conjugado era activo, pero es posible que la actividad enzimática haya disminuido. Sin embargo, como se demostró en este trabajo, el quitosano como aditivo actúa como termo estabilizante de PaDa-I; podemos esperar que con la modificación covalente se aumente este efecto. Por lo que este conjugado es muy interesante y se continuará explorando este entrecruzado en el laboratorio.

## **Conclusiones**

### **Modificaciones genéticas**

El reemplazo de residuos oxidables alrededor del grupo hemo por mutagénesis sitio dirigida produjo enzimas con actividad peroxigenasa, aunque mucho menos activas que la enzima parental. Las mutantes se producen en menor cantidad que PaDa-I, lo que puede reflejar un plegamiento inestable. Ninguna mutación le confirió estabilidad oxidativa a PaDa-I.

La mutación Y194S no pudo ser evaluada por la poca muestra obtenida pero la actividad enzimática se perdió casi por completo. La mutación M127L y Y160F produjeron enzimas con menor actividad enzimática. Modificar los residuos de bajo potencial redox a menos de 10 Å del sitio activo no mejoró la estabilidad oxidativa de PaDa-I y sí disminuyó su actividad (se perdió más del 90% de actividad).

### **Modificaciones químicas**

Se modificó a PaDa-I con polietilenglicol utilizando cloruro cianúrico para activarlo. Su peso aumentó a más de 250 kDa. Esta modificación no aumentó termoestabilidad a 60°C o estabilidad ante los solventes como acetona y dimetilsulfóxido.

Las estrategias que se han probado hasta ahora nos permiten comprobar que PaDa-I no está modificada covalentemente con quitosano cuando se usó carbodiimida como entrecruzante. La termoestabilidad mejora 2 veces respecto a PaDa-I libre, pero se demostró que es derivado de la presencia del quitosano como aditivo. El quitosano puede entonces utilizarse para mejorar la termoestabilidad de la enzima, a través de interacciones iónicas susceptibles de romperse manipulando el pH.

Se modificó a PaDa-I con quitosano utilizando glutaraldehído como entrecruzante. Al modificar a PaDa-I con quitosano, se forma un entrecruzado no soluble en el que se retiene la enzima. Será interesante caracterizar este conjugado utilizando un sistema de catálisis heterogéneo.

## **Perspectivas**

Los procesos para estabilizar a una enzima son caso específico, en esta tesis se modificó genéticamente a PaDa-I utilizando una estrategia de modificación racional y no se aumentó su estabilidad oxidativa.

Por esto, se considera que para estabilizar a PaDa-I es necesario utilizar una estrategia de modificación genética como la evolución dirigida que permita obtener una variante con estabilidad oxidativa aumentada. Al obtener la variante el siguiente propósito es ser capaces de relacionar las mutaciones acumuladas con el aumento de estabilidad oxidativa para obtener una comprensión mayor de cómo evitar la inactivación de PaDa-I.

Respecto a la modificación con polietilenglicol, sería interesante comprobar las teorías que se plantearon para la pérdida de actividad enzimática. Una alternativa que nos daría resultados confiables sería medir el contenido de estructura secundaria de PaDa-I modificada, con técnicas como el dicroísmo circular. También medir la actividad enzimática con sustratos muy pequeños en donde el problema de difusión pudiera minimizarse.



## Bibliografía

- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., & Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3582–3586. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40292-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40292-4)
- Aranda, C., Municoy, M., Guallar, V., Kiebist, J., Scheibner, K., Ullrich, R., Del Río, J. C., Hofrichter, M., Martínez, A. T., & Gutiérrez, A. (2019). Selective synthesis of 4-hydroxyisophorone and 4-ketoisophorone by fungal peroxygenases. *Catalysis Science and Technology*, 9(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1039/c8cy02114g>
- Babot, E. D., del Río, J. C., Kalum, L., Martínez, A. T., & Gutiérrez, A. (2013). Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(9), 2323–2332. <https://doi.org/10.1002/bit.24904>
- Bao, X., Huang, X., Lu, X., & Li, J. J. (2014). Improvement of hydrogen peroxide stability of *Pleurotus eryngii* versatile ligninolytic peroxidase by rational protein engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 54(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.10.003>
- Bormann, S., Gomez Baraibar, A., Ni, Y., Holtmann, D., & Hollmann, F. (2015). Specific oxyfunctionalisations catalysed by peroxygenases: Opportunities, challenges and solutions. *Catalysis Science and Technology*, 5(4), 2038–2052. <https://doi.org/10.1039/c4cy01477d>
- Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927–993. <https://doi.org/10.1039/b617536h>
- Carro, J., González-Benjumea, A., Fernández-Fueyo, E., Aranda, C., Guallar, V., Gutiérrez, A., & Martínez, A. T. (2019). Modulating fatty acid epoxidation vs hydroxylation in a fungal peroxygenase. *ACS Catalysis*, 9(7), 6234–6242. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01454>
- Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., & Pedersen, A. H. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 17(4), 379–384. <https://doi.org/10.1038/7939>
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Cieplak, M., & Sułkowska, J. I. (2005). Thermal unfolding of proteins. *Journal of Chemical Physics*, 123(19). <https://doi.org/10.1063/1.2121668>
- Dau, H. A., Ullrich, R., Benndorf, D., Svatoš, A., Muck, A., & Hofrichter, M. (2007). The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5477–5485. <https://doi.org/10.1128/AEM.00026-07>
- De Matteis, L., Germani, R., Mancini, M. V., Di Renzo, F., & Spreti, N. (2015). Encapsulation of chloroperoxidase in novel hybrid polysaccharide-silica biocomposites: Catalytic efficiency, re-use and thermal stability. *Applied Catalysis A: General*, 492, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.12.016>
- Doukyu, N., & Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.009>
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Arminsen, P., Sabuquillo, P., & Guisán, J. M. (1999). Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 7(1–4), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00040-5)
- García-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincón, G., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconjugate Chemistry*, 13(6), 1336–1344. <https://doi.org/10.1021/bc025561p>
- García-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, A. T., & Alcalde, M. (2012). Directed

- evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochemical Journal*, *441*(1), 487–498. <https://doi.org/10.1042/BJ20111199>
- Gonzales, M. F., Brooks, T., Pukatzki, S. U., & Provenzano, D. (2013). Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Visualized Experiments*, *80*, 6–11. <https://doi.org/10.3791/50684>
- Gonzalez-Perez, D., Garcia-Ruiz, E., Ruiz-Dueñas, F. J., Martinez, A. T., & Alcalde, M. (2014). Structural determinants of oxidative stabilization in an evolved versatile peroxidase. *ACS Catalysis*, *4*(11), 3891–3901. <https://doi.org/10.1021/cs501218v>
- Gröbe, G., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Kapturska, D., Friedrich, S., & Hofrichter, M. (2011). *High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus Marasmius rotula*. 1–11.
- Gröbe, G., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Kapturska, D., Friedrich, S., Hofrichter, M., & Scheibner, K. (2011). High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express*, *1*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-31>
- Hernandez, K., Berenguer-murcia, A., Rodrigues, R. C., & Fernandez-lafuente, R. (2012). <Art00003.Pdf>. 2652–2672.
- Hobisch, M., Holtmann, D., Gomez de Santos, P., Alcalde, M., Hollmann, F., & Kara, S. (2020). Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. *Biotechnology Advances*, *February*, 107615. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107615>
- Hofrichter, M., Kellner, H., Herzog, R., Karich, A., Liers, C., Scheibner, K., Kimani, V. W., & Ullrich, R. (2020). *Fungal Peroxygenases: A Phylogenetically Old Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_14)
- Hofrichter, M., Kellner, H., Pecyna, M. J., & Ullrich, R. (2015). Fungal unspecific peroxygenases: Heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 851). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2_13)
- Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2014). Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *19*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.01.015>
- Holtmann, D., Fraaije, M. W., Arends, I. W. C. E., Opperman, D. J., & Hollmann, F. (2014). The taming of oxygen: Biocatalytic oxyfunctionalisations. *Chemical Communications*, *50*(87), 13180–13200. <https://doi.org/10.1039/c3cc49747j>
- Jain, E., Flanagan, M., Sheth, S., Patel, S., Gan, Q., Patel, B., Montaña, A. M., & Zustiak, S. P. (2020). Biodegradable polyethylene glycol hydrogels for sustained release and enhanced stability of rhGALNS enzyme. *Drug Delivery and Translational Research*, *10*(5), 1341–1352. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00714-7>
- Jeng, F. Y., & Lin, S. C. (2006). Characterization and application of PEGylated horseradish peroxidase for the synthesis of poly(2-naphthol). *Process Biochemistry*, *41*(7), 1566–1573. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.021>
- Karich, A., Ullrich, R., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2017). Fungal unspecific peroxygenases oxidize the majority of organic EPA priority pollutants. *Frontiers in Microbiology*, *8*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01463>
- Kiebitz, J., Schmidtke, K. U., Zimmermann, J., Kellner, H., Jehmlich, N., Ullrich, R., Zänder, D., Hofrichter, M., & Scheibner, K. (2017). A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* Catalyzes the Selective Oxygenation of Testosterone. *ChemBioChem*, *18*(6), 563–569. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600677>
- Kimani, V. W. (2019). *New Secretory Peroxidases and Peroxygenases from Saprotrophic Fungi of Kenyan Forests*. November, 1–187.
- Kinner, A., Rosenthal, K., & Lütz, S. (2021). Identification and Expression of New Unspecific Peroxygenases – Recent Advances, Challenges and Opportunities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*(July). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705630>
- La, C. E., Hernandez, R., Stephan, L., Liese, A., & Bon, E. P. S. (2005). *Activity and stability of Caldariomyces*

*fumago chloroperoxidase modified by reductive alkylation , amidation and cross-linking*. 37, 582–588.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.025>

- Linde, D., Olmedo, A., González-Benjumea, A., Estévez, M., Renau-Mínguez, C., Carro, J., Fernández-Fueyo, E., Gutiérrez, A., & Martínez, A. T. (2020). Two new unspecific peroxygenases from heterologous expression of fungal genes in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), 1–16.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02899-19>
- Linde, D., Santillana, E., Fern, E., Gonz, A., Carro, J., Guti, A., Mart, A. T., & Romero, A. (2022). *Structural Characterization of Two Short Unspecific Peroxygenases : Two Different Dimeric Arrangements*.
- Lucas, F., Babot, E. D., Cañellas, M., Del Río, J. C., Kalum, L., Ullrich, R., Hofrichter, M., Guallar, V., Martínez, A. T., & Gutiérrez, A. (2016). Molecular determinants for selective C 25 -hydroxylation of vitamins D 2 and D 3 by fungal peroxygenases. *Catalysis Science and Technology*, 6(1), 288–295.  
<https://doi.org/10.1039/c5cy00427f>
- Martin-Diaz, J., Molina-Espeja, P., Hofrichter, M., Hollmann, F., & Alcalde, M. (2021). Directed evolution of unspecific peroxygenase in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(8), 3002–3014.  
<https://doi.org/10.1002/bit.27810>
- Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., Vind, J., Tovborg, M., Herold-Majumdar, O. M., Hofrichter, M., Liers, C., Ullrich, R., Scheibner, K., Sannia, G., Piscitelli, A., Pezzella, C., Sener, M. E., Kılıç, S., van Berkel, W. J. H., ... Alcalde, M. (2017). Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*, 35(6), 815–831.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06.003>
- Miyazaki-Imamura, C., Oohira, K., Kitagawa, R., Nakano, H., Yamane, T., & Takahashi, H. (2003). Improvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability of manganese peroxidase by combinatorial mutagenesis and high-throughput screening using in vitro expression with protein disulfide isomerase. *Protein Engineering*, 16(6), 423–428. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg054>
- Molina-Espeja, P. (2016). *Diseño de la peroxigenasa inespecífica de \_Agrocybe aegerita\_ mediante evolución dirigida: expresión funcional en levaduras y síntesis de 1-naftol*. file://c:/documentos/Bibliografia-1/2016-Molina-thesis.pdf
- Molina-Espeja, P., Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Alcalde, M. (2014). Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3496–3507. <https://doi.org/10.1128/AEM.00490-14>
- Molina-Espeja, P., Santos-Moriano, P., García-Ruiz, E., Ballesteros, A., Plou, F. J., & Alcalde, M. (2019). Structure-guided immobilization of an evolved unspecific peroxygenase. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms20071627>
- Ogola, H. J. O., Hashimoto, N., Miyabe, S., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H., & Sawa, Y. (2010). Enhancement of hydrogen peroxide stability of a novel *Anabaena* sp. DyP-type peroxidase by site-directed mutagenesis of methionine residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1727–1736. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2603-6>
- Piontek, K., Strittmatter, E., Ullrich, R., Gröbe, G., Pecyna, M. J., Kluge, M., Scheibner, K., Hofrichter, M., & Plattner, D. A. (2013). Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: Cytochrome P450 functionality with benefits. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34767–34776.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514521>
- Plou, F. J., & Ballesteros, A. (1999). Stability and stabilization of biocatalysts. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 17, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01343-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01343-8)
- Poraj-Kobielska, M., Kinne, M., Ullrich, R., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2012). A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 327–329.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.009>
- Poraj-Kobielska, M., Peter, S., Leonhardt, S., Ullrich, R., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2015). Immobilization of unspecific peroxygenases (EC 1.11.2.1) in PVA/PEG gel and hollow fiber modules. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.037>
- Püllmann, P., Knorrscheidt, A., Münch, J., Palme, P. R., Hoehenwarter, W., Marillonnet, S., Alcalde, M., Westermann, B., & Weissenborn, M. J. (2021). A modular two yeast species secretion system for the

- production and preparative application of unspecific peroxygenases. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02076-3>
- Püllmann, P., & Weissenborn, M. J. (2021). Improving the Heterologous Production of Fungal Peroxygenases through an Episomal *Pichia pastoris* Promoter and Signal Peptide Shuffling System. *ACS Synthetic Biology*, 10(6), 1360–1372. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00641>
- Ramirez-Escudero, M., Molina-Espeja, P., Gomez De Santos, P., Hofrichter, M., Sanz-Aparicio, J., & Alcalde, M. (2018a). Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase [Research-article]. *ACS Chemical Biology*, 13(12), 3259–3268. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00500>
- Ramirez-Escudero, M., Molina-Espeja, P., Gomez De Santos, P., Hofrichter, M., Sanz-Aparicio, J., & Alcalde, M. (2018b). Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase. *ACS Chemical Biology*, 13(12), 3259–3268. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00500>
- Ramirez-Ramirez, J., Martin-Diaz, J., Pastor, N., Alcalde, M., & Ayala, M. (2020a). 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(16), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21165734>
- Ramirez-Ramirez, J., Martin-Diaz, J., Pastor, N., Alcalde, M., & Ayala, M. (2020b). 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(16), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21165734>
- Rotilio, L., Swoboda, A., Ebner, K., Rinnofer, C., Glieder, A., Kroutil, W., & Mattevi, A. (2021). Structural and Biochemical Studies Enlighten the Unspecific Peroxygenase from *Hypoxylon* sp. EC38 as an Efficient Oxidative Biocatalyst. *ACS Catalysis*, 11511–11525. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c03065>
- Ryu, K., Hwang, S. Y., Kim, K. H., Kang, J. H., & Lee, E. K. (2008). Functionality improvement of fungal lignin peroxidase by DNA shuffling for 2,4-dichlorophenol degradability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability. *Journal of Biotechnology*, 133(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.008>
- Sáez-Jiménez, V., Acebes, S., Guallar, V., Martínez, A. T., & Ruiz-Dueñas, F. J. (2015). Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design. *PLoS ONE*, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124750>
- Sigmund, M. C., & Poelarends, G. J. (2020). Current state and future perspectives of engineered and artificial peroxygenases for the oxyfunctionalization of organic molecules. *Nature Catalysis*, 3(9), 690–702. <https://doi.org/10.1038/s41929-020-00507-8>
- Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., & Cavaco-Paulo, A. (2018). Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 335–350. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355294>
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., & Lee, J. K. (2013). From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1232–1277. <https://doi.org/10.3390/ijms14011232>
- Sundaramoorthy, M., Ternier, J., & Poulos, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 3(12), 1367–1378. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00274-X)
- Ullrich, R., Nüske, J., Scheibner, K., Spantzel, J., & Hofrichter, M. (2004). Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4575–4581. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4575-4581.2004>
- Ullrich, R., Poraj-Kobielska, M., Scholze, S., Halbout, C., Sandvoss, M., Pecyna, M. J., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2018). Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxygenase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183(March), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.011>
- Valderrama, B., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology*, 9(5), 555–565. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00149-7)
- Wang, Y., Lan, D., Durrani, R., & Hollmann, F. (2017a). Peroxygenases en route to becoming dream catalysts.

What are the opportunities and challenges? *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.10.007>

Wang, Y., Lan, D., Durrani, R., & Hollmann, F. (2017b). Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.10.007>

Xu, Z., Cen, Y. K., Zou, S. P., Xue, Y. P., & Zheng, Y. G. (2020). Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(1), 83–98.  
<https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1682963>

Zhang Tong, Wu Zhenfang, Chen Hui, Wu Qi, Tang Zizhong, Gou Junbo, Wang Lihua, Hao Weiwei, Wang Chunmei, Li Chunmei, Tong, Z., Zhenfang, W., Hui, C., Qi, W., Zizhong, T., Junbo, G., Lihua, W., Chunmei, W., & Chunmei, L. (2010). Progress in strategies for sequence diversity library creation for directed evolution. *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9277–9285.  
[http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=Refine&qid=28&SID=3AGvjUZJe67anfDTEju&page=1&doc=3&cacheurlFromRightClick=no](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=28&SID=3AGvjUZJe67anfDTEju&page=1&doc=3&cacheurlFromRightClick=no)

Zhao, Z., Lan, D., Tan, X., Hollmann, F., Bornscheuer, U. T., Yang, B., & Wang, Y. (2019). How to Break the Janus Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Biocatalysis? Understanding Inactivation Mechanisms to Generate more Robust Enzymes. *ACS Catalysis*, 9(4), 2916–2921. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04948>

Zhi, L., Jiang, Y., Wang, Y., Hu, M., Li, S., & Ma, Y. (2007). Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase. *Biotechnology Progress*, 23(3), 729–733. <https://doi.org/10.1021/bp070024a>