



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

**PRODUCCIÓN EN BIORREACTOR DE UNA FPMO TERMOESTABLE Y
MINERÍA GENÓMICA DE FPMOS PUTATIVAS PROVENIENTES DE
ACTINOMICETOS AISLADOS DEL LUPINO DEL DESIERTO DE ATACAMA.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA

CAROLINA ANDREA GONZÁLEZ ALMONACID

PROFESORA GUÍA:

IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2022

RESUMEN

Las flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a un sustrato y la reducción del otro átomo de oxígeno a agua, son enzimas redox que utilizan un cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD) y NADPH o NADH como donante de electrones. Recientemente se ha reportado una FPMO de clase B llamada *TmCHMO*, originaria del microorganismo *Thermocrispum municipale*, de gran potencial biotecnológico, cuya expresión es recombinante, soluble y activa, resultando atractivo conocer su alcance para sustratos de gran relevancia farmacológica y establecer un protocolo de producción de esta enzima el cual sirva como referencia para analizar la expresión heteróloga de otras FPMOs putativas, homologas a *TmCHMO*, obtenidas de la búsqueda bioinformática en el genoma de 6 *Micromonosporas* y 4 *Streptomyces* provenientes del Lupino del Desierto de Atacama, recientemente aisladas y secuenciadas.

El siguiente trabajo aborda la producción de *TmCHMO* en *Escherichia coli* TOP10-pBAD-His-tag-SUMO a escala biorreactor, cuya inducción se realizó con L-arabinosa 0,1% (p/v) en el cultivo y la actividad enzimática máxima alcanzada fue de 36 [UI/gBS] para ciclohexanona. También se purificó *TmCHMO* en FPLC con afinidad a Níquel y se demostró que *TmCHMO* purificada es capaz de catalizar la transformación de los fármacos de Clomifeno, Dasatinib y en menor actividad Tamoxifeno. Los productos de la reacción de oxidación se utilizan en el estudio de la farmacocinética del medicamento permitiendo determinar su efectividad en los diferentes tratamientos. Por otro lado, se buscó y seleccionó bioinformáticamente 4 FPMOs putativas en base al % de identidad de 35% mínimo, E-value cercano a 0 y secuencias conservadas para FPMOs de clase B y sus respectivas subclases. Se analizó la expresión heteróloga en *Escherichia coli* TOP10-pBAD-His-Tag-SUMO y se observó que para MO2 y MO3 no hubo expresión heteróloga en ninguna de las fracciones analizadas, mientras que para MO1 y MO4 se observó expresión insoluble, sin embargo, no se pudo mejorar la expresión en la fracción soluble pese a las modificaciones en las condiciones de cultivo. Se concluye que establecer una metodología para producir de manera soluble y activa una FPMOs de clase B como *TmCHMO* no asegura la expresión soluble de otras FPMOs putativas de clase B homologas a *TmCHMO*. Surgiendo la posibilidad de modificar o cambiar el sistema de expresión heterólogo utilizado con la finalidad de producir de forma recombinante, soluble y activa FPMOs promisorias para la industria biotecnológica.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.2. Objetivo General | 2 |
| 1.3. Objetivos Específicos..... | 2 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B..... | 3 |
| 2.2 Expresión heteróloga de FPMOs de clase B | 6 |
| 2.3 <i>Tm</i> CHMO, una FPMOs de clase B y subclase BVMO; B1 | 9 |
| 2.4 Microorganismos del desierto de Atacama | 10 |
| 3. METODOLOGÍA | 11 |
| 3.1 Resumen gráfico de metodología analítica y experimental | 11 |
| 3.2 Metodología analítica | 12 |
| 3.3 Metodología experimental | 15 |
| 3.3.1 Búsqueda bioinformática de FPMOs putativos..... | 15 |
| 3.3.2 Clonación de FPMOs putativas..... | 15 |
| 3.3.3 Expresión de <i>Tm</i> CHMO y de FPMOs putativas | 16 |
| 3.3.4 Purificación de <i>Tm</i> CHMO y de FPMOs putativas..... | 17 |
| 3.3.5 Evaluación actividad para la enzima <i>Tm</i> CHMO purificada y en el extracto clarificado..... | 17 |
| 3.3.6 Producción de <i>Tm</i> CHMO en biorreactor a escala laboratorio en <i>Escherichia coli</i> TOP10-pBad-His-Tag-SUMO- <i>Tm</i> CHMO..... | 18 |
| 3.4 Análisis estadístico | 19 |
| 4. RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1 Producción de <i>Tm</i> CHMO a escala Biorreactor en <i>Escherichia coli</i> TOP10-pBAD-His-Tag-SUMO- <i>Tm</i> CHMO..... | 20 |
| 4.2 Evaluación actividad de oxidación de Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib para la enzima <i>Tm</i> CHMO. | 21 |
| 4.3 Búsqueda bioinformática de FPMOs putativas..... | 22 |
| 4.4 Clonación, Expresión y Purificación de FPMOs putativas | 26 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 30 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 34 |
| 7. RECOMENDACIONES | 35 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 9. ANEXOS | 43 |
| Anexo A: Sobre clonación de FPMOs putativas..... | 43 |
| Anexo B: Curvas de calibrado | 45 |
| Anexo C: SDS-PAGE sobre condiciones de expresión de MO1 y MO4 putativas | 49 |
| Anexo D: ejemplo de cálculo para actividad enzimática. | 52 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Ciclo catalítico de FPMO grupo B, figura extraída y modificada de (Paul et al 2021). ... | 1 |
| Figura 2.1 Estructura cristalina de una FPMO de clase B, Fenilacetona monooxigenasa (PAMO). Dominio FAD (verde), NADP (azul-cian), huellas dactilares de BVMO (rojo). Figura extraída y modificada de (Malito et al., 2004). | 3 |
| Figura 2. 2 Representación del ciclo catalítico de algunas FPMOs de clase B (Figura extraída y modificada de Paul et al, 2021). | 5 |
| Figura 2. 3 Estructura cristalina de TmCHMO. Dominio FAD (amarillo), dominio NADPH (naranja), dominio helicoidal (púrpura), regiones enlazadoras (cian). Figura modificada de (Romero et al. 2016). | 9 |
| Figura 3. 1 Diagrama sobre la metodología aplicada en la producción de una FPMOs termoestable (TmCHMO), evaluación de actividad de oxidación de fármacos por TmCHMO y búsqueda bioinformática y expresión heteróloga de FPMOs putativas. | 11 |
| Figura 4. 1 Perfil de crecimiento de E. coli TOP10-pBAD-His-Tag-SUMO-TmCHMO (), perfil de desaparición de glicerol () y perfil de aparición de actividad enzimática de TmCHMO () para ciclohexanona 5 mM inducido con un pulso de L-arabinosa 0,1% (p/v). | 20 |
| Figura 4. 2: Actividad de oxidación de Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib para la enzima TmCHMO. En el eje principal se observa la actividad enzimática de TmCHMO para Ciclohexanona, Bicyclo [3.2.0]hept-2-en-6-one, Tioanisole, Clomifeno, Dasatinib y Tamoxifeno utilizando NADPH como cofactor. El eje secundario muestra el % relativo de actividad enzimática con respecto a Ciclohexanona. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado. | 21 |
| Figura 4.3: Análisis filogenético de las secuencias de las FPMOs putativas encontradas (círculo azul) en conjunto con las secuencias de consulta utilizadas (círculo anaranjado) | 24 |
| Figura 4. 4: FPMOs putativas seleccionadas, en rojo se observan las secuencias conservadas de Rossman, en verde la secuencia conservada de FMO y en azul la secuencia conservada de BVMO | 25 |
| Figura 4. 5: SDS-PAGE sobre la expresión de las FPMOs. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las fracciones insoluble (IN), soluble (S) y purificada desde la fracción soluble (P) de la MO1, respectivamente. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO2, respectivamente. Los carriles 7, 8 y 9 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO3, respectivamente. Los carriles 10, 11 y 12 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO4, respectivamente. Y los carriles 13, 14 y 15 corresponden a las fracciones IN, S y P de la TmCHMO (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie). | 26 |

Figura 4. 6: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO1 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente) (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie). 27

Figura 4. 7: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO4 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente) (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie)...... 28

Figura 4. 8: SDS-PAGE de las FPMOs purificadas desde la fracción soluble. El carril 1 es la MO1, el carril 2 es la MO4, el carril 3 es TmCHMO (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie)..... 28

Figura 4. 9: SDS-PAGE de las MO1 y MO4 purificadas desde la fracción insoluble en condiciones denaturantes con urea 8M. El carril 1 corresponde a MO1 y el carril 2 corresponde a la MO4 (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie)...... 29

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 2. 1 Secuencias conservadas para FPMOs de clase B y sus subclases respectivas..... | 4 |
| Tabla 2. 2 Resumen sobre expresión heteróloga de FPMOs..... | 8 |
| Tabla 4. 1: FPMOs utilizadas como secuencia de consulta en la búsqueda bioinformática de FPMOs putativas. | 22 |
| Tabla 4. 2: FPMOs putativas seleccionadas en base al porcentaje de identidad igual o superior al 35% y E-value cercano a 0..... | 23 |

1. INTRODUCCIÓN

Las flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) del grupo B son enzimas redox que utilizan un cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD) para activar el oxígeno molecular (O_2), utilizando NADPH o NADH como donante de electrones. Estas FPMOs catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a un sustrato y la reducción del otro átomo de oxígeno a agua como se observa en la Figura 1.1 (Romero et al 2018).

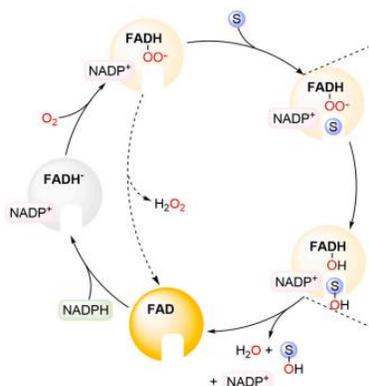


Figura 1.1 Ciclo catalítico de FPMO grupo B, figura extraída y modificada de (Paul et al 2021).

Las FPMOs del grupo B están involucradas en procesos biológicos que incluyen la degradación de la lignina, biosíntesis de productos naturales como metabolitos secundarios complejos y desintoxicación de compuestos xenobióticos (Paul et al 2021; Tolmie et al, 2019). Son biocatalizadores prometedores para la industria biotecnológica ya que se pueden aplicar a un conjunto diverso de reacciones con excelente quimio, regio y enantioselectividad, tales como la conversión de una amplia gama de cetonas en ésteres o lactonas (Alphand et al, 2003), en reacciones de sulfoxidación para la producción de sulfóxidos ópticamente activos (Matsui et al, 2014; Xu et al, 2020), en la oxigenación de heteroátomos para la síntesis de metabolitos de fármacos humanos (Bailleul et al, 2021; Catucci et al, 2020) y por último, están involucradas en reacciones de N-hidroxilaciones de aminoácidos que se encuentran en rutas biosintéticas de metabolitos secundarios (Ballou y Entsch, 2013 ; Robinson y Sobrado, 2013).

Recientemente se ha reportado una FPMO de clase B con actividad Baeyer-Villiger monooxigenasa (BVMO) que utiliza cofactor NADPH y es de gran potencial biotecnológico dado su estabilidad frente a la temperatura y cosolventes, y su síntesis de forma recombinante, soluble y activa, resultando atractivo utilizarla para establecer una

metodología para producir FPMOs de clase B a escala biorreactor y estudiar su actividad para sustratos de relevancia farmacológica (Romero et al. 2016).

Por otro lado, se han aislado y secuenciado 10 actinobacterias provenientes del Lupino del Desierto de Atacama, específicamente 6 *Micromonosporas* y 4 *Streptomyces*. Resultando novedosa la búsqueda bioinformática en el genoma de estos microorganismos, de posibles FPMOs de clase B que cuenten con características diferentes a las BVMOs de *Streptomyces Leeuwenhoekii C34* ya reportadas. Por ejemplo, una secuencia conservada para enzimas del tipo FMOs debido a su promiscuidad en el uso de NADPH o NADH (Jensen C. et al, 2014) y su actividad de oxidación para fármacos.

El siguiente trabajo aborda el estudio de la producción de una FPMO de clase B *TmCHMO* recuperada de una actinobacteria termófila *Thermocristum municipale* (Romero et al. 2016), en *Escherichia coli* TOP10- pBAD-His-tag-SUMO a escala biorreactor, estudiar su posible aplicación sobre sustratos de uso farmacológico, y la expresión heteróloga de posibles FPMOs provenientes de actinobacterias aisladas del Lupino del Desierto de Atacama en *Escherichia coli*. En primer lugar, se produjo a escala biorreactor la enzima *TmCHMO* y se purificó en FPLC con afinidad de Níquel, posterior a ello se evaluó su actividad de oxidación de Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib. Luego se buscó y seleccionó bioinformáticamente FPMOs putativas, y se analizó la expresión heteróloga de estas enzimas en *Escherichia coli* TOP10 utilizando el plásmido pBAD-His-Tag-SUMO.

1.2. Objetivo General

- Establecer un sistema de producción de una FPMOs termoestable y evaluar la expresión heteróloga de FPMOs putativas provenientes de Actinomicetes aislados del Lupino del Desierto de Atacama.

1.3. Objetivos Específicos

- Producir en *Escherichia coli* TOP10 a escala biorreactor una enzima FPMOs de clase B de la actinobacteria *Thermocristum municipale* (*TmCHMO*).
- Evaluar actividad enzimática de *TmCHMO* para Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib.
- Buscar y seleccionar bioinformáticamente FPMOs de Actinomicetes aislados del Lupino del Desierto de Atacama.
- Analizar la expresión heteróloga de FPMOs putativas seleccionadas en *Escherichia coli* TOP10 usando el plásmido pBAD-His-tag-SUMO.

2. ANTECEDENTES

2.1 Flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B

Las flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a un sustrato y la reducción del otro átomo de oxígeno a agua. Específicamente las FPMOs de clase B son enzimas redox que utilizan un cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD) para activar el oxígeno molecular (O₂) y además utilizan NADPH o NADH como donante de electrones.

Las FPMOs del grupo B a su vez se subclasifican en Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMO; B1), en Flavina monooxigenasas (FMO; B2) y en monooxigenasas N-hidroxilantes (NMO; B3) (Van Berkel et al, 2006; Riebel et al, 2013). Siendo enzimas de un solo protómero que tienen un cofactor FAD fuertemente unido y están compuestas estructuralmente por dos dominios $\beta\beta\alpha$ de tres capas de Rossmann que permiten la unión a FAD y NAD(P)H, ver Figura 2.1 (Riebel et al, 2013; Romero et al, 2018).

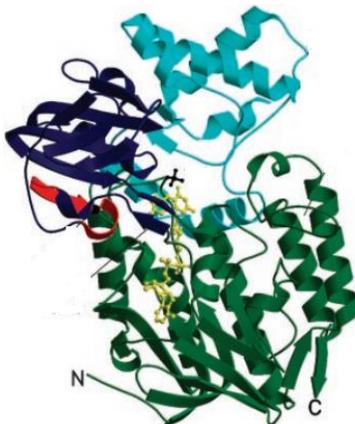


Figura 2.1 Estructura cristalina de una FPMO de clase B, Fenilacetona monooxigenasa (PAMO). Dominio FAD (verde), NADP (azul-cian), huellas dactilares de BVMO (rojo). Figura extraída y modificada de (Malito et al., 2004).

Por otra parte, todas las FPMOs de clase B se pueden identificar y distinguir de las otras clases de FPMOs porque contienen dos secuencias conservadas típicas de pliegues de Rossmann, donde la primera está cercana al extremo N-Terminal mientras que la otra está en medio de la secuencia aminoacídica (Riebel et al, 2013). A su vez las subclases de FPMOs de clase B se pueden identificar y diferenciar entre ellas porque contienen secuencias conservadas específicas, ya sea para las BVMO (B1) y para las FMO (B2) no así para las NMO (B3), ver Tabla 2.1 (Riebel et al, 2013; Fraaije et al, 2002).

Tabla 2. 1 Secuencias conservadas para FPMOs de clase B y sus subclases respectivas.

| | Motivo de Secuencia | Referencia |
|-----------|---|---|
| Rossmann | GXGXX(G/A) | Fraaije et al, 2002 |
| BVMO (B1) | [A/G]GxWxxxx[F/Y]P[G/M]xxxD FxGxxxHxxxWP/D | Riebel et al, 2012 Riebel et al, 2013 Fraaije et al, 2002 |
| FMO (B2) | FXGXXXHXXX(Y/F) FxGxxxHxxxY(K/R) | Fraaije et al, 2002 Riebel et al, 2013 |

Las BVMOs (B1) son el tipo de FPMOs de clase B más estudiado (Paul et al., 2021), son dependientes de NADPH y catalizan principalmente la conversión (u oxidación) de una amplia gama de cetonas en ésteres o lactonas como es el caso de la ϵ -caprolactona a partir de la ciclohexanona, la ϵ -caprolactona es precursora de poliésteres biodegradables como poli(ϵ -caprolactona) y poliglicaprona, biopolímeros empleados en la industria biomédica (Contreras y Medina 2016), también es precursora en la síntesis de caprolactama, monómero clave en la elaboración de nailon, polímero producido globalmente a una escala de 4 millones de toneladas por año (Thaore, Chadwick, y Shah 2018). Las BVMOs igualmente catalizan reacciones de sulfoxidación para producir sulfóxidos ópticamente activos, un ejemplo es la síntesis del inhibidor de ácido gástrico esomeprazol a partir de pirmetazol (Xu et al, 2020; Zhang et al, 2019). Por último, las BVMOs también pueden catalizar reacciones de epoxidaciones y N-oxigenaciones (Colonna et al, 2002; Maczka et al., 2018).

Las FMOs (B2) son enzimas recientemente consideraras como biocatalizadores (Ríoz-Martínez et al, 2011), éstas utilizan tanto NADPH como NADH y catalizan principalmente reacciones de oxidación a compuestos que contienen heteroátomos mientras que son ineficientes en las reacciones catalizadas por las BVMOs (Riebel et al, 2013). Las FMOs son de gran relevancia farmacológica ya que catalizan por ejemplo la oxigenación de Clomifeno, medicamento no esteroideo utilizado para el tratamiento de fertilidad en mujeres (Rostami-Hodjegan et al, 2004; Dewailly et al, 2010), Dasatinib metabolito utilizado para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica y la leucemia linfoblástica aguda (Kamath et al, 2007) y Tozasertib fármaco en evaluación para el tratamiento contra el cáncer (Ballard et al, 2007; Catucci et al, 2013).

Por último, las NMOs (B3) son la tercera subclase de las FPMOs de clase B, requieren de NADPH y catalizan N -hidroxilaciones de aminoácidos, como lisina, aspartato y ornitina que se encuentran en vías biosintéticas de metabolitos secundarios como sideróforos y agentes antimicrobianos (Ballou y Entsch, 2013; Robinson y Sobrado, 2013; Wang et al, 2018; Matsuda et al, 2018), hasta la fecha no se ha reportado actividad de sulfoxidación ni BVMO para las NMOs (Paul et al, 2021).

Algunas de las reacciones enzimáticas más estudiadas por las FPMOs de clase B se representan en la Figura 2.2, donde A) es la Oxidación de Baeyer-Villiger de Fenilacetona a Acetato de bencilo por PAMO; B) es la Oxidación de Baeyer-Villiger de ciclohexanona a ϵ -caprolactona por CHMO de *Acinetobacter* sp; C) es la N -hidroxilación de trimetilamina a N -óxido de trimetilamina por monooxigenasa Tmm; D) es la Oxidación de Baeyer-Villiger de β -ionona a su acetato por monooxigenasa FMO5; E) es la N -hidroxilación de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a 2-(hidroxiamino)-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol por Ni-FMO y F) es la Sulfoxidación de pirimetazol a esomeprazol por CHMO_m de *Acinetobacter* sp.

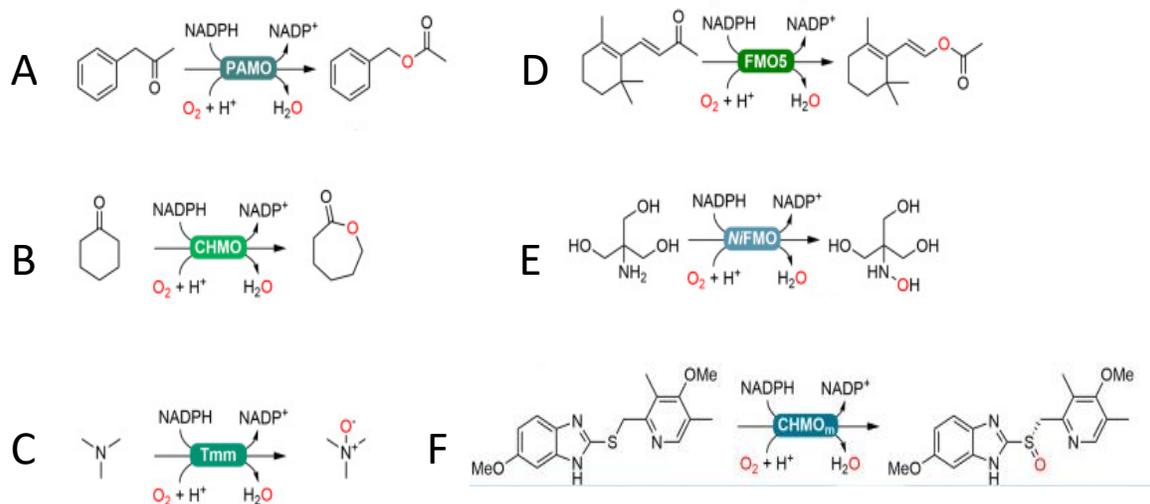


Figura 2. 2 Representación del ciclo catalítico de algunas FPMOs de clase B (Figura extraída y modificada de Paul et al, 2021).

2.2 Expresión heteróloga de FPMOs de clase B

Para que las FPMOs de clase B puedan expresarse de manera soluble, activa y funcional es necesario tener en consideración las condiciones de cultivo que optimizan la expresión de estas enzimas, el control sobre las condiciones de cultivo, la célula hospedera a utilizar y el vector de expresión que favorece la producción heteróloga de las FPMOs.

Expresar FPMOs de clase B en un biorreactor Batch permite mejorar la producción de estas proteínas recombinantes, ya que se logra operar en condiciones controladas de pH mediante la adición de ácido-base, existe control sobre la transferencia de oxígeno hacia el cultivo microbiano mejorando los rendimientos de biomasa y producción de las enzimas, también se puede manipular la temperatura del cultivo en base a la necesidad del crecimiento microbiano y la expresión de la proteína recombinante de interés (Doran, P. 1995).

En lo que respecta a las condiciones de cultivo para la síntesis de las FPMOs algunos de los factores que han sido estudiados con mayor frecuencia son la temperatura de crecimiento y la temperatura de inducción, además de la concentración del inductor y el momento de la inducción (Chen y Xu 2011; Doig et al., 2001; Lee y Keasling 2008). Asimismo, la composición del medio de cultivo en el que se realiza la expresión también es un factor relevante, ya que los componentes del medio pueden interferir en la producción basal de las enzimas recombinantes, ya sea generando una alta producción bajo condiciones no inducidas o provocar la liberación de la proteína al medio extracelular (Grossman et al., 1998).

Se ha reportado que para la producción de FPMOs se utiliza con mayor frecuencia el medio complejo Terrific Broth (TB) (Ver Tabla 2.3), sin embargo, en este trabajo se utilizará Luria Bertani (LB) dado su bajo costo comercial con respecto a TB (www.sigmaaldrich.com) y porque se han informado interesantes resultados sobre la producción a escala biorreactor de una FPMOs utilizando LB enriquecido con fuentes de carbono tales como glicerol para aumentar los niveles de masa celular y así obtener mayor cantidad de enzima recombinante (Doig et al., 2001).

El inductor más utilizado en la expresión de las FPMOs es L-Arabinosa, puesto que resulta atractivo comercialmente debido a los bajos costos que este inductor presenta, además de la estricta regulación de la expresión y el control sobre el nivel de expresión génica tras la inducción (Szélieová et al. 2016). En la Tabla 2.2 se observan las diferentes concentraciones

de L-Arabinosa utilizadas en la expresión de las distintas FPMOs, cuya concentración va desde 0.002% hasta 0.1% (v/v).

Sobre la temperatura óptima de crecimiento e inducción para la expresión de las FPMOs, se ha reportado que la temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es de 37°C, sin embargo, no necesariamente aquella temperatura corresponde a la temperatura óptima para inducir la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* (Singha et al., 2017). En algunos casos el uso de temperaturas por debajo de la temperatura óptima de crecimiento favorece la síntesis de proteínas recombinantes, mejorando el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés puesto que al disminuir la temperatura se disminuye la sobrecarga de la maquinaria de transcripción y traducción, favoreciendo el correcto plegamiento de la proteína recombinante y la ubicación de la enzima en los compartimentos deseados (Chen y Xu., 2011; Donovan, Robinson, y Glick 1996). En la Tabla 2.2 se observan las temperaturas de crecimiento e inducción para la expresión recombinante de diferentes FPMOs.

La célula hospedera más utilizada para la expresión de FPMOs recombinantes es *Escherichia coli* (Ver Tabla 2.2), puesto que es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: la rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), la fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, la alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo y la gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes (Nygren y Sta, 2002).

Particularmente, *Escherichia coli* TOP10 es una cepa recombinante que se caracteriza por ser capaz de mantener constante los niveles de L-Arabinosa en su interior en el transcurso del tiempo, ya que transporta, pero no metaboliza este monosacárido de cinco carbonos, favoreciendo la expresión de proteínas recombinantes inducidas por este inductor (Doig et al. 2001; www.thermofisher.com).

Por último, el plásmido pBAD-His-tag-SUMO es un vector de expresión recurrentemente utilizado en la síntesis recombinante de FPMOs de clase B (Ver Tabla 2.2) el cual se utilizará en el siguiente trabajo y fue donado por el profesor Marco Fraaije de la Universidad de Groningen (The Netherlands) y la empresa GECCO-biotech. Este plásmido posee un promotor araBAD para una expresión regulada e inducida por L-arabinosa, señales de la iniciación de la traducción optimizadas para *Escherichia coli*, etiqueta de polihistidina N-terminal (6xHis) para favorecer la purificación, un marcador que confiere

resistencia a Ampicilina y una proteína de fusión SUMO que mejora la solubilidad de la proteína de interés (www.thermofisher.com).

Tabla 2. 2 Resumen sobre expresión heteróloga de FPMOs

| Enzima | Clase/Subclase | Célula hospedera | Vector de expresión | Medio cultivo | Inductor/ concentración % (v/v) | T°C crecimiento/ inducción | Referencia |
|-----------|----------------|----------------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| TmCHMO | B/BVMO | <i>Escherichia coli</i> TOP 10 | pBAD-His-Tag-SUMO-TmCHMO | LB/LB | L-arabinosa/0.02% | 37°/24° | Romero et al, 2016 |
| Sle_13190 | B/BVMO | NEB 10-β <i>Escherichia coli</i> | pCRE2 | TB/ TB | L -arabinosa/ 0.002, 0.02 y 0.2% | 37°/ 17, 24, 30 y 37°C | Gran-Scheuch et al, 2018 |
| Sle_62070 | B/BVMO | NEB 10-β <i>Escherichia coli</i> | pCRE2 | TB/ TB | L -arabinosa/ 0.002, 0.02 y 0.2% | 37°/ 17, 24, 30 y 37°C | Gran-Scheuch et al, 2018 |
| TjPAMO | B/BVMO | <i>Escherichia coli</i> TOP 10 | pBADNK | TB/TB | L -arabinosa/ 0,1 % | 37°/37° | Fraaije et al, 2005 |
| AcCHMO | B/BVMO | <i>Escherichia coli</i> TOP 10 | pQR239 | LB/LB | L -arabinosa/ 0,1 % | 37°/37° | Doig et al. 2003 |
| NiFMO | B/FMO | NEB 10-β <i>Escherichia coli</i> | pBAD-His-Tag-SUMO-NiFMO | TB/ TB | L-arabinosa/0.02% | 37°/25° | Loncar et al, 2019 |
| FMO1 | B/FMO | NEB 10-β <i>Escherichia coli</i> | pBAD-His-Tag-SUMO-FMO1 | TB/ TB | L-arabinosa/0.02% | 24° o 17°/24° o 17° | Bailleul et al, 2021 |
| FMO5 | B/FMO | <i>E. coli</i> . BL21 | pBAD-NK | TB/ TB | L-arabinosa/0.02% | 37°/24° | Nicoll et al, 2019 |

2.3 *Tm*CHMO, una FPMOs de clase B y subclase BVMO; B1

*Tm*CHMO (*Tm*CHMO; EC 1.14.13.22) es un biocatalizador Baeyer-Villiger, dependiente de FAD y NADPH. Su secuencia fue recuperada de una actinobacteria termófila (*Thermocrispum municipale*) aislada del compost de residuos municipales. Su estructura general comprende cuatro regiones; un dominio FAD, un dominio NADPH, un dominio helicoidal y regiones enlazadoras (Ver figura 2.1) (Romero et al. 2016).

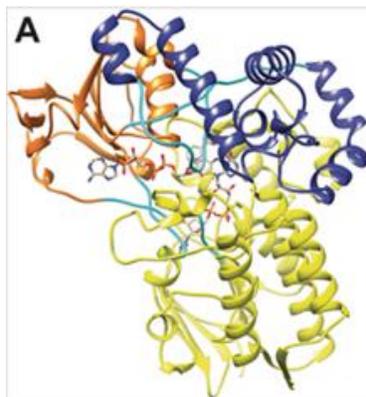


Figura 2. 3 Estructura cristalina de *Tm*CHMO. Dominio FAD (amarillo), dominio NADPH (naranja), dominio helicoidal (púrpura), regiones enlazadoras (cian). Figura modificada de (Romero et al. 2016)

Esta enzima, recientemente descubierta, demostró ser un prometedor biocatalizador oxidativo ya que se puede expresar de manera recombinante, soluble y activa, además de catalizar eficientemente cetonas alifáticas, aromáticas y cíclicas, así como también sulfuros (Romero et al., 2016; De Gonzalo et al., 2018). Por otro lado, se han obtenido conversiones para ciclohexanona utilizando la enzima aislada y la célula completa (Romero et al., 2016; Solé et al., 2019).

A su vez este biocatalizador reportó gran termoestabilidad con respecto a otras CHMO estudiadas, siendo su temperatura de desnaturalización de 48°C y conservando aproximadamente un 58% de su actividad, para ciclohexanona, después de 5,5 h a 45°C. Además, se caracteriza por su gran estabilidad con respecto a los disolventes, conservando más del 80% de su actividad, para ciclohexanona, transcurridas 20 h de incubación con acetonitrilo al 14% a 20°C (Romero et al. 2016).

2.4 Microorganismos del desierto de Atacama

La región hiperárida del Desierto de Atacama se caracteriza por una gran variación diaria de temperatura, entre -8 y 50 °C (Pulschen et al., 2015), baja disponibilidad de agua (Azua-Bustos et al., 2012), exposición alta a luz ultravioleta y alta salinidad, el desierto contiene depósitos naturales de aniones como Cl, ClO_3^- , entre otros (Paulino-Lima et al., 2013). Estas características generan como consecuencia que la biodiversidad microbiana que prospera ahí resulte de gran interés biotecnológico, siendo llamativa la exploración de estos microorganismos y sus enzimas.

Desde hace un tiempo se ha trabajado en la búsqueda de actinobacterias provenientes del Desierto de Atacama dado su gran potencial biotecnológico (Cameron et al, 1966; Okoro et al, 2009; Opfell y Zebal 1967). Estos microorganismos se caracterizan por ser productores de metabolitos secundarios complejos tales como antibióticos y sideróforos (Jarmusch et al, 2021; Carro et al 2018). Por otra parte, se ha reportado que las FPMOs de clase B están involucradas en procesos metabólicos relacionados con la construcción de metabolitos secundarios (Tolmie et al, 2019).

Hasta la fecha, se han reportado dos BVMOs de *Streptomyces Leeuwenhoekii C34* (Actinobacteria proveniente del Desierto de Atacama) estas enzimas reportaron gran estabilidad a altas temperaturas y cosolventes (Fraaije et al, 2005; Gran-Scheuch et al, 2018), lo cual se puede relacionar con que son enzimas aisladas de un microorganismo extremófilo cuyas enzimas suelen ser más tolerantes frente a altas condiciones de temperatura (Demirjian et al, 2001; Karan et al, 2012).

Recientemente se han aislado y secuenciado 10 actinobacterias provenientes del Lupino del Desierto de Atacama, específicamente 6 *Micromonosporas* y 4 *Streptomyces*. Resulta atractivo realizar una búsqueda bioinformática en el genoma de estos microorganismos, de posibles FPMOs de clase B, considerando los antecedentes expuestos y además que cuenten con características diferentes a las BVMOs de *Streptomyces Leeuwenhoekii C34* ya reportadas, como por ejemplo un dominio NADH y/o una secuencia conservada para enzimas del tipo FMOs. También resulta interesante producir la enzima *TmCHMO* en biorreactor a escala laboratorio y conocer sus sustratos considerando su atractiva estabilidad frente a la temperatura y cosolventes. Y de paso, sería interesante poder establecer un protocolo de producción de esta enzima el cual sirva como referencia para el estudio de la expresión heteróloga de las posibles FPMOs, homologas a *TmCHMO*, provenientes del Lupino del Desierto de Atacama.

3. METODOLOGÍA

3.1 Resumen gráfico de metodología analítica y experimental

En la figura 3.1 se muestra un esquema resumen con la metodología utilizada en el desarrollo de esta investigación.

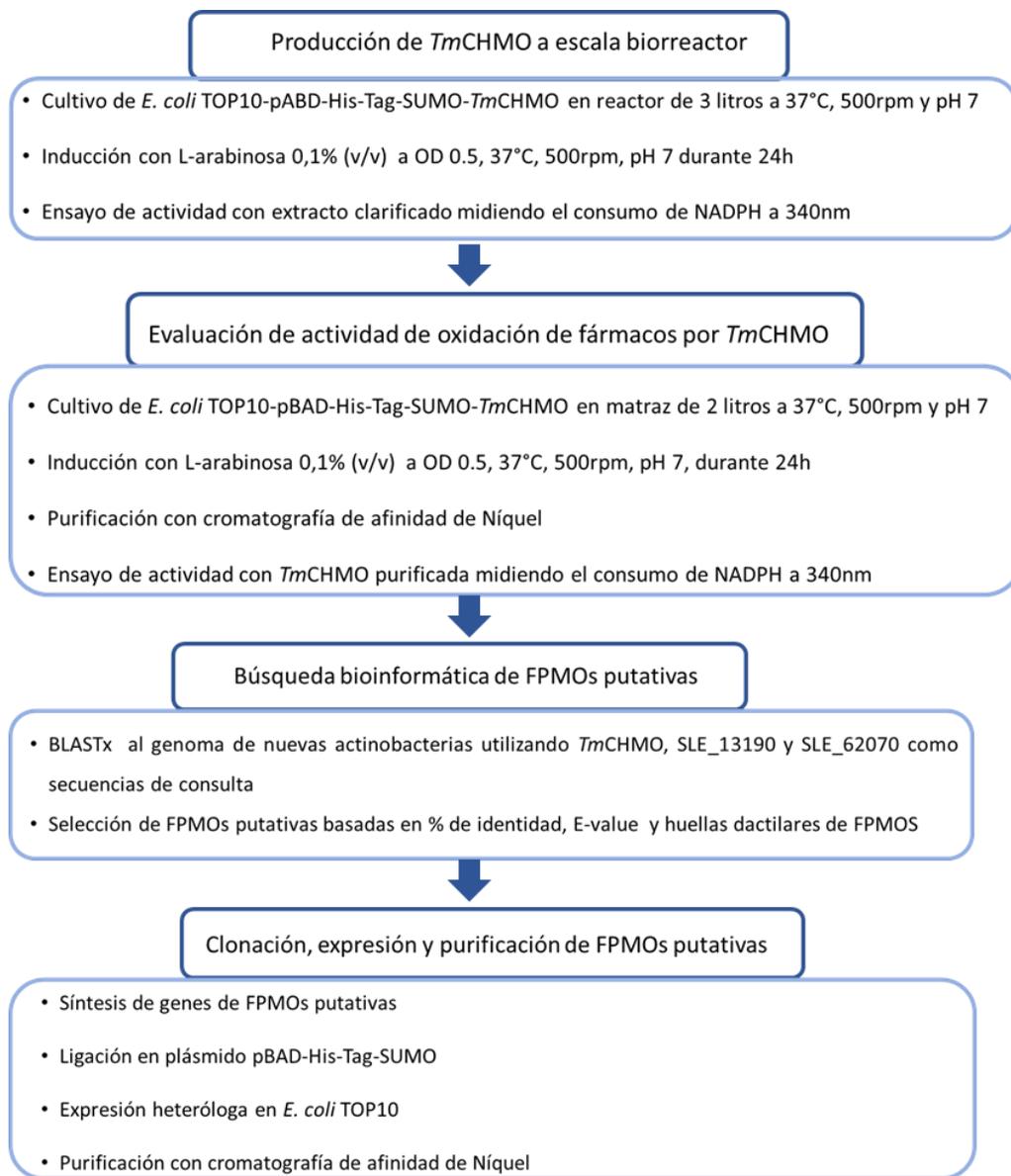


Figura 3. 1 Diagrama sobre la metodología aplicada en la producción de una FPMOs termoestable (*TmCHMO*), evaluación de actividad de oxidación de fármacos por *TmCHMO* y búsqueda bioinformática y expresión heteróloga de FPMOs putativas.

3.2 Metodología analítica

En la Tabla 3.1 se describen las metodologías analíticas utilizadas en el desarrollo de esta investigación.

Tabla 3.1: Metodologías analíticas utilizadas en la producción de una FPMO termoestable (*Tm*CHMO), evaluación de actividad de oxidación de fármacos para *Tm*CHMO y búsqueda bioinformática y expresión heteróloga de FPMOs putativas provenientes de actinomicetos aislados del Lupino del Desierto de Atacama.

Medición concentración de biomasa

- Se tomó 1 mL de caldo de cultivo, se diluyó en caso de ser necesario, se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Biochrom Libra S50) y se interpoló el valor de absorbancia obtenido en curva de calibrado (Anexo B1).

Medición concentración de glicerol

- Se tomó 1 mL de caldo de cultivo y se puso en un Eppendorf de 1,5 mL, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C en microcentrífuga (Eppendorf 5403), se filtró en filtros de Nylon de 0,22 µm y se dispuso la muestra en un Vial, se midió cada muestra en HPLC-IR, bajo las siguientes condiciones cromatográficas; T 55°C, Flujo 0,6 mL/min, Fase móvil 1,5mM H₂SO₄, Columna Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm, (Bio-rad), inyección de 20 µL y tiempo de retención de 14 min, finalmente se interpoló el resultado obtenido en curva de calibrado (Anexo B2).

Preparación muestras para purificación en FPLC

- Todo el trabajo se realizó en hielo o a 4°C. Se tomaron 50 mL de caldo de cultivo y se transfirieron a un tubo de centrifuga, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C en centrifuga (Eppendorf 5804R) se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer fosfato 20 mM pH-7.4, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet lavado en 25 mL de una solución buffer fosfato 20 mM pH-7.4, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol y 3 mM Benzamidina.
 - El pellet anteriormente obtenido fue sonicado (Qsonica Q500) durante 20 ciclos de 5 On y 20 segundos Off a una amplitud de 40%. Se centrifugó durante 30 minutos a 11.000 rpm y 4°C, finalmente se separó el pellet del extracto clarificado y el pellet se suspendió en 25mL de urea 8M.
-

Purificación de *Tm*CHMO y de FPMOs putativas

- Se utilizó el sistema de purificación FPLC Akta™ Avant 25 para la purificación de *Tm*CHMO y las FPMOs putativas a 4°C. Durante la cromatografía se registró la absorbancia a 280 nm. La columna Histrap FF de 1 ml (GE healthcare Life Sciences) se equilibró previamente con 10 volúmenes de columna de tampón A (fosfato 20 mM pH 7.4, 5 mM imidazol, 500 mM NaCl) con un flujo de 1 ml/min. Se cargaron 17 mL de cada muestra a la columna a un flujo de 0,5 ml/min usando un loop capilar. La columna se lavó con 20 volúmenes de tampón A con un flujo de 1 ml/min. La proteína unida se eluyó en 8 ml de un gradiente lineal (de 0% a 100%) de Tampón B (fosfato 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM) con un flujo de 0,5 ml/min. El pico de elución fue recolectado y se utilizó para el análisis SDS-PAGE y medición de actividad enzimática.
- Para la desalinización de *Tm*CHMO la muestra total fue cargada en la columna de desalinización Hiprep™ 26/10 previamente equilibrada con Tris-HCl pH 7,4 50 mM. La elución se realizó a un flujo de 10 ml/min con 1,5 volúmenes de columna de buffer Tris-HCl pH 7,4 50 mM. La elución fue recolectada en una placa de 96 pocillos profundo en fracciones de 2 mL y se juntaron las fracciones correspondientes al primer pico de 280 nm.
- Para el caso de la purificación en condiciones denaturadas se utilizó el mismo método descrito, la fracción insoluble fue denaturada con urea 8 M y los Buffer A y B descritos anteriormente fueron preparados con urea 8 M.

Medición concentración de proteína del extracto clarificado

- Para la cuantificación de proteínas del extracto crudo se tomaron 5 µL, se diluyó en caso de ser necesario, y se hizo reaccionar con 200 µL del reactivo Bradford durante 2 min, se midió absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Biochrom UVM340) y se interpoló el valor de absorbancia obtenido en curva de calibrado (Anexo B3).

Medición actividad enzimática de *Tm*CHMO en extracto clarificado y purificada

- Para la medición de la actividad enzimática en el extracto clarificado, en una placa de 96 pocillos se hizo reaccionar 70 µL del sobrenadante obtenido con 70 µL de Buffer Tris-HCL pH 7.4 50 mM, 40 µL de NADPH 200 mM y 20 µL de ciclohexanona 5mM, se midió la desaparición de NADPH mediante la lectura directa de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro (SPECTROstar Omega) durante 45 minutos a 25°C. Finalmente se realizaron los cálculos de actividad enzimática (Anexo D).
- Para la medición de la actividad enzimática de *Tm*CHMO purificada, en una placa de 96 pocillos se hizo reaccionar 20 µL de la enzima purificada con 20 µL de NADPH 200 mM y diferentes concentraciones de cada sustrato, añadiendo buffer

Tris-HCL pH 7.4 50 mM hasta alcanzar 200 μ L de volumen de reacción, se midió la desaparición de NADPH mediante la lectura directa de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro (SPECTROstar Omega) durante 45 minutos a 25°C. Finalmente se realizaron los cálculos de actividad enzimática (Anexo D).

SDS PAGE

- Las muestras fueron mezcladas con buffer denaturante 5X, posteriormente se calentaron por 10 minutos a 90°C. Se cargaron volúmenes de 10 y 3 μ L de muestra en gel de poliacrilamida 12,5%. Las muestras fueron corridas durante 45 minutos a voltaje constante (200 V). El gel fue teñido en solución de azul de Coomassie durante 1 hora, posteriormente fue desteñido con solución de distinción (40% metanol/10% ácido acético).
- Para las muestras en condiciones denaturadas se utilizó el mismo método descrito, y las muestras fueron diluidas con buffer fosfato 20 mM pH-7.4 hasta alcanzar la concentración 1M de urea.

Electroforesis con gel de agarosa

- Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 6X. Se cargaron volúmenes de 3 μ L de muestra en gel de agarosa 1% en buffer TAE con red gel 10.000X. Las muestras fueron corridas durante 120 minutos a voltaje constante (90 V). El DNA fue observado en luz UV.
-

3.3 Metodología experimental

Todos los reactivos químicos fueron comprados en Sigma-Aldrich, Difco o Merck, el plásmido pBAD-His-Tag-SUMO-*tm*CHMO fue donado por el profesor Marco Fraaije de la Universidad de Groningen (The Netherlands) y la empresa GECCO-biotech. Los genes fueron sintetizados en GeneUniversal y los primers junto a la secuenciación fue realizada en Macrogen.

3.3.1 Búsqueda bioinformática de FPMOs putativos

Se realizó la búsqueda bioinformática local de FPMOs putativas a partir de la secuencia genómica de 10 cepas aisladas de Lupino del Desierto de Atacama, entre ellas 4 *Streptomyces* y 6 *Micromonosporas*. Se utilizó el programa informático BLAST, las secuencias de consultas fueron secuencias codificantes de proteínas termoestables de BVMOs provenientes de *Streptomyces Leeuwenhoekii* C34 (“SLE_13190”, “SLE_62070”) y la ciclohexanona monooxigenasa de *Thermocrispum municipale* (WP_028849141.1). Se seleccionaron las secuencias de las FPMOs putativas de interés en base al porcentaje de identidad de 35% mínimo y E-value cercano a 0. Finalmente se analizaron los dominios conservados y sitios importantes en la base de datos InterPro <https://www.ebi.ac.uk/interpro/> y MEGA-X.

3.3.2 Clonación de FPMOs putativas

A los genes que codifican para las FPMOs putativas (MO1, MO2, MO3 y MO4) se les realizó una optimización de codones para *E. coli* utilizando la herramienta de *IDT* <https://www.idtdna.com/>. Posterior a ello los genes fueron sintetizados en GenUniversal junto a las secuencias específicas para las enzimas de restricción HindIII y NdeI. Se realizó una digestión a los plásmidos Puc57-MO1; Puc57-MO2; Puc57MO3; Puc57MO4; pBAD-His-Tag-SUMO-*Tm*CHMO con las enzimas de restricción señaladas anteriormente y se purificaron por electroforesis con gel de agarosa los insertos MO1; MO2; MO3; MO4 y el vector pBAD-His-Tag-SUMO, luego se hizo una extracción desde el gel de agarosa con el Kit de extracción GenJET para cada inserto y el vector. Se clonó cada inserto por separado en el vector pBAD-His-Tag-SUMO con la enzima T4 ligasa obteniendo como resultado las siguientes construcciones: pBAD-His-Tag-SUMO-MO1; pBAD-His-Tag-SUMO-MO2; pBAD-His-Tag-SUMO-MO3; pBAD-His-Tag-SUMO-MO4. Cada construcción fue transformada en *E. coli* TOP10 y se sembraron en LB-Agar con Ampicilina 100 mg/L durante la noche, se tomaron colonias aisladas y se sembraron nuevamente en LB-Agar con Ampicilina 100 mg/L durante la noche, luego se realizó un PCR de colonia a dos clones por

transformante y se observaron los insertos junto al vector por electroforesis con gel de agarosa (Ver Anexo A), finalmente se corroboró por secuenciación en Macrogen y se realizaron cultivos de las transformantes en LB- Ampicilina 100 mg/L los cuales fueron almacenados a -80°C con glicerol al 20%.

3.3.3 Expresión de *Tm*CHMO y de FPMOs putativas

Para todos los cultivos realizados se suplementó el medio LB con Ampicilina 100 mg/L y glicerol 3 g/L. De igual manera para todos los cultivos, a partir del respectivo criovial almacenado a -80°C, se realizaron siembras por agotamiento en placas LB-Agar con Ampicilina 100 mg/L, las que se incubaron a 37°C durante la noche con el fin de obtener colonias aisladas y hacer preinóculos de 10mL de medio LB cultivados durante 12h a 37°C y 250 rpm.

Para la expresión de *Tm*CHMO y de las FPMOs putativas se tomaron 5mL del respectivo preinóculo y se inocularon 45mL de medio LB fresco en un matraz de 250 mL y se incubó a 37°C y 250 rpm durante 12h, luego se tomaron 40mL de inóculo y se inocularon 360 mL de medio LB fresco en un matraz de 2L y se cultivó a 37°C y 250 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 4 (fase de crecimiento tardía) para luego inducir añadiendo un pulso de 2mL de L-Arabinosa 200 mg/mL al cultivo para alcanzar una concentración de 0,1% (p/v) de L-Arabinosa en él y continuar el cultivo a 24°C durante 18h a 250 rpm. Posteriormente se ajustó la metodología para la optimización de la expresión de las FPMOs putativas. A partir del preinóculo de 10mL se tomó una alícuota para inocular medio LB fresco y dejar la OD₆₀₀ inicial en 0,05 y cultivar a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5 para luego nuevamente inocular LB fresco y dejar la OD₆₀₀ inicial en 0,1 e incubar a 37°C y 250 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,5 e inducir añadiendo L-Arabinosa y optimizar la expresión probando diferentes concentraciones de inductor (0.02% y 0.1%), temperatura (17°C y 24°C) incubando durante 24 y 48 h.

Para cada cultivo se tomó el caldo de cultivo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en tampón fosfato 20 mM pH-7.4, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet lavado en una solución de tampón fosfato 20 mM pH-7.4, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol y 3 mM Benzamidina. Luego se sonicó la muestra durante 20 ciclos 5/20 On/Off a una amplitud de 40% y se centrifugó durante 30 min a 11000 rpm. Se separó el pellet del extracto clarificado, el pellet se resuspendió en urea 8M y se guardaron alícuotas de muestras para el análisis de SDS-PAGE (descrito en la sección 3.2 Metodología analítica) y la parte restante de cada muestra se utilizó para ser purificada.

Se utilizó como control *E. coli* TOP10 la cual fue tratada en las mismas condiciones sin Ampicilina

3.3.4 Purificación de *Tm*CHMO y de FPMOs putativas

Para la purificación del extracto clarificado de *Tm*CHMO y de las FPMOs putativas se realizaron todos los procedimientos en hielo a 4°C. Durante la cromatografía se registró la absorbancia a 280 nm. La columna Histrap FF de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences) se equilibró previamente con 10 volúmenes de columna de tampón A (fosfato 20 mM pH 7.4, 5 mM imidazol, 500 mM NaCl) con un flujo de 1 ml/min. Se cargó cada muestra a la columna a un flujo de 0,5 ml/min usando un loop capilar. La columna se lavó con 20 volúmenes de tampón A con un flujo de 1 ml/min. La proteína unida se eluyó en 8 ml de un gradiente lineal (de 0% a 100%) de Tampón B (fosfato 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM) con un flujo de 0,5 ml/min. El pico de elución fue recolectado y se utilizó para el análisis SDS-PAGE y medición de actividad enzimática.

Para la purificación de las respectivas muestras en condiciones denaturadas se utilizó el mismo método descrito anteriormente y las muestras fueron denaturadas con urea 8M y los buffers A y B también contenían urea 8M.

Para la desalinización de *Tm*CHMO la muestra total se cargó en la columna de desalinización previamente equilibrada con Tris-HCl pH 7,4 50mM. La elución se realizó a un flujo de 10 ml/min con 1,5 volúmenes de columna de buffer Tris-HCl pH 7,4 50mM. La elución fue recolectada en una placa de 96 pocillos profundos en fracciones de 2 mL y se juntaron las fracciones correspondientes al primer pico de absorbancia a 280 nm.

3.3.5 Evaluación actividad para la enzima *Tm*CHMO purificada y en el extracto clarificado.

Para la evaluación de actividad de *Tm*CHMO purificada se realizaron los ensayos en una placa de 96 pocillos en donde se hizo reaccionar 20 µL de la enzima *Tm*CHMO purificada con 20 µL de NADPH 200 mM y diferentes concentraciones de cada sustrato, añadiendo Tris-HCl pH 7.4 50 mM hasta alcanzar 200 µL de volumen de reacción. Se midió la desaparición de NADPH mediante la lectura directa de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro durante 45 minutos a 25°C de cada ensayo por triplicado. Para el control el sustrato fue reemplazado por buffer.

Para la medición de la actividad enzimática en el extracto clarificado, en una placa de 96 pocillos se hizo reaccionar 70 µL del sobrenadante obtenido con 70 µL de Buffer Tris-HCL

pH 7.4 50 mM, 40 μ L de NADPH 200 mM y 20 μ L de ciclohexanona 50mM. Se midió la desaparición de NADPH mediante la lectura directa de absorbancia a 340 nm durante 45 minutos a 25°C de cada ensayo por triplicado. Se realizaron dos controles en donde uno de ellos contenía todo lo necesario para el ensayo enzimático menos el sustrato (el cual fue reemplazado por buffer) y el otro solo contenía NADPH y sustrato (el extracto crudo fue reemplazado por buffer).

3.3.6 Producción de *Tm*CHMO en biorreactor a escala laboratorio en *Escherichia coli* TOP10-pBad-His-Tag-SUMO-*Tm*CHMO.

La producción de *Tm*CHMO se realizó en duplicado y en cada caso se tomaron 20 mL de preinóculo y se inocularon 180 mL de medio LB fresco en un matraz de 1L y se incubó a 37°C y 250 rpm durante 12 h. Se tomaron los 200 mL de inóculo y se inoculó el reactor que contenía 1,8 L de medio LB fresco, se cultivó a 37°C, pH 7, 500 rpm y 1 vvm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 4 (fase de crecimiento tardía) para luego inducir añadiendo un pulso de 10 mL de L-Arabinosa 200 mg/mL al cultivo para alcanzar una concentración de 0,1% (p/v) de L-Arabinosa en él y continuar el cultivo a 37°C durante 24 h a 500 rpm. Se tomaron muestras durante el cultivo para medir aparición de biomasa, desaparición de fuente de carbono y, una vez iniciada la inducción, la aparición de actividad enzimática y concentración de proteína del extracto clarificado según lo descrito en la sección 3.2 Metodología analítica.

3.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos fueron analizados utilizando Análisis de Varianza (ANOVA) simple con un p-value < 0,05. Una vez encontradas las diferencias se usó un análisis post hoc (Tukey HSD) para determinar cuáles valores son significativamente diferentes con respecto a los otros. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando STATGRAPHICS Centurión 18 versión 18.1.12.

4. RESULTADOS

4.1 Producción de *TmCHMO* a escala Biorreactor en *Escherichia coli* TOP10-pBAD-His-Tag-SUMO- *TmCHMO*.

Se realizó la producción de *TmCHMO* a escala biorreactor utilizando *Escherichia coli* TOP10 (pBAD-His-Tag-SUMO-*TmCHMO*) cuya velocidad específica de crecimiento fue de $0,67 \text{ h}^{-1}$ y se obtuvo un rendimiento de biomasa con respecto a la fuente de carbono de $0,46 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$. La inducción se realizó con un pulso de L-Arabinosa (0,1% p/v) a una OD cercana 4 (3,8 horas iniciado el cultivo) y posteriormente se midió actividad enzimática a través de la desaparición de NADPH a 340nm en el extracto clarificado. En la figura 4.1 se presentan los perfiles de crecimiento de biomasa, desaparición de fuente de carbono y aparición de actividad enzimática de *TmCHMO*.

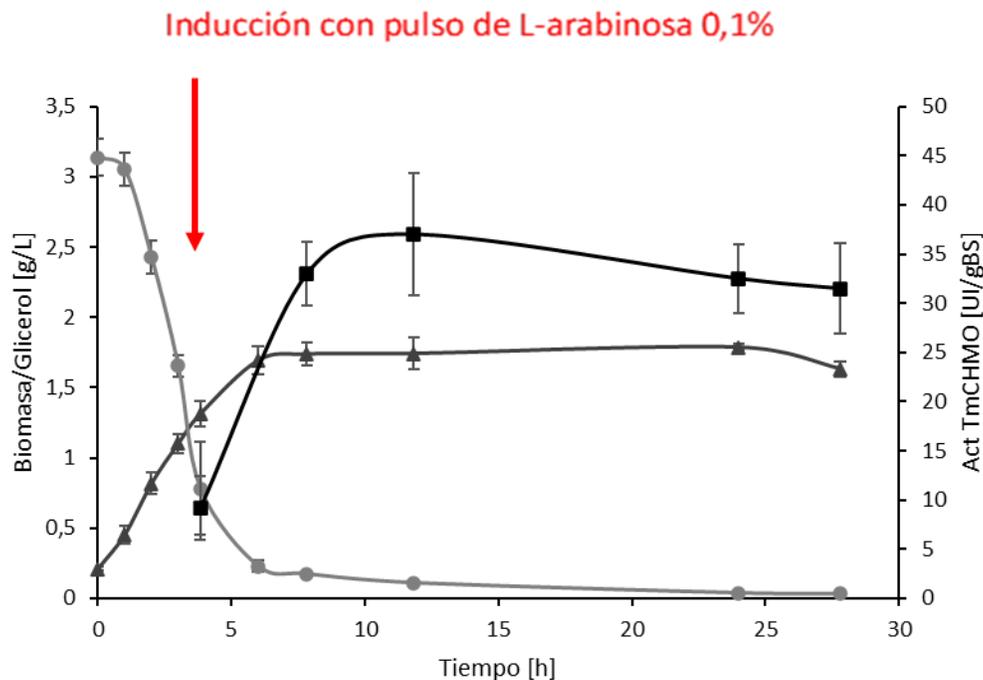


Figura 4. 1 Perfil de crecimiento de *E. coli* TOP10-pBAD-His-Tag-SUMO-*TmCHMO* (▲), perfil de desaparición de glicerol (●) y perfil de aparición de actividad enzimática de *TmCHMO* (■) para ciclohexanona 5 mM inducido con un pulso de L-arabinosa 0,1%(p/v).

4.2 Evaluación actividad de oxidación de Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib para la enzima *TmCHMO*.

Se evaluó la actividad enzimática de *TmCHMO*, purificada mediante afinidad a la columna His-Trap FF 1mL, para Ciclohexanona, Bicyclo [3.2.0]hept-2-en-6-one, Tioanisole, Clomifeno, Dasatinib y Tamoxifeno midiendo la velocidad de desaparición de NADPH a 340nm. Los resultados de actividad se observan en la figura 4.2.

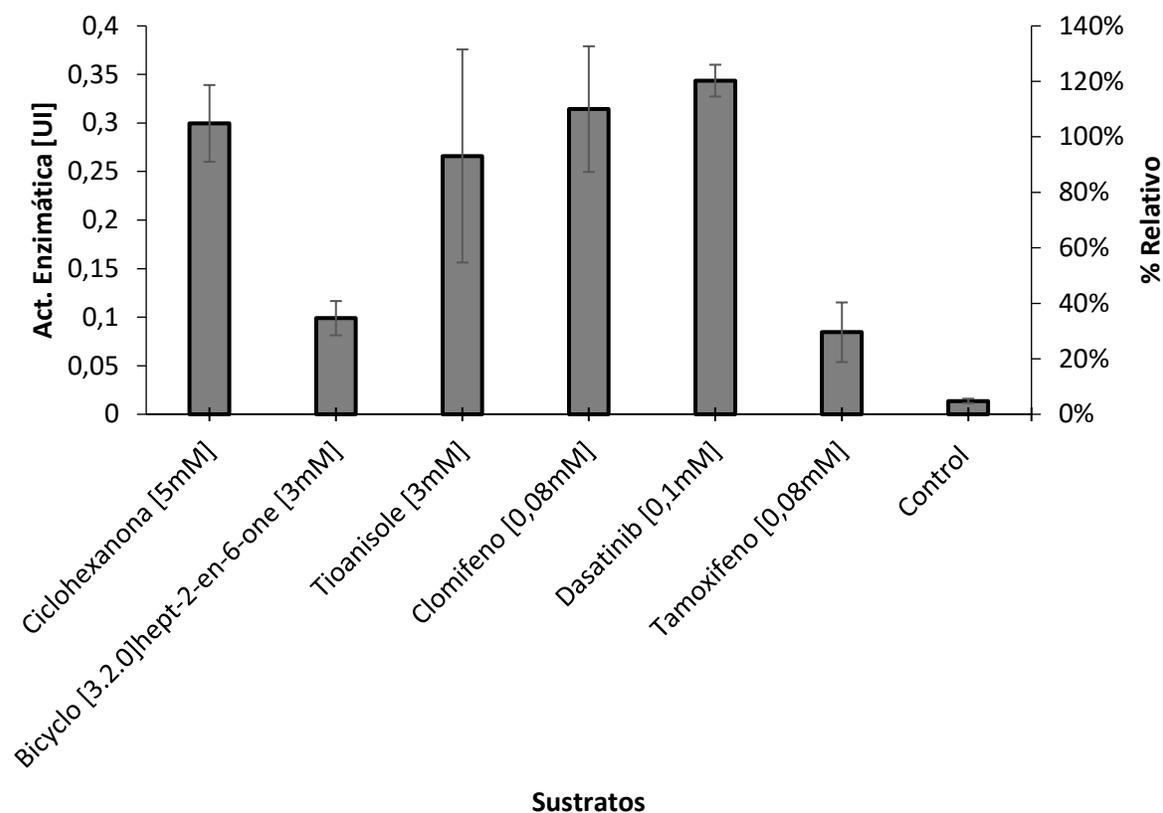


Figura 4. 2: Actividad de oxidación de Clomifeno, Tamoxifeno y Dasatinib para la enzima *TmCHMO*. En el eje principal se observa la actividad enzimática de *TmCHMO* para Ciclohexanona, Bicyclo [3.2.0]hept-2-en-6-one, Tioanisole, Clomifeno, Dasatinib y Tamoxifeno utilizando NADPH como cofactor. El eje secundario muestra el % relativo de actividad enzimática con respecto a Ciclohexanona. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

4.3 Búsqueda bioinformática de FPMOs putativas

En la tabla 4.1 se pueden observar las FPMOs de clase B cuyas secuencias fueron utilizadas como secuencias de consulta en la búsqueda bioinformática de las FPMOs putativas. Las secuencias genómicas consultadas corresponden a 10 actinobacterias aisladas del Lupino del Desierto de Atacama, específicamente 6 *Micromonosporas* y 4 *Streptomyces*.

Tabla 4. 1: FPMOs utilizadas como secuencia de consulta en la búsqueda bioinformática de FPMOs putativas.

| Enzima | Subclase | T _m °C | Microorganismo de origen | Referencia |
|------------------------------------|----------|----------------------|--|-----------------------------|
| <i>Tm</i> CHMO (WP_028849141.1) | BVMO | 47° | <i>Thermocrispum municipale</i> (extremófilo) | Romero et al, 2016 |
| Sle_13190 | BVMO | 45° | <i>Streptomyces Leeuwenhoekii</i> <i>C34 (actinobacteria</i> <i>extremófila)</i> | Gran-Scheuch et al, 2018 |
| Sle_62070 | BVMO | 45° | <i>Streptomyces Leeuwenhoekii</i> <i>C34 (actinobacteria</i> <i>extremófila)</i> | Gran-Scheuch et al, 2018 |

En la Tabla 4.2 se presentan las FPMOs putativas seleccionadas en base al porcentaje de identidad igual o superior al 35% y un E-value cercano a 0, además se observan las secuencias de consulta que coincidieron en el alineamiento y el microorganismo del que proviene cada una de las FPMOs putativas.

Tabla 4. 2: FPMOs putativas seleccionadas en base al porcentaje de identidad igual o superior al 35% y E-value cercano a 0.

| Putative FPMOs | Microorganismo | Sec. consulta | % Identidad | E-Value |
|--|----------------|--|----------------|-------------------------|
| M51_FPMO Cyclohexanone monooxygenase (EC 1.14.13.22) | M51 | WP_028849141.1 | 36 | 7e-71 |
| M37_FPMO Cyclohexanone monooxygenase (EC 1.14.13.22) | M37 | WP_028849141.1 SLE_62070 SLE_13190 | 42 51 42 | 1e-06 1e-11 2e-06 |
| M25_FPMO Flavin-dependent monooxygenase ArsO associated with arsenic resistance | M25 | WP_028849141.1 | 35 | 1e-04 |
| M25_MO Putative oxidoreductasa | M25 | WP_028849141.1 | 36 | 2e-04 |
| G35A_FPMO_1 Flavin-dependent monooxygenase ArsO associated with arsenic resistance | G35-A | SLE_62070 | 37 | 6e-05 |
| G35A_FPMO_2 Flavin-dependent monooxygenase ArsO associated with arsenic resistance | G35-A | SLE_62070 WP_028849141.1 | 35 35 | 3e-05 2e-11 |
| S16_FPMO Flavin-dependent monooxygenase ArsO associated with arsenic resistance | S16 | SLE_62070 | 39 | 5e-5 |
| M60a_FPMO Monooxygenase, flavin-binding family | M60a | WP_028849141.1 | 36 | 1e-31 |
| G35A_MO Neopentalenolactone D synthase (EC 1.14.13.171) | G35-A | SLE_62070 SLE_13190 | 86 48 | 0 4e-163 |

Se utilizó un alineamiento de las secuencias de las FPMOs putativas encontradas (círculo azul) junto con las secuencias de consulta utilizadas (círculo anaranjado) para construir un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining en el software MEGA-X, representado en la figura 4.3.

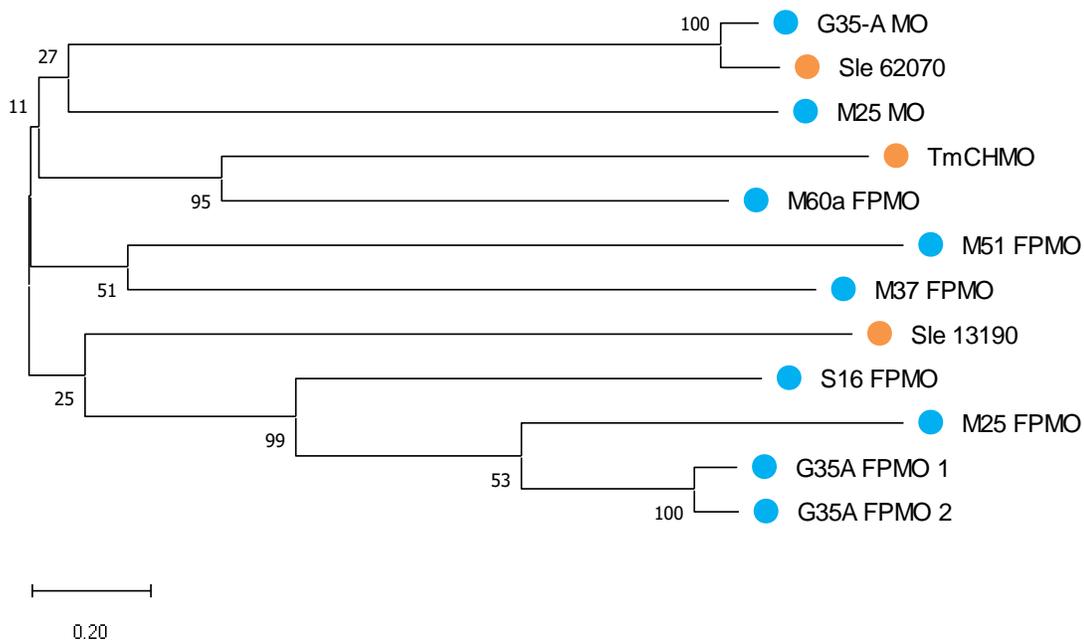


Figura 4.3: Análisis filogenético de las secuencias de las FPMOs putativas encontradas (círculo azul) en conjunto con las secuencias de consulta utilizadas (círculo anaranjado)

A partir del análisis e identificación de las secuencias conservadas de Rossman, de las secuencias conservadas que subclasifican a las FPMOs en BVMOs y FMOs y de la similitud entre ellas, se seleccionaron 4 FPMOs putativas, las cuales se pueden observar en la figura 4.4.

| | | |
|-------------|---|-----|
| M60a_FPMO | -MASDHVDVLIIGAGLSGIGAACHLRDRCPDKTYAVLEARDTI GGTWDLFRYP -GIRSDS | 58 |
| M25_FPMO | --VPGSCDVVVVGGGQAGLAAGYYLRCA--GLDLVILDAQPHSGGAWRHGWESLRLFSPA | 56 |
| G35A_FPMO_2 | --VTQHADVVVVGGGQAGLAAGYHLRRH--GLDFVILDANPAPGGSWQHMMWASLHLFSPA | 56 |
| S16_FPMO | VTGGQHTQVVIVGGGQAGLAAGYHLRRL--GVDFVILDAQSTPGGAWQHTWDSLHLFSPA | 58 |
| | :*:::*.* :*::*.* :** . :*::*.* **:* : * | |
| M60a_FPMO | DMFTLGYSFKPWTAPKAIADGTTIREYVRETAREYDVSRIHFRHR-----VLRAEWD | 111 |
| M25_FPMO | EYSPLPGWMLRQEGEEFPTAGHVVDYVRAYEQRYELRVRRPVRVREVRAGERLAVQTD | 116 |
| G35A_FPMO_2 | EHSSLPGRMLPAQPGETYPDAGHVVDYLADYEKRYELPVQHNRVQTVRRDGERLLVEAD | 116 |
| S16_FPMO | AFSSLPGRMLPRQPGEYYPDAAHVVAYLRDYEKRYELPVERPVRVVLGVHNGGLLRVETD | 118 |
| | * : . : * : :*::* . * * : * | |
| M60a_FPMO | SGTARWTVHAQRTDТАЕТVVLТCСFLFACTGYRYDEGYTPPLPGVDAYAGRLVHPQHWP | 171 |
| M25_FPMO | DGA--WLA-----PYVISATG--TWDRPHVVDIPGRAE FAGRQLHTVHYI | 157 |
| G35A_FPMO_2 | SGT--WRT-----QAVISATG--TWSRPFPLTPVGRSV FAGRQLHTVNYR | 157 |
| S16_FPMO | SGT--WRA-----RAVISATG--TWWRFPLPATPGRAD FAGRQLHTVDYR | 159 |
| | .* : * . : :*::* : . . * ** :.* :* . : | |
| M60a_FPMO | DDLHTGKRVVVI GSGATA VTLVPAQA--AHVTMLQRSPTYILALPARDRLADALRR | 229 |
| M25_FPMO | SPEDFRGQRVVVVGGGNSAAQILAEVSRV--ADTTWVTLRPARFMPY-DVDGR----- | 207 |
| G35A_FPMO_2 | APADFAQQRVIVVGGGNSGAQIAADLALDGRAEMTWVTRPRFLPD-DIDGR----- | 209 |
| S16_FPMO | RPQDFAGQRVIVVGGGNSGAQIAADLAHD--TDLTWATQRPRFLAD-DIDGR----- | 209 |
| | *. *::*:*.* :.. : : . * : : . * | |
| M60a_FPMO | WLPAAAYPVVRWKNVLLSTVNFQLSRRAPGLVKRVLRRRAARGRLPVGYDVRHFSPRYD | 289 |
| M25_FPMO | -----VLFQVATRKA-----A-----GGA----- | 221 |
| G35A_FPMO_2 | -----ALFDVATARR-----RALDAGRDD----- | 228 |
| S16_FPMO | -----ALFDAATARR-----HALDAGRDT----- | 228 |
| | . : . . : | |
| M60a_FPMO | PWDQRLCVAPDGLF--TAV---RDGTASVLTDTIDTFTAAGVRLTSGAEVPADIVVTAT | 344 |
| M25_FPMO | ----GESVSDLGDIVMVPSVRDARNRGLHSRPMFARLTERGVRWVDGTEESCDAVIWCT | 277 |
| G35A_FPMO_2 | ----TGGVASLGDIVAVPPVRAARDAGLLSVRPTFTRLTADGVRWDDGSHRDADAVWCT | 284 |
| S16_FPMO | ----TGGVASLGDIVAVPPVREARDRGLVKASPMFTRLVPGGVEWDDGSRTEADAIWCT | 284 |
| | * : ** : . * * : : . . ** . * : . * : : * | |
| M60a_FPMO | GLNLLALGGLTLRVGDVVDLPTVAYKGMMLSGVNFALTIGYTNASWTLKAD--L--- | 399 |
| M25_FPMO | GFRPNLTHLAPLPGWRQGEV---AAEGTRSVDPEPRLY-LLGWSP--GSPPSDAEAPSS | 330 |
| G35A_FPMO_2 | GFRPALAHLAPLNLRGPRGHI---PTDGTRALGEPRLH-LLGYGD--WTGPASATLIGV | 337 |
| S16_FPMO | GFRPALSHLAPLQLRGVGRGHI---ATAGTRAVDEPRH-LLGYGD--WTGPASATLIGV | 337 |
| | * : . * : . : * . * : : * : : : . : | |
| M60a_FPMO | -----VAGYVCRLLRHLDRGTQQVVTPLPPPADRVPLIDLRSYVLRVAVDTLPKQG | 451 |
| M25_FPMO | RSRSPASPARSFCRSPACSSNTST---GAQP----- | 359 |
| G35A_FPMO_2 | GRP--AREAHHQIARQLGT----- | 354 |
| S16_FPMO | GRP--AREAAREIADLPA----- | 353 |
| | * . . | |
| M60a_FPMO | ATAPWRLHQNYARDVLLMRHGRLTDEGVRFSSRAGEVTGPDHAPRPVASQRR | 502 |
| M25_FPMO | ----- | 359 |
| G35A_FPMO_2 | ----- | 354 |
| S16_FPMO | ----- | 353 |

Figura 4. 4: FPMOs putativas seleccionadas, en rojo se observan las secuencias conservadas de Rossman, en verde la secuencia conservada de FMO y en azul la secuencia conservada de BVMO

4.4 Clonación, Expresión y Purificación de FPMOs putativas

A las construcciones de las FPMOs putativas se les realizó un PCR de colonia y se observaron los amplificadores correspondientes para cada inserto en gel de agarosa. Además, se corroboró por secuenciación en Macrogen el marco de lectura y posibles mutaciones (Ver anexo A). Las FPMOs seleccionadas se renombraron de la siguiente manera: M60a_FPMO → MO1, M25_FPMO → MO2, G35A_FPMO_2 → MO3, S16_FPMO → MO4 y los tamaños predichos aproximados son de 73kDa, 57kDa, 55kDa y 53kDa respectivamente. El tamaño predicho aproximado para *TmCHMO* es de 77kDa.

Se analizó la expresión heteróloga de las FPMOs putativas seleccionadas en *Escherichia coli* TOP10 usando el plásmido pBAD-His-tag-SUMO, mediante SDS-PAGE y afinidad a la columna His-Trap FF 1mL. En primera instancia, los cultivos se realizaron en matraces y la expresión se indujo con una concentración de 0,1% (p/v) de L-arabinosa a 24°C y tiempo de cosecha de 18h post inducción. En la figura 4.5 se puede observar los resultados obtenidos.

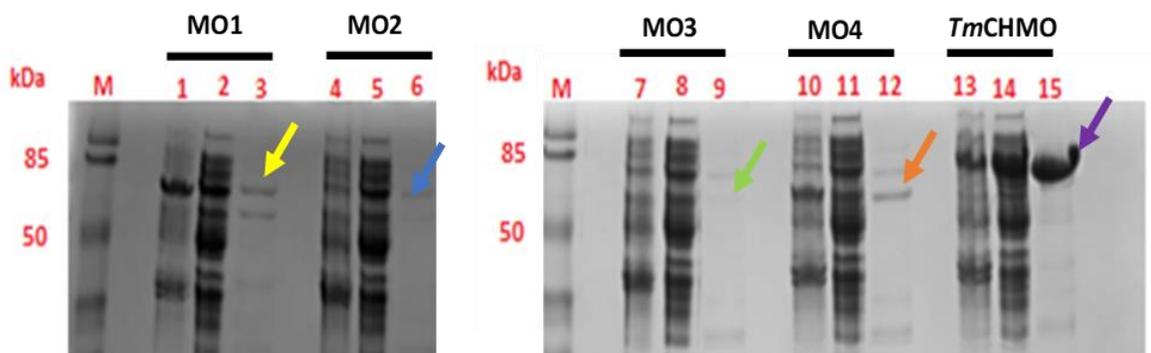


Figura 4. 5: SDS-PAGE sobre la expresión de las FPMOs. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las fracciones insoluble (IN), soluble (S) y purificada desde la fracción soluble (P) de la MO1, respectivamente. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO2, respectivamente. Los carriles 7, 8 y 9 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO3, respectivamente. Los carriles 10, 11 y 12 corresponden a las fracciones IN, S y P de la MO4, respectivamente. Y los carriles 13, 14 y 15 corresponden a las fracciones IN, S y P de la *TmCHMO* (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie).

Dado la baja expresión de las MO2 y MO3 se seleccionaron las MO1 y MO4 para continuar con el desarrollo de la investigación. Se evaluó, mediante SDS-PAGE, el efecto en el nivel de expresión de las condiciones de concentración de 0,02% y 0,1%, temperaturas de 24°C y 18°C y tiempos de cosecha post inducción de 24h y 48h. En las figuras 4.6 y 4.7 se observan los resultados obtenidos.

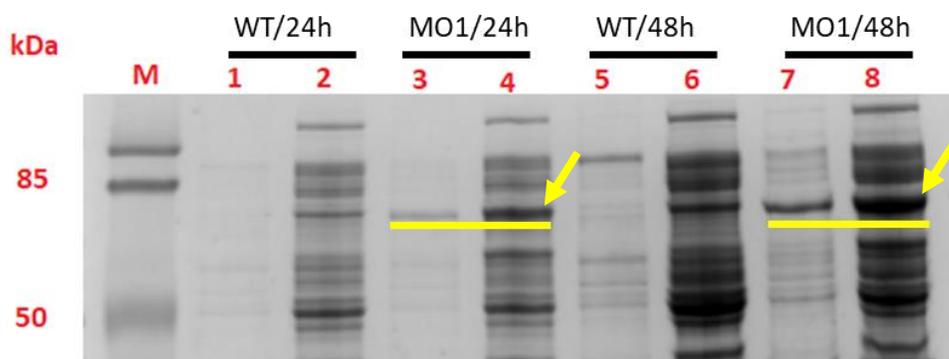


Figura 4. 6: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO1 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente) (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie).

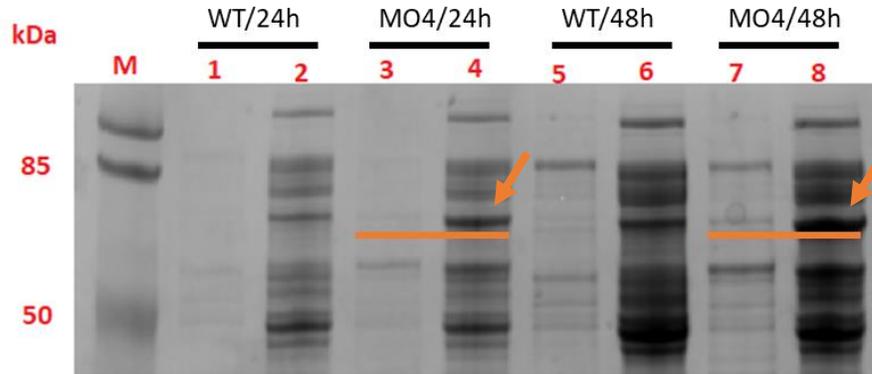


Figura 4. 7: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO4 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente) (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie).

Se evaluó la expresión de las MO1 y MO4 con 0,02% de L-arabinosa, 18°C y tiempo de cosecha de 48h post inducción, mediante SDS-PAGE y afinidad a la columna His-Trap FF 1mL. Los resultados se observan en la figura 4.8 y 4.9.

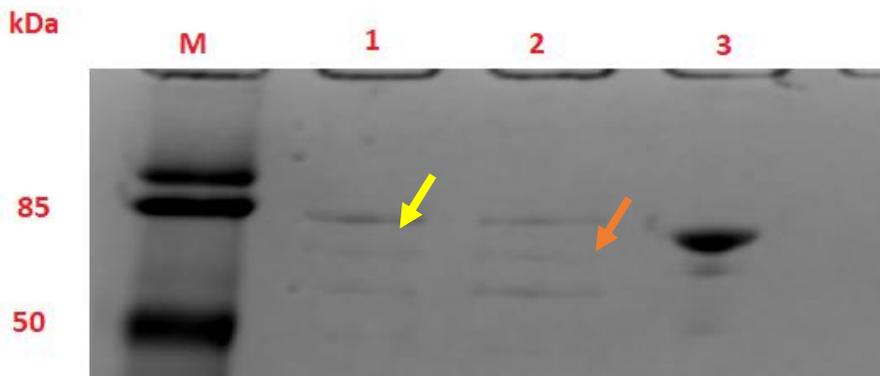


Figura 4. 8: SDS-PAGE de las FPMOs purificadas desde la fracción soluble. El carril 1 es la MO1, el carril 2 es la MO4, el carril 3 es TmCHMO (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie).

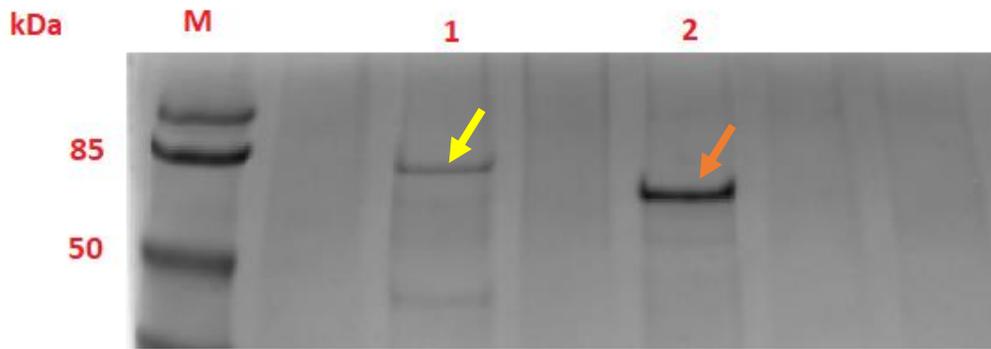


Figura 4. 9: SDS-PAGE de las MO1 y MO4 purificadas desde la fracción insoluble en condiciones denaturantes con urea 8M. El carril 1 corresponde a MO1 y el carril 2 corresponde a la MO4 (SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie).

5. DISCUSIÓN

Sobre la producción a escala biorreactor de *TmCHMO*, las células de *Escherichia coli* Top10- pBAD-His-tag-SUMO crecieron a una velocidad específica de crecimiento de $0,67 \text{ h}^{-1}$ y se obtuvo un rendimiento de biomasa de $0,46 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$. En la figura 4.1 se puede observar que el crecimiento celular se detiene cuando la fuente de carbono se agota y que la producción de *TmCHMO* se inicia con la inducción con L-arabinosa en la fase de crecimiento tardía de las células de *Escherichia coli* Top10 - pBAD-His-tag-SUMO. También se observa que a las 4h post inducción se alcanza una actividad enzimática de 33 [UI/gBS] cercana a la actividad enzimática máxima alcanzada de 36 [UI/gBS] a las 8h post inducción, esto se puede relacionar con que al inducir en la fase de crecimiento tardía la célula ha crecido lo suficiente y se encuentra en un estado metabólico maduro que cuenta con todos los requerimientos necesarios para iniciar eficientemente la expresión enzimática de la proteína recombinante (Doig et al., 2001). Igualmente se observa que la actividad enzimática de *TmCHMO* transcurridas 24 h post inducción se mantiene cercana a la actividad máxima alcanzada, vinculando esta estabilidad en la actividad enzimática con la termoestabilidad de la enzima (Romero et al., 2016) y con que la enzima se encuentra protegida de condiciones potencialmente dañinas al estar en el medio intracelular (Wachtmeister y Rother 2016).

Con respecto a la actividad enzimática de *TmCHMO*, en la figura 4.2 se observa que esta enzima es capaz de catalizar reacciones de N-oxidación para los metabolitos de fármacos de Clomifeno y Dasatinib y con menor actividad catalítica para Tamoxifeno. También se observa que para Clomifeno y Dasatinib la enzima *TmCHMO* es capaz de catalizar la transformación de estos sustratos con una actividad enzimática similar a Ciclohexanona, cercana a los $0,3 \text{ [UI]}$, sustrato comúnmente utilizado en la caracterización de esta enzima y de otras BVMOs similares (Romero et al., 2016; Donoghue et al., 1976). La actividad catalítica de *TmCHMO* para la N-oxidación de estos metabolitos de fármacos se puede atribuir a que las BVMOs han sido comúnmente identificadas como enzimas capaces de catalizar una amplia gama de sustratos de diferentes tamaños (Leisch. H et al., 2011; Paul. C et al., 2021).

A partir de la búsqueda bioinformática local de FPMOs putativas en la secuencia genómica de 10 cepas aisladas de Lupino del Desierto de Atacama, en la tabla 4.2 se observa que se obtuvieron 9 posibles FPMOs todas con un porcentaje de identidad y E-value superior a 35% y cercano a 0 respectivamente. También se puede observar que más de una secuencia de consulta utilizada (Ver tabla 4.1) coincidió en el alineamiento de algunas de las FPMOs putativas encontradas.

Las FPMOs putativas identificadas fueron analizadas utilizando la base de datos y herramienta de diagnóstico InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). En primera instancia se observó que todas las FPMOs putativas tienen el dominio conservado de Rossman o también llamado de unión FAD/NAD(P)H. También se observó que las primeras dos FPMOs putativas M51_FPMO y M37_FPMO mencionadas en la tabla 4.2 corresponden a Ciclohexanonas monooxigenasas que tienen un dominio conservado para la Superfamilia de facilitadores principales (MFS) siendo proteínas de transporte de membrana de pequeños solutos en respuesta a gradientes quimiotácticos (Pao, S. et al 1998). Esto podría dificultar la expresión soluble de estas proteínas en el sistema de *Escherichia coli* al ser una proteína nativa de membrana.

En la figura 4.3 se observa un árbol filogenético utilizando un alineamiento entre las secuencias de las FPMOs putativas y las secuencias de consulta utilizadas. Aquí se corrobora una mayor relación entre las FPMOs putativas M51_FPMO y M37_FPMO con respecto a las otras FPMOs putativas, lo cual se puede atribuir al dominio conservado para MFS, de igual manera se observa una mayor relación entre las FPMOs G35A_FPMO_1 y G35A_FPMO_2 las cuales provienen del mismo microorganismo y comparten un 86% de identidad. También se observa mayor similitud entre la FPMO putativa M60a_FPMO y la FPMO de consulta, *TmCHMO*, e igualmente entre la FPMO putativa G35A_MO y la FPMO de consulta Sle_62070.

Se buscó dentro de las secuencias aminoacídicas de todas las FPMOs las secuencias conservadas de Rossman y las secuencias conservadas específicas para FMO y BVMO señaladas en la tabla 2.1 y además de ver su ubicación dentro de la secuencia. A partir de este análisis se observó que todas las FPMOs putativas tienen secuencias conservadas de Rossman donde la primera está cercana al extremo N-Terminal y la segunda está en medio de la secuencia aminoacídica, como fue mencionado en Riebel et al, 2013. También se encontraron secuencias conservadas para FMO en las FPMOs putativas M25_FPMO, M25_MO, G35A_FPMO_1, G35A_FPMO_2 y S16_FPMO, mientras que se identificaron secuencias conservadas para BVMO en las FPMOs M51_FPMO, M60a_FPMO y G35A_MO. Al contrario, no se observó una secuencia conservada específica para FMO o BVMO en la secuencia aminoacídica de las FPMOs M37_FPMO, lo cual se puede relacionar con que corresponda a una FPMO de subclase de NMO (Paul. C et al., 2021). En la figura 4.4 se observa el alineamiento de 4 FPMOs putativas seleccionadas para el análisis sobre la expresión heteróloga y la identificación de las secuencias conservadas dentro de cada secuencia aminoacídica.

Para la expresión heteróloga de las FPMOs putativas en *Escherichia coli* TOP10 usando el plásmido pBAD-His-tag-SUMO, primero se realizaron cultivos de las enzimas putativas y de *TmCHMO* en donde la inducción se realizó a OD₆₀₀ cercana a 4 (fase de crecimiento tardía) con 0,1% (p/v) de L-arabinosa en el cultivo a 24°C durante 18h. En la figura 4.6 en los carriles 13, 14 y 15 (indicador purpura) se puede observar la aparición de una banda correspondiente al tamaño predicho de *TmCHMO* en la fracción insoluble, soluble y purificada y en la figura 4.2 se puede observar la actividad enzimática de *TmCHMO* purificada corroborando que la metodología de expresión y purificación reportada en Romero et al., 2016 y Doig et al., 2001 permite obtener la enzima *TmCHMO* sobreexpresada en la fracción soluble, purificada y funcional.

Por otra parte, en la figura 4.6 no se observa la aparición de una banda correspondiente al tamaño predicho de las enzimas putativas MO2 (ver carriles 4, 5 y 6 indicador azul) y MO3 (ver carriles 7, 8 y 9 indicador verde) en ninguna de las fracciones señaladas. El problema de expresión al que se ven enfrentadas ambas enzimas putativas puede estar relacionado con la etapa de transcripción debido a la estabilidad y cantidad de transcripto del ARNm, así como también estar vinculado a la etapa de traducción debido a la formación de estructuras secundarias del ARNm y a la necesidad de coexpresión de otros genes necesarios en la expresión de cada una de las enzimas putativas. Aquellos problemas se pueden resolver modificando el sistema de expresión heterólogo utilizado, ya sea, utilizando otra cepa, modificando el plásmido por uno que tenga promotor viral, co-expresando proteínas que favorezcan la solubilidad de las FPMOs como chaperonas (Baneyx, F., 1999; Gopal, G., y Kumar, A., 2013).

Para el caso de las MO1 (ver carriles 1, 2 y 3 indicador amarillo) y MO4 (ver carriles 10, 11 y 12 indicador naranja) en la figura 4.6 se observa la aparición de una banda correspondiente al tamaño predicho de las enzimas putativas tanto para la fracción insoluble, soluble y purificada. Se seleccionaron ambas enzimas y se realizaron cultivos considerando las condiciones de expresión reportadas para distintas FPMOs en literatura (ver tabla 2.2). A partir del análisis en SDS-PAGE, nuevamente se observa la aparición de una banda correspondiente al tamaño predicho para MO1 y MO4, indicadas en las figuras 4.7, 4.8 y Anexos C (color amarillo para la MO1 y naranja para la MO4) sin embargo, no se observó una mejoría en la expresión soluble de las enzimas putativas en ninguna de las condiciones nuevas de cultivo.

Se seleccionó como nuevas condiciones de cultivo la concentración de inductor en el cultivo de 0,02% (p/v) de L-arabinosa a 18°C durante 48h puesto que se ha reportado que el disminuir la concentración de inductor y la temperatura favorecen el correcto plegamiento

de la proteína de interés (Gopal, G., y Kumar, A., 2013; Chen y Xu., 2011). Se purificó mediante afinidad a la columna His-Trap FF 1mL desde la fracción soluble. En la figura 4.9 no se observa que con las nuevas condiciones de expresión haya una mejoría en la purificación de las MO1 y MO4. Por último, se purificó mediante afinidad a la columna His-Trap FF 1mL desde la fracción insoluble en condiciones denaturadas con urea 8M las MO1 y MO4 observando en la figura 4.10 que sí se purifican bandas correspondientes al tamaño predicho para las enzimas putativas, comprobando que existe expresión recombinante de las MO1 y MO4 sin embargo aquella expresión no es soluble.

Tanto para la MO1 y la MO4 los problemas para sobreexpresar cada enzima en la fracción soluble se puede relacionar con la capacidad intrínseca de plegamiento de cada proteína al ser expresadas en un sistema de expresión heterólogo, en este caso *E. coli*. También se puede vincular a la necesidad de modificaciones postraduccionales mediadas por chaperonas nativas las cuales deben ser coexpresadas y, por último, se puede relacionar con la construcción del vector de expresión que se ha utilizado ya que se ha reportado que la cola de 6 residuos de histidina utilizada, en algunos casos, favorece la formación de cuerpos de inclusión ya sea porque interfiere en el correcto plegamiento de la proteína o porque modifica la carga global de la proteína (Gopal, G., y Kumar, A., 2013; Singha, T., et al 2017; Zhu, S., et al 2013) aquella posibilidad se puede analizar mediante la eliminación de la cola de histidina en las construcciones y posterior evaluación de la expresión heteróloga.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, se produjo a escala biorreactor la enzima *TmCHMO* cuya actividad enzimática máxima alcanzada fue de 36 [UI/gBS] y se demostró que 4h post inducción se logra una actividad enzimática similar a la máxima y que esta actividad se mantiene estable en el transcurso de 24h post inducción. Por otra parte, se demostró que *TmCHMO* es capaz de catalizar reacciones de N-oxidación para los metabolitos de fármacos de Clomifeno, Dasatinib y en menor actividad para Tamoxifeno, resultando interesante a futuro poder complementar aquellos resultados de actividad enzimática mediante una metodología que permita evaluar directamente la desaparición del sustrato y/o aparición del o los productos de la reacción.

A partir de la búsqueda bioinformática, en el genoma de las actinobacterias aisladas del Lupino del Desierto de Atacama, se identificaron y se seleccionaron cuatro FPMOs putativas en donde para dos de ellas, MO2 y MO3, no se observó expresión heteróloga en ninguna de las fracciones analizadas utilizando el sistema de expresión *E. coli* pBAD-His-Tag-SUMO. Mientras que para las MO1 y MO4 se observó expresión insoluble, sin embargo, no se pudo mejorar la expresión en la fracción soluble pese a las modificaciones en las condiciones de cultivo utilizando el sistema de expresión *E. coli* pBAD-His-Tag-SUMO. Aquello permite concluir que establecer una metodología para producir de manera soluble y activa una FPMOs de clase B como *TmCHMO* no asegura la expresión soluble de otras FPMOs putativas de clase B homologas a *TmCHMO*.

7. RECOMENDACIONES

Considerando que, para la evaluación de actividad de oxidación de los metabolitos de fármacos de Clomifeno, Dasatinib y Tamoxifeno por TmCHMO se utilizó una medición indirecta, la cual corresponde a la desaparición de NADPH en el tiempo, se recomienda complementar aquellos resultados de actividad enzimática con una metodología que permita evaluar directamente la desaparición del sustrato y/o aparición del o los productos de la reacción.

También se recomienda analizar la expresión de las FPMOs putativas modificando el sistema de expresión heterólogo, ya sea, utilizando otra cepa, modificando el plásmido por uno que tenga promotor viral, co-expresando proteínas que favorezcan la solubilidad de las FPMOs como chaperonas, entre otros.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alphanh, Veronique et al. 2003. “Towards large-scale synthetic applications of BaeyerVilliger monooxygenases”. *Trends in Biotechnology* 21(7): 318–23.
- Azua-Bustos, A., Urrejola, C., & Vicuña, R. (2012). Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama Desert. *Febs Letters*, 586(18), 2939-2945.
- Bailleul, G., Nicoll, C. R., Mascotti, M. L., Mattevi, A., & Fraaije, M. W. (2021). Ancestral reconstruction of mammalian FMO1 enables structural determination, revealing unique features that explain its catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Ballard JE, Prueksaritanont T, Tang C. Hepatic Metabolism of MK-0457, a potent aurora kinase inhibitor: interspecies comparison and role of human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35:1447–51.
- Ballou, D. P., & Entsch, B. (2013). The reaction mechanisms of groups A and B flavoprotein monooxygenases. *Complex Flavoproteins. Dehydrogenases and Physical Methods. De Gruyter, Berlin/Boston*, 1-28.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411-421.
- Cameron RE, Gensel DR, Blank CB (1966) Soil studies -desert microflora XII. Abundance of microflora in soil samples from the Chile Atacama Desert. space programs summary. In: Supporting research and advanced developments, space programs summary No. 37–38, vol 4. Jet Propulsion Lab, Pasadena, pp 140–147.
- Carro, L., Razmilic, V., Nouioui, I., Richardson, L., Pan, C., Golinska, P., ... & Goodfellow, M. (2018). Hunting for cultivable *Micromonospora* strains in soils of the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1375-1387.
- Catucci, G., Gilardi, G., & Sadeghi, S. J. (2020). Production of drug metabolites by human FMO3 in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-7.
- Catucci G, Occhipinti A, Maffei M, Gilardi G, Sadeghi S. Effect of human flavin-containing monooxygenase 3 polymorphism on the metabolism of aurora kinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:2707–16.

- Contreras, J., Medina, D., & López-Carrasquero, F. (2016). Síntesis y polimerización de bis-macromonómeros de poli (ϵ -caprolactona). *Avances en Química*, 11(2), 77-85.
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G., Ottolina, G., Pasta, P., & Zambianchi, F. (2002). First asymmetric epoxidation catalysed by cyclohexanone monooxygenase. *Tetrahedron Letters*, 43(10), 1797-1799.
- Chen, Xiao jun, y Han hong Xu. 2011. "Expression and Purification of Recombinant MP-GFP Protein in Escherichia coli". *Agricultural Sciences in China* 10(3): 394–403. [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60018-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60018-7).
- de Gonzalo, G., Mihovilovic, M. D., & Fraaije, M. W. (2010). Recent developments in the application of Baeyer–Villiger monooxygenases as biocatalysts. *ChemBioChem*, 11(16), 2208-2231.
- Demirjian, D. C., Morís-Varas, F., & Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current opinion in chemical biology*, 5(2), 144-151.
- Dewailly D, Hieronimus S, Mirakian P, Hugues JN. Polycystic ovary syndrome (PCOS). *Annales D Endocrinologie*. 2010; 71:8–13.
- Doig, Steven D. et al. 2001. "Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from Escherichia coli TOP10 pQR239". *Enzyme and Microbial Technology* 28(2–3): 265–74.
- Doig, S. D., Simpson, H., Alphanh, V., Furstoss, R., & Woodley, J. M. (2003). Characterization of a recombinant Escherichia coli TOP10 [pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer–Villiger oxidations. *Enzyme and microbial technology*, 32(3-4), 347-355.
- Donoghue, N. A., Norris, D. B., & Trudgill, P. W. (1976). The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *European Journal of Biochemistry*, 63(1), 175-192.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of industrial microbiology*, 16(3), 145-154.
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. Elsevier.

- Fraaije, M. W., Kamerbeek, N. M., van Berkel, W. J., & Janssen, D. B. (2002). Identification of a Baeyer–Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS letters*, 518(1-3), 43-47.
- Fraaije, M. W., Wu, J., Heuts, D. P., Van Hellemond, E. W., Spelberg, J. H. L., & Janssen, D. B. (2005). Discovery of a thermostable Baeyer–Villiger monooxygenase by genome mining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 393-400.
- Gran-Scheuch, A., Trajkovic, M., Parra, L., & Fraaije, M. W. (2018). Mining the Genome of *Streptomyces leeuwenhoekii*: Two New Type I Baeyer–Villiger Monooxygenases from Atacama Desert. *Frontiers in microbiology*, 9, 1609.
- Grossman, Trudy H., Ernest S. Kawasaki, Sandhya R. Punreddy, y Marcia S. Osburne. 1998. “Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability”. *Gene* 209(1–2): 95–103
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The protein journal*, 32(6), 419-425.
- Jarmusch, S. A., Lagos-Susaeta, D., Diab, E., Salazar, O., Asenjo, J. A., Ebel, R., & Jaspars, M. (2021). Iron-mediated fungal starvation by lupine rhizosphere-associated and extremotolerant *Streptomyces* sp. S29 desferrioxamine production. *Molecular omics*, 17(1), 95-107.
- Jensen, C. N., Ali, S. T., Allen, M. J., & Grogan, G. (2014). Exploring nicotinamide cofactor promiscuity in NAD (P) H-dependent flavin containing monooxygenases (FMOs) using natural variation within the phosphate binding loop. Structure and activity of FMOs from *Cellvibrio* sp. BR and *Pseudomonas stutzeri* NF13. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 191-198.
- Kamath AV, Wang J, Lee FY, Marathe PH. Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer Chemoth Pharma*. 2007; 61:365–76.
- Karan, R., Capes, M. D., & DasSarma, S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic biosystems*, 8(1), 1-15.

- Lee, Sung Kuk, y Jay D. Keasling. 2008. “Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods”. *Protein Expression and Purification* 61(2): 197–203
- Leisch, H., Morley, K., & Lau, P. C. (2011). Baeyer– Villiger monooxygenases: more than just green chemistry. *Chemical reviews*, 111(7), 4165-4222.
- Lončar, N., Fiorentini, F., Bailleul, G., Savino, S., Romero, E., Mattevi, A., & Fraaije, M. W. (2019). Characterization of a thermostable flavin-containing monooxygenase from *Nitrocola laciaponensis* (NiFMO). *Applied microbiology and biotechnology*, 103(4), 1755-1764.
- Maczka, W., Winska, K., & Grabarczyk, M. (2018). Biotechnological methods of sulfoxidation: yesterday, today, tomorrow. *Catalysts* 8, 624.
- Malito, E., Alfieri, A., Fraaije, M. W., & Mattevi, A. (2004). Crystal structure of a Baeyer–Villiger monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13157-13162.
- Matsuda, K., Tomita, T., Shin-Ya, K., Wakimoto, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2018). Discovery of unprecedented hydrazine-forming machinery in bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 140(29), 9083-9086.
- Matsui, T., Dekishima, Y. y Ueda, M. (2014). Producción biotecnológica de sulfóxidos orgánicos quirales: estado actual y perspectivas. *Microbiología aplicada y biotecnología*, 98 (18), 7699-7706.
- Nicoll, C. R., Bailleul, G., Fiorentini, F., Mascotti, M. L., Fraaije, M. W., & Mattevi, A. (2020). Ancestral-sequence reconstruction unveils the structural basis of function in mammalian FMOs. *Nature structural & molecular biology*, 27(1), 14-24.
- Nygren, H, y Stefan Sta. 2002. “REVIEW Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in”. *Molecular Biotechnology* 105: 91–105.
- Okoro CK, Bull AT, Mutreja A, Rong X, Huang Y, Goodfellow M (2010) *Lechevalieria atacamensis* sp. nov., *Lechevalieria deserti* sp. nov. and *Lechevalieria roselyniae* sp. nov., isolated from hyperarid soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:296–300. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009985-0>.

- Opfell JB, Zebal GP (1967) Ecological patterns of micro-organisms in desert soils. *Life Sci Space Res* 5:187–203.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 1-34.
- Paulino-Lima, I. G., Azua-Bustos, A., Vicuña, R., González-Silva, C., Salas, L., Teixeira, L., ... & Lage, C. (2013). Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microbial ecology*, 65(2), 325-335.
- Paul, C. E., Eggerichs, D., Westphal, A. H., Tischler, D., & van Berkel, W. J. (2021). Flavoprotein monooxygenases: versatile biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 51, 107712.
- Pulschen, A. A., Rodrigues, F., Duarte, R. T., Araujo, G. G., Santiago, I. F., Paulino-Lima, I. G., ... & Galante, D. (2015). UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiologyopen*, 4(4), 574-588.
- Riebel, A., de Gonzalo, G., & Fraaije, M. W. (2013). Expanding the biocatalytic toolbox of flavoprotein monooxygenases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 88, 20-25.
- Riebel, A., Dudek, H. M., De Gonzalo, G., Stepniak, P., Rychlewski, L., & Fraaije, M. W. (2012). Expanding the set of rhodococcal Baeyer–Villiger monooxygenases by high-throughput cloning, expression and substrate screening. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(6), 1479-1489.
- Rioz-Martínez, A., Kopacz, M., De Gonzalo, G., Pazmino, D. E. T., Gotor, V., & Fraaije, M. W. (2011). Exploring the biocatalytic scope of a bacterial flavin-containing monooxygenase. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(5), 1337-1341.
- Rostami-Hodjegan A, Lennard MS, Tucker GT, Ledger WL. Monitoring plasma concentrations to individualize treatment with clomiphene citrate. *Fertil Steril*. 2004; 81:1187–93.
- Robinson, R. M., & Sobrado, P. (2012). Flavin-dependent monooxygenases in siderophore biosynthesis. *Complex Flavoproteins. Dehydrogenases and Physical Methods*. De Gruyter, Berlin, 29-50.

- Romero, Elvira, J. Rubén Gómez Castellanos, Andrea Mattevi, y Marco W. Fraaije. 2016. “Characterization and Crystal Structure of a Robust Cyclohexanone Monooxygenase”. *Angewandte Chemie - International Edition* 55(51): 15852–55.
- Romero, E., Gómez Castellanos, J. R., Gadda, G., Fraaije, M. W., & Mattevi, A. (2018). Same substrate, many reactions: oxygen activation in flavoenzymes. *Chemical reviews*, 118(4), 1742-1769.
- Singha, Tapan Kumar et al. 2017. “Efficient genetic approaches for improvement of plasmid-based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review”. *Process Biochemistry* 55: 17–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.026>.
- Széliová, Diana et al. 2016. “Modulation of heterologous expression from PBAD promoter in *Escherichia coli* production strains”. *Journal of Biotechnology* 236: 1–9.
- Thaore, Vaishali, David Chadwick, y Nilay Shah. 2018. “Sustainable production of chemical intermediates for nylon manufacture: A techno-economic analysis for renewable production of caprolactone”. *Chemical Engineering Research and Design* 135: 140–52. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.05.026>.
- Van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., & Fraaije, M. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of biotechnology*, 124(4), 670-689.
- Wachtmeister, Jochen, y Dörte Rother. 2016. “Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale”. *Current Opinion in Biotechnology* 42: 169–77.
- Wang, K. K. A., Ng, T. L., Wang, P., Huang, Z., Balskus, E. P., & van der Donk, W. A. (2018). Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Xu, N., Zhu, J., Wu, Y. Q., Zhang, Y., Xia, J. Y., Zhao, Q., ... & Xu, J. H. (2020). Enzymatic preparation of the chiral (S)-sulfoxide drug esomeprazole at pilot-scale levels. *Organic Process Research & Development*, 24(6), 1124-1130.
- Zhang, Y., Wu, Y. Q., Xu, N., Zhao, Q., Yu, H. L., & Xu, J. H. (2019). Engineering of cyclohexanone monooxygenase for the enantioselective synthesis of (S)-omeprazole. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(7), 7218-7226.

- Zhu, S., Gong, C., Ren, L., Li, X., Song, D., & Zheng, G. (2013). A simple and effective strategy for solving the problem of inclusion bodies in recombinant protein technology: His-tag deletions enhance soluble expression. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 837-845.

9. ANEXOS

Anexo A: Sobre clonación de FPMOs putativas

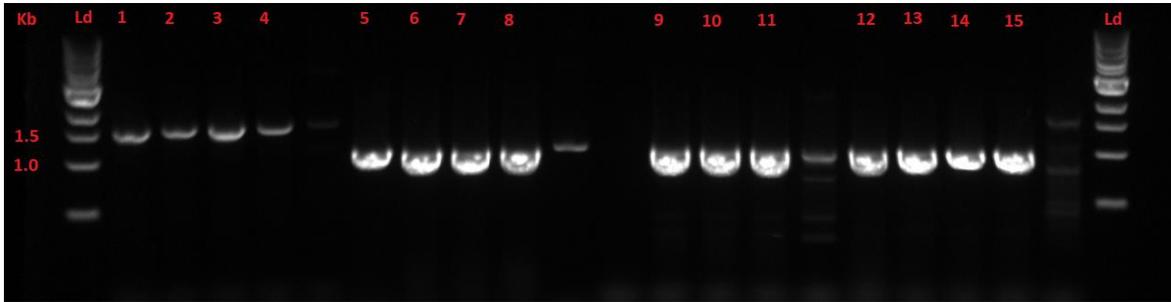


Figura Anexo A1: PCR de colonia para cada construcción de FPMOs. Los carriles del 1 al 4 corresponden a la MO1 clones del 1 al, respectivamente. Los carriles del 5 al 8 corresponden a la MO2 clones del 1 al 4. Los carriles del 9 al 11 corresponden a la MO3 clones del 1 al 3. Los carriles del 12 al 15 corresponden a MO4 clones del 1 al 4. Ld corresponde al marcador.

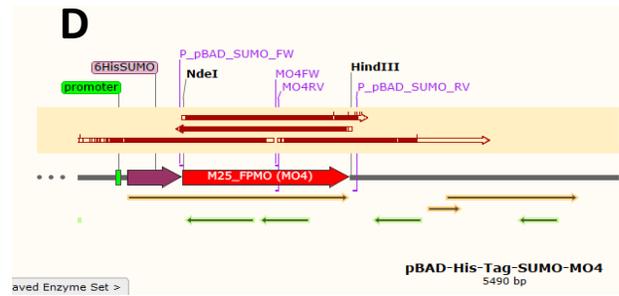
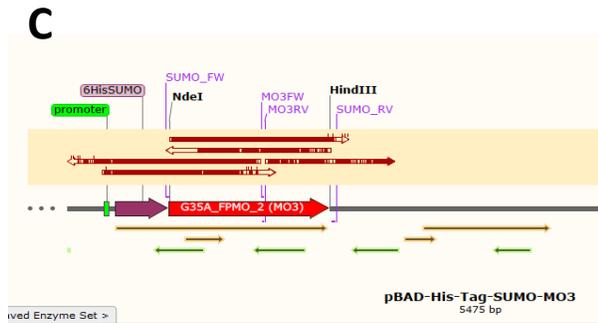
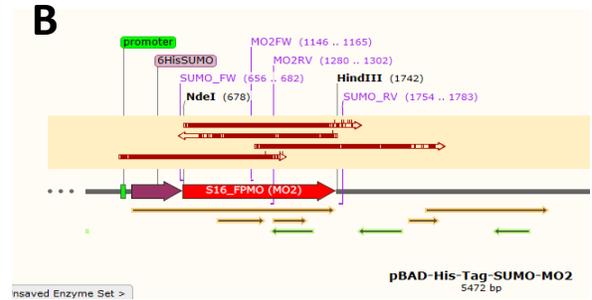
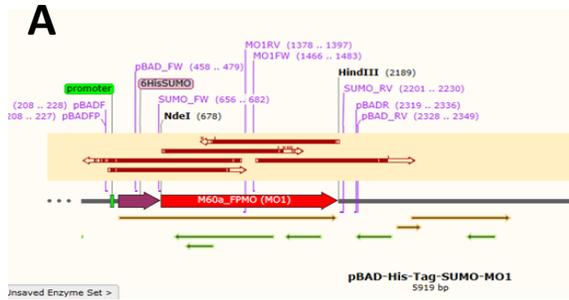


Figura Anexo A2: Secuenciación de las FPMOs. La figura A corresponde a la MO1 C2. La figura B corresponde a la MO2 C2. La figura C corresponde a la MO3 C2 y La figura D corresponde a la MO4 C2. El fragmento en rojo corresponde al gen codificante para cada proteína y los fragmentos en burdeo corresponden a los resultados de secuenciación.

Anexo B: Curvas de calibrado

Anexo B1: Curva Calibrado Biomasa

- Realizar cultivo de *E. coli TOP10* - pBAD-His-tag-SUMO según lo descrito en la sección de Metodología experimental 3.3.3
- Detener la cinética de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial
- Centrifugar en tubos para centrifuga de 50 mL con 30 mL de caldo de cultivo cada uno, a 9000 rpm x 10 min y separar el sobrenadante del pellet de biomasa.
- Resuspender el pellet de biomasa con 30 mL de solución de 2,5 mM de NaCl. Realizar el punto anterior 3 veces.
- Resuspender el pellet obtenido en 5 mL de agua desionizada y depositarlos en capachos.
- Dejar secar los capachos con la muestra de biomasa a 105°C durante 24 h, enfriar durante 15 min y pesar.
- Realizar cálculo de la concentración de biomasa.
- Paralelamente realizar diluciones al caldo de cultivo con LB y medir la absorbancia a 600 nm

Resultados

Peso Seco

| Capacho inicial g | Capacho FINAL g | Biomasa g | Volumen mL | [Biomasa] g/mL |
|-------------------|-----------------|-----------|------------|----------------|
| 1,02 | 1,04 | 0,02 | 30 | 0,83 |
| 1,10 | 1,12 | 0,02 | 30 | 0,82 |

[Biomasa] g/mL: 0,83 g/mL

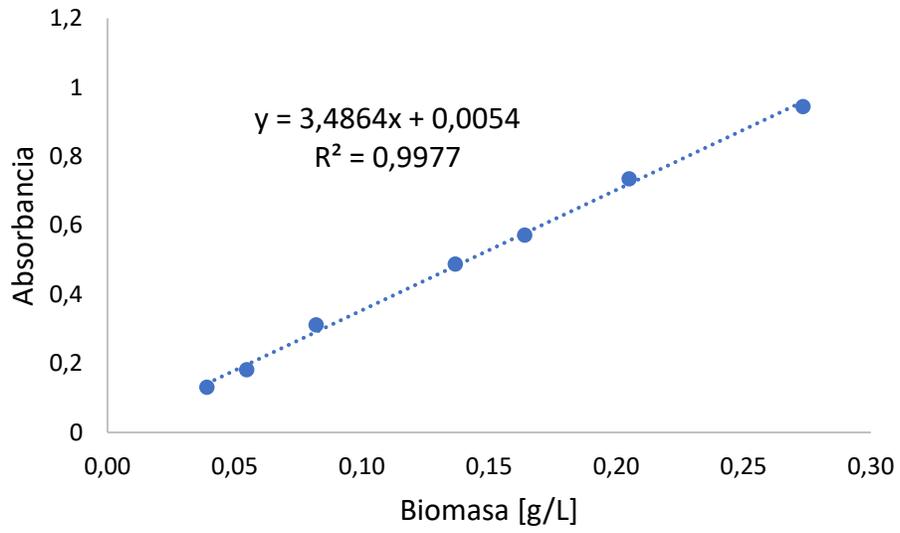


Figura Anexo B1: Curva de calibrado de concentración de biomasa

Anexo B2: Curva Calibrado Glicerol

- Para preparar solución patrón, masar 0,5 g de glicerol y disolver en 100 mL de agua destilada en matraz de aforo
- Diluir la solución patrón en el rango de concentraciones entre 10 y 0,078 g/L
- Filtrar las muestras con filtros de Nylon de 0,22 μm y disponer cada muestra en un vial
- Medir cada muestra en HPLC-IR, bajo las siguientes condiciones cromatográficas; T° 55°C, Flujo 0,6 mL/min, Fase móvil 1,5mM H₂SO₄, Columna Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm, (marca Bio-rad), inyección de 20 μL y tiempo de retención de 14,04 \pm 0,0025 minutos.

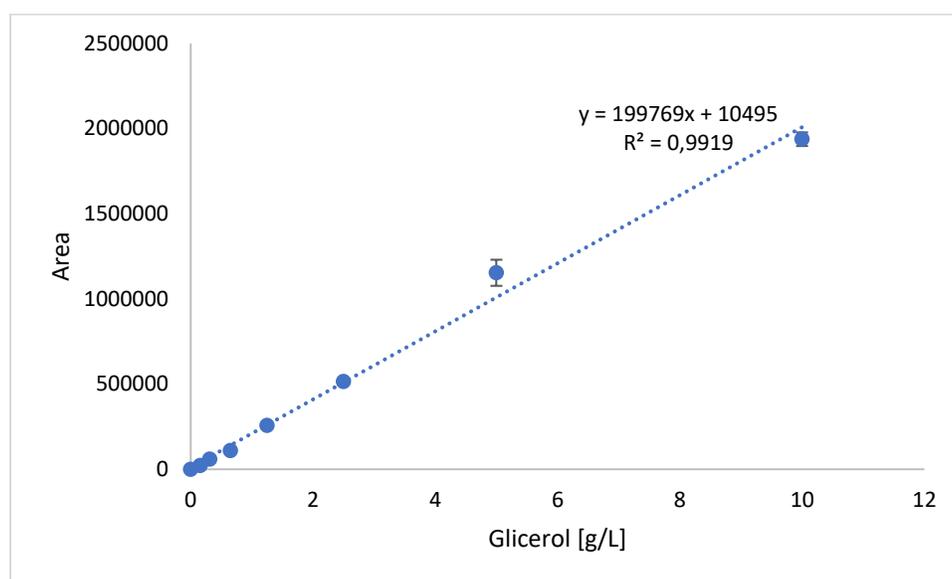


Figura Anexo B2: Curva de calibrado de concentración de Glicerol

Anexo B3: Curva Calibrado BSA

- Diluir la solución patrón (2 mg/mL) en el rango de concentraciones en mg/mL entre 0,75 y 0,15.
- Para cada solución tomar 5 uL e incorporarlo en una placa de 96 pocillos con 200 uL de reactivo Bradford, esperar dos minutos y medir absorbancia a 595 nm, contra blanco de 200 uL de reactivo Bradford y 5 uL de agua destilada.

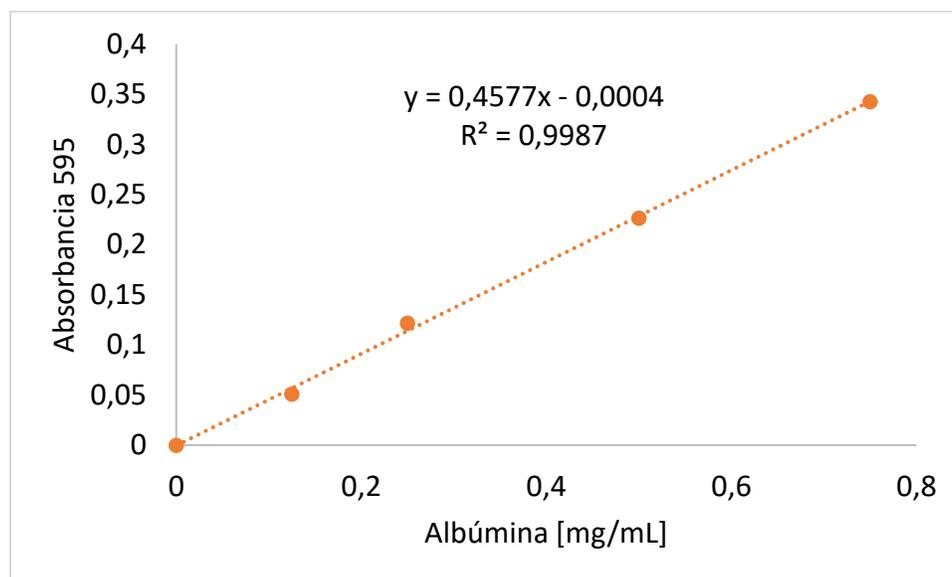


Figura Anexo B3: Curva de calibrado de concentración de albúmina

Anexo C: SDS-PAGE sobre condiciones de expresión de MO1 y MO4 putativas

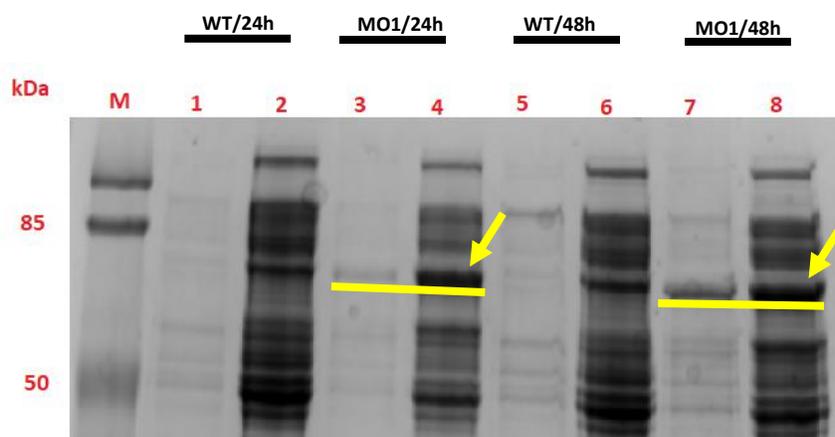


Figura Anexo C1: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO1 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 24°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a E. coli TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente).

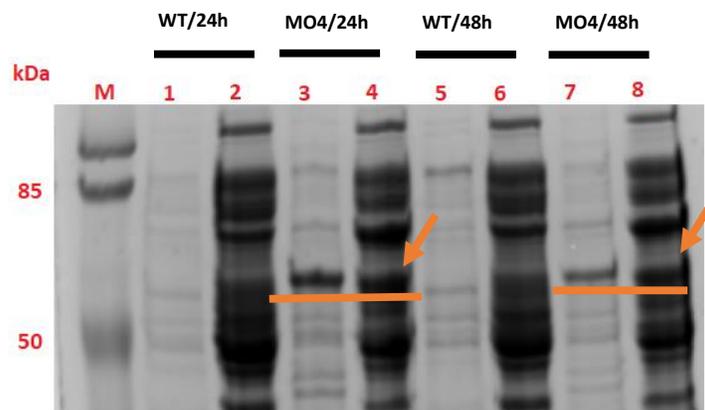


Figura Anexo C2: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO4 con la concentración de inductor de 0,02% (v/v) y 24°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente).

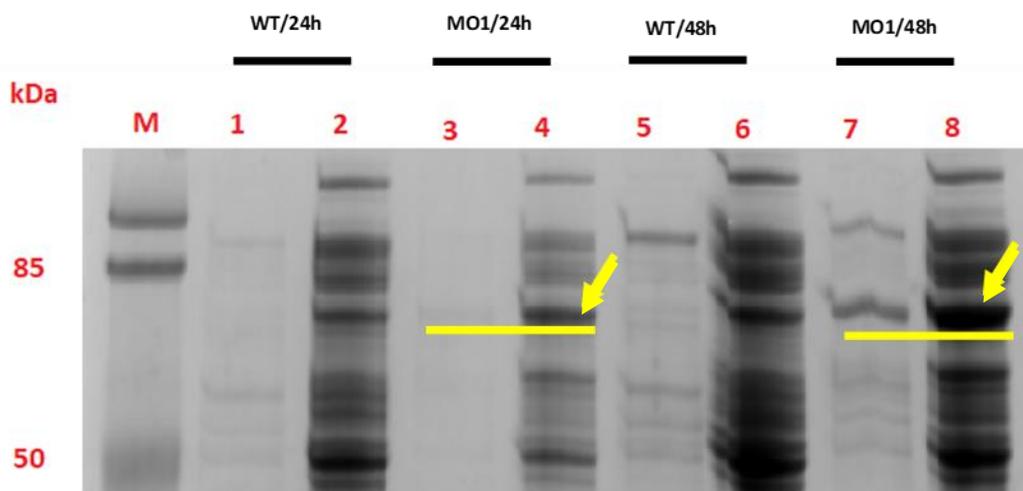
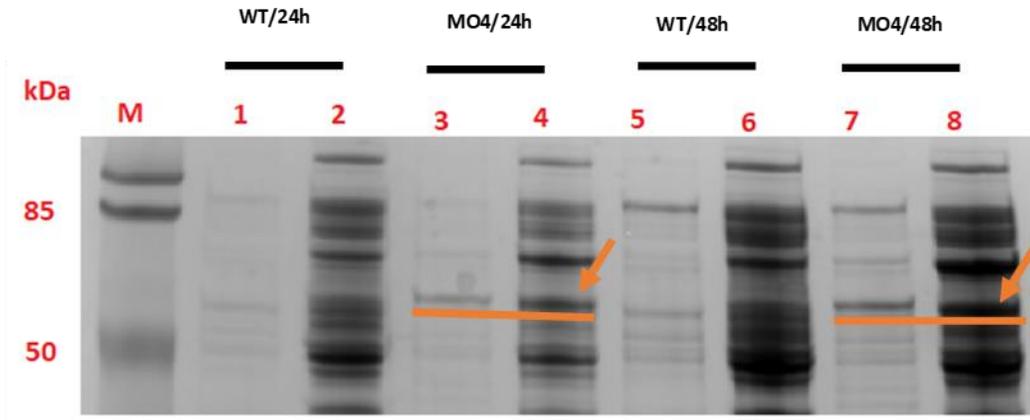


Figura Anexo C3: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO1 con la concentración de inductor de 0,1% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO1 (fracción IN y S respectivamente).



*Figura Anexo C4: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima MO4 con la concentración de inductor de 0,1% (v/v) y 18°C. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 h post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 h post inducción. Los carriles 1 y 2 son de *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 3 y 4 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 5 y 6 corresponden a *E. coli* TOP10 sin transformar (fracción IN y S respectivamente). Los carriles 7 y 8 corresponden a MO4 (fracción IN y S respectivamente).*

Anexo D: ejemplo de cálculo para actividad enzimática.

A continuación, se presenta un ejemplo de cálculo que permite explicar cómo se obtuvieron los resultados de actividad enzimática para *Tm*CHMO expuestos en el capítulo 4. Resultados, sección 4.1 y 4.2. Cabe mencionar que el ejemplo de cálculo corresponde a la actividad enzimática del extracto clarificado de la sección 4.1 de uno de los duplicados a las 8h post inducción.

A los resultados de absorbancia se les aplicó la Ley de Beer y Lambert con el fin de obtener los valores de concentración de NADPH que se muestran en la tabla Anexo D.1.

Ley de Beer y Lambert

$$Abs = E * [NADPH] * L$$

Abs: Absorbancia

E: coeficiente de extinción del NADPH = 6,22 (cm*mM)⁻¹

[NADPH]: concentración de NADPH (mM)

L: Longitud de la celda = 0,52 (cm)

Tabla Anexo D.1: Valores de absorbancia (OD) para cada triplicado y valores de absorbancia para los respectivos controles.

| Tiempo [min] | Blanco (S/E) | | Ensayo | | | | Blanco (S/S) | | Blanco (S/E) | | Ensayo | | | | Blanco (S/S) | |
|--------------|--------------|-------|--------|-------|-------|-------|--------------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| | OD | OD | OD | OD | OD | OD | OD | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm | [NADPH] Mm |
| 0 | 1,094 | 0,711 | 0,788 | 0,751 | 0,731 | 0,765 | 0,643 | 0,3382 | 0,2260 | 0,2365 | 0,1988 | 0,2198 | 0,2436 | 0,2322 | | |
| 1,333333333 | 0,85 | 0,764 | 0,79 | 0,753 | 0,616 | 0,651 | 0,588 | 0,2628 | 0,1905 | 0,2013 | 0,1818 | 0,2362 | 0,2442 | 0,2328 | | |
| 2,666666667 | 0,83 | 0,76 | 0,774 | 0,751 | 0,535 | 0,558 | 0,506 | 0,2566 | 0,1654 | 0,1725 | 0,1564 | 0,2350 | 0,2393 | 0,2322 | | |
| 4 | 0,821 | 0,755 | 0,771 | 0,743 | 0,443 | 0,467 | 0,422 | 0,2538 | 0,1370 | 0,1444 | 0,1305 | 0,2334 | 0,2384 | 0,2297 | | |
| 5,333333333 | 0,812 | 0,743 | 0,762 | 0,733 | 0,352 | 0,377 | 0,337 | 0,2511 | 0,1088 | 0,1166 | 0,1042 | 0,2297 | 0,2356 | 0,2266 | | |
| 6,666666667 | 0,806 | 0,734 | 0,754 | 0,724 | 0,269 | 0,295 | 0,258 | 0,2492 | 0,0832 | 0,0912 | 0,0798 | 0,2269 | 0,2331 | 0,2238 | | |
| 8 | 0,8 | 0,725 | 0,745 | 0,714 | 0,194 | 0,22 | 0,185 | 0,2473 | 0,0600 | 0,0680 | 0,0572 | 0,2242 | 0,2303 | 0,2208 | | |
| 9,333333333 | 0,792 | 0,716 | 0,738 | 0,705 | 0,136 | 0,16 | 0,129 | 0,2449 | 0,0420 | 0,0495 | 0,0399 | 0,2214 | 0,2282 | 0,2180 | | |
| 10,666666667 | 0,785 | 0,708 | 0,728 | 0,694 | 0,102 | 0,118 | 0,096 | 0,2427 | 0,0315 | 0,0365 | 0,0297 | 0,2189 | 0,2251 | 0,2146 | | |
| 12 | 0,776 | 0,699 | 0,72 | 0,684 | 0,09 | 0,099 | 0,087 | 0,2399 | 0,0278 | 0,0306 | 0,0269 | 0,2161 | 0,2226 | 0,2115 | | |
| 13,333333333 | 0,768 | 0,69 | 0,711 | 0,675 | 0,088 | 0,094 | 0,086 | 0,2374 | 0,0272 | 0,0291 | 0,0266 | 0,2133 | 0,2198 | 0,2087 | | |

Los resultados de concentración de NADPH fueron graficados en función del tiempo como se describe en la figura Anexo D.1 (al observar el gráfico se puede notar que el signo negativo fue corregido para efectos de cálculos posteriores).

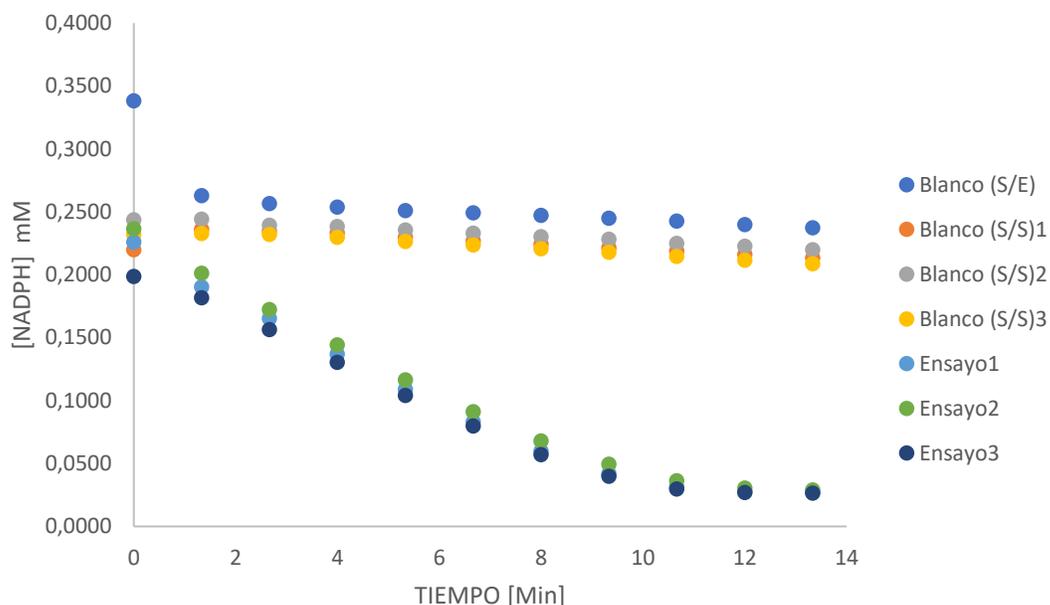


Figura Anexo D.1: Gráfica de desaparición de NADPH en el tiempo Blanco (S/E) corresponde al blanco que contiene todo lo necesario para la reacción menos enzima y Blanco (S/S) corresponde al blanco que contiene todo lo necesario para la reacción menos sustrato.

Para el cálculo de la actividad enzimática se realizó el siguiente balance:

Balance de desaparición de [NADPH] en el tiempo $\frac{d[NADPH]}{dt} = a$

Integrando la ecuación para los valores de:

$$\int_0^{[NADPH]} d[NADPH] = a * \int_0^t dt$$

Se obtiene la siguiente ecuación lineal:

$$[NADPH] = a * t$$

[NADPH]: concentración de NADPH (mM)

a: Actividad enzimática (mM/min)

t: tiempo (min)

Se calculó la pendiente entre el tiempo y la [NADPH] en los tiempos iniciales de reacción y se corroboró la linealidad con el coeficiente de correlación R^2 . Dado que la reacción de biocatálisis requiere de un mol de NADPH para catalizar un mol de ciclohexanona, el resultado de actividad enzimática se expresa en mM de ciclohexanona por unidad de tiempo, como se observa en la siguiente tabla.

Tabla Anexo D.2: Valores de actividad enzimática de TmCHMO en el extracto clarificado en Mm/min para cada triplicado y valores de absorbancia para los respectivos controles.

| | Blanco (S/E) | | Ensayo | | | Blanco (S/S) | |
|--------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------|
| Act [mM/min] | 0,0010 | 0,0186 | 0,0190 | 0,0169 | 0,0020 | 0,0018 | 0,0018 |

Para la obtención de actividad enzimática en unidades de UI por gramo de biomasa seca (UI/gBS) se realizó la siguiente modificación de unidades, a cada uno de los triplicados.

$$\left(\frac{mMOL}{L * min}\right) * 1000 \frac{\mu MOL}{mMOL} * 0,0002 L * 2,85$$

Donde el factor 2,85 corresponde a la dilución que se realizó al hacer el ensayo enzimático.

Donde gBS corresponde a los gramos de biomasa seca requeridos para obtener los 70 uL del extracto clarificado.

Tabla Anexo D.3: Valores de actividad enzimática de TmCHMO en el extracto clarificado en (UI/gBS) para cada triplicado y valores de absorbancia para los respectivos controles.

| | Blanco (S/E) | | Ensayo | | | Blanco (S/S) | |
|-------------|--------------|----|--------|----|---|--------------|---|
| Act[UI/gBS] | 2 | 46 | 47 | 42 | 5 | 5 | 4 |

