



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

**PRODUCCIÓN DE FLAVOPROTEÍNAS MONOOXIGENASAS PUTATIVAS
PROVENIENTES DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL LUPINO DEL
DESIERTO DE ATACAMA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

PAZ ANTONIA QUINTANILLA ARAYA

PROFESORA GUÍA:
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

Este trabajo fue financiado por:
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA (CeBiB)

SANTIAGO DE CHILE

2024

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE INGENIERA CIVIL EN QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: PAZ ANTONIA QUINTANILLA ARAYA
FECHA: 2024
PROF.GUÍA: IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

PRODUCCIÓN DE FLAVOPROTEÍNAS MONOOXIGENASAS PUTATIVAS PROVENIENTES DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL LUPINO DEL DESIERTO DE ATACAMA

Las flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B son enzimas de amplio interés industrial ya que están involucradas en procesos biológicos que incluyen la degradación de lignina, biosíntesis de metabolitos secundarios complejos, y desintoxicación de compuestos xenobióticos.

Recientemente se han reportado FPMOs originarias de los microorganismos *S. leeuwenhoe-kii* C34 y de *Thermocrispum municipale* que cuentan con gran potencial biotecnológico dada su elevada termoestabilidad y tolerancia a disolventes. Dichas enzimas sirvieron como referencia en un estudio previo para seleccionar bioinformáticamente FPMOs putativas provenientes de actinomicetos del Lupino del Desierto de Atacama. De esta selección, se puso a prueba la expresión de cuatro enzimas utilizando el sistema *E. coli* TOP10 pBAD-His-Tag-SUMO (que produce las proteínas en el citoplasma) donde se observó que dos de estas FPMOs no se expresaron, mientras que las dos restantes se expresaron en la fase insoluble, pese a las modificaciones que se realizaron en las condiciones de cultivo. De esta manera, dado el potencial de las FPMOs putativas seleccionadas producto de su similitud con las extremozimas mencionadas nace el siguiente trabajo de título, el cual consiste en evaluar alternativas para expresar estas enzimas de manera soluble y activa.

Para este estudio se expresaron las FPMOs putativas MO1, MO4 (ambas con la etiqueta proteica "SUMO", que regula la localización, solubilidad y estabilidad de las proteínas), G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema *E. coli* NiCO21 (DE3) pET22b(+), que facilita el transporte de proteínas al periplasma. De los ensayos realizados se pudo concluir que existió expresión en la fase soluble para todas las enzimas luego de la inducción con IPTG 0,3 mM en ensayos a nivel de matraces de 1 L con 200 mL de medio LB fosfato de sodio 0,1 M y glicerol 3 g/L. Esta diferencia en la expresión con el estudio de referencia se atribuye al transporte de las enzimas al periplasma, lugar que propicia el correcto plegamiento de las proteínas mediante la formación de enlaces disulfuro, lo que está impedido en el citoplasma por la presencia de enzimas que favorecen la reducción de cisteínas.

Con el fin de caracterizar las enzimas producidas se evaluó la desaparición de NADPH en presencia de los sustratos biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, tioanisol, ciclohexanona y fenilalanina, de donde se concluyó que los mayores niveles de catálisis fueron para G35A_MO_SUMO con biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. A partir de estos resultados se evaluó la expresión de G35A_MO_SUMO con inducción tanto en fase temprana como tardía de crecimiento, midiendo su actividad catalítica usando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. De esto se concluyó que existe una mayor actividad específica cuando la inducción se realiza durante la fase tardía (3,4 veces la actividad obtenida en la inducción en fase temprana), lo que se atribuye a la presencia de una mayor cantidad de enzima en el extracto soluble debido a una síntesis proteica más controlada (dado un metabolismo menos activo) en esta etapa de crecimiento celular.

*Debes ser feliz porque
el nuevo mundo se acerca.*

L'altra dimensione-Måneskin

Agradecimientos

Para partir, quisiera expresar los más sinceros e infinitos agradecimientos a cada miembro de mi familia. A mis abuelos, por criarme y cuidarme desde pequeña tal como si yo hubiese sido su hija; y por darme ese amor incondicional hasta el día que dejaron este mundo. Espero que desde el cielo me sigan cuidando y que estén orgullosos de mí. Este logro es para ustedes.

Agradecer también a mi mamá, María, por ser ese ejemplo a seguir y mi pilar fundamental en cada etapa de mi vida. Eres una mujer maravillosa y estoy enormemente orgullosa de todo lo que has logrado. A mis hermanas, Carolina y Camila, por enseñarme tantas cosas que hoy me convierten en la persona que soy y por quererme de la manera más pura y sincera posible. A Cristian, uno de mis cuñados, por apoyarme siempre a pesar de la distancia. A mi otro cuñado, Rodrigo por muchas veces cumplir ese rol de padre y por impulsarme a seguir en cada logro académico que me propuse. A mi tío, Juan Antonio, por esas tardes de fin de semana donde me dejó en la Universidad para poder seguir avanzando en los resultados de este trabajo de título, y por siempre quererme y aceptarme tal cual soy a pesar de nuestras múltiples diferencias ideológicas. A mi sobrino, Nicolás, porque a pesar de su corta edad fue capaz en muchas ocasiones de subirme el ánimo cuando la vida se puso cuesta arriba. Y por último (pero no menos importante) a mi sobrina, Sofía, por ser esa fuente de inspiración y motivación a estudiar la carrera que escogí. Espero que todos los conocimientos que adquirí permitan que tengas una vida plena y feliz, ahora y siempre. A todos ustedes, infinitas gracias.

Agradezco a mi profesora guía, Irene Martínez, por todo el apoyo, la paciencia brindada y por sobretodo, la confianza depositada en mí tanto para realizar esta memoria como para ser parte numerosas veces de sus cuerpos docentes. Espero haber realizado el mejor trabajo y haber estado siempre a la altura.

A los amigos que formé en la U: Ángela, Dani, Diego, Dino, Floppy, Gera, Javi y Yoshi. Gracias por soportar cada una de mis quejas, por apoyarme en los momentos más difíciles y por estar ahí siempre que los necesité. Son personas valiosas y espero que esta amistad perdure en el tiempo.

A mis mascotas, por su amor incondicional y por sus travesuras que muchas veces me hicieron reír cuando lo único que quería hacer era llorar.

Por último, agradecer a cada persona que formó parte de este proceso y de mi vida en general. Sin ustedes, nada de esto sería posible.

A todos, gracias totales.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. Objetivo general	4
1.1.2. Objetivos específicos	4
1.2. Alcances y limitaciones	4
2. Antecedentes	6
2.1. Oxidación de Baeyer-Villiger	6
2.2. Flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B	7
2.3. Ciclohexanona monooxigenasa derivada de la bacteria <i>Thermocristum municipale</i> (TmCHMO)	10
2.4. Uso de biotransformaciones con células completas	11
2.5. Expresión de proteínas recombinantes de forma soluble	13
2.6. <i>Escherichia coli</i> NiCo21 (DE3) y vector de expresión pet22b(+)	15
2.7. Expresión y caracterización de BVMOs en cepas de <i>E. coli</i> recombinante	17
2.7.1. Expresión de una BVMO de tipo I proveniente de <i>Amycolatopsis thermoflava</i>	17
2.7.2. Expresión de RaBVMO y AmBVMO	17
2.7.3. Producción de dos nuevas BVMOs de tipo I provenientes del desierto de Atacama	18
2.7.4. Estudio de referencia	20
3. Materiales y Metodología	26
3.1. Recursos y requerimientos	26
3.2. Plan de trabajo	26
3.2.1. Metodología experimental	27
3.2.1.1. Construcción de los sistemas de expresión	27
3.2.1.2. Preparación de cultivo en placa Petri	28
3.2.1.3. Preparación de preinóculo	28
3.2.1.4. Preparación de células quimiocompetentes	28
3.2.1.5. Transformación de células de <i>E. coli</i> NiCo21 (DE3) como hospedadoras	29
3.2.1.6. Expresión de proteínas recombinantes	29
3.2.1.7. Purificación de las proteínas recombinantes desde el extracto clarificado	30
3.2.2. Metodología analítica	30
3.2.2.1. Medición de concentración de biomasa	30

3.2.2.2.	Medición de actividad enzimática	31
3.2.2.3.	Medición de concentración de proteínas totales	31
3.2.2.4.	SDS PAGE	32
4.	Resultados y discusión	33
4.1.	Ensayos de actividad enzimática utilizando diferentes sustratos para todas las enzimas del estudio	33
4.2.	Ensayos de actividad enzimática para la proteína G35A_MO_SUMO expresada en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo distintas condiciones de crecimiento	41
5.	Conclusiones	45
6.	Recomendaciones y proyecciones futuras	47
	Bibliografía	48
	Anexos	54
A.	Elaboración soluciones de trabajo	54
A.1.	Elaboración de solución stock 50 mg/mL de ampicilina	54
A.2.	Elaboración de solución stock 500 mg/mL de glicerol	54
A.3.	Elaboración de solución stock 0,5 M de IPTG	54
A.4.	Preparación de buffer Tris-HCl 200 mM; pH 7,4	54
A.5.	Preparación de reactivo de Bradford	55
A.6.	Preparación solución stock NADPH 360 μ M	55
A.7.	Preparación solución stock biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona 20 mM	55
A.8.	Preparación solución stock de ciclohexanona 20 mM	55
A.9.	Preparación solución stock de fenilalanina 20 mM	55
A.10.	Preparación solución stock de tioanisol 20 mM	56
B.	Preparación de medios de cultivo para <i>E.coli</i>	57
B.1.	Elaboración de medio LB líquido en tampón fosfato 0,1 M; pH 6,8	57
B.2.	Preparación de placas Petri con medio LB-agar y antibiótico para el cultivo de células <i>E. coli</i>	57
C.	Elaboración de las curvas de calibrado de proteína	58
C.1.	Curva de calibrado para la medición de concentración de proteínas tras la expresión de todas las monooxigenasas del estudio en el sistema <i>E.coli</i> NiCO21 (DE3) pET22b(+)	58
C.2.	Curva de calibrado asociada a la medición de la concentración de la proteína G35A_MO_SUMO expresada en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo distintas condiciones de crecimiento	61
D.	Detalle de los resultados obtenidos	63
D.1.	Resultados utilizados para elaborar las curvas de crecimiento de cultivos de <i>E.coli</i>	63
D.2.	Resultados de los ensayos de actividad enzimática	64
D.2.1.	Ensayos de actividad enzimática para todas las monooxigenasas del estudio utilizando diferentes sustratos	64
D.2.1.1	Valores de absorbancia y concentración de NADPH	64
D.2.2.	Velocidad de consumo de NADPH	77

D.2.2.1	Determinación de la concentración de proteínas totales . .	78
D.2.3.	Ensayos de actividad enzimática para G35A_MO_SUMO expresada en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) . . .	79
D.2.3.1	Valores de absorbancia y concentración de NADPH con inducción temprana	79
D.2.3.2	Valores de absorbancia y concentración de NADPH con inducción tardía	80
D.2.3.3	Velocidad de consumo de NADPH	82
D.2.3.4	Determinación de la concentración de proteínas totales . .	82
E.	Memoria de cálculo	84
E.1.	Solución de ampicilina	84
E.2.	Determinación de la concentración de proteínas totales	84
E.3.	Determinación de la actividad enzimática	85

Índice de Tablas

2.1.	Secuencias conservadas para FPMOs de clase B y sus subclases respectivas. . .	8
2.2.	Sustratos probados en el análisis de las BVMOs putativas de tipo I del estudio de <i>Gran-Scheuch et. al.</i>	19
2.3.	FPMOs utilizadas como secuencia de consulta en la búsqueda bioinformática de FPMOs putativas.	20
2.4.	FPMOs putativas seleccionadas en base al porcentaje de identidad igual o superior al 35 % y E-value cercano a 0.	21
3.1.	Resumen de las construcciones realizadas para las enzimas seleccionadas en el estudio junto con el microorganismo del que provienen.	28
4.1.	Actividad enzimática para G35A_MO_SUMO proveniente de extracto clarificado de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) tras la inducción en fase temprana y tardía de crecimiento.	43
C.1.	Absorbancias a 595 nm obtenidas para concentraciones conocidas de proteína estándar utilizadas para realizar la curva de calibrado asociada a la medición de concentración de proteínas totales tras la expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	58
C.2.	Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de la expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	59
C.3.	Absorbancias a 595 nm obtenidas para concentraciones conocidas de proteína estándar utilizadas para realizar la curva de calibrado asociada a la medición de concentración de proteínas totales tras los ensayos de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	61
C.4.	Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	61
D.1.	Datos para la elaboración de la curva de crecimiento del cultivo de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) G35A_MO_SUMO, incubado a 37°C y 180 RPM.	63
D.2.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.	64
D.3.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO4.	65
D.4.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO1.	65
D.5.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO.	66

D.6.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.	67
D.7.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO4.	68
D.8.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO1.	69
D.9.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO.	70
D.10.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.	71
D.11.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para MO4.	72
D.12.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para MO1.	73
D.13.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para G35A_MO.	74
D.14.	Valores de absorbancia y concentración de NADPH para el control en los ensayos de actividad con todas las enzimas del estudio.	75
D.15.	Velocidades de consumo de NADPH en mM/min para todas las enzimas del trabajo de título.	78
D.16.	Resultados de absorbancia a 565 nm obtenidos a partir del ensayo de cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para los cultivos de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) con la expresión de todas las proteínas del estudio tras la inducción con IPTG.	78
D.17.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.	79
D.18.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.	79
D.19.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.	79
D.20.	Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.	80
D.21.	Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.	81
D.22.	Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.	81
D.23.	Velocidades de consumo de NADPH en mM/min para los cultivos inducidos en las dos fases de crecimiento seleccionadas.	82
D.24.	Resultados de absorbancia a 565 nm obtenidos a partir del ensayo de cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para la proteína G35A_MO_SUMO expresada en los cultivos de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) tras la inducción con IPTG.	83
D.25.	Resultados de concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para los cultivos de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) con la expresión de la proteína G35A_MO_SUMO tras la inducción con IPTG.	83

Índice de Ilustraciones

1.1.	Ciclo catalítico de la FPMO del grupo B fenilacetona monooxigenasa proveniente de <i>Thermobifida fusca</i>	1
1.2.	Estructura general de G35A_MO.	3
2.1.	Mecanismo aceptado para la oxidación de Baeyer-Villiger usando ciclohexanona como sustrato.	7
2.2.	Estructura general de TmCHMO y su sitio activo.	10
2.3.	Esquema del motor químico de regeneración de NADPH formado por las enzimas Aldosa reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.	12
2.4.	Esquema del motor químico de regeneración de NAD ⁺ formado por las enzimas glucosa deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa.	13
2.5.	Mapa del vector de expresión pET22b(+).	16
2.6.	Conversión de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona en (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona y (-)-(1R,5S)-3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona.	20
2.7.	Análisis filogenético de las secuencias de las FPMOs putativas encontradas (círculo azul) en conjunto con las secuencias de consulta utilizadas (círculo naranja).	22
2.8.	SDS-Page sobre expresión de MO1 en las fracciones insoluble y soluble con 0,02% (p/v) de L-arabinosa.	23
2.9.	SDS-Page sobre expresión de MO1 en las fracciones insoluble y soluble con 0,02% (p/v) de L-arabinosa.	23
2.10.	SDS-Page de las FPMOs purificadas desde la fracción soluble. Figura extraída de <i>González, Carolina; 2022 [9]</i>	24
2.11.	SDS-Page de las FPMOs purificadas desde la fracción insoluble. Figura extraída de <i>González, Carolina; 2022 [9]</i>	24
3.1.	Diagrama de las etapas de trabajo en la producción de las FPMOs putativas del estudio.	27
4.1.	Estructura molecular de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona.	34
4.2.	Estructura molecular de tioanisol.	34
4.3.	Conversión de tioanisol en su respectivo sulfóxido y sulfona.	34
4.4.	Estructura molecular de fenilalanina.	35
4.5.	Conversión de fenilalanina en tirosina.	35
4.6.	Estructura molecular de ciclohexanona.	35
4.7.	Conversión de ciclohexanona en ϵ -caprolactona.	36
4.8.	Análisis de la expresión de las enzimas de este estudio mediante SDS-PAGE.	36
4.9.	Actividad enzimática de todas las enzimas del estudio utilizando los sustratos seleccionados.	37

4.10.	Curva de crecimiento para <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) con el gen que codifica para la enzima G35A_MO_SUMO.	41
4.11.	SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima G35A_MO_SUMO en ambas condiciones de inducción con una concentración de IPTG 0,3 mM.	43
C.1.	Curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+), utilizando Albúmina de suero Bovino (BSA) como proteína estándar.	59
C.2.	Curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas luego de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo las condiciones de crecimiento seleccionadas, utilizando Albúmina de suero Bovino (BSA) como proteína estándar.	62
D.1.	Perfiles de consumo de NADPH de G35A_MO_SUMO con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	76
D.2.	Perfiles de consumo de NADPH de MO4 con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	76
D.3.	Perfiles de consumo de NADPH de MO1 con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	77
D.4.	Perfiles de consumo de NADPH de G35A_MO con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+).	77
D.5.	Perfil de consumo de NADPH para las mediciones de actividad enzimática de G35A_MO_SUMO en extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) inducido en fase temprana, utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato.	80
D.6.	Perfil de consumo de NADPH para las mediciones de actividad enzimática de G35A_MO_SUMO en extracto clarificado proveniente de <i>E.coli</i> NiCo21 (DE3) pET22b(+) inducido en fase tardía, utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato.	82

1. Introducción

La creciente preocupación a nivel mundial por implementar procesos industriales más sustentables y económicamente rentables ha contribuido al uso de la biocatálisis enzimática como una alternativa amigable con el medio ambiente frente a la síntesis orgánica convencional. Las enzimas son catalizadores atractivos para varios procesos industriales por ser biodegradables, no tóxicas, eficientes y selectivas. Estos biocatalizadores pueden ofrecer un alto nivel de seguridad, un bajo consumo energético y un proceso global respetuoso con el medio ambiente [1].

Un ejemplo concreto de enzimas que muestran potencial industrial son las flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B, las cuales son proteínas capaces de catalizar la incorporación de un átomo de oxígeno a un sustrato utilizando como cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD), y NADPH o NADH como donante de electrones [2]. Dichas enzimas son capaces de producir ésteres, lactonas y sulfóxidos con alta quimio, regio y enantioselectividad mientras operan en condiciones de reacción suaves [1].

En la Figura 1.1 se muestra el ciclo catalítico de una FPMO del grupo B.

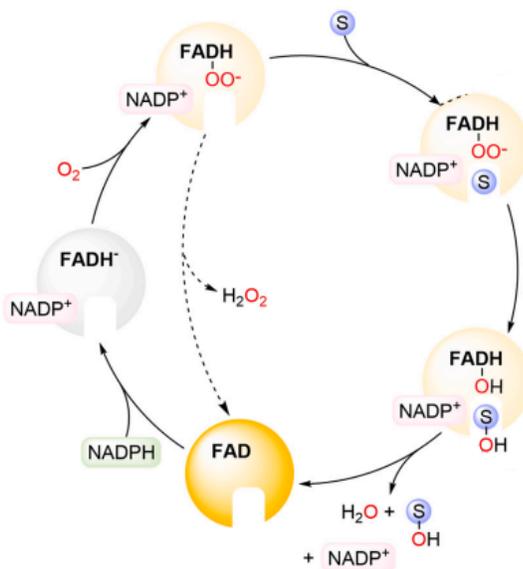


Figura 1.1: Ciclo catalítico de la FPMO del grupo B fenilacetona monooxigenasa proveniente de *Thermobifida fusca*. Figura extraída y modificada de Paul et. al, 2021 [3].

Sin embargo, a pesar de ser muy valoradas por su potencial biosintético, las principales limitaciones para la aplicación de las FPMOs en una escala industrial incluyen su baja estabilidad, caracterizada por una termoestabilidad deficiente y una tolerancia limitada a solventes [1]. Es debido a esto que se han realizado diversos estudios con el objetivo de caracterizar y producir FPMOs robustas capaces de resistir condiciones de reacción adversas. En general, las enzimas aisladas de organismos mesófilos no toleran esas condiciones. Sin embargo, las extremozimas (que son enzimas derivadas de organismos extremófilos), suelen ser más aptas para soportar escenarios críticos.

En ese sentido, se han realizado estudios en entornos con condiciones severas con el objetivo de identificar FPMOs robustas. Un ejemplo de ambiente con estas características es el Desierto de Atacama, el cual se destaca por tener una gran variación de temperatura durante el día (entre -8 y 50°C), baja disponibilidad de agua y bajos niveles de humedad, alta exposición a luz ultravioleta y alta salinidad; lo que permite que la biodiversidad microbiana que existe en ese territorio resulte de gran interés biotecnológico puesto que ofrece una vasta reserva de herramientas con aplicaciones en la industria, salud, agricultura y medio ambiente, lo que a su vez promueve el desarrollo de soluciones innovadoras y sostenibles para los desafíos actuales en biotecnología [4].

Recientemente se han reportado dos FPMOs (SLE_13190 y SLE_62070; códigos de UniProt A0A0F7VUW7 y A0A0F7W6X7, respectivamente) provenientes de un actinomiceto del Desierto de Atacama, capaces de catalizar reacciones de oxidación en varias cetonas y sulfuros, que presentan elevada termoestabilidad y tolerancia a disolventes [1] (ver Sección 2.7.3 para mayor detalle).

Junto con lo anterior, en el año 2016 se descubrió que la FPMO de clase B originaria del microorganismo *Thermocrispum municipale* (TmCHMO; EC 1.14.13.22), aislado desde el compost de residuos municipales, cuenta con gran potencial biotecnológico dada su elevada termoestabilidad (temperatura de desnaturalización a los 48°C), tolerancia a disolventes, especificidad de sustrato, y expresión recombinante, soluble y activa [5]. Además, tiene la capacidad de catalizar la transformación de los fármacos Clomifeno (medicamento no esteroideo utilizado en el tratamiento de fertilidad en mujeres [6]), Dasatinib (metabolito utilizado para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica y la leucemia linfoblástica aguda [7]) y con menor actividad, Tamoxifeno (utilizado en el tratamiento de cáncer de mama [8]) según lo reportado por *Carolina González Almonacid* (CeBiB) en un estudio previo [9]. De igual manera, esta enzima convierte de manera eficiente una amplia variedad de cetonas alifáticas, aromáticas y cíclicas, además de sulfuros proquirales. [10].

Tanto SLE_13190, SLE_62070 y TmCHMO sirvieron además como referencia en el estudio previo realizado por *Carolina González* [9] para seleccionar bioinformáticamente FPMOs putativas provenientes de actinomicetos del Lupino del Desierto de Atacama debido a su similitud con las extremozimas ya mencionadas. De esta selección, únicamente se puso a prueba la expresión de cuatro enzimas utilizando como organismo hospedero *Escherichia coli* TOP10 y el plásmido pBAD-His-Tag-SUMO, donde se observó que dos de estas FPMOs no se expresaron, mientras que las dos restantes se expresaron en la fase insoluble, pese a las modificaciones que se realizaron en las condiciones de cultivo (ver Sección 2.7.4 para mayor detalle). Es por esto que, dado el potencial biotecnológico de estas FPMOs producto de

su similitud con las extremozimas de referencia, es necesario construir nuevos sistemas de expresión utilizando plásmidos y cepas hospederas diferentes al del estudio base con el fin de evaluar alternativas en donde estas enzimas puedan expresarse de manera soluble y activa.

Considerando que la expresión en la fase insoluble es un factor clave para evaluar la posibilidad de expresar las proteínas de forma soluble en los sistemas a desarrollados, en este estudio se seleccionaron las enzimas MO1 y MO4 (ambas con la etiqueta "SUMO", la cual regula la localización, solubilidad y estabilidad de la proteína diana [11]), ya que previamente se expresaron de manera insoluble.

Además, con el objetivo de ampliar el estudio y dada alta similitud de una de las FPMOs putativas seleccionadas previamente con SLE_62070 (porcentaje de identidad del 86%), se construyeron sistemas de expresión con el fin de evaluar una alternativa de expresión soluble y activa para esta FPMO (G35A_MO; EC. 1.14.13.171), la cual no fue estudiada en el trabajo de referencia llevado a cabo por *Carolina González* [9]. Dichos sistemas además incluyeron una versión modificada de esta enzima, en la cual se le agregó una etiqueta "SUMO" (G35A_MO_SUMO).

En la Figura 1.2 se presenta la estructura general de G35A_MO.

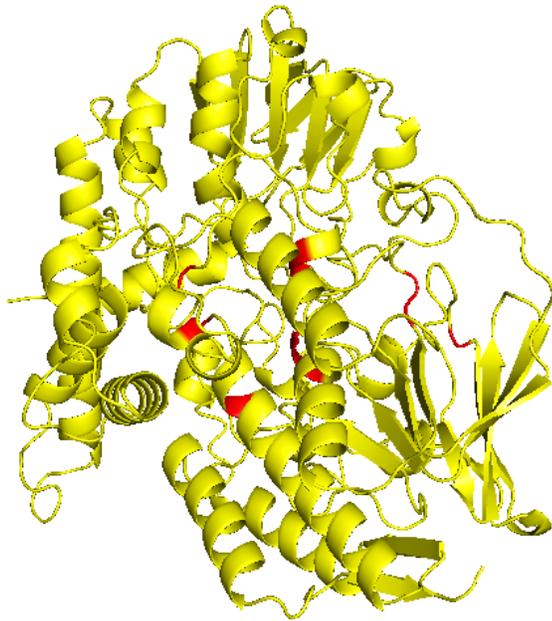


Figura 1.2: Estructura general de G35A_MO. En amarillo se muestra la estructura proteica de la enzima y en rojo los sitios de unión de FAD. Figura construida a partir de la secuencia reportada en UniProt [12].

En particular, los sistemas de expresión mencionados anteriormente fueron construidos utilizando el vector de expresión pET22b(+) (que fue escogido por permitir el transporte de las proteínas al periplasma), el cual fue transformado en la cepa *Escherichia coli* Ni-

Co21(DE3) (ver Anexo 2.6 para mayor detalle).

Para la realización de este estudio se utilizó una concentración de inductor (IPTG ¹) de 0,3 mM y temperatura de incubación tras añadir el inductor de 24°C. Además, se evaluó la expresión basal de las proteínas recombinantes, es decir, en ausencia del inductor. Finalmente, cabe destacar que los ensayos fueron realizados a nivel de matraz con una agitación de 180 RPM en medio Luria-Bertani (LB) en buffer fosfato de sodio (cuya composición se detalla en el Anexo B.1) con glicerol 3 g/L y el antibiótico correspondiente.

1.1. Objetivos

A continuación, se señalan los objetivos del presente trabajo de memoria de título:

1.1.1. Objetivo general

- Producir FPMOs putativas provenientes de actinomicetos aislados del Lupino del Desierto de Atacama, seleccionadas previamente de manera bioinformática, utilizando un sistema de expresión de proteínas dirigido al periplasma en una cepa de *Escherichia coli* recombinante.

1.1.2. Objetivos específicos

- Obtener las variantes de *Escherichia coli* recombinantes que expresen las FPMOs seleccionadas para su secreción al periplasma.
- Caracterizar las enzimas producidas evaluando su actividad enzimática para diferentes sustratos, los cuales se seleccionarán en base a los niveles de conversión de las reacciones mediadas por las enzimas TmCHMO y SLE_62070.
- Evaluar la expresión de la FPMO que presente mayor actividad en diferentes fases de crecimiento bacteriano.

1.2. Alcances y limitaciones

En esta sección se describen los alcances y limitaciones del desarrollo del trabajo de título, enmarcando hasta qué punto abarcó el estudio considerando el tiempo que se tuvo para ejecutarlo.

En primer lugar, es importante mencionar que de las cuatro FPMOs expresadas con anterioridad, para el presente estudio solamente se utilizaron aquellas que tuvieron expresión insoluble (MO1 y MO4) en el estudio de referencia, debido a que esto representa un antecedente importante respecto a la posibilidad de poder expresar dichas enzimas en la fase soluble con los sistemas construidos. Además, dado que la enzima G35A_MO presentada en el estudio base es aquella que exhibe un mayor porcentaje de identidad con alguna de las secuencias de consulta, se dejan fuera del estudio otras enzimas que tengan menor porcentaje

¹ IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido. Análogo molecular de la allolactosa, el cual elimina un represor del operón lac para inducir la expresión génica.

de identidad comparado con esta FPMO, debido a que el porcentaje de identidad representa un factor importante a raíz de la similitud en la estructura proteica de la enzima.

Por otro lado, es importante destacar que las condiciones de posible expresión soluble no son necesariamente replicables para su utilización en otras enzimas pertenecientes a la familia de FPMOs de clase B, debido a que dichas condiciones dependen de las características que presenten estas proteínas. Asimismo, cabe destacar que se dejó fuera del estudio el desarrollo de biotransformaciones utilizando otros microorganismos como hospederos, cuyo uso puede presentar productividades distintas en cuanto a la expresión de proteínas por las características propias de estos.

Como otra limitación en el desarrollo de este trabajo se tiene que se dejaron fuera del estudio otras condiciones en la expresión de proteínas tales como modificaciones a la velocidad de agitación, al medio de cultivo y/o utilización de otras fuentes de carbono distinta al glicerol en cualquier etapa del desarrollo de la investigación debido a que no se contó con el tiempo disponible para analizar dichas variables. Además, puesto que el trabajo fue realizado en escala de matraces, no se controló el pH ni la aereación del cultivo, por lo que también quedaron fuera modificaciones a estos parámetros durante la expresión proteica.

2. Antecedentes

2.1. Oxidación de Baeyer-Villiger

La oxidación Baeyer-Villiger de cetonas (BV) es una reacción orgánica centenaria descubierta en 1899 por los científicos alemanes Adolf von Baeyer y Victor Villiger, en la cual se lleva a cabo la conversión de cetonas en los correspondientes ésteres o lactonas. A lo largo de los años esta reacción ha sido revisada en varias ocasiones y ha alcanzado un gran éxito en la química orgánica sintética debido a una serie de ventajas, las cuales incluye su tolerancia con respecto a otros grupos funcionales que puedan estar presentes en la molécula a oxidar, y su regioselectividad, que puede predecirse fácilmente sobre la base del orden de prioridad de grupos migradores [13].

La reacción química BV tradicional se lleva a cabo utilizando peroxiácidos orgánicos como oxidantes. Sin embargo, el uso de este tipo de reactivos no se considera respetuoso con el medio ambiente y, además, su uso tiene como desventaja no dar lugar siempre a ésteres y lactonas asimétricos. Es por esto que el desarrollo de un esquema de oxidación BV mediado por enzimas es extremadamente atractivo ya que estas pueden producir (con alta selectividad) una amplia gama de ésteres ópticos puros y lactonas que no son alcanzables usando química convencional, respetando las condiciones medio ambientales [14].

Actualmente, el mecanismo de reacción aceptado para la oxidación de Baeyer-Villiger es el propuesto por Criegee hace aproximadamente 60 años, el cual se presenta en la Figura 2.1. En este caso, la reacción es catalizada por la enzima ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) y el sustrato utilizado es ciclohexanona.

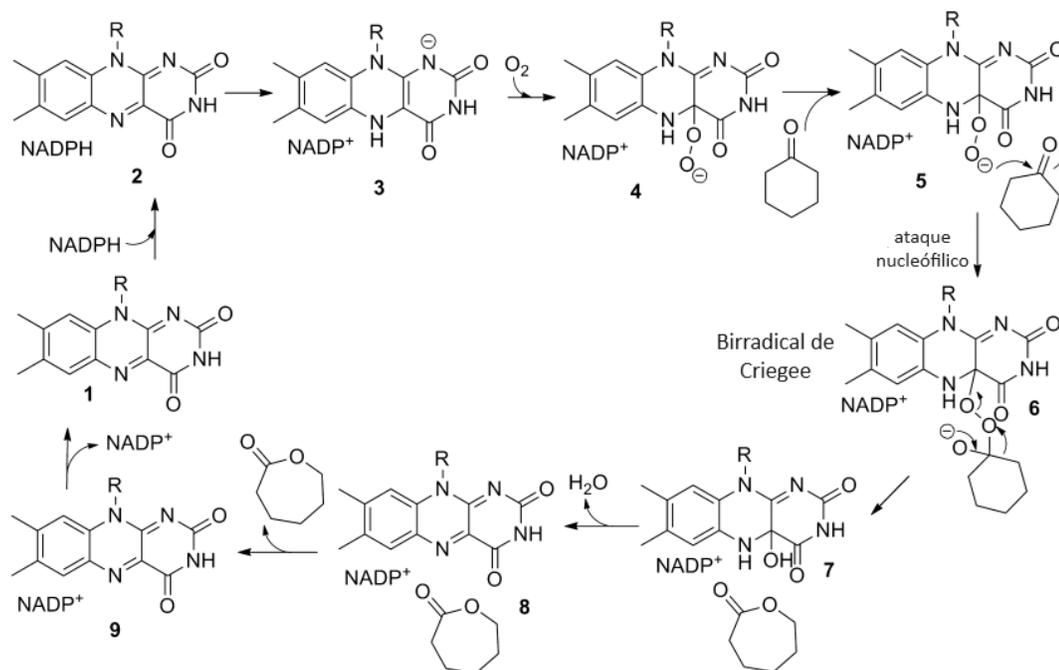


Figura 2.1: Mecanismo aceptado para la oxidación de Baeyer-Villiger usando ciclohexanona como sustrato. En la figura, la reacción es catalizada por CHMO y se muestra el FAD, la ciclohexanona como sustrato y el estado de protonación del cofactor NADPH. Figura extraída y modificada de *Bermúdez et.al*, 2014 [14].

En este mecanismo, el estado inicial implica el grupo prostético FAD fuertemente unido a la CHMO (1). Luego, el NADPH se une a la enzima (2) y transfiere un ion hidruro al FAD para dar lugar al complejo NADPH²-FADH-Enzima (3). Este complejo reacciona con el oxígeno molecular para formar un intermediario flavin-peróxido (intermediario C4a-peroxiflavina) (4), que acepta el sustrato ciclohexanona (5) y finalmente sufre un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo para producir el intermediario tetraédrico conocido como birradical de Criegee (6). Este intermediario se reordena a la correspondiente hidroxiflavina y ϵ -caprolactona (7). Tras la liberación tanto de agua como de lactona (8 y 9), el ciclo catalítico se cierra finalmente con la liberación de NADPH⁺.

2.2. Flavoproteínas monooxigenasas (FPMOs) de clase B

Las flavoproteínas monooxigenasas son enzimas que catalizan la inserción de un átomo de oxígeno molecular en un sustrato orgánico, utilizando como cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD), y NADPH o NADH como donante de electrones [2]. Estas enzimas están implicadas en un gran número de vías metabólicas tanto en procariontes como en eucariontes [15], y se pueden identificar y distinguir de otras clases de FPMOs porque contienen dos secuencias conservadas típicas de pliegues de Rossmann², donde la primera está cercana al

² Pliegues de Rossmann: Motivo estructural que se encuentra en las proteínas que se unen a nucleótidos, tales como los cofactores enzimáticos FAD, NAD⁺ y NADPH⁺.

extremo N-Terminal mientras que la otra está en medio de la secuencia aminoacídica [16].

Este tipo de enzimas resultan de amplio interés industrial puesto que están involucradas en procesos biológicos que incluyen la degradación de lignina, biosíntesis de productos naturales como metabolitos secundarios complejos, y desintoxicación de compuestos xenobióticos [3]. Además se consideran biocatalizadores oxidativos atractivos para la producción sostenible de productos químicos finos y productos intermedios valiosos hacia ingredientes farmacéuticos activos debido a su alta quimio, estéreo y regioselectividad [15].

Las FPMOs de clase B a la vez se subclasifican en Baeyer-Villiger monooxigenasas (BV-MO), en Flavina monooxigenasas (FMO), en monooxigenasas N-hidroxilantes (NMO) y en monooxigenasas dependientes de flavina YUC (YUCCAs) [16–18]. Estas clasificaciones se realizan utilizando diferentes parámetros, tales como la reacción que catalizan, el tipo de sustratos que pueden acomodar y/o sus elementos estructurales conservados para el caso de las BVMOs (B1) y las FMOs (B2). Sin embargo, en muchos casos, la estructura cristalina de los miembros de este vasto grupo de enzimas no está disponible, por lo que la clasificación se basa principalmente en la homología de secuencias más que en los datos estructurales [19].

En la Tabla 2.1 se presentan las secuencias conservadas para las FPMOs de clase B, y para las subclases BVMO y FMO.

Tabla 2.1: Secuencias conservadas para FPMOs de clase B y sus subclases respectivas. Tabla extraída y modificada de *González, Carolina*; 2022 [9].

	Motivo de Secuencia
Rossmann	GXGXX(G/A)
BVMO (B1)	[A/G]GxWxxxx[F/Y]P[G/M]xxxD FxGxxxHxxxWP/D
FMO (B2)	FXGXXXHXXX(Y/F) FxGxxxHxxxY(K/R)

Las BVMOs son el tipo de FPMOs de clase B más estudiado puesto que el empleo de estos biocatalizadores permite conseguir en muchos casos elevadas selectividades empleando condiciones de reacción suaves y respetuosas con el medio ambiente al evitar el uso de reactivos tóxicos [15]. Estas enzimas son abundantes en los genomas bacterianos, fúngicos y vegetales, pero casi ausentes en los genomas animales o humanos [20], y catalizan principalmente la conversión de una amplia gama de cetonas en ésteres o lactonas [15], las cuales son utilizadas con fines de biorremediación y aplicaciones de química verde, tales como la síntesis de intermediarios quirales [19]. Además, catalizan reacciones de sulfoxidación para producir sulfóxidos ópticamente activos, y también son capaces de catalizar reacciones de epoxidación y N-oxigenación [21, 22].

Las BVMOs se subclasifican en dos grupos dependiendo de los cofactores requeridos: las de tipo I son biocatalizadores dependientes de NADPH/FAD, mientras que las de tipo II requieren NADH/FMN para la catálisis [23].

La enzima más estudiada del grupo I de las monooxigenasas de Baeyer-Villiger es la ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* (AcCHMO), cuyo sustrato más comúnmente utilizado es ciclohexanona para producir ϵ -caprolactona, la que es ampliamente utilizada en la industria como monómero para la síntesis de poliésteres [24]. Además, en relación con esta monooxigenasa existen varias publicaciones en las que se describen sulfoxidaciones catalizadas por esta enzima [25].

Sin embargo, la producción a escala industrial de AcCHMO en su microorganismo de origen presenta varias restricciones puesto que este es un patógeno de clase II, por lo que para su manipulación microbiana se requieren técnicas cuidadosas y estrictas. Junto con ello, los protocolos actuales de fermentación para la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* implican el crecimiento de esta en una fuente de carbono tóxica (ciclohexanol), que si bien permite la producción de la enzima activa, no posibilita altas concentraciones de biomasa, por lo que, para producir este biocatalizador a escala industrial en su cepa nativa se requieren grandes volúmenes de medio de cultivo, lo que no es interesante para el sector industrial [26]. Además, en estudios donde se ha expresado esta enzima de forma heteróloga (particularmente en el trabajo de *Delgove et. al.* [10], donde se expresó esta proteína en el sistema *E. coli* NEB 10 beta-pCRE), se ha demostrado que la AcCHMO presenta termoestabilidad y tolerancia a disolventes que puede resultar poco atractiva para la industria, puesto que esta enzima pierde por completo su actividad tras unos pocos minutos a 45°C; y que se desactiva completamente tras 25 minutos en acetonitrilo al 14 % v/v a 20°C, y tras 24 horas en metanol al 5 % a 25°C [10].

Por otro lado, las FMOs son biocatalizadores que utilizan como donante de electrones tanto NADPH como NADH, y catalizan principalmente reacciones de oxidación a compuestos que contienen heteroátomos [19]. Estas enzimas se descubrieron por primera vez en mamíferos (incluyendo humanos), pero están presentes en todos los reinos de la vida [3]; y son de gran relevancia a nivel farmacológico puesto que catalizan la oxigenación de Clomifeno [6], Dasatinib [7] y Tozasertib, un fármaco que está siendo evaluado para el tratamiento contra el cáncer [20, 27].

Las NMOs son la tercera subclase de las FPMOs de clase B, las cuales requieren NADPH y catalizan N-hidroxilaciones de aminoácidos que se encuentran en vías biosintéticas de metabolitos secundarios, como sideróforos y agentes antimicrobianos [28].

Finalmente, las YUCCAs se han incluido recientemente como un subgrupo de las FPMOs de clase B. Estas son enzimas típicamente vegetales que están implicadas en la biosíntesis y el metabolismo de hormonas y factores de crecimiento [18].

2.3. Ciclohexanona monooxigenasa derivada de la bacteria *Thermocrispum municipale* (TmCHMO)

El deseo de producir compuestos enantioméricamente puros utilizando condiciones eficientes y respetuosas con el medio ambiente ha resultado en el desarrollo de un amplio conjunto de metodologías biocatalíticas. Este desarrollo es especialmente claro cuando se llevan a cabo procesos oxidativos selectivos, en los que la aplicación de enzimas aisladas o sistemas celulares completos para producir enzimas como catalizadores evita la utilización de oxidantes agresivos y condiciones de reacción agresivas.

Una de las reacciones oxidativas más importantes es la síntesis de sulfóxidos ópticamente activos. En esta síntesis se han empleado diferentes tipos de oxidorreductasas, incluyendo monooxigenasas, dioxigenasas y peroxidasas. Entre ellas, las ciclohexanona monooxigenasas (CHMO) han sido una de las oxidorreductasas más explotadas para la preparación de sulfóxidos.

Recientemente (año 2016), se descubrió y purificó una nueva CHMO proveniente del microorganismo termófilo *Thermocrispum municipale* (TmCHMO), el cual fue aislado desde el compost de residuos municipales en Alemania. Esta enzima es una BVMO del tipo I, por lo que es dependiente de FAD y NADPH. La estructura de la TmCHMO presenta cuatro regiones correspondientes a los dominios FAD y NADPH, un dominio helicoidal y una región enlazadora, además de un sitio activo compacto. Debido a lo anterior presenta preferencia por sustratos pequeños, en lugar de más voluminosos [5]. A continuación (Figura 2.2) se presenta la estructura general de TmCHMO y su sitio activo.

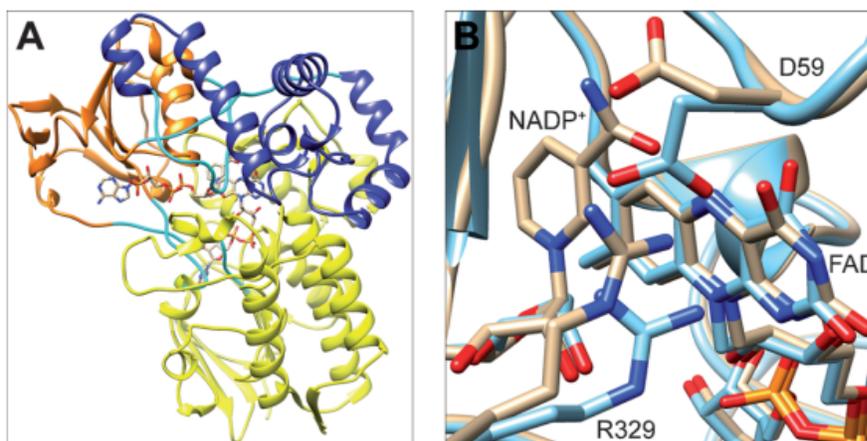


Figura 2.2: Estructura general de TmCHMO y su sitio activo. Figura A) Amarillo: dominio FAD; naranja: dominio NADPH; morado: dominio helicoidal. Figura B) Se muestra la superposición de los sitios activos de las formas oxidadas (naranja) y reducida (celeste). Figura extraída de *Romero et. al.*, 2016 [5].

Los primeros estudios asociados a TmCHMO han revelado que esta CHMO tiene una especificidad de sustrato muy similar a la de AcCHMO (la cual fue descrita en la sección anterior), una termoestabilidad mucho mayor que esta (la temperatura de desnaturalización

de TmCHMO es mayor en 11°C en comparación con la de AcCHMO) [5], y que al contrario que AcCHMO, es capaz de tolerar varios disolventes orgánicos en concentraciones de hasta el 15 % v/v. Junto con ello, se ha descubierto que TmCHMO convierte eficientemente una variedad de cetonas alifáticas, aromáticas y cíclicas, así como sulfuros proquirales. Además, TmCHMO catalizó la formación de (R)-metil sulfóxido enantiopuro a partir de tioanisol y mostró una excelente selectividad en la oxidación Baeyer-Villiger de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona [25].

2.4. Uso de biotransformaciones con células completas

Debido a que las reacciones catalizadas por las FPMOs de clase B requieren de la presencia de un donante de electrones, este debe estar constantemente en el medio para permitir una correcta biocatálisis. Una de las posibles formas de lograr lo anterior es añadir constantemente el donante de electrones al medio de cultivo, lo que resulta un proceso costoso debido a la necesidad de medir continuamente la concentración de este. En ese sentido, con el objetivo de evitar dicho problema, se han desarrollado dos estrategias para conseguir una regeneración continua del donante de electrones en el medio: la implementación de una segunda reacción enzimática distinta a la catalizada por la proteína recombinante de interés que permita la regeneración del donante de electrones (lo que se conoce como sistemas enzimáticos), o el uso de células completas.

Para el primer caso, la enzima adicional reduce el donante de electrones, devolviéndolo a su estado original, utilizando un sustrato auxiliar apropiado que actúe como donante de hidruro. Un ejemplo que implica el uso de dos enzimas para regenerar un cofactor es el sistema enzimático utilizado para la producción de xilitol (polialcohol de cinco carbonos con propiedades como edulcorante no calórico y no cariogénico, que además previene la osteoporosis, arritmias cardíacas e infecciones respiratorias) a partir de D-xilosa utilizando sistemas inmovilizados de aldosa reductasa. En este proceso se emplean dos enzimas y el cofactor NADPH/NADP⁺. La primera enzima, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona utilizando el NADP⁺ como cofactor, generando NADPH. Luego, la segunda enzima, la aldosa reductasa, utiliza el NADPH generado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para reducir la xilosa a xilitol, regenerando así el NADP⁺ para la oxidación de glucosa-6-fosfato [29]. Las reacciones catalizadas por ambas enzimas se presentan en el siguiente esquema (Figura 2.3):

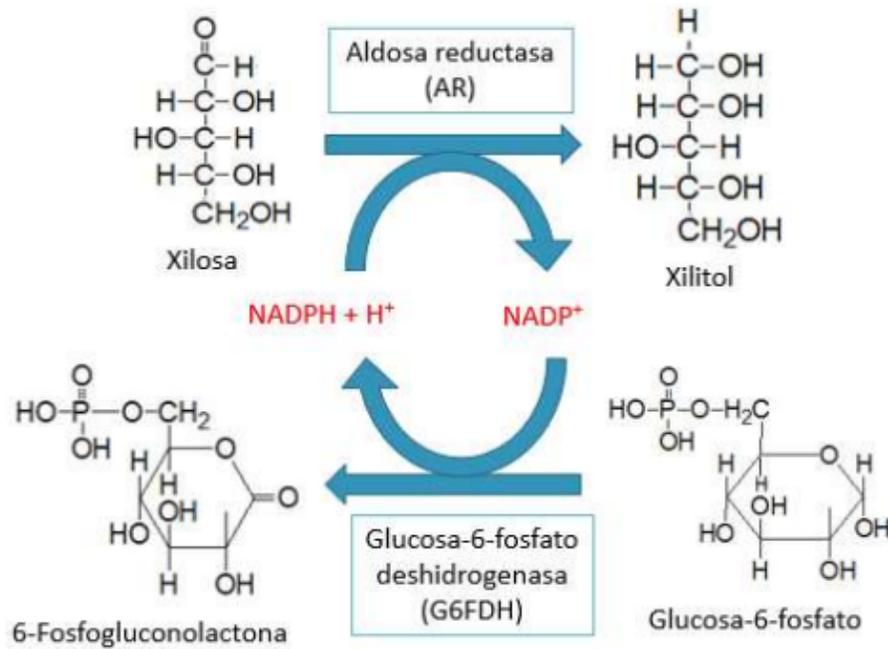


Figura 2.3: Esquema del motor químico de regeneración de NADPH formado por las enzimas Aldosa reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Figura extraída de Méndez, Tania; 2018 [29].

Sin embargo, pese a que esta técnica suele resultar efectiva en la regeneración del donante de electrones, tiene asociados costos adicionales producto de la necesidad de aislar y purificar la enzima secundaria [30]. Es debido a ello, que para evitar los costos asociados mencionados, se prefiere el uso de células completas. Al utilizar este sistema, los propios microorganismos vivos proporcionan un sistema de regeneración natural de todos los cofactores necesarios en la biocatálisis ya que utilizan su propia maquinaria metabólica, sin la necesidad de incurrir en costos extras de aislamiento y purificación de enzimas secundarias.

Un ejemplo específico del uso de células completas en biocatálisis es la producción de ácido láctico a partir de glucosa, llevada a cabo por bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus spp.* o *Lactococcus lactis* en biorreactores a gran escala. En este proceso se emplean dos enzimas y el cofactor NADH/NAD⁺. La primera enzima, la glucosa deshidrogenasa, cataliza la oxidación de la glucosa a piruvato utilizando el NAD⁺ como cofactor generando NADH, mientras que la segunda enzima, la lactato deshidrogenasa, utiliza el NADH generado por la glucosa deshidrogenasa para reducir el piruvato a ácido láctico, regenerando así el NAD⁺ para esta última enzima [31]. Un esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas mencionadas se presenta en la Figura 2.4.

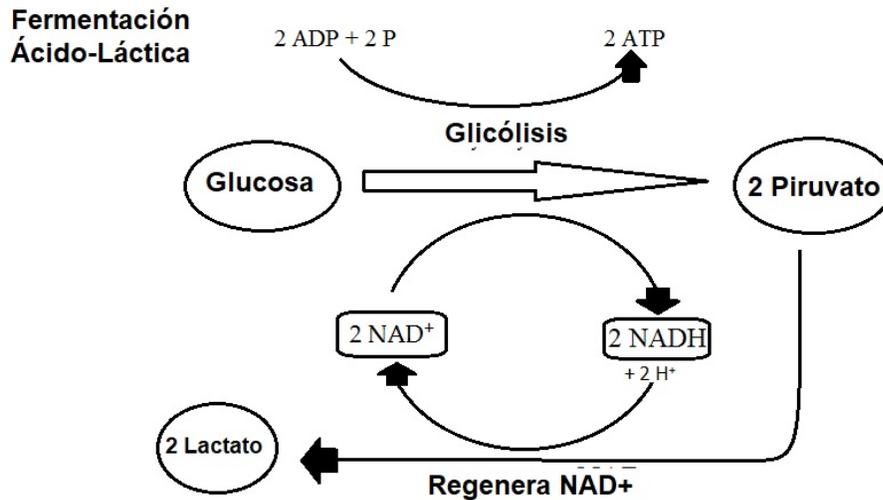


Figura 2.4: Esquema del motor químico de regeneración de NAD⁺ formado por las enzimas glucosa deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa. Figura extraída de *Lifeder*, 2020 [31].

2.5. Expresión de proteínas recombinantes de forma soluble

Con el objetivo de asegurar que las proteínas expresadas estén adecuadamente plegadas y realicen su función, es necesario que estas se expresen de manera soluble [32], evitando, por tanto, la formación de cuerpos de inclusión. Para ello, existen diversos factores que afectan dicha forma de expresión, los cuales abarcan: el organismo hospedero a utilizar, la composición del medio de cultivo, el vector de expresión, la coexpresión de proteínas chaperonas, la fase de crecimiento bacteriano en que se realiza la inducción, el tiempo que dure esta y la temperatura a la que se lleve a cabo, y la concentración del inductor [33].

En cuanto al microorganismo hospedero, el más utilizado y estudiado tanto genética como fisiológicamente para la producción de proteínas recombinantes es *Escherichia coli*. Esta bacteria Gram negativa pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se reproduce por fisión binaria. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: el bajo tiempo de duplicación, la fácil manipulación genética, la alta incorporación de material genético foráneo, la gran variedad de vectores de expresión compatibles y variantes mutantes, y que no requiere medios de cultivos costosos para su desarrollo [34], siendo el medio LB el más usado para el crecimiento de esta bacteria.

Respecto a la composición del medio de cultivo se ha reportado en diversos estudios que esta puede afectar la producción de proteínas solubles puesto que los componentes del medio pueden interferir en la producción basal de dichas proteínas, ya sea generando una alta producción bajo condiciones sin inductor o provocar la liberación de la proteína al medio extracelular [35]. Para el caso del medio LB se tiene que este es uno de los medios más utilizados en biología molecular y bacteriología para la expresión de proteínas recombinantes debido a su riqueza nutricional (que permite alcanzar altas densidades celulares) y su facilidad de uso. Sin embargo, para el caso de algunas proteínas específicas su utilización puede afectar la

estructura y el plegamiento de estas debido a la presencia de los componentes del medio LB, particularmente la sal presente en este [36]. En dichos casos se recomienda utilizar medios modificados o específicos diseñados para mejorar la solubilidad y el plegamiento correcto de esas proteínas específicas.

En relación con los vectores de expresión, los más comunes para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* son los plásmidos, los cuales son elementos genéticos circulares de ADN que deben cumplir con ciertas propiedades específicas para ser considerados vectores de expresión. Entre estas propiedades destacan la inclusión de un promotor y un terminador que regule la transcripción del gen de interés; un origen de replicación, el cual determina el número de copias del plásmido en la célula, afectando directamente la cantidad de proteína expresada; y un gen que confiera resistencia a antibióticos o algún otro marcador seleccionable alternativo para facilitar la identificación de las células que han incorporado el plásmido [37].

A estos vectores de expresión pueden añadirse "etiquetas" proteicas o "tags" para mejorar la solubilidad de la proteína durante la expresión, la purificación mediante cromatografía de afinidad o la inmunodetección después del aislamiento y la purificación [38]. Estos "tags" son elegidos dependiendo de la aplicación de la proteína de interés, entre los cuales se tiene que los mayormente utilizados corresponden a los del tipo His (particularmente 6 His-Tag), los cuales ayudan a la purificación de las proteínas [33] mediante el uso de columnas de afinidad de níquel o cobalto; y los "*Small Ubiquitin-like Modifiers*" (en español: modificadores pequeños similares a la ubiquitina), también conocidos como proteínas SUMO, los que son una familia de proteínas compuesta por varias proteínas pequeñas que modifican la función de otras proteínas (proteínas diana), participando en diversos procesos celulares, como la transducción de señales, el transporte nuclear y la estabilización de proteínas; regulando la localización, solubilidad y estabilidad de la proteína diana [11].

Con respecto a la coexpresión de proteínas chaperonas se ha demostrado en diversos estudios que la utilización de esta técnica a escala laboratorio evita la formación de agregados insolubles (tales como cuerpos de inclusión), incrementando, por tanto, la producción de la proteína recombinante de interés de manera soluble al facilitar el correcto plegamiento de esta [39]. Sin embargo, su uso puede significar en aumentos en los costos de la producción de proteína al requerir la incorporación de los genes que codifican para estas chaperona en el vector de expresión. Además, en algunos casos, la sobreexpresión de chaperonas puede inducir estrés adicional en las células bacterianas, afectando su crecimiento y viabilidad, lo que puede repercutir negativamente en la producción de la proteína de interés.

Por otro lado, se tiene que la densidad celular antes de la inducción es un factor crítico para la expresión soluble de proteínas recombinantes. Lo anterior se debe a que en una tasa de crecimiento mayor puede aumentar la probabilidad de que el vector de expresión no sea transferido durante la división celular, impidiendo tener niveles adecuados de expresión proteica [33]. No obstante, una inducción en la fase temprana de crecimiento puede llevar a una acumulación excesiva de proteína que puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión, puesto que en dicha fase la producción de proteínas es rápida debido al metabolismo celular altamente activo. De esta manera, realizar la inducción en la fase tardía de crecimiento (con un metabolismo menos activo) puede permitir un proceso de síntesis proteica más

controlado, lo que puede derivar en una mayor proporción de proteínas recombinantes solubles y correctamente plegadas, pese a que se tenga una menor cantidad de proteína total [34].

Junto con ello, se tiene que otro factor importante al momento de expresar proteínas recombinantes es el tiempo que dure la inducción. Por lo general, un tiempo de inducción prolongado puede ser beneficioso para las proteínas recombinantes que requieran adquirir modificaciones post traduccionales, formación de enlaces disulfuro o el ensamblaje en estructuras oligoméricas. A pesar de ello, un tiempo de inducción demasiado largo puede aumentar la acumulación de cuerpos de inclusión, especialmente si la proteína es propensa a formar agregados insolubles, además de aumentar el riesgo de degradación de la proteína de interés debido a la actividad de proteasas endógenas o la inestabilidad inherente de la proteína [40, 41].

Otro aspecto relevante a considerar en la producción de proteínas recombinantes es la temperatura en la que se realiza la inducción. En general, la formación de cuerpos de inclusión puede ser reducida bajando la tasa a la que se sintetizan las proteínas, lo que a su vez se consigue disminuyendo la temperatura a la que se encuentra el cultivo tras añadir el inductor para bajar la carga metabólica de las células [42, 43].

Por último, en cuanto a la concentración del inductor se tiene que si este es añadido en concentraciones excesivas puede dar resultado a efectos tóxicos, tales como una reducción del crecimiento celular y/o una reducción de la concentración de proteína recombinante. Para el caso de IPTG, se ha demostrado que concentraciones entre 0 y 1 mM generalmente no afectan la tasa de crecimiento de *Escherichia coli* ni tampoco la concentración de proteína recombinante [33]. Sin embargo, esto puede variar dependiendo de varios factores, como el sistema de expresión utilizado, la cepa bacteriana, la cinética de crecimiento celular y la naturaleza de la proteína a ser expresada. Es por ello que se debe determinar experimentalmente las concentraciones óptimas que generen una expresión suficiente de la proteína de interés sin afectar el desarrollo y metabolismo celular.

2.6. *Escherichia coli* NiCo21 (DE3) y vector de expresión pet22b(+)

Escherichia coli NiCo21(DE3) es una cepa derivada de BL21(DE3) que se ha diseñado para mejorar la expresión de proteínas en vectores que contengan el promotor del fago T7 al minimizar la contaminación por proteínas indeseadas marcadas con polihistidina que se aíslan mediante cromatografía de metales inmovilizados, tales como níquel [44].

En cuanto al vector de expresión se tiene que los vectores pET son los más potentes desarrollados hasta la fecha para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En ellos, los genes diana se clonan bajo el control de señales de transcripción y (opcionalmente) de traducción del bacteriófago T7. Para ello, la expresión se induce proporcionando una ARN polimerasa T7 en la célula huésped. La ARN polimerasa T7 es tan selectiva y activa que cuando el vector está totalmente inducido, casi todos los recursos de la célula se convierten en expresión del gen diana, llegando a que el producto deseado puede comprender

más del 50 % de la proteína celular total unas horas después de añadir el inductor [45].

En particular, el vector pET22b(+) es un vector bacteriano de alto número de copias que se caracteriza por presentar la secuencia señal pelB en el extremo N-terminal que dirige la proteína de interés al espacio periplásmico de la bacteria, donde se promueve su plegamiento mediante la formación de los enlaces disulfuro. Adicionalmente, presenta un promotor T7 inducible por IPTG, un origen de replicación pBR322, un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), un sitio de clonación múltiple y una secuencia específica para la purificación de proteínas (etiqueta 6xHis) en el extremo carboxilo terminal [46, 47]. En la Figura 2.5 se presenta el mapa del vector de expresión pET22b(+).

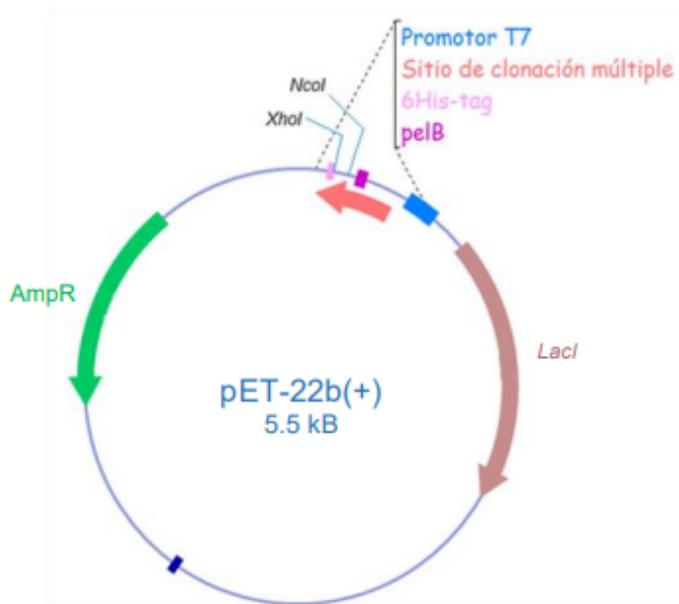


Figura 2.5: Mapa del vector de expresión pET22b(+). Figura extraída de Gasperin, Jahaziel; 2015 [47].

Respecto a la secreción de la proteína recombinante al espacio periplásmico se tiene que dicha forma de expresión evita la proteólisis de la enzima, debido a que este espacio contiene una menor cantidad de proteínas (particularmente de proteasas) en comparación con el citoplasma.

Por otro lado, pese a que la expresión de proteínas recombinantes en el citoplasma de *E. coli* es preferida por los altos rendimientos obtenidos, la presencia de enzimas como tiorredoxina y glutaredoxina, que favorecen la reducción de las cisteínas, impiden la formación de enlaces disulfuro, por lo que aquellas proteínas que presenten estas uniones solo pueden ser correctamente plegadas en el periplasma mediante las enzimas Dsb (*Disulfide bridge-forming enzymes*) [47].

2.7. Expresión y caracterización de BVMOs en cepas de *E.coli* recombinante

En la siguiente sección se presentarán algunos ejemplos de expresión de BVMOs utilizando células enteras de *E.coli* recombinante. Cabe destacar que estos estudios sientan precedentes para la posible expresión de las FPMOs seleccionadas para este trabajo de título, pero que, tal como fue mencionado en la Sección 1.2 es probable que las condiciones y sistemas de expresión presentados en estos ejemplos no sean los más adecuados para la expresión de las FPMOs seleccionadas.

2.7.1. Expresión de una BVMO de tipo I proveniente de *Amycolatopsis thermoflava*

A partir de la secuencia aminoacídica de TmCHMO, en el estudio realizado por *Mansouri et. al* [23], se identificó una BVMO proveniente de *Amycolatopsis thermoflava* (BVMO_{flava}) cuya similitud con la secuencia de TmCHMO corresponde a un 83%, y donde además la secuencia de BVMO_{flava} contenía los dos pliegues de Rossman típicos de las FPMOs de clase B y las secuencias conservadas propias de las BVMO (G/AGxWxxxxF/YPG/ MxxxD y FxGxxxHxxxWP/D).

BVMO_{flava} fue expresada de manera soluble al clonar el gen que codifica esta enzima en el vector pET22b(+) con una etiqueta "His-tag" en el extremo C- terminal, el cual fue transformado en *E.coli* BL21(DE3). La expresión proteica se llevó a cabo a 20°C durante 20-22 horas, induciendo en una OD₆₀₀ de 0,6-0,8 con IPTG 50 µM. La enzima fue purificada desde la fase soluble usando la columna de afinidad His-Trap y mostró actividad comparable con TmCHMO en la conversión de ciclohexanona a ε caprolactona a 30°C, 50 mM Tris-HCl + 10 µM FAD, 0,5 mM de ciclohexanona y 100 µM NADPH a pH 6,5; 7,5 y 8,5.

2.7.2. Expresión de RaBVMO y AmBVMO

Usando la secuencia de TmCHMO como secuencia base, en el estudio realizado por *Wei et. al.* [48] se seleccionaron mediante bioinformática dos BVMOs putativas provenientes de *Amycolatopsis methanolica* (AmBVMO) y *Rhodococcus aetherivorans* (RaBVMO), cuyas secuencias aminoacídicas presentaron una similitud con la secuencia de TmCHMO de un 82,3 % y un 46,7%, respectivamente. Además, ambas secuencias presentaron los dos pliegues de Rossman típicos de las FPMOs de clase B y una de las secuencias conservadas típicas de las BVMOs (FXGXXXHXXXW(P/D)).

Dichas BVMOs putativas fueron expresadas en el vector pET28a (incluyendo una etiqueta "His-tag" en el extremo N-terminal) utilizando *E.coli* BL21(DE3) como microorganismo hospedero. La expresión proteica para ambas enzimas se llevó a cabo a 16°C durante 20 horas, induciendo en una OD₆₀₀ de 0,6-0,8 con IPTG 0,2 mM y la purificación desde la fase soluble (en la cual se produjo aproximadamente el 90 % de ambas enzimas) fue llevada a cabo usando la columna de afinidad His-Trap.

De los ensayos de actividad enzimática realizados, se concluyó que tanto RaBVMO como AmBVMO presentan un amplio espectro de sustratos, incluyendo cetonas cíclicas y tioéteres, donde RaBVMO produce principalmente sulfóxidos (S), mientras que AmBVMO produce

sulfóxidos (R). Además, en el estudio, ciclohexanona resultó ser el mejor sustrato para ambas enzimas con actividades específicas de 3,11 U/mg para RaBVMO y 1,37 U/mg para AmBVMO. Cabe destacar que dichos ensayos fueron realizados a 30°C y 180 RPM durante 15 minutos, utilizando 5 mM de sustrato (usando metanol como co-disolvente, 5 % v/v), buffer Tris-HCl (pH 9,0, 100 mM) y la cantidad adecuada de BVMO en un volumen total de 500 μ L.

2.7.3. Producción de dos nuevas BVMOs de tipo I provenientes del desierto de Atacama

En la investigación de *Gran-Scheuch et al.* [1] se identificaron dos BVMOs putativas de tipo I (SLE_13190 y SLE_62070) en el genoma de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 (el cual es un actinomiceto aislado del Desierto de Atacama) usando las secuencias conservadas de los pliegues de Rossmán y las secuencias propias de las BVMO de tipo I ([AG]-G-x-W-x-x-xx-[FY]-[GM]-x-x-x-D y F-x-G-x-x-H-x-x-x-W-[PD]).

Ambos genes fueron clonados y expresados en el vector pCRE2 usando como organismo hospedero *E.coli* TOP10. En el vector además se incluyó la secuencia para expresar la enzima fosfito deshidrogenasa (PTDH) con una etiqueta "His-Tag" en el extremo N-terminal, la cual actúa como recicladora de NADPH en este sistema coenzimático. La expresión proteica fue probada a distintas temperaturas y concentraciones de inductor, dando los mejores resultados para ambas enzimas cuando la expresión fue llevada a cabo a 17°C por 48 horas usando 0,02 % de L-arabinosa.

Tras la expresión, ambas enzimas fueron purificadas y caracterizadas, concluyendo que las dos poseen una temperatura de desnaturalización de alrededor de 45°C para pH entre 7,5 y 10; pudiendo clasificar estas como enzimas relativamente termoestables. Junto con ello, cada enzima fue incubada en seis mezclas distintas que contenían entre 3 y 6 diferentes cetonas y tioéteres (dando un total de 30 sustratos, cada uno utilizado a una concentración final de 400 μ M en cada mezcla) y 2,5 % de 1,4-dioxano como cosolvente. Dichas mezclas fueron incubadas por 24 horas a 24°C y, tras la extracción, el análisis reveló una amplia aceptación de sustrato para ambas enzimas. Cabe destacar que la conversión se determinó semicuantitativamente para cada sustrato mediante el análisis de las áreas de pico en los cromatogramas GC normalizados por el compuesto o compuestos de la mezcla que no fueron aceptados por la enzima. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Sustratos probados en el análisis de las BVMOs putativas de tipo I del estudio *Gran-Scheuch et. al.* En la tabla se muestra la conversión de cada reactivo dependiendo de la enzima. Los resultados se clasifican según el grado de conversión observado como 100-81 %, +++++; 80-61 %, +++++; 60-41 %, ++++; 40-21 %, ++; <20, +; o <1 %, -. Tabla extraída y modificada de *Gran-Scheuch et. al.*, 2018 [1].

Mezcla	Sustrato	Sle_13190	Sle_62070
1	2-hexilciclopentanona	+++++	++++
1	3-metil-2,4-pentanodiona	-	-
1	Bencilfenilo sulfuro	-	+++
1	Cicloundecanona	-	-
1	Indol	-	-
1	Fenilacetona	+++++	+++++
2	2-propilciclohexanona	+++++	++
2	3-octanona	-	++
2	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	+++++	+++++
2	Ciclododecanona	-	-
2	Ciclopentanona	-	-
2	Sulfuro de p-tolil metílico	++++	++++
3	2-fenilciclohexanona	++++	+++++
3	1,4-androstadieno-3,17-diona	-	-
3	Ciclopentadecanona	+	+
3	Nicotina	-	-
3	Zingerona	-	-
4	4-hidroxiacetofenona	-	-
4	4-fenilciclohexanona	+++++	+++++
4	Androstenediona	++++	++
5	4-octanona	-	+
5	Acetofenona	-	-
5	Ciclohexanona	+++	+
5	Pregnenolona	-	-
5	Tioanisol	+++	++++
6	2-octanona	+	-
6	4-metilciclohexanona	++	+++
6	Benzoin	++	+++++
6	Ciclooctanona	-	-
6	Estanolona (Dihidrotestosterona)	++	+++++

Además, en el estudio fueron analizadas las propiedades enantioselectivas de SLE_62070 para una muestra racémica de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, donde se observó que luego de 2 horas de conversión se produjo exclusivamente un regioisómero para cada enantiómero. El (+)-enantiómero se oxidó a (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona, el que es un im-

portante precursor en la síntesis de prostaglandinas naturales y sintéticas; mientras que el (-)-enantiómero se oxidó a (-)-(1R,5S)-3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona, el cual puede tener aplicaciones en la síntesis de sistemas de ciclopentano y ciclohexano altamente sustituidos [49]. La conversión de la mezcla racémica de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona se ejemplifica en la Figura 2.6.

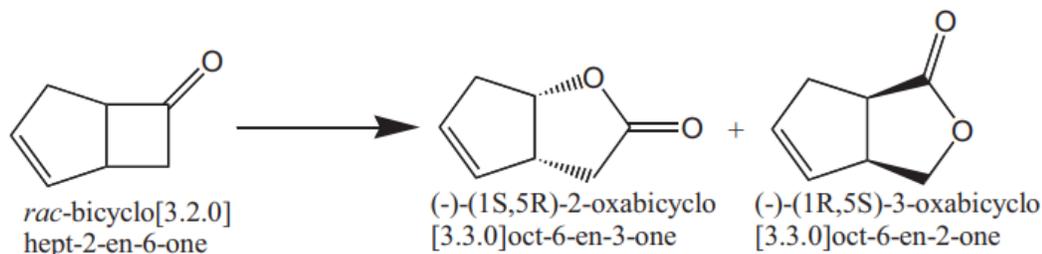


Figura 2.6: Conversión de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona en (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-ona y (-)-(1R,5S)-3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona. Figura extraída de *Bucko et. al.*, 2011 [50].

2.7.4. Estudio de referencia

En el estudio realizado por *Carolina González Almonacid* [9] se consultaron 10 secuencias genómicas correspondientes a actinobacterias aisladas del Lupino del Desierto de Atacama (6 *Micromonosporas* y 4 *Streptomyces*). Las FPMOs cuyas secuencias fueron utilizadas como referencia se pueden ver en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: FPMOs utilizadas como secuencia de consulta en la búsqueda bioinformática de FPMOs putativas. Tabla extraída y modificada de *González, Carolina*; 2022 [9].

Enzima	Subclase	T _m °C	Microorganismo de origen
<i>Tm</i> CHMO (WP_028849141.1)	BVMO	47°	<i>Thermocrispum municipale</i> (extremófilo)
Sle_13190	BVMO	45°	<i>Streptomyces Leeuwenhoekii</i> C34 (actinobacteria extremófila)
Sle_62070	BVMO	45°	<i>Streptomyces Leeuwenhoekii</i> C34 (actinobacteria extremófila)

En base al porcentaje de identidad igual o superior al 35% y un E-value cercano a 0 se hizo una primera selección de FPMOs putativas. Dicha selección se puede ver en detalle en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: FPMOs putativas seleccionadas en base al porcentaje de identidad igual o superior al 35% y E-value cercano a 0. Tabla extraída de *González, Carolina; 2022 [9]*.

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

Donde las tres últimas enzimas corresponden a MO4, MO1 y G35A_MO (respectivamente), las cuales fueron expresadas en el presente estudio. Del análisis realizado se puede notar que tanto para MO4 como para G35A_MO la secuencia base corresponde a SLE_62070, mientras que para MO1 la secuencia base correspondió a TmCHMO.

Posterior a ello, se realizó un análisis filogenético utilizando un alineamiento entre las FPMOs seleccionadas y las secuencias de consultas utilizadas. Los resultados de esto se pueden ver en la Figura 2.7.

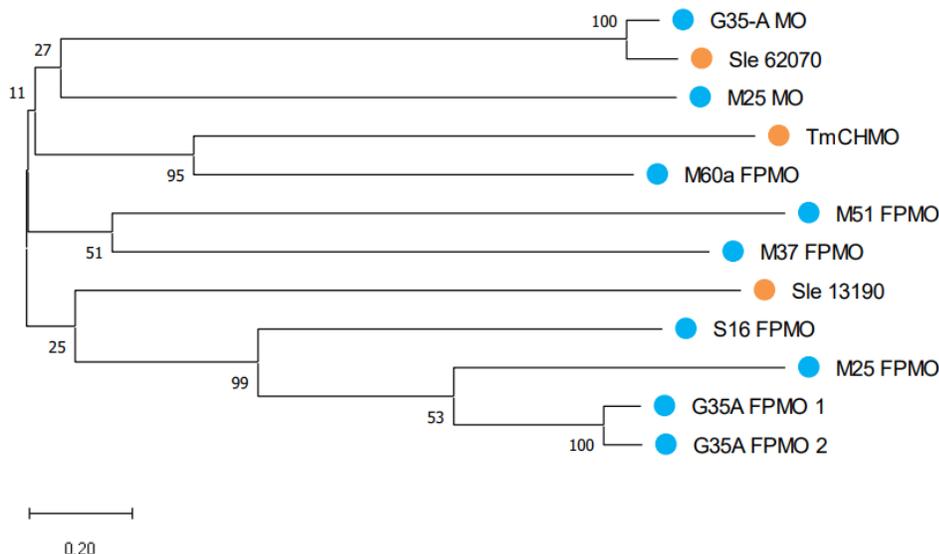


Figura 2.7: Análisis filogenético de las secuencias de las FPMOs putativas encontradas (círculo azul) en conjunto con las secuencias de consulta utilizadas (círculo naranjo). Figura extraída de *González, Carolina; 2022* [9].

Finalmente, a partir del análisis e identificación de las secuencias conservadas de Rossmann y de las secuencias conservadas que subclasifican las FPMOs en BVMOs y FMOs (cuyos resultados se pueden ver en el estudio de referencia [9]), se seleccionaron 4 FPMOs putativas. Las FPMOs seleccionadas se renombraron de la siguiente manera: M60a_FPMO \rightarrow MO1, M25_FPMO \rightarrow MO2, G35A_FPMO_2 \rightarrow MO3, S16_FPMO \rightarrow MO4, cuyos tamaños predichos aproximados son de 73kDa, 57kDa, 55kDa y 53kDa, respectivamente.

Una vez seleccionadas estas enzimas, se realizó la expresión heteróloga usando como hospedero *Escherichia coli TOP10*, el plásmido *pBAD-His-tag-SUMO* y utilizando como medio cultivo LB. Para ello, primero se realizaron cultivos de las células que contienen los plásmidos codificantes para las enzimas putativas en donde la inducción se realizó a OD_{600} cercana a 4 (fase de crecimiento tardía) con 0,1% (p/v) de L-arabinosa en el cultivo a 24°C durante 18 horas, obteniendo como resultado que no se observó expresión ni para MO2 ni para MO3, mientras que para MO1 y MO4 se observó expresión insoluble.

Posterior a ello, dado la nula expresión de MO2 y MO3, se seleccionaron nuevas condiciones de cultivo únicamente para expresar MO1 y MO4, las cuales correspondían a una concentración de 0,02% (p/v) de L-arabinosa, 18°C de temperatura, y 24 y 48 horas como

tiempo de post inducción; cuyos resultados fueron que no se observó un mejoría en la expresión soluble de MO1 y MO4.

En la Figura 2.8 se muestran los resultados del análisis de la expresión de MO1. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 horas post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 horas 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).

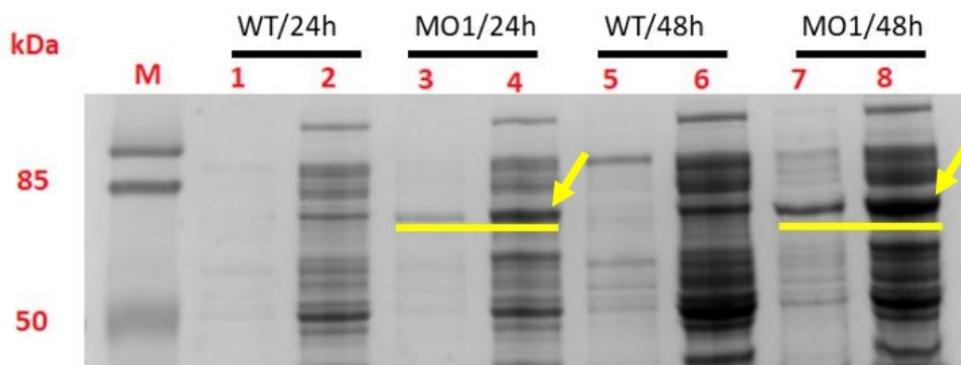


Figura 2.8: SDS-Page sobre expresión de MO1 en las fracciones insoluble y soluble con 0,02% (p/v) de L-arabinosa. Figura extraída de *González, Carolina; 2022* [9].

En la Figura 2.9 se muestran los resultados del análisis de la expresión de MO4. Los carriles del 1 al 4 corresponden a las 24 horas post inducción y los carriles del 5 al 8 a las 48 horas 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).

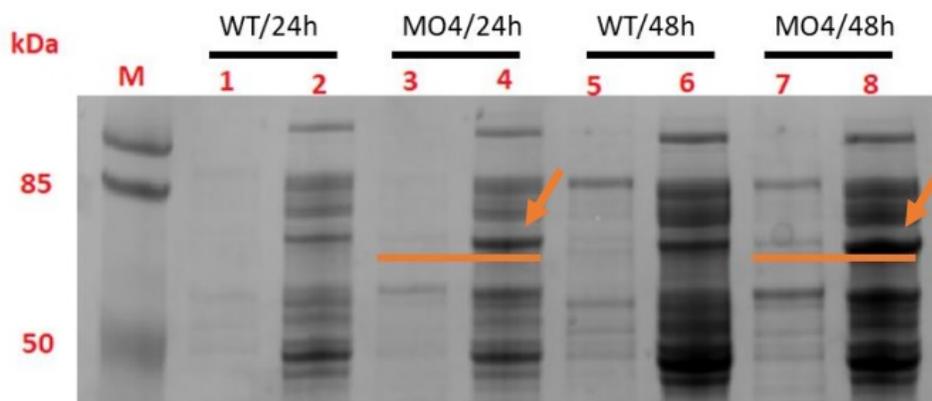


Figura 2.9: SDS-Page sobre expresión de MO4 en las fracciones insoluble y soluble con 0,02% (p/v) de L-arabinosa. Figura extraída de *González, Carolina; 2022* [9].

En la Figura 2.10 se presenta el SDS-Page de MO1, MO4 y TmCHMO purificadas desde la fracción soluble de la expresión heteróloga con 0,02% de L-arabinosa, temperatura de 18°C y tiempo de cosecha post inducción de 48 horas. En dicha imagen, el carril 1 es la MO1, el carril 2 es la MO4, el carril 3 es TmCHMO.

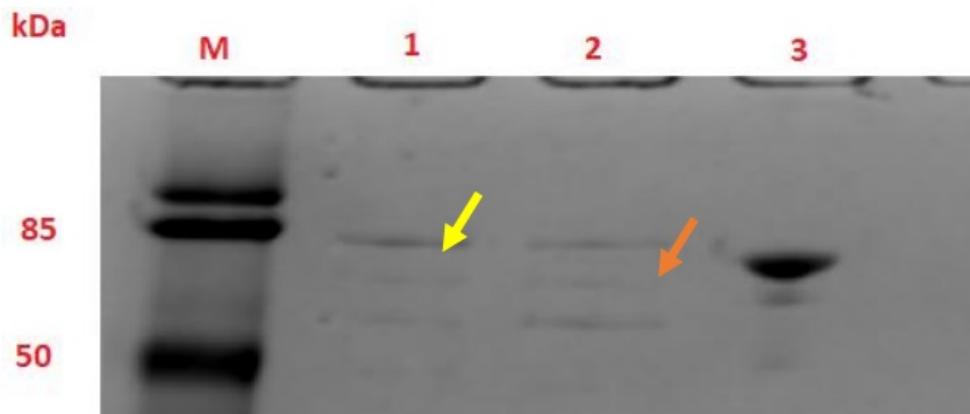


Figura 2.10: SDS-Page de las FPMOs purificadas desde la fracción soluble. Figura extraída de *González, Carolina; 2022* [9].

Finalmente, en la Figura 2.11 se presenta el SDS-Page de MO1, MO4 y TmCHMO purificadas desde la fracción insoluble, en condiciones denaturantes con urea 8 M, de la expresión heteróloga con 0,02% de L-arabinosa, temperatura de 18°C y tiempo de cosecha post inducción de 48 horas. En dicha imagen, el carril 1 es la MO1 y el carril 2 es la MO4.

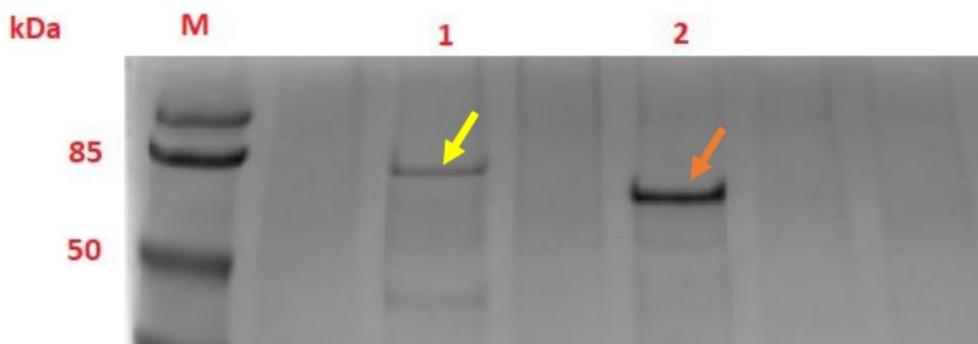


Figura 2.11: SDS-Page de las FPMOs purificadas desde la fracción insoluble. Figura extraída de *González, Carolina; 2022* [9].

Según lo concluido en el estudio de *Carolina González* [9], la nula expresión de MO2 y MO3 puede estar relacionada 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, tales como genes que codifiquen para proteínas chaperonas que favorezcan la solubilidad.

Al respecto de la expresión insoluble de MO1 y MO4, se concluyó en el estudio mencionado que 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 dichos problemas se pueden vincular a la necesidad de modificaciones postraduccionales mediadas por chaperonas nativas las cuales deben ser coexpresadas junto con la enzima de interés.

3. Materiales y Metodología

3.1. Recursos y requerimientos

El desarrollo de esta memoria de trabajo de título se enmarcó dentro de un proyecto de investigación del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), por lo que los recursos y financiamiento económico se encontraron a cargo de esta institución. Dentro de los recursos utilizados se encuentran los laboratorios del centro, los cuales se ubican en la calle Beauchef 851, Edificio Poniente, séptimo piso, Santiago de Chile.

3.2. Plan de trabajo

En la siguiente sección se presentará el detalle de la metodología realizada. Cabe destacar que en algunos fragmentos de esta metodología se hará la diferenciación para lo realizado en la expresión de todas las enzimas (MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO) cuya actividad fue evaluada posteriormente con diferentes sustratos, y para lo llevado a cabo en la expresión de G35A_MO_SUMO en distintas fases de crecimiento. Si es que no se hace dicha distinción, se puede considerar que la metodología fue igual para ambos experimentos.

A continuación, en la Figura 3.1, se esquematiza un resumen de la metodología utilizada durante el desarrollo de esta investigación, la cual (tal como fue mencionado) será presentada en detalle en lo que sigue:

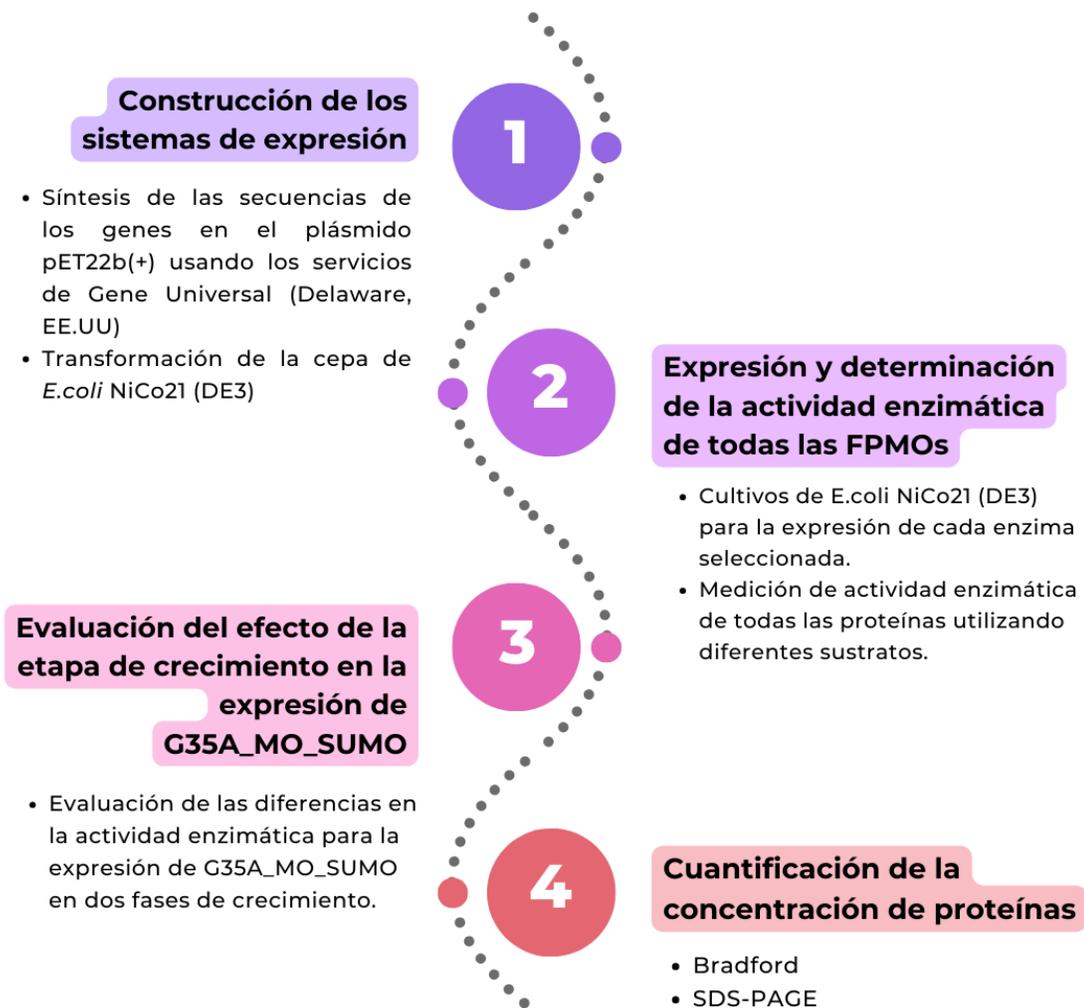


Figura 3.1: Diagrama de las etapas de trabajo en la producción de las FPMOs putativas del estudio.

3.2.1. Metodología experimental

En la siguiente sección se presentará la metodología experimental llevada a cabo durante la realización del trabajo de memoria. La elaboración de las soluciones y los medios empleados se detallan en el Anexo A y en el Anexo B.

3.2.1.1. Construcción de los sistemas de expresión

En primer lugar, para la construcción de los sistemas de expresión fue necesario tener la secuencia que codifica para las enzimas de interés en el plásmido seleccionado. Para ello, se utilizaron los servicios de la empresa Gene Universal (Delaware, Estados Unidos). El resumen de las construcciones realizadas se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Resumen de las construcciones realizadas para las enzimas seleccionadas en el estudio junto con el microorganismo del que provienen.

Célula hospedera	Plásmido	Enzima	Microorganismo de origen [9]
E.coli NiCo21 (DE3)	pET22b (+)	MO1	M60a (<i>Micromonospora</i>)
		MO4	S16 (<i>Streptomyces</i>)
		G35A_MO	G35-A (<i>Streptomyces</i>)
		G35A_MO_SUMO	G35-A (<i>Streptomyces</i>)

3.2.1.2. Preparación de cultivo en placa Petri

Para la propagación de los microorganismos seleccionados se prepararon placas Petri con medio LB-agar y ampicilina en una concentración de 100 mg/L.

Posteriormente, se tomó una muestra del cultivo stock de la cepa de *E. coli* que cuenta con el plásmido con el gen de interés desde un criovial almacenado a -80°C , sembrando por agotamiento en estrías una placa Petri con medio LB-agar y ampicilina, en una campana de flujo laminar, con el fin de obtener colonias aisladas de la bacteria. Posteriormente, la placa sembrada se guardó a 37°C por 24 horas en una incubadora.

Cabe destacar que las células hospederas sin plásmido fueron sembradas en las mismas condiciones, pero sin añadir antibiótico a las placas Petri con LB-agar.

3.2.1.3. Preparación de preinóculo

Con el propósito de preparar los preinóculos correspondientes, primero se sembraron placas Petri con LB-agar de la manera que ya fue descrita. Posteriormente se tomaron colonias aisladas de las placas respectivas y se inocularon tubos Falcon de 50 mL, en los cuales se incorporaron previamente 10 mL de medio LB fosfato de sodio 0,1 M, 60 μL de solución glicerol 500 mg/mL y 20 μL de ampicilina 50 mg/mL. Finalmente, dichos tubos fueron incubados a 37°C y 180 RPM overnight.

3.2.1.4. Preparación de células quimiocompetentes

Con el objetivo de tener células de *E.coli* capaces de aceptar ADN exógeno, se siguió el siguiente procedimiento:

En primer lugar se realizó un preinóculo overnight de las células sin plásmido en 10 mL de medio LB con 60 μL de glicerol 500 mg/mL. Posterior a ello, se inocularon 200 mL de medio LB fresco en un matraz de 1 L iniciando con una OD_{600} de 0,05 y se incubó dicho inóculo a 37°C y 180 RPM hasta alcanzar una OD_{600} entre 0,2-0,3. Una vez alcanzado este valor, se dejó el matraz en hielo por 10 minutos para luego centrifugar, utilizando la centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), el contenido de estos por 10 minutos a 4.000 RPM (2.147 x *g*) y 4°C . A continuación, se resuspendieron las células en 50 mL de MgCl_2 0,1 M previamente esterilizado y se incubó en hielo por 5 minutos. Luego, nuevamente se centrifugó por 10 minutos, esta vez a 5.000 RPM (3.354 x *g*) y 4°C . Después, nuevamente se resuspendieron las células, esta vez en 10 mL CaCl_2 0,1 M previamente esterilizado y se incubó en hielo por 20 minutos. Posteriormente, se volvió a centrifugar por 10 minutos a

5.000 RPM ($3.354 \times g$) y 4°C , para luego resuspender las células en 4 mL de una solución 85 % v/v de CaCl_2 y 15 % v/v glicerol 500 mg/mL y guardar en volúmenes de 100 μL en tubos Eppendorf a -80°C .

3.2.1.5. Transformación de células de *E. coli* NiCo21 (DE3) como hospederas

Para la transformación de las células hospederas se siguió el siguiente procedimiento (provisto por New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos [51]):

En primer lugar, se mezclaron 2 μL (200 ng de material genético) del vector de expresión con 50 μL de las células hospederas quimiocompetentes (las cuales se descongelaron previamente en hielo por 10 minutos) en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Luego, los tubos se mantuvieron en hielo por 30 minutos para después calentarlos por exactamente 10 segundos a 42°C y dejar nuevamente en hielo por 5 minutos. Posterior a esto se añadieron 950 μL de medio LB fresco y se incubó por 1 hora a 37°C y 250 RPM. A continuación, se sembraron volúmenes de 100 μL y 200 μL en placas de LB-agar con ampicilina 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Finalmente, dichas placas fueron incubadas overnight a 37°C y luego fueron guardadas a 4°C .

3.2.1.6. Expresión de proteínas recombinantes

Para la expresión de proteínas primero se realizó un preinóculo según lo descrito en la Sección 3.2.1.3. Luego, de dicho preinóculo se tomó una alícuota de 100 μL para inocular 10 mL de LB fresco con 60 μL de solución glicerol 500 mg/mL y 20 μL de ampicilina 50 mg/mL. El inóculo recientemente descrito fue incubado por aproximadamente 4 horas a 37°C a 180 RPM.

Posterior a ello, se tomó el volumen correspondiente de este segundo inóculo para inocular 200 mL de LB fosfato fresco en matraces de 1 L con el objetivo de partir con una OD_{600} inicial de 0,1. Luego, los matraces fueron incubados a 37°C y 180 RPM hasta alcanzar una OD_{600} de 0,6-0,7 (en base al protocolo de expresión de proteínas con *E. coli* NiCo21 (DE3) de New England Biolabs [52]) para los ensayos de expresión y determinación de la actividad enzimática para todas las FPMOs del estudio, y una OD_{600} de 0,5-0,8 o de 3-3,3 (según la curva de crecimiento realizada) para los ensayos de evaluación del efecto de la etapa de crecimiento en la expresión de G35A_MO_SUMO.

Una vez alcanzada la concentración deseada, para el caso de los ensayos de evaluación del efecto de la etapa de crecimiento en la expresión de G35A_MO_SUMO, se tomaron muestras de 10 mL en tubos Falcon de 50 mL (las cuales fueron utilizadas como control en los ensayos de actividad) y se indujo la expresión de las enzimas en los cultivos realizados en matraces de 1 L con IPTG 0,3 mM (dejando para ambas condiciones de crecimiento un matraz sin inducir) y se incubaron overnight a 24°C y 180 RPM; mientras que para el caso de los ensayos de expresión y determinación de la actividad enzimática para todas las FPMOs del estudio, en cuanto se alcanzaron las OD seleccionadas simplemente se indujo todos los matraces asociados al experimento con IPTG 0,3 mM y se incubaron overnight a 24°C y 180 RPM. Cabe destacar que en ambos ensayos el tiempo de inducción fue de 16 horas, y que para el caso de los experimentos con todas las FPMOs no se tomaron muestras previo a añadir el inductor puesto que en este caso los controles para la medición de actividad enzimática correspondieron a la mezcla de NADPH con sustrato en ausencia del purificado del extracto clarificado del cultivo.

Para el caso de los ensayos de evaluación del efecto de la etapa de crecimiento en la expresión de G35A_MO_SUMO, las muestras de 10 mL (sin IPTG) se centrifugaron en la centrífuga Eppendorf 5804R a 5.000 RPM (3.354 x *g*) durante 10 minutos a 4°C, para luego resuspender el pellet en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,8. Luego, se centrifugó nuevamente a 5.000 RPM (3.354 x *g*) por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se guardaron los tubos Falcon con pellet celular a 4°C overnight.

Para cada cultivo incubado overnight se tomaron 40 mL en tubos Falcon y se centrifugaron a 5.000 RPM (3.354 x *g*) durante 10 minutos a 4°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20 mL buffer fosfato 20 mM pH-6,8 y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 5.000 RPM (3.354 x *g*) y 4°C. Posteriormente, se resuspendió el pellet lavado en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (incluyendo los pellets que se guardaron de las muestras sin IPTG para los ensayos únicamente con G35_MO_SUMO). Luego se sonicó la muestra durante 20 ciclos 5/20 On/Off a una amplitud de 40% y se centrifugó por 30 minutos a 11.000 RPM (16.233 x *g*) y 4°C. Finalmente, se separó el pellet del extracto clarificado (el cual fue purificado en el caso de los ensayos con todas las FPMOs putativas), y se guardaron alícuotas de las muestras para el análisis de SDS-PAGE.

3.2.1.7. Purificación de las proteínas recombinantes desde el extracto clarificado

Para la purificación de las proteínas presentes en el extracto clarificado obtenido en los ensayos de expresión y evaluación de actividad enzimática para todas las FPMOs seleccionadas en el presente trabajo, se utilizó el cromatógrafo FPLC Akta™ Avant 25, registrando la absorbancia a 280 nm y manteniendo las muestras en hielo. La columna Histrap FF de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos) se equilibró previamente con 10 volúmenes de columna de Tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, 5 mM imidazol, 500 mM NaCl) con un flujo de 1 mL/min. Posteriormente se cargaron 10 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 (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM) con un flujo de 0,5 mL/min. Las fracciones del pico de elución fueron recolectadas y se utilizaron para el análisis SDS-PAGE y medición de actividad enzimática.

3.2.2. Metodología analítica

A continuación se presenta el detalle de la metodología analítica empleada para la obtención de los diversos resultados de esta memoria de título.

3.2.2.1. Medición de concentración de biomasa

En condiciones de esterilidad se tomó 1 mL del caldo de cultivo de *E. coli* (donde se diluyó en caso de ser necesario utilizando medio LB estéril para estar dentro de la linealidad del espectrofotómetro) y se ubicó en una cubeta para espectrofotometría. Se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro para determinar la OD del cultivo de *E. coli*, utilizando como blanco 1 mL de medio LB sin células. Para el caso de la construcción de la curva de crecimiento asociada a los ensayos realizados únicamente con G35A_MO_SUMO, se repitió este procedimiento aproximadamente cada 30 minutos en cada uno de los matraces prepa-

rados, registrando como mínimo 10 mediciones de absorbancia para obtener una adecuada curva de crecimiento. Posteriormente, se graficaron los valores de OD vs tiempo.

3.2.2.2. Medición de actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática de las proteínas que se encuentran presentes en el extracto clarificado o en el purificado obtenido del cultivo, luego de la sonicación y posterior centrifugación, se monitorea la disminución en la absorbancia del NADPH a 340 nm, 35°C y 200 RPM, para luego determinar la velocidad de consumo de NADPH (en mM/min) durante la reacción con el sustrato seleccionado.

El procedimiento descrito en la presente sección se realiza porque el NADPH absorbe a una longitud de onda de 340 nm y su oxidación se ve reflejada en una disminución de la absorbancia a través del tiempo a dicha longitud de onda [53], por lo que las mediciones de actividad enzimática fueron realizadas mediante el seguimiento del consumo de NADPH a 340 nm. Además, dado que el consumo de NADPH (reflejado en su oxidación a NADP^+) está relacionado estequiométricamente con la desaparición de sustrato, la medición realizada en esta sección corresponde a una medición indirecta de la catálisis enzimática.

Para el caso de los ensayos con todas las FPMOs las mediciones fueron realizadas utilizando 30 μL de sustrato en concentración 20 mM (obtenidos a partir de una solución stock, cuyos protocolos de preparación se presentan desde el Anexo A.7 al Anexo A.10), 70 μL de NADPH 360 μM (obtenido a partir de una solución stock, cuyo protocolo se presenta en el Anexo A.6) y 60 μL del extracto clarificado tras el proceso de purificación. El análisis fue llevado a cabo en una microplaca transparente de 96 pocillos (Corning Costar, Nueva York, Estados Unidos), realizando cada ensayo por triplicado. Cabe destacar que el control se efectuó bajo las mismas condiciones sin el extracto enzimático, reemplazando este último con agua MilliQ.

En el caso de los ensayos realizados únicamente con G35A_MO_SUMO, las mediciones fueron realizadas en una microplaca transparente de 96 pocillos donde se agregaron los elementos presentados a continuación en el siguiente orden: 50 μL de sustrato, 100 μL de NADPH 360 μM y 50 μL del sobrenadante del cultivo (extracto enzimático, donde se encontraría la enzima de forma soluble); realizando cada medición por triplicado.

Posteriormente, para ambos ensayos, se realizaron los cálculos respectivos de actividad enzimática a partir de la cantidad de NADPH consumido al adicionar el sustrato a la solución donde se encuentra la enzima de forma soluble. Un ejemplo de cálculo de la actividad enzimática se presenta en el Anexo E.3.

3.2.2.3. Medición de concentración de proteínas totales

Para la determinación de la concentración de proteínas totales (en mg/mL) se empleó el "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" de Bio-Rad (BioRad, California, Estados Unidos), que se basa en el uso del método de Bradford (1976) [54]. La preparación de este reactivo se presenta en el Anexo A.5. Posteriormente, se realizó la preparación de las curvas de calibrado usando como proteína estándar albúmina de suero bovino. El procedimiento de la elaboración de las curvas se detalla en el Anexo C.2.

A continuación, se tomaron 5 μL del extracto obtenido luego de la sonicación o purificación (diluyéndose en caso de ser necesario) y se hizo reaccionar con 200 μL de reactivo Bradford durante 5 minutos en una microplaca de 96 pocillos. Luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el lector de microplacas SPECTROstar Omega (BMGLabtech, Ortenberg, Alemania). Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software asociado al equipo (OMEGA MARS).

Posterior a ello, se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos mediante el uso de las curvas de calibrado mencionadas anteriormente para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra analizada. Cada medición de la cantidad de proteínas se realizó en triplicado, empleando un volumen de 5 μL de agua MilliQ como blanco y agregando el correspondiente volumen de reactivo Bradford.

3.2.2.4. SDS PAGE

Para realizar este procedimiento se mezclaron las muestras con buffer denaturante 5X. Luego, estas se calentaron por 10 a minutos a 90°C y posteriormente se cargaron en volúmenes de 7 μL en gel de poliacrilamida 12,5%. Los geles fueron corridos durante 45 minutos a 200 V. Posterior a ello, el gel fue teñido en azul de Coomassie durante 1 hora y desteñido con una solución 40% metanol, 10% ácido acético y 50% H_2O [55].

4. Resultados y discusión

4.1. Ensayos de actividad enzimática utilizando diferentes sustratos para todas las enzimas del estudio

En primer lugar, se realizaron los cultivos de los sistemas *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) para las monooxigenasas MO1 y MO4 (ambas modificadas con la etiqueta proteica "SUMO"), así como para G35A_MO y su versión modificada con la misma etiqueta que las FPMOs mencionadas con anterioridad (G35A_MO_SUMO).

Con el objetivo de evaluar si existe expresión soluble de las enzimas, se midió la desaparición de NADPH en presencia de diferentes sustratos utilizando las proteínas obtenidas en el purificado del extracto clarificado, puesto que si este cofactor desaparece durante la reacción es debido a la presencia de monooxigenasas que están llevando a cabo la catálisis enzimática.

Los sustratos seleccionados correspondieron a biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, tioanisol, ciclohexanona y fenilalanina. Los dos primeros fueron escogidos debido a que tanto TmCHMO como SLE_62070 (que fueron las secuencias de referencia para MO1; y MO4 y G35A_MO, respectivamente) presentaron relativamente alta conversión enzimática para dichos sustratos (tal como fue reportado en base a bibliografía en las Secciones 2.3 y 2.7.3).

En cuanto a ciclohexanona, esta fue escogida debido a ser el sustrato más comúnmente utilizado para la catálisis enzimática de TmCHMO, por lo que es esperable que MO1 presente actividad enzimática en presencia de este compuesto. Sin embargo, tal como se puede notar en la Tabla 2.2 de la Sección 2.7.3, en el estudio realizado por *Gran-Scheuch et. al.* [1] SLE_62070 no presentó altos niveles de actividad para este reactivo, por lo que se espera que las enzimas MO4 y G35A_MO (junto con la enzima modificada con la etiqueta "SUMO") tampoco presenten altos niveles de actividad enzimática para la conversión de ciclohexanona.

Finalmente, debido a la catalización eficiente de SLE_62070 en presencia de una variedad de sustratos que contienen el grupo fenil (fenilacetona, 2-fenilciclohexanona, 4-fenilciclohexanona y benzoin), se elige fenilalanina para los ensayos de actividad enzimática, ya que es altamente probable que tres de las cuatro enzimas del estudio (G35A_MO, su modificación con SUMO y MO4) catalicen estos reactivos debido a su similitud con SLE_62070. Lo anterior se puede observar en la Tabla 2.2, extraída del estudio de *Gran-Scheuch et. al.* [1], presentada en la Sección 2.7.3.

A continuación (desde la Figura 4.1 a la Figura 4.7), se presenta la estructura molecular de cada uno de los sustratos utilizados, junto con las reacciones de oxidación asociadas mediadas por monooxigenasas. Para el caso de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, su respectiva reacción de oxidación se puede ver en la Figura 2.6 del Anexo 2.7.3.

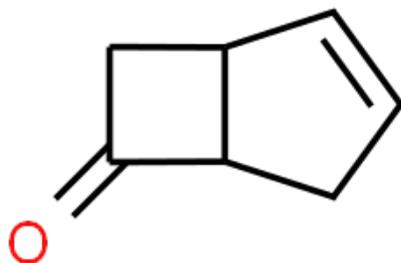


Figura 4.1: Estructura molecular de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. Figura extraída de la página web de *Royal Society of Chemistry*; 2024 [56].

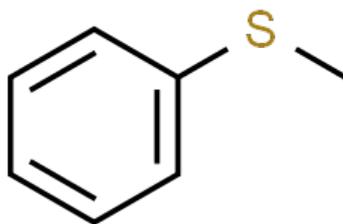


Figura 4.2: Estructura molecular de tioanisol. Figura extraída de la página web de *Royal Society of Chemistry*; 2024 [57].

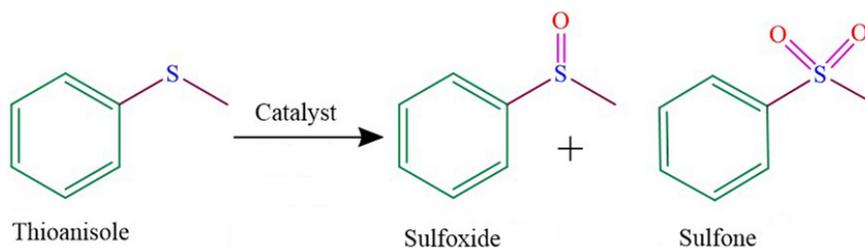


Figura 4.3: Conversión de tioanisol en su respectivo sulfóxido y sulfona. Figura extraída y modificada de *Kesharwani et al.*; 2021 [58].

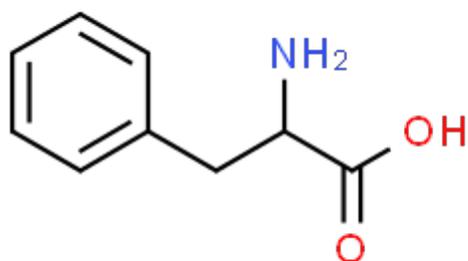


Figura 4.4: Estructura molecular de fenilalanina. Figura extraída de la página web de *Royal Society of Chemistry*; 2024 [59].

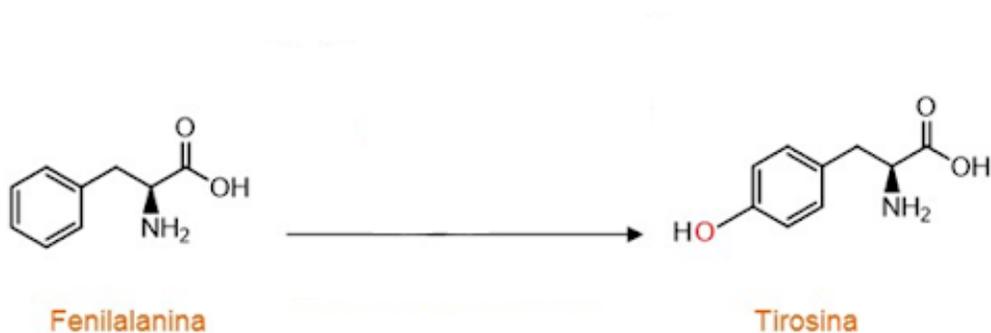


Figura 4.5: Conversión de fenilalanina en tirosina. Reacción comúnmente mediada por la enzima fenilalanina-4-monooxigenasa. Figura extraída y modificada de la página web de *Universidad de Salamanca*; 2018 [60].

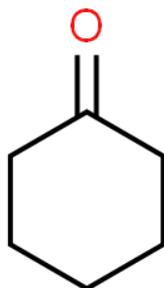


Figura 4.6: Estructura molecular de ciclohexanona. Figura extraída de la página web de *Royal Society of Chemistry*; 2024 [61].

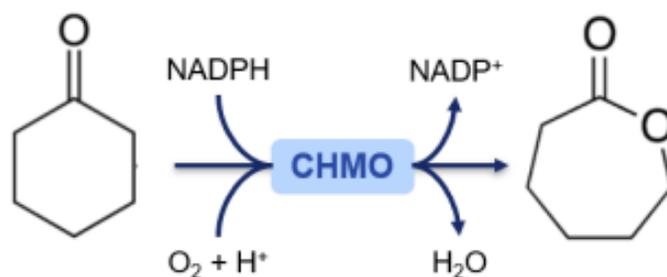


Figura 4.7: Conversión de ciclohexanona en ϵ -caprolactona. Reacción llevada a cabo utilizando una enzima ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) como biocatalizador. Figura extraída y modificada de *Paul et al.*; 2021 [3].

Tras el procedimiento de purificación de las enzimas desde la fase soluble, se realizó un gel de SDS-PAGE, el cual se presenta en la Figura 4.8.

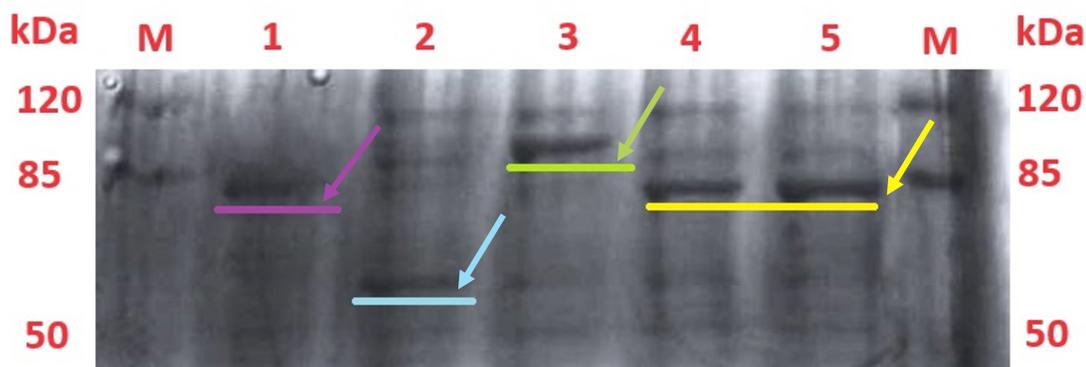


Figura 4.8: Análisis de la expresión de las enzimas de este estudio mediante SDS-PAGE. El carril 1 corresponde a la enzima MO1 tras el proceso de purificado (tamaño predicho: 73 kDa), el carril 2 a MO4 tras el proceso de purificado (tamaño predicho: 53 kDa), el carril 3 a G35A_MO_SUMO tras el proceso de purificado (tamaño predicho: 95 kDa); y los carriles 4 y 5 a G35A_MO tras el proceso de purificado (tamaño predicho: 67 kDa).

A partir de los datos de concentración de NADPH (obtenidos de la absorbancia de NADPH medida en triplicado) se evaluó la actividad enzimática por miligramos de proteína ($\text{mg}_{\text{proteína}}$) para cada uno de los sustratos. Dichos valores obtenidos se resumen en la Figura 4.9. Los valores de la concentración de proteínas se presenta en el Anexo D.2.2.1; y un ejemplo de cálculo de cómo se obtuvieron los valores de actividad enzimática en $[\text{UI}/\text{mg}_{\text{proteína}}]$ se describe en el Anexo E.3.

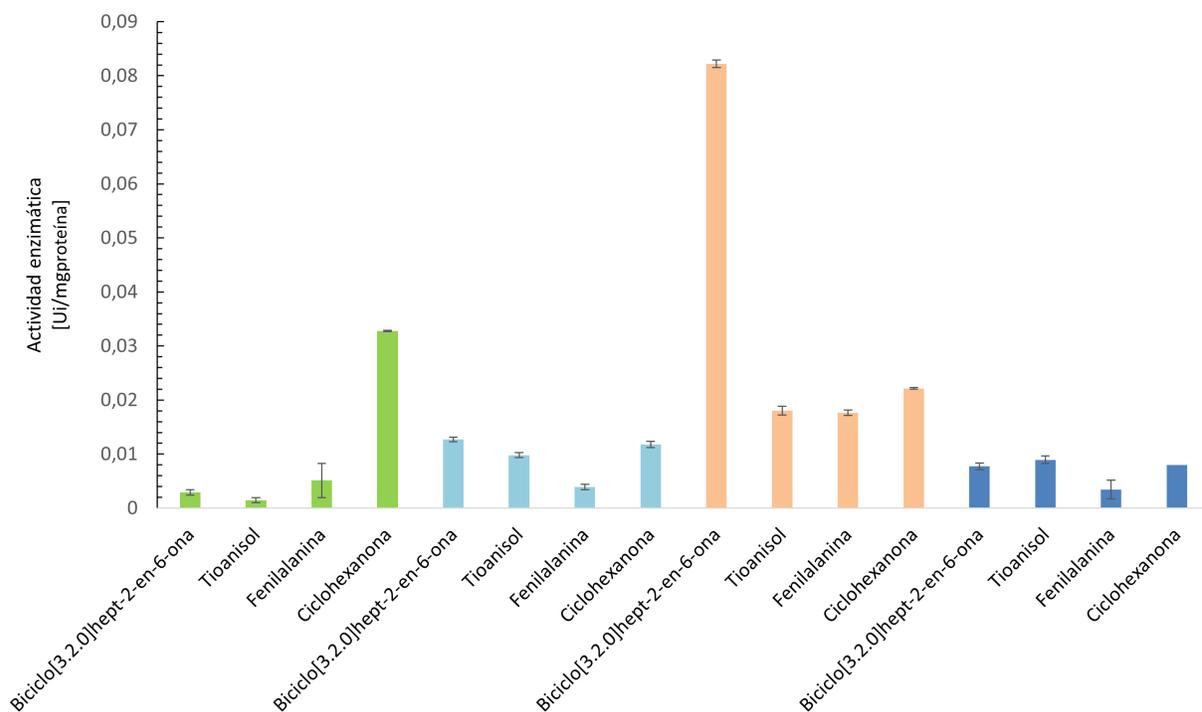


Figura 4.9: Actividad enzimática de todas las enzimas del estudio utilizando los sustratos seleccionados. En verde se presenta la actividad de la enzima MO1, en celeste la actividad de MO4, en naranja la actividad de G35A_MO_SUMO, y en azul la actividad de G35A_MO.

En virtud de los datos registrados, se puede evidenciar que todas las FPMOs putativas del estudio presentan actividad enzimática, lo que se atribuye a una disminución en la concentración de NADPH para todos los sustratos utilizando cada una de las enzimas obtenidas desde la fracción soluble.

Además, tal como se puede observar en la Figura 4.8 hay presencia de las cuatro enzimas tras la etapa de purificación por cromatografía de afinidad, confirmando la recuperación de las enzimas de manera soluble al final del procedimiento. Sin embargo, tal como se puede notar en dicha figura, existen bandas inespecíficas que reflejan la presencia de otras proteínas distintas a las enzimas de interés en los picos recuperados tras la cromatografía. Lo anterior, puede ser evitado aumentando la eficiencia en el proceso de purificado, optimizando los pasos de unión y elución al aumentar la concentración de imidazol en los lavados iniciales (donde la recomendación es usar 10-30 mM para proteínas con la etiqueta His-Tag), lo que ayuda a eliminar proteínas no específicas sin eluir la proteína de interés [62, 63], y/o usando técnicas de purificación adicionales como lo son la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de exclusión por tamaño.

La diferencia en la expresión con el estudio de referencia (donde no se pudieron expresar las enzimas MO1 y MO4 en la fase soluble), puede deberse al transporte de las enzimas de interés al espacio periplásmico de la bacteria durante su producción (dado el uso del vector pET22b (+)), lugar que propicia el correcto plegamiento de las proteínas mediante la formación de enlaces disulfuro; lo que está impedido en el citoplasma (región celular donde se

expresaron las enzimas MO1 y MO4 originalmente) por la presencia de enzimas que favorecen la reducción de cisteínas [47].

Dada la similitud de las proteínas de este estudio con TmCHMO y SLE_62070 (según corresponda), se puede deducir que los productos formados en la catálisis de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, tioanisol y ciclohexanona son los expuestos en las Figuras 2.6, 4.3 y 4.7, respectivamente; según lo reportado en las Secciones 2.3 y 2.7.3. Como para el caso de fenilalanina no se tiene una reacción de referencia en la biotransformación con TmCHMO o SLE_62070, se asume que el producto formado y la reacción enzimática llevada a cabo por las enzimas del estudio es la expuesta en la Figura 4.5, cuyo producto es comúnmente formado por la enzima fenilalanina-4-monooxigenasa.

Debido a que la enzima G35A_MO_SUMO presenta los mayores niveles de actividad enzimática por miligramo de proteínas para todos los sustratos escogidos (a excepción de ciclohexanona donde el mayor valor de actividad enzimática por miligramo de proteínas lo presenta MO1), se decide continuar el estudio únicamente con esta enzima con el fin de evaluar las diferencias en la actividad enzimática al expresar dicha proteína en el sistema *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) en una fase temprana y tardía de crecimiento. Además, debido a que esta enzima presentó los mejores resultados de actividad con el sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, los ensayos de actividad para comparar la expresión en las fases de crecimiento ya descritas serán llevados a cabo utilizando este reactivo. Finalmente, dado que la pendiente de la curva de consumo de NADPH para la enzima y sustrato seleccionados es constante a lo largo del experimento (según lo que se puede observar en la Figura D.1 del Anexo D.2.1), para la medición de absorbancia y posteriores cálculos de consumo de NADPH en las dos fases de crecimiento ya mencionadas, se medirán únicamente los primeros 7 minutos del ensayo.

En cuanto al análisis de estos resultados, en primer lugar, si se compara la actividad enzimática de G35A_MO con la actividad de la misma enzima modificada con la etiqueta "SUMO", se puede notar que esta última presenta una catálisis más eficiente para todos los sustratos seleccionados. Esto puede deberse a que esta etiqueta permite un mejor plegamiento de la enzima, mejorando su conformación tridimensional y permitiendo que su sitio catalítico se encuentre mayormente expuesto, dando como resultado una mejor oxidación de los reactivos del estudio, lo cual sería acorde a lo reportado en la Sección 2.5.

En base a lo reportado por *Gran-Scheuch et. al.* [1] y dada la similitud de G35A_MO con SLE_62070, y que esta última enzima sirvió como referencia en la búsqueda informática de MO4, se hubiese esperado que el orden en cuanto a actividad enzimática (con los sustratos utilizados) tanto para G35A_MO como para su versión modificada con "SUMO" y para MO4, hubiese sido (de mayor a menor): biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, fenilalanina (en base a la preferencia de SLE_62070 por el grupo fenil), tioanisol y ciclohexanona. Sin embargo, tal como se puede observar en la Figura 4.9 para G35A_MO_SUMO el orden en actividad fue: biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, ciclohexanona, y luego tioanisol y fenilalanina (con la misma actividad enzimática). Para G35A_MO el orden fue: biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona y ciclohexanona (con la misma actividad), tioanisol y fenilalanina. Finalmente, para MO4 el orden fue: biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, ciclohexanona, tioanisol y fenilalanina.

Esta diferencia en la actividad enzimática esperada con la reportada en este estudio puede

deberse a la solubilidad de los sustratos utilizados. Mientras que ciclohexanona es soluble en agua y miscible con los solventes orgánicos más comunes [64], tioanisol es soluble en alcohol y aceites, pero poco soluble en agua [65]. Por otro lado, biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona es soluble en alcoholes, éteres y cetonas, y ligeramente soluble en agua [66]; en tanto que fenilalanina es soluble en ácido fórmico y clorhídrico, poco soluble en agua e insoluble en etanol [67]. Estas características de los sustratos mencionados pueden hacer necesaria la presencia de un cosolvente para la medición de actividad enzimática, con el objetivo de tener una mayor cantidad de sustrato soluble disponible para la catálisis. Como en el estudio de *Gran-Scheuch et. al.* [1] se utilizó 1,4-dioxano como cosolvente, mientras que en el presente análisis no se utilizó ninguna sustancia con este propósito, se puede deducir que la diferencia en las actividades enzimáticas se deban justamente a este factor.

Pese a que para este estudio no se utilizaron cosolventes, G35A_MO, su versión modificada y MO4 presentaron las mayores actividades enzimáticas en presencia del sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, lo que es acorde a lo esperado en base a la similitud de estas enzimas con SLE_62070 y lo reportado en el trabajo de *Gran-Scheuch et. al.* [1]. Esta diferencia en la actividad enzimática respecto a los otros sustratos utilizados en el estudio puede deberse a una mejor acomodación del sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona en el sitio activo de las enzimas mencionadas dada su estructura rígida y de tamaño pequeño (observable en la Figura 4.1), permitiendo una mejor interacción sustrato-enzima.

Respecto a la rigidez del sustrato, se puede destacar que una molécula rígida puede mantener una conformación específica que puede ser ideal para la interacción con el sitio activo de la enzima. Esta rigidez puede asegurar que los grupos funcionales del sustrato estén orientados correctamente para la catálisis, lo que podría aumentar la eficiencia de la reacción. Además, dado que en algunos casos, la flexibilidad excesiva de un sustrato puede dar lugar a interacciones no deseadas o a la formación de complejos enzimáticos ineficientes, un sustrato rígido puede minimizar estas interacciones no productivas, facilitando una reacción más directa y efectiva. Lo anterior se sustenta en base a los estudios de *Bdira et. al.* [68] donde se muestra que una distorsión en el sustrato disminuye la velocidad y efectividad en un paso específico de la catálisis enzimática.

En cuanto al tamaño pequeño de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona se puede mencionar que al ser una molécula pequeña podría acceder más fácilmente al sitio activo, especialmente si la entrada a este es estrecha o está parcialmente oculta por la estructura de la enzima.

Si se comparan las características de rigidez y tamaño de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona con el resto de los sustratos utilizados se puede notar que tanto tioanisol como fenilalanina presentan anillos bencénicos en su estructura (tal como se aprecia en las Figuras 4.2 y 4.4, respectivamente), los cuales son más flexibles estructuralmente que los anillos fusionados del biciclo puesto que su estructura tiene menos restricciones rotacionales. Además, puesto que el ciclohexano presente en ciclohexanona puede permitir conformaciones silla y bote, dicho sustrato también es más flexible estructuralmente que biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. En cuanto a la comparación de tamaños, se puede notar que fenilalanina es una molécula más grande que biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, por lo que este último podría presentar ventajas al momento de la catálisis enzimática debido a su tamaño pequeño.

Por último, tal como fue mencionado anteriormente MO1 presentó los mayores niveles de actividad enzimática para ciclohexanona. Lo anterior es acorde a lo predicho puesto la similitud de esta enzima con TmCHMO y la baja actividad reportada para ciclohexanona de SLE_62070 (secuencia de referencia para las otras enzimas del estudio).

4.2. Ensayos de actividad enzimática para la proteína G35A_MO_SUMO expresada en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo distintas condiciones de crecimiento

Para poder identificar las OD donde realizar la inducción para las fases de crecimiento seleccionadas es necesario realizar una curva de crecimiento. Dicha curva fue realizada a nivel de matraces de 1 L (en duplicado) a una temperatura de 37°C y 180 RPM, utilizando como medio de cultivo LB con buffer fosfato 0,1 M y glicerol 3 g/L. La curva obtenida (con el eje de OD₆₀₀ en escala logarítmica) se muestra en la Figura 4.10, mientras que el detalle de los datos se presenta en el Anexo D.1.

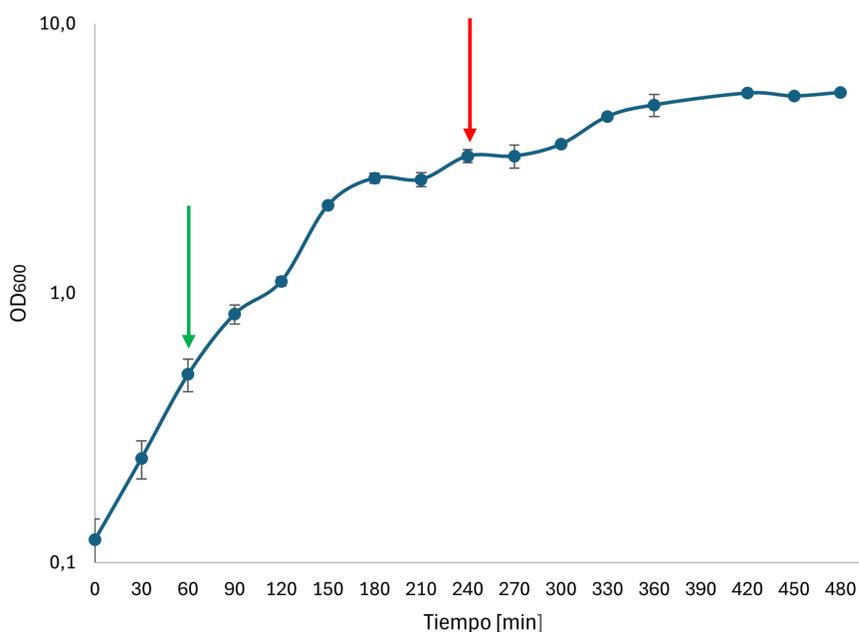


Figura 4.10: Curva de crecimiento para *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) con el gen que codifica para la enzima G35A_MO_SUMO, donde con flecha verde y roja se marca el momento de las inducciones.

A partir de la curva de crecimiento de biomasa anterior se determinó realizar la inducción tanto a la primera hora de iniciado el cultivo como a la cuarta (inducción temprana e inducción tardía), lo que según lo presentado, corresponden a valores de OD₆₀₀ de 0,5-0,8 para la fase temprana de crecimiento y OD₆₀₀ de 3-3,3 para la fase tardía. Lo anterior, se gráfica en la Figura 4.10 con una flecha verde y roja, respectivamente.

Para la expresión de la enzima G35A_MO_SUMO se realizaron ocho cultivos de los cuales cuatro fueron seleccionados para la inducción temprana y cuatro para la inducción tardía, dejando en cada caso uno de los cultivos sin inducir con el objetivo de tener un experimento control para cada una de las condiciones de inducción. Además, tal como fue mencionado en la Sección 3.2.1.6 se tomaron muestras de 10 mL de cada cultivo (en ambas condiciones de crecimiento) previo a la inducción con el objetivo de medir la actividad enzimática en caso

de existir expresión basal de las proteínas para cada sistema.

Cabe mencionar que los cultivos para la inducción temprana se iniciaron aproximadamente 3 horas después de los cultivos de inducción tardía con el objetivo de tomar las muestras, agregar el inductor y cosechar en los mismos tiempos.

Tras las 16 horas de inducción se tomaron muestras para medir la concentración de biomasa, cuyos resultados fueron una OD_{600} promedio de 5,6 para los cultivos inducidos en fase temprana (valores de 5,72; 5,53 y 5,50 para los tres matraces; $\sigma=0,119$) y una OD_{600} promedio de 5,8 para la fase tardía (valores de 5,88; 5,72 y 5,90 para los tres matraces; $\sigma=0,099$). Los cultivos sin inducir alcanzaron una OD_{600} de 7,8 y 8,5 para la fase temprana y tardía, respectivamente.

Luego de utilizar el método estadístico t-test (particularmente usando la calculadora de GraphPad Software Inc. [69]) para determinar si existe diferencia significativa entre las OD_{600} promedio alcanzadas en las fases temprana y tardía se llegó a un *p-value* equivalente a 0,0888, lo que indica que no existe una diferencia significativa entre dichas OD promedio (esto al considerar que se tiene una diferencia significativa con un *p-value* < 0,0001). Junto con ello, el t-test arrojó una diferencia de promedios de 0,2 y un intervalo de confianza del 95 % para la diferencia de las medias de [-0,44814; 0,04814]. Lo expuesto en cuanto a las OD alcanzadas en ambas fases de inducción es conforme a lo indicado por *Malik et. al.* [41], donde se expuso la OD final tras 3 horas de inducción con la misma concentración de IPTG (25 μ M) para diferentes crecimientos de *E. coli*, y donde la diferencia entre el menor y mayor valor de densidad óptica fue de 0,46.

Por otro lado, la diferencia de las OD alcanzadas entre los matraces a los que se añadió el inductor y a los que no (donde la OD_{600} para estos últimos fue mayor) es acorde a lo presentado por *Gomes et. al.* [70], donde se expuso que la inducción con IPTG tuvo un efecto negativo no sólo sobre el crecimiento, sino también sobre la viabilidad celular de los cultivos en suspensión de *E. coli*; lo que fue atribuido en el estudio al estrés metabólico que impone la expresión de proteínas recombinantes, incluido el secuestro de recursos celulares para la transcripción y traducción del gen diana.

Una vez obtenido el extracto clarificado, se evaluó la actividad enzimática mediante la desaparición de NADPH para cada condición utilizando como sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. A partir de los datos de concentración de NADPH se evaluó la actividad enzimática por miligramos de proteína ($mg_{proteína}$) y por litros de medio de cultivo (L_{mc}) para biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona (actividad específica en $UI/mg_{proteína}$ y en UI/L_{mc} , respectivamente). Un ejemplo de cálculo de la obtención de estos valores se presenta en el Anexo E.3, mientras que el detalle de las concentraciones de biomasa obtenidas mediante el método de Bradford utilizadas para estos resultados se encuentra en el Anexo D.2.3.4. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 4.1, donde además se presenta la desviación estándar de los datos.

Tabla 4.1: Actividad enzimática para G35A_MO_SUMO proveniente de extracto clarificado de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) tras la inducción en fase temprana y tardía de crecimiento.

Inducción temprana		Inducción tardía	
Actividad promedio cultivos [UI/mg _{proteína}]	Actividad promedio cultivos [UI/L _{mc}]	Actividad promedio cultivos [UI/mg _{proteína}]	Actividad promedio cultivos [UI/L _{mc}]
0,174 ±0,053	0,046 ±0,053	0,583 ±0,036	0,078 ±0,036

Además, con el objetivo de visualizar las proteínas expresadas en la fase soluble se realizó un gel SDS PAGE, cuyo resultado se ve en la siguiente imagen:

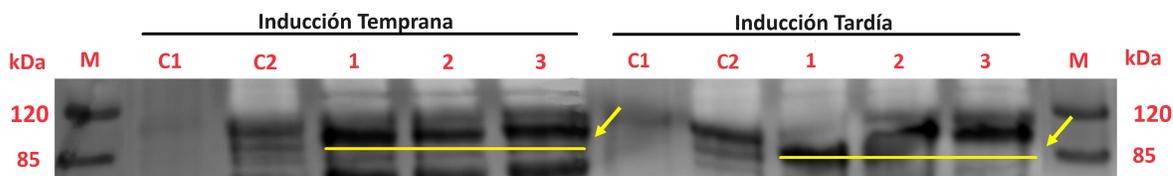


Figura 4.11: SDS-PAGE sobre la expresión de la enzima G35A_MO_SUMO en ambas condiciones de inducción con una concentración de IPTG 0,3 mM. En la imagen se observa las proteínas presentes en el extracto clarificado soluble tanto para los controles (ensayos sin IPTG donde el control 1 representa la muestra tomada en el tiempo cero de inducción, mientras que el control 2 corresponde a la muestra tomada en el momento de la cosecha; carriles C1 y C2, respectivamente), como para los cultivos realizados en triplicado (carriles 1, 2 y 3), para la inducción temprana y tardía.

En primer lugar, en base a las Figuras D.5 y D.6 del Anexo D.2.3, es posible notar que no existe una disminución significativa en la concentración de NADPH para los controles del estudio en ninguna de las fases de crecimiento seleccionadas. De esta manera, no es posible hablar de una expresión basal de la proteína de interés en condiciones sin inductor.

Cabe destacar que los controles correspondieron a los ensayos sin IPTG, donde el control 1 representa la muestra tomada en el tiempo cero de inducción, mientras que el control 2 corresponde a la muestra tomada en el momento de la cosecha.

Por otro lado, a partir de lo expuesto, se percibe que los mayores valores de actividad enzimática por miligramos de proteína se obtienen al inducir la expresión en la fase tardía del cultivo, pese a que la concentración de proteínas totales fue menor para dicha condición (concentración de proteínas totales promedio de 0,538 [mg/mL] vs un promedio de 1,091 [mg/mL] para la fase temprana). Lo anterior, puede deberse a una mayor cantidad de la enzima de interés soluble presente en el extracto de la fase tardía en comparación con la fase temprana (a pesar de la diferencia de proteínas totales), lo que se puede observar en la Figura 4.11, donde las bandas correspondientes a la proteína de interés son más gruesas para los carriles asociados a la inducción en fase tardía de crecimiento.

Lo expuesto es acorde a lo esperado, puesto que, tal como fue mencionado en la Sección 2.5, es altamente probable que la inducción en fase tardía haya permitido una síntesis proteica más

controlada, lo que a su vez haya podido permitir obtener una mayor proporción de proteína recombinante soluble y bien plegada en esta condición en comparación con la inducción realizada en fase temprana de crecimiento.

5. Conclusiones

Primeramente se puede concluir que se cumplieron los objetivos de este trabajo de título, puesto que se pudieron producir en la fase soluble FPMOs putativas provenientes de actinomicetos aislados del Lupino del Desierto de Atacama (MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO) en los sistemas de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) a nivel de matraces, lo que no se había podido lograr en estudios previos donde dos de las enzimas seleccionadas para este trabajo se expresaron únicamente en la fracción insoluble. Esta diferencia en la expresión con el estudio de referencia podría deberse a la expresión de las enzimas en el periplasma, lugar que propicia el correcto plegamiento de las proteínas mediante la formación de enlaces disulfuro, lo que está impedido en el citoplasma (región celular donde se expresaron las enzimas MO1 y MO4 originalmente) por la presencia de enzimas que favorecen la reducción de cisteínas. De esta manera, además se concluye que los enlaces disulfuro son esenciales para la producción soluble de las enzimas seleccionadas.

Para poder cumplir con los objetivos específicos, una vez expresadas las proteínas de forma soluble, se procedió a caracterizar las enzimas producidas evaluando su actividad enzimática. Para ello, se midió la desaparición de NADPH en presencia de las enzimas purificadas desde la fracción soluble del cultivo utilizando diferentes sustratos, de donde se pudo concluir que la enzima G35A_MO_SUMO mostró los mayores niveles de actividad enzimática para tres de las cuatro moléculas utilizadas, presentando una catálisis altamente eficiente en presencia de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, sustrato que además fue transformado mayormente en comparación con los otros reactivos en los ensayos usando MO4 y G35A_MO. Lo anterior puede deberse a la estructura rígida y de tamaño pequeño de biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona (características que no están presentes en los otros reactivos del estudio) que permitió una mejor acomodación del sustrato en el sitio activo de la enzima.

Por otro lado, se puede concluir que la diferencia en la catálisis de la enzima modificada con la etiqueta "SUMO" y su versión no modificada en el caso de G35A_MO, podría deberse a que dicha etiqueta permita un mejor plegamiento de la enzima, permitiendo a su vez que su sitio activo este mayormente expuesto para las reacciones catalíticas.

Finalmente, para evaluar las condiciones de expresión modificando la fase de crecimiento en que se realiza la inducción, se seleccionó la enzima G35A_MO_SUMO y el sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona dados los resultados anteriormente expuestos. Con este propósito, se realizó una curva de crecimiento de biomasa, a partir de lo cual se determinó realizar la inducción a la primera y la cuarta hora de cultivo. Además, con el objetivo de evaluar la existencia de expresión basal de esta enzima se realizaron ensayos bajo las mismas condiciones pero sin añadir IPTG a los cultivos. De lo anterior, en primer lugar, se pudo concluir que

no existe expresión basal de la proteína en condiciones sin inductor puesto que no existió una disminución significativa en la concentración de NADPH para los controles del estudio en presencia de los sustratos seleccionados. Junto con ello, se pudo concluir que pese a la menor concentración de proteínas en la fase tardía de inducción, en dicha condición se perciben los mayores valores de actividad enzimática por miligramos de proteínas totales y por litro de medio de cultivo, siendo estos valores 3,4 veces lo obtenido para la actividad específica en fase temprana. De esto se deduce que en la fase tardía es probable que exista una mayor cantidad de enzima de interés soluble presente en el extracto debido a una síntesis proteica más controlada permitida por esta condición de crecimiento, puesto que el metabolismo en dicha condición es más lento y por tanto, permite una producción de proteínas más regulada.

6. Recomendaciones y proyecciones futuras

Respecto a experimentos futuros se espera poder continuar caracterizando las enzimas del estudio al evaluar la desaparición de NADPH en presencia de diversos sustratos. En ese sentido y dadas las características de los sustratos utilizados en este trabajo (particularmente la solubilidad), se recomienda evaluar la medición de actividad enzimática en presencia de cosolventes para estos mismos reactivos, con el objetivo de evaluar si este procedimiento mejora la catálisis enzimática. Además, debido que las monooxigenasas requieren oxígeno para las reacciones que catalizan, se recomienda emplear un sistema en el cual se adicione oxígeno a los ensayos con el objetivo de igualmente evaluar si existen diferencias en el consumo de NADPH dadas estas condiciones. Por último, se sugiere analizar si existen variaciones en la catálisis enzimática al agregar los sustratos en diferentes concentraciones a la de este estudio. Lo anterior también permitiría dilucidar si es que existe inhibición por sustrato (en caso de usar concentraciones mayores a la de este trabajo) para la enzimas seleccionadas.

Por otra parte, se recomienda evaluar la producción de estas enzimas en otros sistemas de expresión, con el fin de determinar si existe una mayor expresión de las enzimas de interés tanto en condiciones de crecimiento temprano como tardío. Dado que generalmente la expresión de proteínas recombinantes en el citoplasma presenta altos rendimientos, se recomienda el uso de cepas de *E.coli* que favorezcan la formación de enlaces disulfuro en esta región celular, tales como *E.coli* Origami y *E.coli* SHuffle; puesto que tal como fue mencionado anteriormente el citoplasma impide la formación de enlaces disulfuro (los cuales se concluyen como necesarios para la expresión soluble de las enzimas del estudio) dado la presencia de enzimas que favorecen la reducción de cisteínas.

Finalmente, debido al interés comercial que presentan algunos de los productos de la catálisis con monooxigenasas (por ejemplo ϵ -caprolactona) y la creciente preocupación por implementar procesos industriales más amigables con el medio ambiente, se propone evaluar el escalamiento del cultivo celular desde matraces a reactores fed-batch a escala de laboratorio, y si es posible a reactores de escala industrial. Lo anterior, se plantea con el fin de obtener cultivos de alta densidad celular que permitan generar un aumento en la síntesis del producto deseado. Además, con lo propuesto anteriormente se pueden evaluar condiciones como el pH y la aeración del cultivo (lo que no se pudo analizar a nivel de matraces) que pueden modificar los niveles de actividad enzimática y rendimiento celular.

Bibliografía

- [1] Gran-Scheuch, A., Trajkovic, M., Parra, L., y Fraaije, M. W., “Mining the Genome of *Streptomyces leeuwenhoekii*: Two New Type I Baeyer–Villiger Monooxygenases From Atacama Desert,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018, doi:10.3389/fmicb.2018.01609.
- [2] Romero, E., Castellanos, J. R. G., Gadda, G., Fraaije, M. W., y Mattevi, A., “Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes,” *Chemical Reviews*, vol. 118, pp. 1742–1769, 2018, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00650.
- [3] Pauline, E., Eggerichs, D., Westphal, A. H., Tischler, D., y van Berkel, W. J., “Flavoprotein monooxygenases: Versatile biocatalysts,” *Biotechnology Advances*, vol. 51, p. 107712, 2021, doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107712.
- [4] Paulino-Lima, I. G., Azua-Bustos, A., Vicuña, R., González-Silva, C., Salas, L., Teixeira, L., Rosado, A., da Costa Leitao, A. A., y Lage, C., “Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile,” *Microbial Ecology*, vol. 65, pp. 325–335, 2013, doi:10.1007/s00248-012-0121-z.
- [5] Romero, E., Castellanos, J. R. G., Mattevi, A., y Fraaije, M. W., “Characterization and Crystal Structure of a Robust Cyclohexanone monooxygenase,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 55, pp. 15852–15855, 2016, doi:10.1002/anie.201608951.
- [6] Rostami-Hodjegan, A., Lennard, M. S., Tucker, G. T., y Ledger, W. L., “Monitoring plasma concentrations to individualize treatment with clomiphene citrate,” *Fertility and Sterility*, vol. 81, pp. 1187–1193, 2004, doi:10.1016/j.fertnstert.2003.07.044.
- [7] Kamath, A. V., Wang, J., Lee, F. Y., y Marathe, P. H., “Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL,” *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 61, pp. 365–376, 2008, doi:10.1007/S00280-007-0478-8.
- [8] Clemons, M., Danson, S., y Howell, A., “Tamoxifen (‘Nolvadex’): a review,” *Cancer Treatment Reviews*, vol. 28, pp. 165–180, 2002, doi:10.1016/S0305-7372(02)00036-1.
- [9] “Gonzalez Almonacid, Carolina. 2022. 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. Santiago, Chile. Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 62p. [en línea]. <<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/192690>>[Fecha de consulta: 9 de julio 2023].”
- [10] Delgove, M. A. F., Fürst, M. J. L. J., Fraaije, M. W., Bernaerts, K. V., y DeWilde-man, S. M. A., “Exploring the Substrate Scope of Baeyer-Villiger Monooxygenases with Branched Lactones as Entry towards Polyesters,” *ChemBioChem*, vol. 19, pp. 354–360,

- 2018, doi:10.1002/cbic.201700427.
- [11] “SUMO-tagged Proteins - Creative Biostructure. [en línea]. <<https://www.creative-biostructure.com/sumo-tagged-proteins-556.htm>> [Fecha de consulta: 9 de julio 2023].”.
- [12] “ptIE - Neopentalenolactone D synthase - Streptomyces avermitilis (strain ATCC 31267 / DSM 46492 / JCM 5070 / NBRC 14893 / NCIMB 12804 / NRRL 8165 / MA-4680) | uniProtKB | UniProt. [en línea] <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q82IY8/entry>>[Fecha de consulta: 8 de agosto 2024].”.
- [13] Michelin, R. A., Sgarbossa, P., Scarso, A., y Strukul, G., “The Baeyer–Villiger oxidation of ketones: A paradigm for the role of soft Lewis acidity in homogeneous catalysis,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 254, pp. 646–660, 2010, doi:10.1016/J.CCR.2009.09.014.
- [14] Bermúdez, E., Ventura, O. N., Eriksson, L. A., y Saenz-Méndez, P., “Improved homology model of cyclohexanone monooxygenase from acinetobacter calcoaceticus based on multiple templates,” *Computational Biology and Chemistry*, vol. 49, pp. 14–22, 2014, doi:10.1016/j.compbiolchem.2014.01.012.
- [15] Ceccoli, R. D., Bianchi, D. A., y Rial, D. V., “Flavoprotein monooxygenases for oxidative biocatalysis: recombinant expression in microbial hosts and applications,” *Frontiers in microbiology*, vol. 5, 2014, doi:10.3389/FMICB.2014.00025.
- [16] Riebel, A., Gonzalo, G. D., y Fraaije, M. W., “Expanding the biocatalytic toolbox of flavoprotein monooxygenases from Rhodococcus jostii RHA1,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 88, pp. 20–25, 2013, doi:10.1016/J.MOLCATB.2012.11.009.
- [17] Berkel, W. J. V., Kamerbeek, N. M., y Fraaije, M. W., “Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts,” *Journal of biotechnology*, vol. 124, pp. 670–689, 2006, doi:10.1016/J.JBIOTECH.2006.03.044.
- [18] Mascotti, M. L., Lapadula, W. J., y Ayub, M. J., “The Origin and Evolution of Baeyer-Villiger Monooxygenases (BVMOs): An Ancestral Family of Flavin Monooxygenases,” 2015, doi:10.1371/journal.pone.0132689.
- [19] Catucci, G., Gao, C., Sadeghi, S. J., y Gilardi, G., “Chemical applications of Class B flavoprotein monooxygenases,” *Rendiconti Lincei*, vol. 28, pp. 195–206, 2017, doi:10.1007/S12210-016-0583-X/METRICS.
- [20] Catucci, G., Occhipinti, A., Maffei, M., Gilardi, G., y Sadeghi, S. J., “Effect of Human Flavin-Containing Monooxygenase 3 Polymorphism on the Metabolism of Aurora Kinase Inhibitors,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, p. 2707, 2013, doi:10.3390/IJMS14022707.
- [21] Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G., Ottolina, G., Pasta, P., y Zambianchi, F., “First asymmetric epoxidation catalysed by cyclohexanone monooxygenase,” *Tetrahedron Letters*, vol. 43, pp. 1797–1799, 2002, doi:10.1016/S0040-4039(02)00029-1.
- [22] Maczka, W., Wińska, K., y Grabarczyk, M., “Biotechnological Methods of Sulfoxidation: Yesterday, Today, Tomorrow,” *Catalysts* 2018, Vol. 8, Page 624, vol. 8, p. 624, 2018, doi:10.3390/CATAL8120624.
- [23] Mansouri, H. R., Mihovilovic, M. D., y Rudroff, F., “Investigation of a New Type I Baeyer-Villiger Monooxygenase from Amycolatopsis thermoflava Revealed High Thermodynamic but Limited Kinetic Stability,” 2020, doi:10.1002/cbic.201900501.

- [24] Rahmani, S., Maroufkhani, M., Mohammadzadeh-Komuleh, S., y Khoubi-Arani, Z., “Polymer nanocomposites for biomedical applications,” *Fundamentals of Bionanomaterials*, pp. 175–215, 2022, doi:10.1016/B978-0-12-824147-9.00007-8.
- [25] de Gonzalo, G. y Franconetti, A., “Enantioselective sulfoxidations employing the thermostable cyclohexanone monooxygenase from *Thermocristipum municipale*,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 113, pp. 24–28, 2018, doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2018.02.006.
- [26] Barclay, S. S., Woodley, J. M., Lilly, M. D., Spargo, P. L., y Pettman, A. J., “Production of cyclohexanone monooxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus* for large scale Baeyer-Villiger monooxygenase reactions,” *Biotechnology Letters*, vol. 23, pp. 385–388, 2001, doi:10.1023/A:1005610815727/METRICS.
- [27] Ballard, J. E., Prueksaritanont, T., y 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 35, pp. 1447–1451, 2007, doi:10.1124/DMD.107.015438.
- [28] Dijkman, W., “Functions and applications of NMOs. Bachelor’s Thesis, Biology. [en línea] <<https://fse.studenttheses.ub.rug.nl/8594/>> [Fecha de consulta: 24 de junio 2024],”.
- [29] PÉREZ, T. M., “Evaluación de la actividad enzimática en sistemas inmovilizados de la aldosa reductasa . Tesis presentada a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería. UNIVERSIDAD MICHOACANA. [en línea]. <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/4899> [Fecha de consulta: 9 de julio 2023],”.
- [30] Junter, G.-A. y Jouenne, T., “Immobilized Viable Cell Biocatalysts: A Paradoxical Development,” *Reference Module in Life Sciences*, 2017, doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.09086-5.
- [31] “Lifeder. 2020. Fermentación láctica: proceso paso a paso y ejemplos. [en línea]. <<https://www.lifeder.com/fermentacion-lactica/>> [Fecha de consulta: 9 de julio 2023],”.
- [32] Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., y Sotelo-Mundo, R., “PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL,” *Biotecnología*, vol. 15, p. 8, 2013, doi:10.18633/bt.v15i3.152.
- [33] Papanephytou, C. P. y Kontopidis, G., “Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review,” *Protein expression and purification*, vol. 94, pp. 22–32, 2014, doi:10.1016/J.PEP.2013.10.016.
- [34] Rosano, G. L. y Ceccarelli, E. A., “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, p. 79503, 2014, doi:10.3389/FMICB.2014.00172/BIBTEX.
- [35] Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R., y Osburne, M. S., “Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability,” *Gene*, vol. 209, pp. 95–103, 1998, doi:10.1016/S0378-1119(98)00020-1.
- [36] Arakawa, T. y Timasheff, S. N., “The Interactions of Proteins with Salts, Amino Acids,

- and Sugars at High Concentration,” pp. 226–245, 1991, doi:10.1007/978-3-642-76226-0_8.
- [37] “Plasmid Vector - an overview | ScienceDirect Topics. [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/plasmid-vector>> [Fecha de consulta: 12 de octubre 2024].”
- [38] “Purificación de proteínas recombinantes o de fusión etiquetadas. [en línea]. <<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/products/protein-biology/protein-sample-prep/recombinant-fusion-tag-protein-purification>> [Fecha de consulta: 9 de julio 2023].”
- [39] Aguilar González, M.; De León Rodríguez, A. . V. R. G., “Coexpresión de las chaperonas DnaK y DnaJ y vasostatina. . [en línea]. <<https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2010/12%20Verano%20Ciencia%20Region%20Centro/UAQ%20Aguilar%20Gonzalez.pdf>> [Fecha de consulta: 9 de julio 2023],” Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Laboratorio de Biotecnología Molecular Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.
- [40] HJazi, A., Alqarni, A., Alfahed, A., Abusalim, G., Shmrany, H., Alqasem, A., HJazi, B., Alobaisi, Y., Aloraini, G., y Walsaeer, P., “Expression and Purification of Recombinant T7 RNA Polymerase in Escherichia Coli,” International Journal of Membrane Science and Technology, vol. 10, pp. 3900–3909, 2023, doi:10.15379/ijmst.v10i2.3261.
- [41] Malik, A., Alsenaidy, A., Elrobh, M., Khan, W., Alanazi, M., y Bazzi, M., “Optimization of expression and purification of hspa6 protein from camelus dromedaries in e. coli,” Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, doi:10.1016/j.sjbs.2015.04.017.
- [42] Chen, X. J. y Xu, H. H., “Expression and Purification of Recombinant MP-GFP Protein in Escherichia coli,” Agricultural Sciences in China, vol. 10, pp. 394–403, 2011, doi:10.1016/S1671-2927(11)60018-7.
- [43] Donovan, R. S., Robinson, C. W., y Click, B. R., “Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter,” Journal of industrial microbiology, vol. 16, pp. 145–154, 1996, doi:10.1007/BF01569997.
- [44] “NiCo21(DE3) Competent E. coli | NEB [en línea] <<https://www.neb.com/en/product/s/c2529-nico21de3-competent-e-coli#Product%20Information>> [Fecha de consulta: 24 de junio 2024].”
- [45] “pET-22b(+) DNA - Novagen | 69744 [en línea] <https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/pET-22b-DNA-Novagen,EMD_BIO-69744?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F> [Fecha de consulta: 24 de junio 2024].”
- [46] “pET-22b(+) Sequence and Map [en línea] <[https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-22b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-22b(%2B))>[Fecha de consulta: 11 de junio 2024].”
- [47] Bulbarela, J. G., “2015. Clonación y expresión de la conotoxina recombinante cal26a de Conus californicus en Escherichia coli. Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Ensenada, Baja California, México. [en línea] <<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/657/1/242751.pdf>>[Fecha de consulta: 8 de agosto 2024].”
- [48] Wei, S., Liu, Y., Zhou, J., Xu, G., y Ni, Y., “Two enantiocomplementary Baeyer-Villiger monooxygenases newly identified for asymmetric oxyfunctionalization of thioether,” Mo-

- lecular Catalysis, vol. 513, p. 111784, 2021, doi:10.1016/J.MCAT.2021.111784.
- [49] Shipston, N. F., Lenn, M. J., y Knowles, C. J., “Enantioselective whole cell and isolated enzyme catalysed baeyer-villiger oxidation of bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 15, pp. 41–52, 1992, doi:10.1016/0167-7012(92)90067-E.
- [50] Bučko, M., Schenk Mayerová, A., Gemeiner, P., Vikartovská, A., Mihovilovič, M. D., y Lacík, I., “Continuous testing system for baeyer–villiger biooxidation using recombinant escherichia coli expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 49, pp. 284–288, 2011, doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2011.05.013.
- [51] “High Efficiency Transformation Protocol (C2529) | NEB. [en línea]. <<https://www.neb.com/en/protocols/2012/05/31/high-efficiency-transformation-protocol-c2529>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024].”.
- [52] “Protein Expression Using NiCo21(DE3) (C2529) | NEB. [en línea]. <<https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/protocol-for-expression-using-nic021-de3-c2529>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024].”.
- [53] Mannervik, B., “Measurement of glutathione reductase activity,” *Current Protocols in Toxicology*, vol. 00, pp. 7.2.1–7.2.4, 1999, doi:10.1002/0471140856.TX0702S00.
- [54] MM, B., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Analytical biochemistry*, vol. 72, pp. 248–254, 1976, doi:10.1006/ABIO.1976.9999.
- [55] Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970, doi:10.1038/227680A0.
- [56] “Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one | C7H8O | ChemSpider. [en línea]. <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.262366.html>> [Fecha de consulta: 9 de agosto 2024].”.
- [57] “Thioanisole | C7H8S | ChemSpider. [en línea]. <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7239.html?rid=0439420f-dce1-4c8f-a3dc-90fd1c35c650>> [Fecha de consulta: 9 de agosto 2024].”.
- [58] Kesharwani, N., Chaudhary, N., y Haldar, C., “Heterogeneous Catalytic Oxidative Bromination and Oxidation of Thioethers By Vanadium(IV) Oxido Complex of Benzoylacetone and Effect of Solid Supports,” *Catalysis Letters*, vol. 151, 2021, doi:10.1007/s10562-021-03594-9.
- [59] “DL-Phenylalanine | C9H11NO2 | ChemSpider. [en línea]. <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.969.html?rid=3e6bf20f-14e9-4c7a-88e5-3a99fa1c7a72&page_number=0> [Fecha de consulta: 9 de agosto 2024].”.
- [60] “Universidad de Salamanca. Elaboración de guiones para el estudio interactivo de la relación estructura-función de proteínas. [en línea]. <<http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/FHyF/index.html>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024].”.
- [61] “Cyclohexanone | C6H10O | ChemSpider. [en línea]. <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7679.html?rid=b7eeeb46-2831-434c-a314-1d730c33cd9c>> [Fecha de consulta: 9 de agosto 2024].”.
- [62] “Imidazol para soluciones tampón. [en línea]. <<https://itwreagents.com/iberia/es/product/imidazol-para-soluciones-tampon/A1073>> [Fecha de consulta: 13 de octubre

- 2024],”.
- [63] “Moreno Rueda, Luz. 2010. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes VP5, VP6 Y VP8 del Rotavirus . Trabajo para optar al grado de Magister en Bioquímica. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Medicina. 146p. [en línea]. <<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/6935/597660.2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [Fecha de consulta: 13 de octubre 2024],”.
- [64] “RIESGO QUÍMICO-ACCIDENTES GRAVES CICLOHEXANONA. 2008. [en línea]. <<http://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024],”.
- [65] “Thioanisole | C₇H₈S | CID 7520 - PubChem. [en línea]. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7520>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024],”.
- [66] “Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one, (1R,5S)-.[en línea]. <[https://www.chembk.com/en/chem/Bicyclo\[3.2.0\]hept-2-en-6-one,%20\(1R,5S\)-](https://www.chembk.com/en/chem/Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one,%20(1R,5S)-)> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024],”.
- [67] “L-fenilalanina - Aminoscience [en línea]. <<https://www.aminoscience.com.br/es/materia-prima-e-aplicacoes/l-fenilalanina/>> [Fecha de consulta: 15 de agosto 2024],”.
- [68] Bdira, F. B., Waudby, C. A., Volkov, A. N., Schröder, S. P., Eiso, A. B., Codée, J. D., Overkleeft, H. S., Aerts, J. M., van Ingen, H., y Ubbink, M., “Dynamics of Ligand Binding to a Rigid Glycosidase**,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 59, pp. 20508–20514, 2020, doi:10.1002/ANIE.202003236.
- [69] “T test calculator. [en línea]. <<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>> [Fecha de consulta: 12 de octubre 2024],”.
- [70] Gomes, L., Monteiro, G., y Mergulhão, F., “The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by Escherichia coli Biofilms,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, 2020, doi:10.3390/IJMS21020576.
- [71] “BIORAD. 1994. Bio-Rad Protein Assay. 4p.,”.
- [72] “Caldo Luria (Caldo LB Miller) Formato 500 g [en línea]. <<https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-microbiologia/1227-14975-caldo-luria-caldo-lb-miller.html>> [Fecha de consulta: 15 de junio 2024],”.
- [73] “Phosphate Buffer (pH 5.8 to 7.4) Preparation and Recipe | AAT Bioquest. [en línea]. <<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/Disponibileen-buffer-ph-5-8-to-7-4>> [Fecha de consulta: 30 de mayo 2024],”.
- [74] Hor, L., Peverelli, M. G., Perugini, M. A., y Hutton, C. A., “A new robust kinetic assay for dap epimerase activity,” *Biochimie*, vol. 95, pp. 1949–1953, 2013, doi:10.1016/J.BIOCHI.2013.06.026.
- [75] Walters, C., Keeney, A., Wigal, C. T., Johnston, C. R., y Cornelius, R. D., “The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens,” *Journal of Chemical Education*, vol. 74, pp. 99–102, 1997, doi:10.1021/ED074P99.
- [76] Aalbers, F. S. y Fraaije, M. W., “Design of artificial alcohol oxidases: Alcohol dehydrogenase-nadph oxidase fusions for continuous oxidations,” *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, vol. 20, pp. 51–56, 2019, doi:10.1002/CBIC.201800421.

Anexos

Anexo A. Elaboración soluciones de trabajo

A.1. Elaboración de solución stock 50 mg/mL de ampicilina

Para la elaboración de la solución stock se pesó 1 g de ampicilina sal sódica (USBiological, Massachusetts, Estados Unidos), los cuales fueron disueltos en 10 mL de agua desionizada (MilliQ) con agitación. Luego, se aforó a 20 mL y se filtró en un tubo Falcon bajo esterilidad utilizando una jeringa estéril de 20 mL y un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para soluciones acuosas con un tamaño de poro de 0,22 μm (EDLAB CA Syringe Filter). Finalmente, se almacenó la solución a 4°C por máximo una semana.

A.2. Elaboración de solución stock 500 mg/mL de glicerol

Para preparar la solución stock de glicerol se pesaron 29,5 g de glicerol al 85 % (Merck, Darmstadt, Alemania). Luego, se disolvieron estos en 20 mL de agua desionizada con agitación para posteriormente aforar a 50 mL y filtrar en tubo Falcon bajo esterilidad utilizando una jeringa estéril de 20 mL y un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para soluciones acuosas con un tamaño de poro de 0,22 μm (EDLAB CA Syringe Filter). Finalmente, se almacenó la solución a 4°C.

A.3. Elaboración de solución stock 0,5 M de IPTG

Para preparar 5 mL de la solución stock de IPTG 0,5 M, se pesaron 0,6 g de este (Merck, Darmstadt, Alemania). Luego se disolvieron estos en 2 mL de agua desionizada para posteriormente aforar a 5 mL y filtrar en tubo Falcon bajo esterilidad utilizando una jeringa de 10 mL y un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para soluciones acuosas con un tamaño de poro de 0,22 μm (EDLAB CA Syringe Filter).

Es importante mencionar que dicha solución stock debe ser utilizada inmediatamente una vez preparada.

A.4. Preparación de buffer Tris-HCl 200 mM; pH 7,4

Para preparar 500 mL de dicho buffer se pesaron 12,114 g de Base Tris (Winkler, Santiago, Chile). Luego estos se disolvieron en 250 mL de agua destilada con agitador magnético y se agregó lentamente ácido clorhídrico (HCl) concentrado a la solución para ajustar el pH a un valor de 7,4 utilizando un pHímetro HI5521 (Hanna Instruments, Padua, Italia). Posteriormente, se aforó la solución a 500 mL.

A.5. Preparación de reactivo de Bradford

Para la preparación de 50 mL de reactivo utilizado para la cuantificación de proteínas se realiza el siguiente procedimiento sugerido por el proveedor (BioRad, California, Estados Unidos) [71]:

Primero, se diluyó una parte del reactivo "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" de Bio-Rad en cuatro partes de agua MilliQ (dilución 1:5). Luego, se filtró la solución utilizando un filtro de papel con un tamaño de poro de 11 μm (Whatman, Maidstone, Reino Unido) para disponer el reactivo preparado en un tubo Falcon.

Cabe destacar que el reactivo diluido puede ser utilizado por aproximadamente 2 semanas, manteniéndolo a temperatura ambiente.

A.6. Preparación solución stock NADPH 360 μM

Este procedimiento se aplica para la preparación de un volumen de 20 mL de una solución stock de NADPH 360 μM que es utilizada para los ensayos de actividad enzimática. Los pasos para su preparación son los siguientes:

Primero, se deben pesar 6 mg de NADPH sal tetrasódica (Chem Cruz, Texas, Estados Unidos). Luego, estos se deben disolver utilizando buffer Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 (preparado diluyendo en agua destilada la solución stock de Tris-HCl 200 mM; pH 7,4) para disponer el reactivo preparado en un tubo Falcon envuelto con papel aluminio y almacenarlo a -20°C alejado de la luz, por no más de 2 semanas.

A.7. Preparación solución stock biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona 20 mM

Para preparar esta solución stock se deben disolver 85 μL de cis-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en 40 mL de buffer Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 (preparado diluyendo en agua destilada la solución stock de Tris-HCl 200 mM; pH 7,4) en un tubo Falcon. Luego la solución debe ser almacenada en cámara fría a una temperatura de 4°C .

A.8. Preparación solución stock de ciclohexanona 20 mM

Para la preparación de esta solución stock se deben disolver 10 μL de ciclohexanona (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en 5 mL de buffer Tris HCl 50 mM; pH 7,4. Posterior a ello, la solución de ser almacenada en cámara fría a 4°C .

A.9. Preparación solución stock de fenilalanina 20 mM

Con el fin de preparar la solución stock de fenilalanina se deben pesar 16 mg de esta para disolverlos en 5 mL de buffer Tris HCl 50 mM; pH 7,4. Luego, se debe almacenar la solución en cámara fría.

A.10. Preparación solución stock de tioanisol 20 mM

Para preparar la solución stock de tioanisol se deben disolver 12 μL de este compuesto en 5 mL de Tris HCl 50 mM; pH 7,4. Finalmente, se debe almacenar la solución en cámara fría.

Anexo B. Preparación de medios de cultivo para *E. coli*

B.1. Elaboración de medio LB líquido en tampón fosfato 0,1 M; pH 6,8

Para preparar LB líquido en tampón fosfato 0,1 M se pesaron los siguientes reactivos en las concentraciones que se detallan a continuación [72, 73]:

- Triptona (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos): 10 g/L
- Extracto de levadura (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos): 5 g/L
- NaCl (Winkler, Santiago, Chile): 10 g/L
- Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Merck, Darmstadt, Alemania): 8,71 g/L
- NaH₂PO₄ · H₂O (Merck, Darmstadt, Alemania): 7,04 g/L

Luego, se disolvieron en agua destilada con agitación a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 6,8 con solución de NaOH 10 M o HCl 50 % para luego esterilizar a 121°C y 1 atm en autoclave.

B.2. Preparación de placas Petri con medio LB-agar y antibiótico para el cultivo de células *E. coli*

Con el objetivo de preparar placas Petri con medio LB-agar, primero se pesaron los siguientes reactivos con las concentraciones que se indican a continuación:

- Triptona (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos): 10 g/L
- Extracto de levadura (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos): 5 g/L
- NaCl (Winkler, Santiago, Chile): 10 g/L
- Agar-agar (BD, Nueva Jersey, Estados Unidos): 20 g/L

Luego, estos se disolvieron en agua destilada con agitación a temperatura ambiente y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atm.

Posterior a ello, se agregó el antibiótico correspondiente para lograr una concentración de trabajo de 100 mg/L de ampicilina. Luego, se añadieron aproximadamente 20 mL de la mezcla de LB-agar con antibiótico a cada placa Petri, para luego sellarlas con Parafilm una vez estas estuvieran solidificadas y almacenarlas a 4°C.

Anexo C. Elaboración de las curvas de calibrado de proteína

Para la preparación de las curvas de calibrado de proteína, primero se diluyó la solución patrón de BSA (2 mg/mL) en concentraciones conocidas utilizando agua destilada. Posteriormente se incorporaron 5 μ L de cada dilución en una microplaca de 96 pocillos con 200 μ L de reactivo de Bradford. Cabe destacar que para el caso del blanco se utilizaron 5 μ L de agua destilada en el volumen respectivo de reactivo. Luego, se esperaron 5 minutos y se midió absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas, realizando cada medición en triplicado.

Es importante mencionar que se realizó una curva de calibrado cada vez que se midió la concentración de proteínas pues la capacidad del reactivo de Bradford de unirse a las proteínas (que es lo que produce un cambio en la absorbancia medida a una longitud de onda específica) puede variar con el tiempo de almacenamiento de este (o con el tiempo de almacenamiento del BSA), entre lotes o preparaciones del reactivo; y con cambios en las condiciones experimentales, tales como la temperatura. De esta manera, y en base a lo expuesto, hacer varias curvas de calibrado permite asegurar que cualquier variación en la estabilidad del colorante se refleje en los resultados obtenidos para la proteína estándar, garantizando que las mediciones de absorbancia para las enzimas de interés sean consistentes al caso en específico que se está evaluando.

C.1. Curva de calibrado para la medición de concentración de proteínas tras la expresión de todas las monooxigenasas del estudio en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+)

En la siguiente tabla se presentan los datos de las concentraciones de albúmina de suero bovino utilizadas para elaborar la curva de calibrado necesaria en la cuantificación de la cantidad de proteínas totales luego de los experimentos realizados con todas las monooxigenasas del estudio (MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO) expresadas en *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+). Con ello, se presenta además el detalle de los valores de absorbancia a 595 nm para los triplicados realizados.

Tabla C.1: Absorbancias a 595 nm obtenidas para concentraciones conocidas de proteína estándar utilizadas para realizar la curva de calibrado asociada a la medición de concentración de proteínas totales tras la expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

Nº de muestra	Concentración BSA [mg/mL]	Absorbancia Réplica 1	Absorbancia Réplica 2	Absorbancia Réplica 3
1 (blanco)	0,000	0,189	0,191	0,193
2	0,125	0,250	0,242	0,258
3	0,250	0,328	0,339	0,340
4	0,500	0,480	0,464	0,483

Con estos valores, se obtienen los valores de absorbancia (Abs) promedio junto con la desviación estándar entre las absorbancia de las réplicas. Finalmente, a partir de estos resul-

tados, se calcula la absorbancia promedio para cada concentración de BSA sin la absorbancia promedio del blanco. El resumen de estos resultados se expone a continuación:

Tabla C.2: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de la expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

Nº de muestra	Concentración BSA [mg/mL]	Promedio Absorbancia (595 nm)	σ	Abs-Abs _{blanco}
1 (blanco)	0,000	0,191	0,002	0,000
2	0,125	0,250	0,008	0,059
3	0,250	0,336	0,007	0,145
4	0,500	0,476	0,010	0,285

Con los valores de absorbancia promedio obtenidos de cada concentración de proteínas, se elabora una curva de calibrado Absorbancia (595 nm) vs. Concentración de proteína. La representación gráfica de la curva de calibrado de proteína se muestra en la Figura C.1.

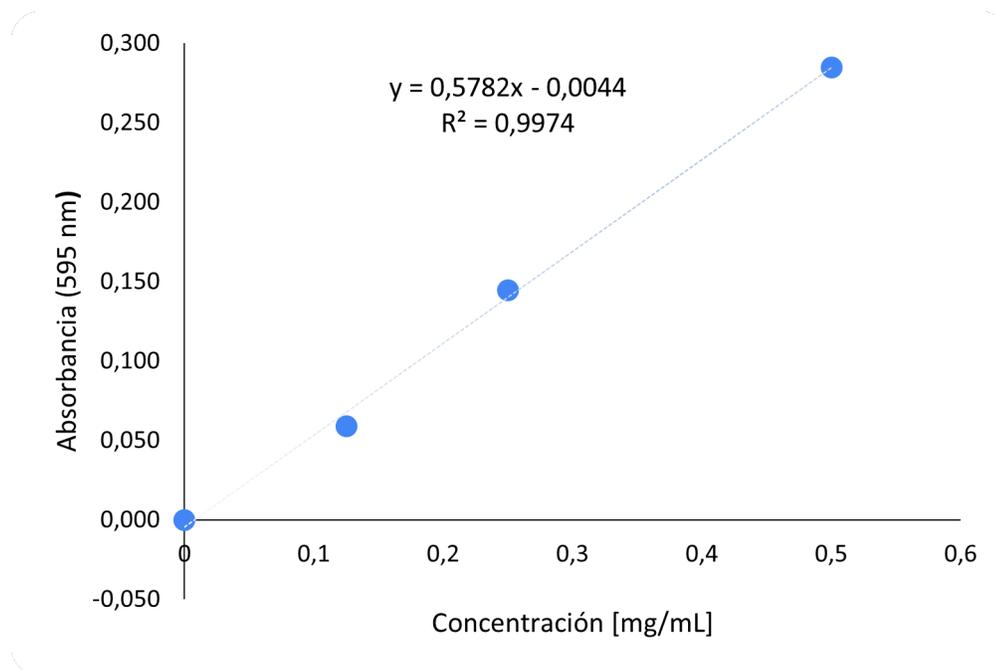


Figura C.1: Curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de expresión de MO1, MO4, G35A_MO y G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+), utilizando Albúmina de suero Bovino (BSA) como proteína estándar.

De esta manera, la absorbancia promedio del blanco (la cual deberá restarse a la absorbancia promedio de las proteínas de interés) es de 0,191; mientras que la ecuación que permite determinar la concentración de proteínas en mg/mL, a partir del valor de absorbancia medida a 595 nm, para este caso es la siguiente:

$$\text{Concentración de proteína } \left[\frac{mg}{mL} \right] = \frac{\text{Absorbancia (595 nm)} + 0,0044}{0,5782} \quad (\text{C.1})$$

C.2. Curva de calibrado asociada a la medición de la concentración de la proteína G35A_MO_SUMO expresada en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo distintas condiciones de crecimiento

A continuación, se presentan los datos de las concentraciones de BSA utilizadas para elaborar la curva de calibrado utilizada en la determinación de la concentración de proteínas totales tras la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo las condiciones de crecimiento seleccionadas. Junto con ello, se presenta el detalle de los valores de absorbancia a 595 nm para los triplicados realizados.

Tabla C.3: Absorbancias a 595 nm obtenidas para concentraciones conocidas de proteína estándar utilizadas para realizar la curva de calibrado asociada a la medición de concentración de proteínas totales tras los ensayos de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

Nº de muestra	Concentración BSA [mg/mL]	Absorbancia Réplica 1	Absorbancia Réplica 2	Absorbancia Réplica 3
1 (blanco)	0,000	0,415	0,456	0,430
2	0,250	0,446	0,61	0,491
3	0,500	0,563	0,576	0,678
4	0,750	0,708	0,678	0,644

A partir de los valores expuestos se construye la siguiente tabla, donde muestran los respectivos valores de absorbancia (Abs) promedio junto con la desviación estándar entre los valores obtenidos para las tres mediciones realizadas. Además, se presentan los resultados de las absorbancias promedios sin la absorbancia promedio del blanco.

Tabla C.4: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas tras los ensayos de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

Nº de muestra	Concentración BSA [mg/mL]	Promedio Absorbancia (565 nm) [-]	σ [-]	Abs-Abs _{blanco} [-]
1 (blanco)	0,00	0,434	0,021	0,000
2	0,25	0,516	0,085	0,082
3	0,50	0,606	0,063	0,172
4	0,750	0,677	0,032	0,243

Con los valores de absorbancia promedio obtenidos de cada concentración de proteínas, se elabora una curva de calibrado Absorbancia (595 nm) vs. Concentración de proteína. La representación gráfica de la curva de calibrado de proteína se muestra en la Figura C.2.

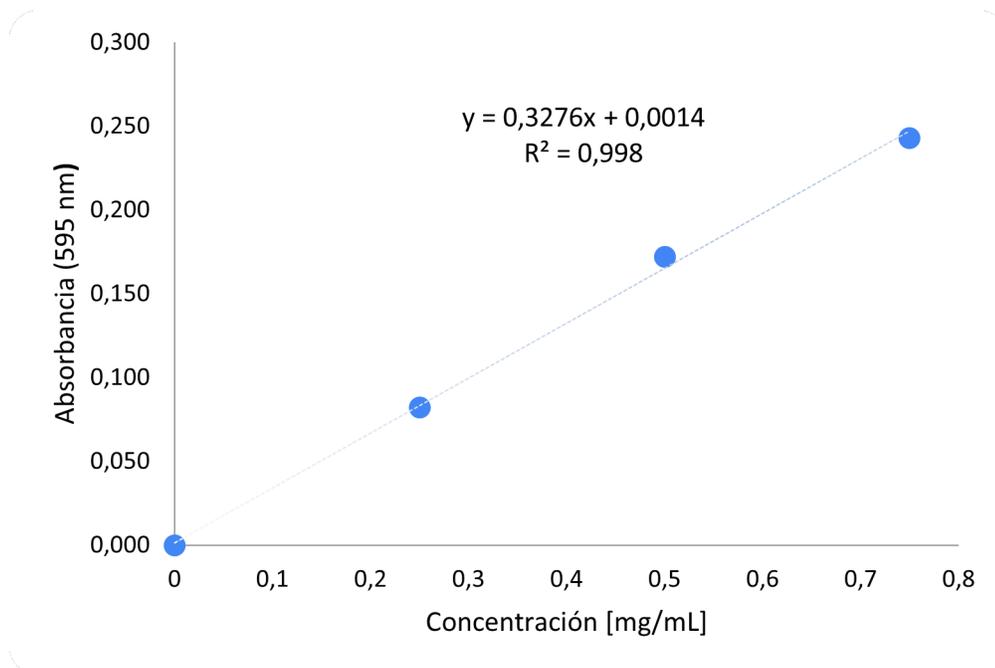


Figura C.2: Curva de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas luego de la expresión de G35A_MO_SUMO en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) bajo las condiciones de crecimiento seleccionadas, utilizando Albúmina de suero Bovino (BSA) como proteína estándar.

Así, la absorbancia promedio del blanco (la cual deberá restarse a la absorbancia promedio de las proteínas de interés) es de 0,434; mientras que la ecuación que permite determinar la concentración de proteínas en mg/mL, a partir del valor de absorbancia medida a 595 nm, para este caso es la siguiente:

$$\text{Concentración de proteína} \left[\frac{mg}{mL} \right] = \frac{\text{Absorbancia (595 nm)} - 0,0014}{0,3276} \quad (C.2)$$

Anexo D. Detalle de los resultados obtenidos

D.1. Resultados utilizados para elaborar las curvas de crecimiento de cultivos de *E.coli*

A continuación, se presenta la tabla con los datos obtenidos para la elaboración de la curva de crecimiento de biomasa de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) a 37°C y 180 RPM en 200 mL de medio de cultivo LB con buffer fosfato 0,1 M y glicerol 3 g/L, a nivel de matraces de 1 L, en donde se tomaron mediciones de OD₆₀₀ cada aproximadamente media hora. Cabe destacar que para este caso la enzima contenida en el sistema de expresión fue G35A_MO_SUMO.

Tabla D.1: Datos para la elaboración de la curva de crecimiento del cultivo de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) G35A_MO_SUMO, incubado a 37°C y 180 RPM.

Nº de medición	Tiempo de cultivo [min]	OD Cultivo 1	OD Cultivo 2	OD _{promedio}	σ [-]
1	0	0,105	0,138	0,122	0,023
2	30	0,216	0,272	0,244	0,040
3	60	0,451	0,548	0,500	0,069
4	90	0,788	0,884	0,836	0,068
5	120	1,077	1,138	1,108	0,043
6	150	2,145	2,095	2,120	0,035
7	180	2,595	2,755	2,675	0,113
8	210	2,530	2,755	2,643	0,159
9	240	3,100	3,355	3,228	0,180
10	270	3,455	3,000	3,228	0,322
11	300	3,580	3,555	3,568	0,018
12	330	4,500	4,550	4,525	0,035
13	360	5,330	4,660	4,995	0,474
14	420	5,470	5,580	5,525	0,078
15	450	5,385	5,400	5,393	0,011
16	480	5,580	5,530	5,555	0,035

D.2. Resultados de los ensayos de actividad enzimática

D.2.1. Ensayos de actividad enzimática para todas las monooxigenasas del estudio utilizando diferentes sustratos

D.2.1.1. Valores de absorbancia y concentración de NADPH

En la siguiente sección se presenta el detalle de los resultados de los valores de absorbancia y concentración de NADPH para los ensayos realizados utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, tioanisol, fenilalanina y ciclohexanona como sustratos para la catálisis enzimática de todas las proteínas expresadas en el estudio.

Primero, de la Tabla D.2 a la Tabla D.5 se muestran los valores de absorbancia para cada uno de los triplicados realizados en los ensayos con G35A_MO_SUMO, MO4, MO1 y G35A_MO, respectivamente.

Tabla D.2: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.

Nº de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona			Tioanisol			Fenilalanina			Ciclohexanona		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0,833	0,797	0,790	0,867	0,823	0,858	0,874	0,817	0,863	0,875	0,840	0,871
2	80	0,818	0,781	0,776	0,867	0,820	0,857	0,874	0,820	0,860	0,875	0,845	0,868
3	160	0,800	0,769	0,764	0,861	0,813	0,851	0,869	0,813	0,858	0,871	0,852	0,860
4	240	0,784	0,756	0,751	0,857	0,806	0,847	0,869	0,816	0,855	0,864	0,839	0,856
5	320	0,767	0,739	0,736	0,85	0,801	0,847	0,866	0,810	0,854	0,865	0,823	0,851
6	400	0,753	0,726	0,722	0,856	0,803	0,841	0,861	0,805	0,841	0,856	0,822	0,849
7	480	0,737	0,707	0,708	0,848	0,797	0,834	0,857	0,803	0,835	0,857	0,816	0,845
8	560	0,727	0,693	0,694	0,836	0,791	0,828	0,853	0,802	0,831	0,848	0,811	0,837
9	640	0,697	0,679	0,676	0,833	0,788	0,822	0,847	0,794	0,825	0,842	0,805	0,834
10	720	0,675	0,661	0,663	0,832	0,782	0,817	0,842	0,792	0,818	0,836	0,800	0,827
11	800	0,664	0,646	0,648	0,822	0,778	0,814	0,836	0,791	0,820	0,836	0,792	0,821
12	880	0,649	0,633	0,630	0,813	0,771	0,811	0,832	0,784	0,806	0,824	0,787	0,815
13	960	0,646	0,617	0,618	0,808	0,766	0,803	0,828	0,779	0,802	0,818	0,784	0,811
14	1040	0,615	0,601	0,602	0,802	0,762	0,803	0,823	0,773	0,795	0,821	0,776	0,808
15	1120	0,602	0,588	0,588	0,798	0,760	0,795	0,820	0,768	0,789	0,804	0,773	0,803
16	1200	0,583	0,567	0,570	0,789	0,754	0,781	0,812	0,760	0,783	0,796	0,766	0,791
17	1280	0,575	0,555	0,564	0,784	0,756	0,775	0,809	0,756	0,778	0,794	0,768	0,796
18	1360	0,556	0,541	0,543	0,806	0,749	0,771	0,806	0,752	0,771	0,790	0,757	0,785
19	1440	0,545	0,527	0,529	0,771	0,735	0,771	0,798	0,745	0,764	0,783	0,744	0,783
20	1520	0,533	0,514	0,516	0,768	0,730	0,757	0,794	0,738	0,758	0,778	0,742	0,773
21	1600	0,514	0,519	0,503	0,758	0,724	0,752	0,788	0,737	0,751	0,771	0,736	0,766
22	1680	0,497	0,488	0,487	0,757	0,718	0,745	0,784	0,729	0,742	0,769	0,732	0,764
23	1760	0,489	0,471	0,476	0,753	0,709	0,742	0,781	0,725	0,737	0,767	0,732	0,753
24	1840	0,474	0,460	0,467	0,743	0,707	0,737	0,776	0,721	0,735	0,759	0,729	0,750
25	1920	0,465	0,446	0,454	0,743	0,700	0,733	0,768	0,719	0,729	0,753	0,729	0,751
26	2000	0,448	0,433	0,439	0,732	0,694	0,724	0,763	0,716	0,719	0,744	0,726	0,744
27	2080	0,436	0,423	0,428	0,727	0,690	0,723	0,760	0,712	0,711	0,742	0,721	0,734
28	2160	0,420	0,409	0,415	0,718	0,683	0,717	0,752	0,707	0,705	0,735	0,714	0,726
29	2240	0,410	0,397	0,403	0,715	0,680	0,713	0,747	0,702	0,700	0,725	0,705	0,721
30	2320	0,402	0,387	0,394	0,710	0,677	0,703	0,747	0,698	0,693	0,718	0,689	0,716

Tabla D.3: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO4.

Nºde medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona			Tioanisol			Fenilalanina			Ciclohexanona		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0,850	0,836	0,840	0,862	0,832	0,830	0,855	0,831	0,834	0,859	0,834	0,822
2	80	0,846	0,844	0,838	0,872	0,828	0,829	0,868	0,840	0,832	0,856	0,829	0,824
3	160	0,842	0,845	0,832	0,859	0,832	0,830	0,870	0,827	0,831	0,856	0,825	0,823
4	240	0,839	0,844	0,827	0,852	0,827	0,823	0,854	0,827	0,827	0,847	0,818	0,819
5	320	0,837	0,835	0,829	0,850	0,824	0,826	0,850	0,828	0,832	0,843	0,816	0,815
6	400	0,832	0,829	0,826	0,853	0,841	0,832	0,855	0,818	0,835	0,846	0,818	0,815
7	480	0,829	0,824	0,824	0,859	0,825	0,822	0,862	0,821	0,824	0,856	0,820	0,813
8	560	0,829	0,829	0,826	0,864	0,826	0,825	0,856	0,821	0,834	0,849	0,816	0,826
9	640	0,826	0,825	0,822	0,876	0,825	0,814	0,854	0,819	0,825	0,854	0,824	0,828
10	720	0,823	0,824	0,820	0,882	0,821	0,824	0,855	0,821	0,822	0,855	0,819	0,845
11	800	0,832	0,825	0,823	0,855	0,815	0,815	0,869	0,815	0,812	0,854	0,811	0,833
12	880	0,832	0,815	0,811	0,857	0,810	0,815	0,849	0,814	0,822	0,838	0,814	0,823
13	960	0,820	0,820	0,814	0,851	0,811	0,810	0,854	0,816	0,823	0,829	0,811	0,817
14	1040	0,816	0,816	0,816	0,855	0,805	0,805	0,851	0,819	0,824	0,822	0,814	0,807
15	1120	0,821	0,809	0,865	0,851	0,810	0,800	0,842	0,808	0,821	0,829	0,801	0,812
16	1200	0,822	0,802	0,811	0,836	0,808	0,799	0,833	0,805	0,808	0,823	0,803	0,795
17	1280	0,820	0,799	0,810	0,841	0,818	0,802	0,832	0,803	0,809	0,821	0,800	0,792
18	1360	0,811	0,799	0,807	0,851	0,819	0,804	0,851	0,808	0,806	0,822	0,809	0,793
19	1440	0,813	0,795	0,803	0,860	0,823	0,801	0,864	0,820	0,812	0,830	0,812	0,780
20	1520	0,832	0,787	0,800	0,874	0,832	0,814	0,854	0,821	0,818	0,827	0,816	0,780
21	1600	0,854	0,790	0,799	0,883	0,827	0,824	0,853	0,828	0,814	0,821	0,809	0,779
22	1680	0,832	0,786	0,804	0,881	0,850	0,824	0,860	0,840	0,808	0,820	0,799	0,783
23	1760	0,828	0,783	0,798	0,892	0,840	0,831	0,865	0,820	0,802	0,815	0,794	0,776
24	1840	0,832	0,789	0,806	0,883	0,799	0,813	0,862	0,855	0,809	0,837	0,795	0,767
25	1920	0,828	0,791	0,789	0,872	0,807	0,810	0,871	0,885	0,804	0,884	0,800	0,771
26	2000	0,811	0,799	0,784	0,845	0,832	0,802	0,888	0,882	0,794	0,903	0,788	0,761
27	2080	0,793	0,809	0,779	0,882	0,830	0,795	0,902	0,892	0,808	0,881	0,788	0,758
28	2160	0,785	0,803	0,772	0,876	0,859	0,802	0,930	0,904	0,800	0,879	0,783	0,754
29	2240	0,780	0,803	0,764	0,883	0,856	0,830	0,921	0,964	0,822	0,868	0,778	0,753
30	2320	0,783	0,808	0,758	0,901	0,848	0,835	0,938	0,963	0,804	0,889	0,800	0,766

Tabla D.4: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO1.

Nºde medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona			Tioanisol			Fenilalanina			Ciclohexanona		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0,875	0,854	0,865	0,832	0,859	0,869	0,834	0,841	0,867	0,846	0,843	1,088
2	80	0,875	0,870	0,865	0,835	0,858	0,864	0,833	0,839	0,870	0,853	0,842	1,138
3	160	0,880	0,875	0,865	0,845	0,859	0,867	0,836	0,843	0,868	0,854	0,847	0,997
4	240	0,875	0,863	0,863	0,844	0,859	0,866	0,832	0,841	0,861	0,845	0,846	0,990
5	320	0,875	0,859	0,860	0,847	0,857	0,862	0,835	0,836	0,862	0,858	0,848	0,989
6	400	0,875	0,852	0,859	0,831	0,863	0,862	0,833	0,835	0,860	0,869	0,836	0,982
7	480	0,882	0,856	0,857	0,833	0,861	0,857	0,844	0,844	0,856	0,860	0,838	0,994
8	560	0,875	0,847	0,856	0,836	0,855	0,854	0,831	0,845	0,866	0,851	0,841	0,974
9	640	0,875	0,845	0,853	0,842	0,863	0,857	0,825	0,844	0,892	0,849	0,862	0,977
10	720	0,883	0,845	0,848	0,855	0,866	0,851	0,828	0,845	0,871	0,841	0,841	0,978
11	800	0,869	0,840	0,843	0,854	0,859	0,845	0,830	0,847	0,883	0,842	0,837	0,980
12	880	0,864	0,840	0,843	0,840	0,852	0,841	0,827	0,839	0,860	0,838	0,831	0,973
13	960	0,868	0,840	0,842	0,854	0,853	0,842	0,831	0,837	0,852	0,837	0,829	0,976
14	1040	0,871	0,832	0,840	0,855	0,846	0,864	0,838	0,834	0,852	0,838	0,834	0,976
15	1120	0,859	0,831	0,838	0,839	0,843	0,837	0,835	0,828	0,848	0,843	0,835	0,973
16	1200	0,853	0,828	0,832	0,824	0,845	0,837	0,830	0,824	0,840	0,834	0,845	0,968
17	1280	0,858	0,825	0,834	0,818	0,863	0,832	0,826	0,822	0,840	0,846	0,842	0,968
18	1360	0,851	0,862	0,834	0,825	0,854	0,836	0,822	0,827	0,840	0,848	0,867	0,969
19	1440	0,847	0,831	0,840	0,817	0,848	0,830	0,825	0,824	0,841	0,840	0,861	0,969
20	1520	0,843	0,817	0,839	0,815	0,838	0,832	0,810	0,822	0,839	0,834	0,862	0,963
21	1600	0,836	0,816	0,837	0,808	0,836	0,820	0,809	0,822	0,834	0,832	0,845	0,964
22	1680	0,840	0,810	0,832	0,810	0,837	0,820	0,802	0,817	0,834	0,827	0,823	0,959
23	1760	0,832	0,809	0,828	0,804	0,834	0,823	0,805	0,818	0,833	0,824	0,825	0,956
24	1840	0,830	0,803	0,829	0,809	0,834	0,822	0,804	0,812	0,831	0,824	0,829	0,958
25	1920	0,832	0,804	0,836	0,806	0,845	0,824	0,800	0,810	0,825	0,814	0,817	0,968
26	2000	0,829	0,802	0,823	0,799	0,830	0,834	0,798	0,810	0,822	0,813	0,805	0,958
27	2080	0,833	0,806	0,813	0,794	0,828	0,810	0,794	0,814	0,817	0,809	0,812	0,958
28	2160	0,836	0,805	0,807	0,797	0,837	0,803	0,790	0,809	0,831	0,803	0,820	0,949
29	2240	0,821	0,801	0,799	0,792	0,844	0,802	0,789	0,809	0,813	0,811	0,860	0,944
30	2320	0,817	0,792	0,797	0,795	0,831	0,799	0,789	0,814	0,813	0,819	0,863	0,945

Tabla D.5: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO.

Nº de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona			Tioanisol			Fenilalanina			Ciclohexanona		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0,819	0,827	0,44	0,826	0,826	0,865	0,823	0,815	0,866	0,828	0,918	0,833
2	80	0,828	0,824	0,44	0,825	0,84	0,863	0,830	0,828	0,862	0,830	0,914	0,836
3	160	0,822	0,824	0,443	0,824	0,829	0,858	0,830	0,826	0,862	0,827	0,919	0,834
4	240	0,817	0,817	0,455	0,819	0,823	0,867	0,825	0,823	0,856	0,829	0,966	0,834
5	320	0,818	0,814	0,446	0,817	0,82	0,855	0,822	0,82	0,856	0,824	0,973	0,828
6	400	0,817	0,81	0,449	0,816	0,822	0,853	0,824	0,814	0,854	0,824	0,953	0,830
7	480	0,809	0,81	0,448	0,812	0,824	0,851	0,823	0,814	0,854	0,826	0,941	0,83
8	560	0,804	0,806	0,439	0,81	0,818	0,856	0,82	0,811	0,852	0,816	0,95	0,826
9	640	0,798	0,806	0,466	0,807	0,826	0,844	0,814	0,807	0,845	0,817	0,927	0,823
10	720	0,799	0,806	0,467	0,802	0,816	0,839	0,826	0,807	0,84	0,823	0,893	0,822
11	800	0,808	0,807	0,441	0,798	0,811	0,834	0,808	0,806	0,835	0,812	0,894	0,822
12	880	0,797	0,802	0,423	0,798	0,798	0,829	0,806	0,806	0,835	0,81	0,882	0,821
13	960	0,796	0,798	0,441	0,796	0,8	0,823	0,806	0,805	0,848	0,805	0,878	0,821
14	1040	0,802	0,797	0,413	0,796	0,797	0,82	0,804	0,807	0,834	0,799	0,873	0,821
15	1120	0,807	0,792	0,409	0,792	0,794	0,816	0,798	0,812	0,829	0,803	0,872	0,822
16	1200	0,786	0,786	0,44	0,788	0,789	0,811	0,795	0,806	0,826	0,792	0,864	0,814
17	1280	0,799	0,786	0,421	0,795	0,791	0,817	0,807	0,791	0,846	0,785	0,866	0,814
18	1360	0,807	0,782	0,425	0,794	0,798	0,816	0,784	0,786	0,828	0,78	0,862	0,813
19	1440	0,787	0,78	0,43	0,781	0,791	0,798	0,783	0,788	0,821	0,777	0,859	0,815
20	1520	0,769	0,778	0,428	0,775	0,791	0,796	0,783	0,788	0,814	0,772	0,864	0,814
21	1600	0,798	0,771	0,397	0,771	0,775	0,791	0,79	0,784	0,812	0,77	0,849	0,81
22	1680	0,803	0,777	0,407	0,777	0,774	0,787	0,783	0,788	0,805	0,763	0,843	0,808
23	1760	0,793	0,758	0,43	0,784	0,783	0,778	0,772	0,793	0,801	0,76	0,84	0,808
24	1840	0,781	0,748	0,395	0,774	0,787	0,778	0,77	0,792	0,798	0,758	0,838	0,806
25	1920	0,77	0,748	0,39	0,762	0,786	0,776	0,767	0,78	0,793	0,756	0,834	0,815
26	2000	0,759	0,743	0,386	0,762	0,771	0,779	0,759	0,762	0,786	0,749	0,83	0,804
27	2080	0,741	0,754	0,376	0,754	0,781	0,777	0,756	0,76	0,783	0,746	0,827	0,803
28	2160	0,73	0,777	0,372	0,765	0,773	0,77	0,754	0,764	0,777	0,741	0,824	0,812
29	2240	0,749	0,747	0,371	0,758	0,776	0,764	0,747	0,773	0,77	0,742	0,816	0,811
30	2320	0,735	0,74	0,388	0,737	0,79	0,758	0,743	0,76	0,77	0,744	0,818	0,808

De estos valores se puede notar que para el sustrato biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona en los ensayos con G35A_MO, la réplica 3 presenta una desviación considerable con respecto a las otras dos muestras (σ de aproximadamente 0,2 al considerar los tres datos), por lo que para los cálculos de la absorbancia promedio y de la concentración de NADPH (y sus desviaciones estándar) se considerarán únicamente los dos primeros datos.

Luego, a raíz de lo anterior se calculan los valores de absorbancia promedio. El detalle de los resultados obtenidos (junto con su respectiva desviación estándar) se presenta desde la Tabla D.6 a la Tabla D.9.

Tabla D.6: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.

N°de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona		Tioanisol		Fenilalanina		Ciclohexanona	
		Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ
1	0	0,807	0,023	0,849	0,023	0,851	0,030	0,862	0,019
2	80	0,792	0,023	0,848	0,025	0,851	0,028	0,863	0,016
3	160	0,778	0,020	0,842	0,025	0,847	0,030	0,861	0,010
4	240	0,764	0,018	0,837	0,027	0,847	0,027	0,853	0,013
5	320	0,747	0,017	0,833	0,027	0,843	0,029	0,846	0,021
6	400	0,734	0,017	0,833	0,027	0,836	0,028	0,842	0,018
7	480	0,717	0,017	0,826	0,026	0,832	0,027	0,839	0,021
8	560	0,705	0,019	0,818	0,024	0,829	0,026	0,832	0,019
9	640	0,684	0,011	0,814	0,023	0,822	0,027	0,827	0,019
10	720	0,666	0,008	0,810	0,026	0,817	0,025	0,821	0,019
11	800	0,653	0,010	0,805	0,023	0,816	0,023	0,816	0,022
12	880	0,637	0,010	0,798	0,024	0,807	0,024	0,809	0,019
13	960	0,627	0,016	0,792	0,023	0,803	0,025	0,804	0,018
14	1040	0,606	0,008	0,789	0,023	0,797	0,025	0,802	0,023
15	1120	0,593	0,008	0,784	0,021	0,792	0,026	0,793	0,018
16	1200	0,573	0,009	0,775	0,018	0,785	0,026	0,784	0,016
17	1280	0,565	0,010	0,772	0,014	0,781	0,027	0,786	0,016
18	1360	0,547	0,008	0,775	0,029	0,776	0,027	0,777	0,018
19	1440	0,534	0,010	0,759	0,021	0,769	0,027	0,770	0,023
20	1520	0,521	0,010	0,752	0,020	0,763	0,028	0,764	0,020
21	1600	0,512	0,008	0,745	0,018	0,759	0,026	0,758	0,019
22	1680	0,491	0,006	0,740	0,020	0,752	0,029	0,755	0,020
23	1760	0,479	0,009	0,735	0,023	0,748	0,029	0,751	0,018
24	1840	0,467	0,007	0,729	0,019	0,744	0,029	0,746	0,015
25	1920	0,455	0,010	0,725	0,023	0,739	0,026	0,744	0,013
26	2000	0,440	0,008	0,717	0,020	0,733	0,026	0,738	0,010
27	2080	0,429	0,007	0,713	0,020	0,728	0,028	0,732	0,011
28	2160	0,415	0,006	0,706	0,020	0,721	0,027	0,725	0,011
29	2240	0,403	0,007	0,703	0,020	0,716	0,027	0,717	0,011
30	2320	0,394	0,008	0,697	0,017	0,713	0,030	0,708	0,016

Tabla D.7: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO4.

N°de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona		Tioanisol		Fenilalanina		Ciclohexanona	
		Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ
1	0	0,842	0,007	0,841	0,018	0,840	0,013	0,838	0,019
2	80	0,843	0,004	0,843	0,025	0,847	0,019	0,836	0,017
3	160	0,840	0,007	0,840	0,016	0,843	0,024	0,835	0,019
4	240	0,837	0,009	0,834	0,016	0,836	0,016	0,828	0,016
5	320	0,834	0,004	0,833	0,014	0,837	0,012	0,825	0,016
6	400	0,829	0,003	0,842	0,011	0,836	0,019	0,826	0,017
7	480	0,826	0,003	0,835	0,021	0,836	0,023	0,830	0,023
8	560	0,828	0,002	0,838	0,022	0,837	0,018	0,830	0,017
9	640	0,824	0,002	0,838	0,033	0,833	0,019	0,835	0,016
10	720	0,822	0,002	0,842	0,034	0,833	0,019	0,840	0,019
11	800	0,827	0,005	0,828	0,023	0,832	0,032	0,833	0,022
12	880	0,819	0,011	0,827	0,026	0,828	0,018	0,825	0,012
13	960	0,818	0,003	0,824	0,023	0,831	0,020	0,819	0,009
14	1040	0,816	0,000	0,822	0,029	0,831	0,017	0,814	0,008
15	1120	0,832	0,029	0,820	0,027	0,824	0,017	0,814	0,014
16	1200	0,812	0,010	0,814	0,019	0,815	0,015	0,807	0,014
17	1280	0,810	0,011	0,820	0,020	0,815	0,015	0,804	0,015
18	1360	0,806	0,006	0,825	0,024	0,822	0,025	0,808	0,015
19	1440	0,804	0,009	0,828	0,030	0,832	0,028	0,807	0,025
20	1520	0,806	0,023	0,840	0,031	0,831	0,020	0,808	0,025
21	1600	0,814	0,035	0,845	0,033	0,832	0,020	0,803	0,022
22	1680	0,807	0,023	0,852	0,029	0,836	0,026	0,801	0,019
23	1760	0,803	0,023	0,854	0,033	0,829	0,032	0,795	0,020
24	1840	0,809	0,022	0,832	0,045	0,842	0,029	0,800	0,035
25	1920	0,803	0,022	0,830	0,037	0,853	0,043	0,818	0,059
26	2000	0,798	0,014	0,826	0,022	0,855	0,053	0,817	0,075
27	2080	0,794	0,015	0,836	0,044	0,867	0,052	0,809	0,064
28	2160	0,787	0,016	0,846	0,039	0,878	0,069	0,805	0,065
29	2240	0,782	0,020	0,856	0,027	0,902	0,073	0,800	0,060
30	2320	0,783	0,025	0,861	0,035	0,902	0,086	0,818	0,064

Tabla D.8: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para MO1.

N°de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona		Tioanisol		Fenilalanina		Ciclohexanona	
		Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ
1	0	0,865	0,011	0,853	0,019	0,847	0,017	0,926	0,141
2	80	0,870	0,005	0,852	0,015	0,847	0,020	0,944	0,168
3	160	0,873	0,008	0,857	0,011	0,849	0,017	0,899	0,085
4	240	0,867	0,007	0,856	0,011	0,845	0,015	0,894	0,083
5	320	0,865	0,009	0,855	0,008	0,844	0,015	0,898	0,079
6	400	0,862	0,012	0,852	0,018	0,843	0,015	0,896	0,077
7	480	0,865	0,015	0,850	0,015	0,848	0,007	0,897	0,084
8	560	0,859	0,014	0,848	0,011	0,847	0,018	0,889	0,074
9	640	0,858	0,016	0,854	0,011	0,854	0,035	0,896	0,070
10	720	0,859	0,021	0,857	0,008	0,848	0,022	0,887	0,079
11	800	0,851	0,016	0,853	0,007	0,853	0,027	0,886	0,081
12	880	0,849	0,013	0,844	0,007	0,842	0,017	0,881	0,080
13	960	0,850	0,016	0,850	0,007	0,840	0,011	0,881	0,083
14	1040	0,848	0,021	0,855	0,009	0,841	0,009	0,883	0,081
15	1120	0,843	0,015	0,840	0,003	0,837	0,010	0,884	0,077
16	1200	0,838	0,013	0,835	0,011	0,831	0,008	0,882	0,074
17	1280	0,839	0,017	0,838	0,023	0,829	0,009	0,885	0,072
18	1360	0,849	0,014	0,838	0,015	0,830	0,009	0,895	0,065
19	1440	0,839	0,008	0,832	0,016	0,830	0,010	0,890	0,069
20	1520	0,833	0,014	0,828	0,012	0,824	0,015	0,886	0,068
21	1600	0,830	0,012	0,821	0,014	0,822	0,013	0,880	0,073
22	1680	0,827	0,016	0,822	0,014	0,818	0,016	0,870	0,077
23	1760	0,823	0,012	0,820	0,015	0,819	0,014	0,868	0,076
24	1840	0,821	0,015	0,822	0,013	0,816	0,014	0,870	0,076
25	1920	0,824	0,017	0,825	0,020	0,812	0,013	0,866	0,088
26	2000	0,818	0,014	0,821	0,019	0,810	0,012	0,859	0,086
27	2080	0,817	0,014	0,811	0,017	0,808	0,013	0,860	0,085
28	2160	0,816	0,017	0,812	0,022	0,810	0,021	0,857	0,080
29	2240	0,807	0,012	0,813	0,028	0,804	0,013	0,872	0,067
30	2320	0,802	0,013	0,808	0,020	0,805	0,014	0,876	0,064

Tabla D.9: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH con diferentes sustratos para G35A_MO.

N° de medición	Tiempo [s]	Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona		Tioanisol		Fenilalanina		Ciclohexanona	
		Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ	Absorbancia promedio	σ
1	0	0,823	0,006	0,839	0,023	0,835	0,027	0,860	0,051
2	80	0,826	0,003	0,843	0,019	0,840	0,019	0,860	0,047
3	160	0,823	0,001	0,837	0,018	0,839	0,020	0,860	0,051
4	240	0,817	0,000	0,836	0,027	0,835	0,019	0,876	0,078
5	320	0,816	0,003	0,831	0,021	0,833	0,020	0,875	0,085
6	400	0,814	0,005	0,830	0,020	0,831	0,021	0,869	0,073
7	480	0,810	0,001	0,829	0,020	0,830	0,021	0,866	0,065
8	560	0,805	0,001	0,828	0,025	0,828	0,022	0,864	0,075
9	640	0,802	0,006	0,826	0,019	0,822	0,020	0,856	0,062
10	720	0,803	0,005	0,819	0,019	0,824	0,017	0,846	0,041
11	800	0,808	0,001	0,814	0,018	0,816	0,016	0,843	0,045
12	880	0,800	0,004	0,808	0,018	0,816	0,017	0,838	0,039
13	960	0,797	0,001	0,806	0,015	0,820	0,025	0,835	0,038
14	1040	0,800	0,004	0,804	0,014	0,815	0,017	0,831	0,038
15	1120	0,800	0,011	0,801	0,013	0,813	0,016	0,832	0,036
16	1200	0,786	0,000	0,796	0,013	0,809	0,016	0,823	0,037
17	1280	0,793	0,009	0,801	0,014	0,815	0,028	0,822	0,041
18	1360	0,795	0,018	0,803	0,012	0,799	0,025	0,818	0,041
19	1440	0,784	0,005	0,790	0,009	0,797	0,021	0,817	0,041
20	1520	0,774	0,006	0,787	0,011	0,795	0,017	0,817	0,046
21	1600	0,785	0,019	0,779	0,011	0,795	0,015	0,810	0,040
22	1680	0,790	0,018	0,779	0,007	0,792	0,012	0,805	0,040
23	1760	0,776	0,025	0,782	0,003	0,789	0,015	0,803	0,040
24	1840	0,765	0,023	0,780	0,007	0,787	0,015	0,801	0,040
25	1920	0,759	0,016	0,775	0,012	0,780	0,013	0,802	0,041
26	2000	0,751	0,011	0,771	0,009	0,769	0,015	0,794	0,041
27	2080	0,748	0,009	0,771	0,015	0,766	0,015	0,792	0,042
28	2160	0,754	0,033	0,769	0,004	0,765	0,012	0,792	0,045
29	2240	0,748	0,001	0,766	0,009	0,763	0,014	0,790	0,041
30	2320	0,738	0,004	0,762	0,027	0,758	0,014	0,790	0,040

Además, a partir de la absorbancia promedio, se calcula la concentración de NADPH durante el ensayo para cada enzima. Los resultados obtenidos se detallan desde la Tabla D.10 a la Tabla D.13; mientras que un ejemplo de cálculo de cómo fueron obtenidos estos resultados se presenta en el Anexo E.3.

Tabla D.10: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para G35A_MO_SUMO.

N° de medición	Tiempo [s]	NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]	
		Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	σ	Tioanisol	σ	Fenilalanina	σ	Ciclohexanona	σ
1	0	0,250	0,007	0,263	0,007	0,263	0,009	0,267	0,006
2	80	0,245	0,007	0,262	0,008	0,263	0,009	0,267	0,005
3	160	0,240	0,006	0,260	0,008	0,262	0,009	0,266	0,003
4	240	0,236	0,006	0,259	0,008	0,262	0,008	0,264	0,004
5	320	0,231	0,005	0,257	0,008	0,261	0,009	0,262	0,006
6	400	0,227	0,005	0,258	0,008	0,258	0,009	0,260	0,006
7	480	0,222	0,005	0,255	0,008	0,257	0,008	0,260	0,006
8	560	0,218	0,006	0,253	0,007	0,256	0,008	0,257	0,006
9	640	0,211	0,003	0,252	0,007	0,254	0,008	0,256	0,006
10	720	0,206	0,002	0,251	0,008	0,253	0,008	0,254	0,006
11	800	0,202	0,003	0,249	0,007	0,252	0,007	0,252	0,007
12	880	0,197	0,003	0,247	0,007	0,250	0,007	0,250	0,006
13	960	0,194	0,005	0,245	0,007	0,248	0,008	0,249	0,006
14	1040	0,187	0,002	0,244	0,007	0,246	0,008	0,248	0,007
15	1120	0,183	0,002	0,242	0,006	0,245	0,008	0,245	0,006
16	1200	0,177	0,003	0,240	0,006	0,243	0,008	0,242	0,005
17	1280	0,175	0,003	0,239	0,004	0,241	0,008	0,243	0,005
18	1360	0,169	0,002	0,240	0,009	0,240	0,008	0,240	0,006
19	1440	0,165	0,003	0,235	0,006	0,238	0,008	0,238	0,007
20	1520	0,161	0,003	0,232	0,006	0,236	0,009	0,236	0,006
21	1600	0,158	0,002	0,230	0,006	0,235	0,008	0,234	0,006
22	1680	0,152	0,002	0,229	0,006	0,232	0,009	0,233	0,006
23	1760	0,148	0,003	0,227	0,007	0,231	0,009	0,232	0,006
24	1840	0,144	0,002	0,225	0,006	0,230	0,009	0,231	0,005
25	1920	0,141	0,003	0,224	0,007	0,228	0,008	0,230	0,004
26	2000	0,136	0,002	0,222	0,006	0,227	0,008	0,228	0,003
27	2080	0,133	0,002	0,221	0,006	0,225	0,009	0,226	0,003
28	2160	0,128	0,002	0,218	0,006	0,223	0,008	0,224	0,003
29	2240	0,125	0,002	0,217	0,006	0,221	0,008	0,222	0,003
30	2320	0,122	0,002	0,215	0,005	0,220	0,009	0,219	0,005

Tabla D.11: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para MO4.

N° de medición	Tiempo [s]	NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]	
		Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	σ	Tioanisol	σ	Fenilalanina	σ	Ciclohexanona	σ
1	0	0,260	0,002	0,260	0,006	0,260	0,004	0,259	0,006
2	80	0,261	0,001	0,261	0,008	0,262	0,006	0,259	0,005
3	160	0,260	0,002	0,260	0,005	0,261	0,007	0,258	0,006
4	240	0,259	0,003	0,258	0,005	0,258	0,005	0,256	0,005
5	320	0,258	0,001	0,258	0,004	0,259	0,004	0,255	0,005
6	400	0,256	0,001	0,260	0,003	0,258	0,006	0,255	0,005
7	480	0,255	0,001	0,258	0,006	0,258	0,007	0,257	0,007
8	560	0,256	0,001	0,259	0,007	0,259	0,006	0,257	0,005
9	640	0,255	0,001	0,259	0,010	0,257	0,006	0,258	0,005
10	720	0,254	0,001	0,260	0,011	0,257	0,006	0,260	0,006
11	800	0,256	0,002	0,256	0,007	0,257	0,010	0,257	0,007
12	880	0,253	0,003	0,256	0,008	0,256	0,006	0,255	0,004
13	960	0,253	0,001	0,255	0,007	0,257	0,006	0,253	0,003
14	1040	0,252	0,000	0,254	0,009	0,257	0,005	0,252	0,002
15	1120	0,257	0,009	0,254	0,008	0,255	0,005	0,252	0,004
16	1200	0,251	0,003	0,252	0,006	0,252	0,005	0,250	0,004
17	1280	0,250	0,003	0,254	0,006	0,252	0,005	0,249	0,005
18	1360	0,249	0,002	0,255	0,007	0,254	0,008	0,250	0,005
19	1440	0,248	0,003	0,256	0,009	0,257	0,009	0,250	0,008
20	1520	0,249	0,007	0,260	0,010	0,257	0,006	0,250	0,008
21	1600	0,252	0,011	0,261	0,010	0,257	0,006	0,248	0,007
22	1680	0,250	0,007	0,263	0,009	0,258	0,008	0,248	0,006
23	1760	0,248	0,007	0,264	0,010	0,256	0,010	0,246	0,006
24	1840	0,250	0,007	0,257	0,014	0,260	0,009	0,247	0,011
25	1920	0,248	0,007	0,257	0,011	0,264	0,013	0,253	0,018
26	2000	0,247	0,004	0,255	0,007	0,264	0,016	0,253	0,023
27	2080	0,245	0,005	0,258	0,014	0,268	0,016	0,250	0,020
28	2160	0,243	0,005	0,261	0,012	0,271	0,021	0,249	0,020
29	2240	0,242	0,006	0,265	0,008	0,279	0,023	0,247	0,019
30	2320	0,242	0,008	0,266	0,011	0,279	0,027	0,253	0,020

Tabla D.12: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para MO1.

N° de medición	Tiempo [s]	NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]	
		Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	σ	Tioanisol	σ	Fenilalanina	σ	Ciclohexanona	σ
1	0	0,267	0,003	0,264	0,006	0,262	0,005	0,286	0,044
2	80	0,269	0,002	0,264	0,005	0,262	0,006	0,292	0,052
3	160	0,270	0,002	0,265	0,003	0,262	0,005	0,278	0,026
4	240	0,268	0,002	0,265	0,003	0,261	0,005	0,276	0,026
5	320	0,267	0,003	0,264	0,002	0,261	0,005	0,278	0,024
6	400	0,267	0,004	0,263	0,006	0,261	0,005	0,277	0,024
7	480	0,267	0,005	0,263	0,005	0,262	0,002	0,277	0,026
8	560	0,266	0,004	0,262	0,003	0,262	0,006	0,275	0,023
9	640	0,265	0,005	0,264	0,003	0,264	0,011	0,277	0,022
10	720	0,265	0,006	0,265	0,002	0,262	0,007	0,274	0,024
11	800	0,263	0,005	0,264	0,002	0,264	0,008	0,274	0,025
12	880	0,262	0,004	0,261	0,002	0,260	0,005	0,272	0,025
13	960	0,263	0,005	0,263	0,002	0,260	0,003	0,272	0,026
14	1040	0,262	0,006	0,264	0,003	0,260	0,003	0,273	0,025
15	1120	0,261	0,005	0,260	0,001	0,259	0,003	0,273	0,024
16	1200	0,259	0,004	0,258	0,003	0,257	0,002	0,273	0,023
17	1280	0,259	0,005	0,259	0,007	0,256	0,003	0,274	0,022
18	1360	0,262	0,004	0,259	0,005	0,257	0,003	0,277	0,020
19	1440	0,260	0,002	0,257	0,005	0,257	0,003	0,275	0,021
20	1520	0,258	0,004	0,256	0,004	0,255	0,005	0,274	0,021
21	1600	0,257	0,004	0,254	0,004	0,254	0,004	0,272	0,023
22	1680	0,256	0,005	0,254	0,004	0,253	0,005	0,269	0,024
23	1760	0,254	0,004	0,254	0,005	0,253	0,004	0,268	0,023
24	1840	0,254	0,005	0,254	0,004	0,252	0,004	0,269	0,023
25	1920	0,255	0,005	0,255	0,006	0,251	0,004	0,268	0,027
26	2000	0,253	0,004	0,254	0,006	0,250	0,004	0,265	0,027
27	2080	0,253	0,004	0,251	0,005	0,250	0,004	0,266	0,026
28	2160	0,252	0,005	0,251	0,007	0,250	0,006	0,265	0,025
29	2240	0,250	0,004	0,251	0,009	0,248	0,004	0,269	0,021
30	2320	0,248	0,004	0,250	0,006	0,249	0,004	0,271	0,020

Tabla D.13: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos para G35A_MO.

N° de medición	Tiempo [s]	NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]		NADPH [mM]	
		Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	σ	Tioanisol	σ	Fenilalanina	σ	Ciclohexanona	σ
1	0	0,254	0,002	0,259	0,007	0,258	0,008	0,266	0,016
2	80	0,255	0,001	0,261	0,006	0,260	0,006	0,266	0,015
3	160	0,254	0,000	0,259	0,006	0,260	0,006	0,266	0,016
4	240	0,253	0,000	0,259	0,008	0,258	0,006	0,271	0,024
5	320	0,252	0,001	0,257	0,007	0,257	0,006	0,271	0,026
6	400	0,252	0,002	0,257	0,006	0,257	0,006	0,269	0,023
7	480	0,250	0,000	0,256	0,006	0,257	0,006	0,268	0,020
8	560	0,249	0,000	0,256	0,008	0,256	0,007	0,267	0,023
9	640	0,248	0,002	0,255	0,006	0,254	0,006	0,265	0,019
10	720	0,248	0,002	0,253	0,006	0,255	0,005	0,262	0,013
11	800	0,250	0,000	0,252	0,006	0,252	0,005	0,261	0,014
12	880	0,247	0,001	0,250	0,006	0,252	0,005	0,259	0,012
13	960	0,246	0,000	0,249	0,005	0,253	0,008	0,258	0,012
14	1040	0,247	0,001	0,249	0,004	0,252	0,005	0,257	0,012
15	1120	0,247	0,003	0,248	0,004	0,251	0,005	0,257	0,011
16	1200	0,243	0,000	0,246	0,004	0,250	0,005	0,255	0,011
17	1280	0,245	0,003	0,248	0,004	0,252	0,009	0,254	0,013
18	1360	0,246	0,006	0,248	0,004	0,247	0,008	0,253	0,013
19	1440	0,242	0,002	0,244	0,003	0,247	0,006	0,253	0,013
20	1520	0,239	0,002	0,243	0,003	0,246	0,005	0,252	0,014
21	1600	0,243	0,006	0,241	0,003	0,246	0,005	0,250	0,012
22	1680	0,244	0,006	0,241	0,002	0,245	0,004	0,249	0,012
23	1760	0,240	0,008	0,242	0,001	0,244	0,005	0,248	0,012
24	1840	0,237	0,007	0,241	0,002	0,243	0,005	0,248	0,012
25	1920	0,235	0,005	0,240	0,004	0,241	0,004	0,248	0,013
26	2000	0,232	0,003	0,238	0,003	0,238	0,005	0,246	0,013
27	2080	0,231	0,003	0,238	0,005	0,237	0,005	0,245	0,013
28	2160	0,233	0,010	0,238	0,001	0,237	0,004	0,245	0,014
29	2240	0,231	0,000	0,237	0,003	0,236	0,004	0,244	0,013
30	2320	0,228	0,001	0,235	0,008	0,234	0,004	0,244	0,012

Finalmente, en la Tabla D.14 se presentan los valores de absorbancia de los triplicados, junto con el valor de la absorbancia promedio (con su desviación estándar) y la concentración de NADPH en el tiempo para el control.

Tabla D.14: Valores de absorbancia y concentración de NADPH para el control en los ensayos de actividad con todas las enzimas del estudio.

Nº de medición	Tiempo [s]	Absorbancia 340 nm			Absorbancia promedio	σ	NADPH [mM]	σ
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3				
1	0	0,885	0,89	0,878	0,884	0,006	0,273	0,002
2	80	0,888	0,89	0,883	0,887	0,004	0,274	0,001
3	160	0,888	0,891	0,882	0,887	0,005	0,274	0,001
4	240	0,888	0,889	0,88	0,886	0,005	0,274	0,002
5	320	0,889	0,888	0,88	0,886	0,005	0,274	0,002
6	400	0,888	0,889	0,879	0,885	0,006	0,274	0,002
7	480	0,889	0,887	0,881	0,886	0,004	0,274	0,001
8	560	0,887	0,886	0,879	0,884	0,004	0,273	0,001
9	640	0,886	0,886	0,875	0,882	0,006	0,273	0,002
10	720	0,887	0,884	0,876	0,882	0,006	0,273	0,002
11	800	0,888	0,884	0,875	0,882	0,007	0,273	0,002
12	880	0,885	0,882	0,875	0,881	0,005	0,272	0,002
13	960	0,884	0,881	0,874	0,880	0,005	0,272	0,002
14	1040	0,884	0,879	0,872	0,878	0,006	0,272	0,002
15	1120	0,884	0,881	0,873	0,879	0,006	0,272	0,002
16	1200	0,881	0,878	0,87	0,876	0,006	0,271	0,002
17	1280	0,881	0,879	0,87	0,877	0,006	0,271	0,002
18	1360	0,881	0,877	0,868	0,875	0,007	0,271	0,002
19	1440	0,881	0,874	0,868	0,874	0,007	0,270	0,002
20	1520	0,879	0,875	0,867	0,874	0,006	0,270	0,002
21	1600	0,877	0,872	0,866	0,872	0,006	0,269	0,002
22	1680	0,876	0,872	0,864	0,871	0,006	0,269	0,002
23	1760	0,875	0,87	0,864	0,870	0,006	0,269	0,002
24	1840	0,877	0,871	0,862	0,870	0,008	0,269	0,002
25	1920	0,875	0,871	0,864	0,870	0,006	0,269	0,002
26	2000	0,875	0,869	0,861	0,868	0,007	0,268	0,002
27	2080	0,872	0,869	0,861	0,867	0,006	0,268	0,002
28	2160	0,871	0,864	0,858	0,864	0,007	0,267	0,002
29	2240	0,869	0,865	0,858	0,864	0,006	0,267	0,002
30	2320	0,868	0,864	0,856	0,863	0,006	0,267	0,002

A continuación, se presentan los perfiles de consumo de NADPH (desde la Figura D.1 a la Figura D.4) a través del tiempo obtenidos para cada una de las enzimas con los sustratos escogidos, empleando un ensayo de espectrofotometría a 340 nm, mediante una medición indirecta de la actividad.

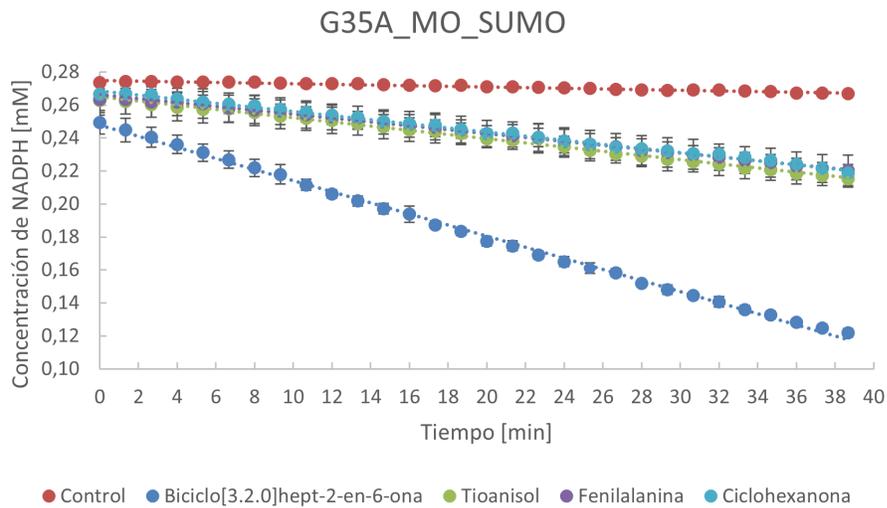


Figura D.1: Perfiles de consumo de NADPH de G35A_MO_SUMO con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

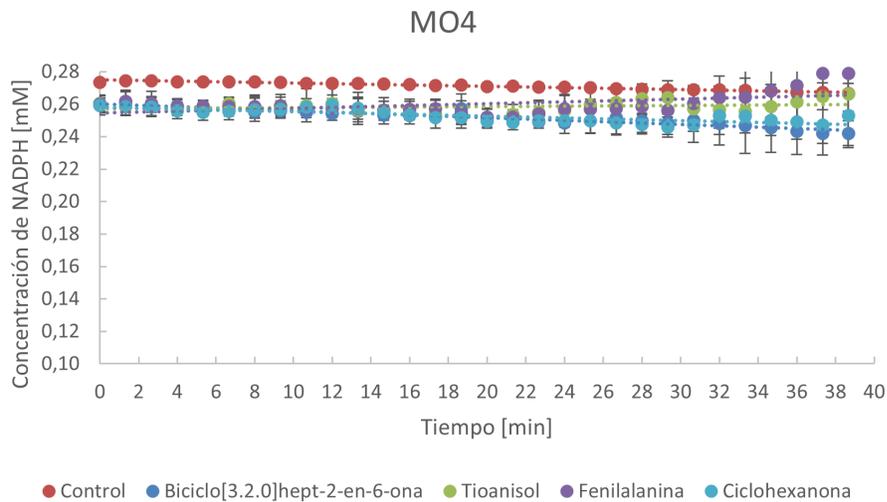


Figura D.2: Perfiles de consumo de NADPH de MO4 con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

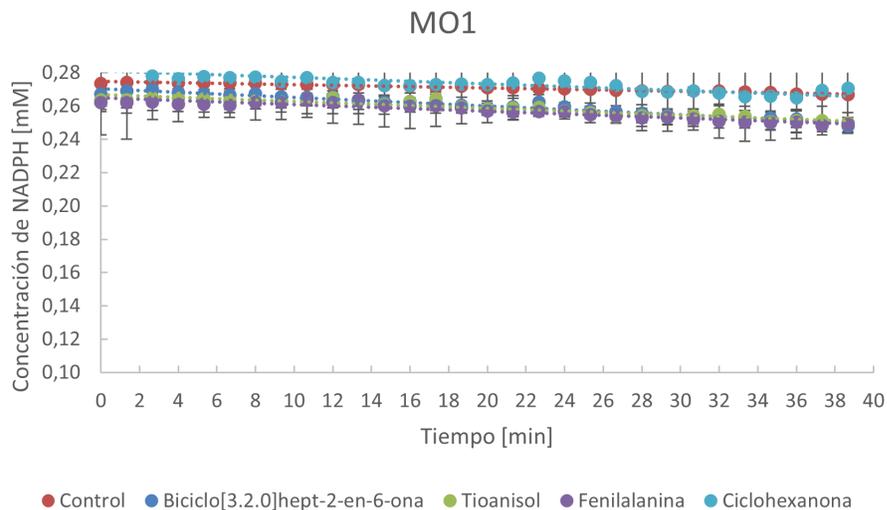


Figura D.3: Perfiles de consumo de NADPH de MO1 con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+)..

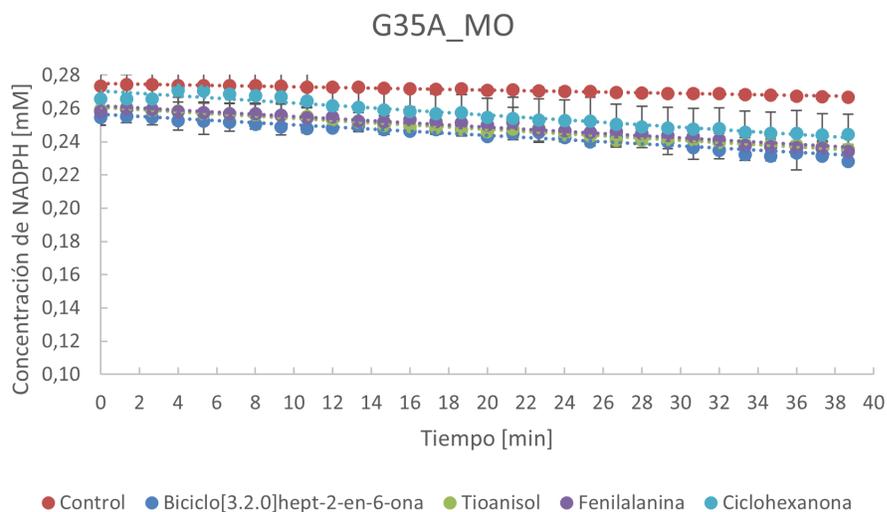


Figura D.4: Perfiles de consumo de NADPH de G35A_MO con distintos sustratos obtenida de extracto clarificado proveniente de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+).

D.2.2. Velocidad de consumo de NADPH

A partir de los datos de concentración de NADPH en el tiempo obtenidos en los ensayos realizados con todas las proteínas del estudio, se determinan los valores de la velocidad de consumo de NADPH en unidades de mM/min. Dichos valores se resumen en la Tabla D.15. Un ejemplo de cálculo de velocidad de consumo de NADPH se encuentra en el Anexo E.3.

Tabla D.15: Velocidades de consumo de NADPH en mM/min para todas las enzimas del trabajo de título.

Velocidad de consumo de NADPH [mM/min]			
G35A_MO_SUMO			
Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	Tioanisol	Fenilalanina	Ciclohexanona
0,0035	0,0007	0,0007	0,0009
MO4			
Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	Tioanisol	Fenilalanina	Ciclohexanona
0,0006	0,0005	0,0002	0,0006
MO1			
Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	Tioanisol	Fenilalanina	Ciclohexanona
0,0001	0,0001	0,0002	0,0014
G35A_MO			
Biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona	Tioanisol	Fenilalanina	Ciclohexanona
0,0004	0,0004	0,0002	0,0004

D.2.2.1. Determinación de la concentración de proteínas totales

A continuación, se presentan los valores de absorbancia a 565 nm obtenidos para el ensayo de cuantificación de proteínas totales para todas las enzimas del estudio utilizando el método de Bradford. Junto con lo anterior, se presenta la absorbancia promedio (junto con su desviación estándar) y dicha absorbancia sin la absorbancia promedio del blanco, que en este caso correspondió a 0,191; tal como fue reportado en la Tabla C.2 del Anexo C.1.

Tabla D.16: Resultados de absorbancia a 565 nm obtenidos a partir del ensayo de cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para los cultivos de E.coli NiCo21 (DE3) pET22b(+) con la expresión de todas las proteínas del estudio tras la inducción con IPTG.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	σ	Absorbancia promedio sin blanco
G35A_MO_SUMO	0,351	0,360	0,357	0,356	0,005	0,165
MO4	0,370	0,384	0,391	0,382	0,011	0,191
MO1	0,362	0,364	0,358	0,361	0,003	0,170
G35A_MO	0,400	0,415	0,411	0,409	0,008	0,218

Con esto, la curva de calibración mostrada en la Figura C.1 y la Ecuación E.2 del anexo ya mencionado, se calcula la concentración de proteínas totales para cada caso, dando como resultado una concentración de 0,293 [mg/mL], 0,337 [mg/mL], 0,302 [mg/mL] y 0,384 [mg/mL] para G35A_MO_SUMO, MO4, MO1 y G35A_MO, respectivamente.

D.2.3. Ensayos de actividad enzimática para G35A_MO_SUMO expresada en el sistema *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+)

D.2.3.1. Valores de absorbancia y concentración de NADPH con inducción temprana

En la siguiente tabla se muestra el detalle de los valores de absorbancia para los triplicados de cada cultivo durante los ensayos de actividad enzimática utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato, tras la expresión en fase temprana de crecimiento celular. También, se incluye el detalle de los valores obtenidos para los ensayos sin IPTG, donde el control 1 representa la muestra tomada en el tiempo cero de inducción, mientras que el control 2 corresponde a la muestra tomada en el momento de la cosecha. Cabe destacar que ambos controles se definieron con el objetivo de dilucidar si existe actividad basal de la proteína sin inductor en diferentes momentos del cultivo.

Tabla D.17: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.

N° de medición	Tiempo [s]	Control 1			Control 2			Cultivo 1			Cultivo 2			Cultivo 3		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0.500	0.507	0.509	0.475	0.524	0.554	0.328	0.383	0.381	0.414	0.461	0.413	0.486	0.547	0.446
2	80	0.491	0.506	0.501	0.462	0.500	0.529	0.273	0.315	0.302	0.353	0.437	0.347	0.424	0.559	0.388
3	160	0.494	0.501	0.498	0.455	0.486	0.511	0.226	0.271	0.244	0.304	0.303	0.288	0.370	0.480	0.335
4	240	0.495	0.498	0.494	0.441	0.474	0.498	0.187	0.226	0.197	0.266	0.248	0.237	0.320	0.313	0.290
5	320	0.496	0.503	0.494	0.427	0.462	0.484	0.157	0.192	0.166	0.228	0.201	0.193	0.274	0.274	0.245
6	400	0.492	0.496	0.490	0.412	0.451	0.471	0.139	0.170	0.146	0.194	0.165	0.159	0.231	0.237	0.207

Con esto se calculan los valores de absorbancia promedio, cuyo detalle se muestra a continuación (junto con su respectiva desviación estándar):

Tabla D.18: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.

N° de medición	Tiempo de ensayo [s]	Absorbancia promedio Control 1	σ	Absorbancia promedio Control 2	σ	Absorbancia promedio Cultivo 1	σ	Absorbancia promedio Cultivo 2	σ	Absorbancia promedio Cultivo 3	σ
1	0	0.505	0.005	0.518	0.040	0.364	0.031	0.429	0.027	0.493	0.051
2	80	0.499	0.008	0.497	0.034	0.297	0.022	0.379	0.050	0.457	0.090
3	160	0.498	0.004	0.484	0.028	0.247	0.023	0.298	0.009	0.395	0.076
4	240	0.496	0.002	0.471	0.029	0.203	0.020	0.250	0.015	0.308	0.016
5	320	0.498	0.005	0.458	0.029	0.172	0.018	0.207	0.018	0.264	0.017
6	400	0.493	0.003	0.445	0.030	0.152	0.016	0.173	0.019	0.225	0.016

Además, a partir de la absorbancia promedio, se calcula la concentración de NADPH durante el ensayo. Un ejemplo de cálculo de cómo fueron obtenidos estos resultados se presenta en el Anexo E.3.

Tabla D.19: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática luego de realizada la inducción con IPTG en fase temprana de crecimiento.

N° de medición	Tiempo de ensayo [s]	NADPH [mM] Control 1	σ	NADPH [mM] Control 2	σ	NADPH [mM] Cultivo 1	σ	NADPH [mM] Cultivo 2	σ	NADPH [mM] Cultivo 3	σ
1	0	0.156	0.001	0.160	0.012	0.113	0.010	0.133	0.008	0.152	0.016
2	80	0.154	0.002	0.154	0.010	0.092	0.007	0.117	0.016	0.141	0.028
3	160	0.154	0.001	0.150	0.009	0.076	0.007	0.092	0.003	0.122	0.023
4	240	0.153	0.001	0.146	0.009	0.063	0.006	0.077	0.005	0.095	0.005
5	320	0.154	0.001	0.141	0.009	0.053	0.006	0.064	0.006	0.082	0.005
6	400	0.152	0.001	0.137	0.009	0.047	0.005	0.053	0.006	0.070	0.005

A continuación, se presentan los perfiles de desaparición de NADPH a través del tiempo para los tres cultivos experimentales en la fase de inducción temprana utilizando como sistema de expresión *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+). Junto con ello, se incluyen los perfiles de los controles tanto en el tiempo cero de inducción (Control 1) como en el momento de la cosecha (Control 2).

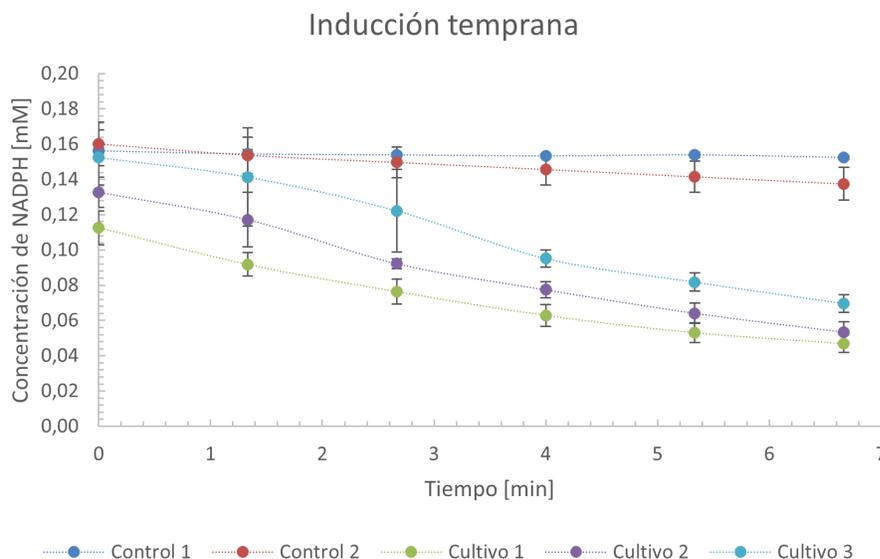


Figura D.5: Perfil de consumo de NADPH para las mediciones de actividad enzimática de G35A_MO_SUMO en extracto clarificado proveniente de *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) inducido en fase temprana, utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato.

D.2.3.2. Valores de absorbancia y concentración de NADPH con inducción tardía

En la siguiente sección, se detallan los resultados de absorbancia obtenidos durante los ensayos de actividad con biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato para la catálisis enzimática de G35A_MO_SUMO expresada en *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) en fase tardía de crecimiento celular. Junto con ello, se presentan los valores de absorbancia para los controles (cultivos sin IPTG), los cuales corresponden a la muestra tomada en el tiempo cero de inducción (Control 1) y a la muestra tomada en el momento de la cosecha (Control 2).

Tabla D.20: Medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.

Nº de medición	Tiempo [s]	Control 1			Control 2			Cultivo 1			Cultivo 2			Cultivo 3		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0	0,429	0,475	0,449	0,546	0,602	0,524	0,383	0,463	0,39	0,455	0,748	0,763	0,768	0,797	0,536
2	80	0,427	0,491	0,438	0,528	0,63	0,495	0,301	0,413	0,293	0,391	0,662	0,657	0,701	0,719	0,347
3	160	0,425	0,441	0,43	0,513	0,587	0,479	0,239	0,353	0,216	0,255	0,598	0,556	0,62	0,649	0,271
4	240	0,417	0,415	0,421	0,499	0,491	0,463	0,19	0,205	0,156	0,197	0,541	0,307	0,447	0,582	0,2
5	320	0,408	0,406	0,414	0,488	0,478	0,45	0,15	0,146	0,123	0,159	0,485	0,166	0,218	0,495	0,144
6	400	0,403	0,398	0,404	0,477	0,466	0,439	0,127	0,122	0,119	0,137	0,357	0,142	0,16	0,265	0,11

A partir de estos valores, se calcula la absorbancia promedio de las réplicas, cuyos valores

se presentan a continuación junto a sus desviaciones estándar correspondientes:

Tabla D.21: Promedios de la medición de absorbancia a 340 nm en ensayo de consumo de NADPH luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.

Nº de medición	Tiempo de ensayo [s]	Absorbancia promedio Control 1	σ	Absorbancia promedio Control 2	σ	Absorbancia promedio Cultivo 1	σ	Absorbancia promedio Cultivo 2	σ	Absorbancia promedio Cultivo 3	σ
1	0	0,451	0,023	0,557	0,040	0,412	0,044	0,655	0,174	0,700	0,143
2	80	0,452	0,034	0,551	0,070	0,336	0,067	0,570	0,155	0,589	0,210
3	160	0,432	0,008	0,526	0,055	0,269	0,073	0,470	0,187	0,513	0,210
4	240	0,418	0,003	0,484	0,019	0,184	0,025	0,348	0,176	0,410	0,194
5	320	0,409	0,004	0,472	0,020	0,140	0,015	0,270	0,186	0,286	0,185
6	400	0,402	0,003	0,461	0,020	0,123	0,004	0,212	0,126	0,178	0,079

Con estos resultados, se determina la concentración de NADPH en todos los tiempos del ensayo. Un ejemplo de cálculo de cómo fueron obtenidos estos datos se presenta en el Anexo E.3.

Tabla D.22: Valores de concentración de NADPH obtenidos en los ensayos de actividad enzimática luego de realizada la inducción con IPTG en fase tardía de crecimiento.

Nº de medición	Tiempo de ensayo [s]	NADPH [mM] Control 1	σ	NADPH [mM] Control 2	σ	NADPH [mM] Cultivo 1	σ	NADPH [mM] Cultivo 2	σ	NADPH [mM] Cultivo 3	σ
1	0	0,139	0,007	0,172	0,012	0,127	0,014	0,203	0,054	0,217	0,044
2	80	0,140	0,011	0,170	0,022	0,104	0,021	0,176	0,048	0,182	0,065
3	160	0,134	0,003	0,163	0,017	0,083	0,023	0,145	0,058	0,159	0,065
4	240	0,129	0,001	0,150	0,006	0,057	0,008	0,108	0,054	0,127	0,060
5	320	0,127	0,001	0,146	0,006	0,043	0,005	0,083	0,058	0,088	0,057
6	400	0,124	0,001	0,142	0,006	0,038	0,001	0,066	0,039	0,055	0,024

A continuación, se presentan los perfiles de desaparición de NADPH a través del tiempo para los tres cultivos experimentales en la fase de inducción tardía utilizando como sistema de expresión *E. coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+). Junto con ello, se incluyen los perfiles de los controles tanto en el tiempo cero de inducción (Control 1) como en el momento de la cosecha (Control 2).

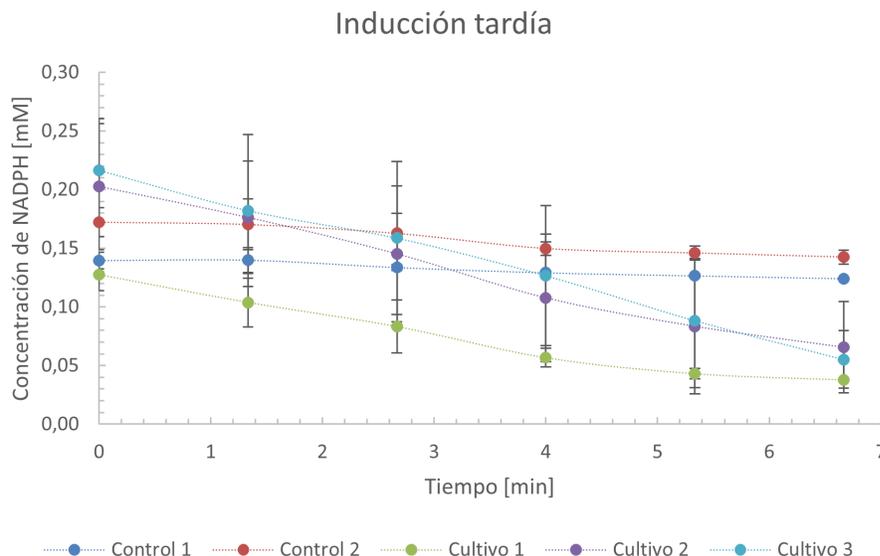


Figura D.6: Perfil de consumo de NADPH para las mediciones de actividad enzimática de G35A_MO_SUMO en extracto clarificado proveniente de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) inducido en fase tardía, utilizando biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona como sustrato.

D.2.3.3. Velocidad de consumo de NADPH

A partir de los datos de concentración de NADPH en el tiempo obtenidos en los ensayos realizados con las proteínas expresadas en las dos fases de crecimiento seleccionadas, se determinan los valores de la velocidad de consumo de NADPH en unidades de mM/min para cada uno de los cultivos que se emplearon en el experimento, agregando el promedio y desviación estándar entre estas. Dichos valores se resumen en la Tabla D.23. Un ejemplo de cálculo de velocidad de consumo de NADPH se encuentra en el Anexo E.3.

Tabla D.23: Velocidades de consumo de NADPH en mM/min para los cultivos inducidos en las dos fases de crecimiento seleccionadas.

Velocidad de consumo de NADPH [mM/min]									
Inducción Temprana					Inducción Tardía				
Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio	σ	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio	σ
0,010	0,012	0,012	0,011	0,001	0,013	0,021	0,024	0,019	0,005

D.2.3.4. Determinación de la concentración de proteínas totales

En la tabla que sigue se muestran los valores de absorbancia a 565 nm obtenidos para el ensayo de cuantificación de proteínas totales en ambas condiciones de expresión (inducción temprana y tardía) utilizando el método de Bradford. En dicha tabla se observan las absorbancias de cada réplica más la absorbancia promedio, junto con su respectiva desviación estándar. Finalmente, se presenta el valor de absorbancia promedio descontándole la absorbancia promedio del blanco, la cual en este caso fue de 0,434 tal como se muestra en la Tabla C.4 del Anexo C.2.

Tabla D.24: Resultados de absorbancia a 565 nm obtenidos a partir del ensayo de cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para la proteína G35A_MO_SUMO expresada en los cultivos de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) tras la inducción con IPTG.

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	σ	Absorbancia promedio sin blanco
Inducción temprana	Control 1	0,415	0,43	0,583	0,476	0,093	0,042
	Control 2	0,620	0,678	0,583	0,627	0,048	0,193
	Cultivo 1	0,610	0,644	0,64	0,631	0,019	0,198
	Cultivo 2	0,576	0,582	0,547	0,568	0,019	0,135
	Cultivo 3	0,678	0,630	0,611	0,640	0,035	0,206
Inducción tardía	Control 1	0,430	0,522	0,468	0,473	0,046	0,040
	Control 2	0,508	0,672	0,526	0,569	0,090	0,135
	Cultivo 1	0,491	0,567	0,421	0,493	0,073	0,059
	Cultivo 2	0,415	0,446	0,708	0,523	0,161	0,089
	Cultivo 3	0,635	0,563	0,456	0,551	0,090	0,118

Con esto, la curva de calibración mostrada en la Figura C.2 y la Ecuación C.2 del anexo ya mencionado, se calcula la concentración de proteínas totales para cada caso. Cabe destacar que en todos los casos (a excepción de lo obtenido para el control 1 de la inducción temprana) se multiplicó por dos la absorbancia promedio sin blanco para obtener la cantidad de proteínas totales con la Ecuación C.2, puesto que todas estas muestras fueron diluidas a la mitad.

Tabla D.25: Resultados de concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford, para los cultivos de *E.coli* NiCo21 (DE3) pET22b(+) con la expresión de la proteína G35A_MO_SUMO tras la inducción con IPTG.

		Concentración proteínas [mg/mL]
Inducción temprana	Control 1	0,125
	Control 2	1,176
	Cultivo 1	1,202
	Cultivo 2	0,818
	Cultivo 3	1,253
Inducción tardía	Control 1	0,238
	Control 2	0,820
	Cultivo 1	0,358
	Cultivo 2	0,541
	Cultivo 3	0,714

Anexo E. Memoria de cálculo

E.1. Solución de ampicilina

Para ejemplificar cómo fue calculado el volumen necesario de la solución stock de ampicilina para los diferentes ensayos del estudio, se utilizará el calculo de volumen necesario de este antibiótico para la preparación de un preinóculo. Para ello, se utilizará la siguiente ecuación:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (\text{E.1})$$

De esta manera, se despeja el volumen de ampicilina considerando que la concentración de su solución stock es de 50 mg/mL, la concentración de trabajo en cultivos es 100 mg/L y que se tiene un volumen de medio de 10 mL.

$$50 \left[\frac{mg}{mL} \right] \cdot V_{ampicilina} = 100 \left[\frac{mg}{L} \right] \cdot 0,01[L]$$
$$V_{ampicilina} = 0,02 [mL] = 20 [\mu L]$$

De manera similar se determinaron los volúmenes necesarios de las diferentes soluciones stock del estudio.

E.2. Determinación de la concentración de proteínas totales

Con el fin de ejemplificar cómo fueron calculadas las distintas concentraciones de proteína total en el estudio, se utilizará como ejemplo la determinación de la concentración de proteína total para el cultivo de G35A_MO_SUMO en los ensayos con todas las proteínas seleccionadas en el presente trabajo de título.

Para ello, primero se debe restar la absorbancia promedio de las réplicas con la absorbancia del blanco (el cual solo contiene agua y reactivo de Bradford), cuyos valores para este caso se informan en la Sección D.2.2.1.

$$Abs_{promedio} = \frac{0,351 + 0,360 + 0,357}{3} = 0,356$$

$$Abs_{promedio} - Abs_{blanco} = 0,356 - 0,191 = 0,165$$

Asegurándose que este valor se encuentre dentro del rango de linealidad de la correspondiente curva de calibrado de proteínas (que en este caso es la representada en la Figura C.1), se utiliza la ecuación asociada y se obtiene el valor de concentración de proteínas totales.

$$C_{promedio} \left[\frac{mg}{mL} \right] = \frac{(Abs_{promedio} - Abs_{blanco}) + 0,0044}{0,5782}$$

$$C_{promedio} \left[\frac{mg}{mL} \right] = \frac{0,165 + 0,0044}{0,5782} \left[\frac{mg}{mL} \right] = 0,293 \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

El resto de concentración de proteínas totales del estudio fue calculado de manera idéntica.

E.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática es una medida del potencial catalítico de las células, la que en este caso, se mide por la desaparición de NADPH en presencia de diversos sustratos.

Para calcular la actividad enzimática, primero se determina la concentración de NADPH. Sabiendo que la absorbancia es proporcional a la concentración de NADPH según la Ley de Lambert y Beer [74, 75], la cual entrega una relación entre la absorbancia medida a una determinada longitud de onda (A), la concentración molar de sustrato o producto (c) en mM, la longitud de la celda donde se realiza la medición (ℓ) y un coeficiente de extinción molar (ϵ); se calcula dicha concentración con lo que sigue:

$$A = \epsilon \cdot \ell \cdot c \quad (\text{E.2})$$

Donde $\epsilon_{NADPH}(340 \text{ nm}) = 6,22 \left[\frac{1}{\text{mM}\cdot\text{cm}} \right]$ [76] y $\ell=0,52 \text{ cm}$ (longitud de celda de la cubeta de 96 pocillos donde se realizaron los ensayos).

Como ejemplo de cálculo se utilizarán los datos de absorbancia en el ensayo de consumo de NADPH con biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona para G35A_MO_SUMO, cuyo detalle se presenta en la Tabla D.2. Utilizando estos valores se calcula la absorbancia promedio de las réplicas, la cual será utilizada en la Ecuación E.2:

$$A_{\text{promedio}} = \frac{0,833 + 0,797 + 0,790}{3} = 0,807$$

De esta manera:

$$A_{\text{promedio}} = \epsilon \cdot \ell \cdot c_{\text{promedio}} \implies c_{\text{promedio}} = \frac{A_{\text{promedio}}}{\epsilon \cdot \ell}$$

$$c_{\text{promedio}} [\text{mM}] = \frac{0,807}{6,22 \cdot 0,52} = 0,250 [\text{mM}]$$

Este cálculo se repite para todo el período de tiempo de este experimento y se realiza de manera idéntica para el resto de ensayos del estudio.

Para determinar la velocidad de consumo de NADPH (k_{NADPH}), se grafican los resultados de concentración en función del tiempo. A partir de dichos gráficos (los cuales se presentan en la Sección 4: Resultados y discusión) se determina que la pendiente de las curvas es constante a lo largo del experimento, por lo que para el cálculo de velocidad de consumo de NADPH (pendiente de las curvas) se utilizarán los datos asociados al minuto 0 y al minuto 7 aproximadamente (400 segundos). De esta manera:

$$k_{NADPH} \left[\frac{\text{mM}}{\text{min}} \right] = \frac{\Delta[NADPH]}{\Delta t} \quad (\text{E.3})$$

$$k_{NADPH} \left[\frac{\text{mM}}{\text{min}} \right] = \frac{0,250 - 0,227}{\frac{400}{60} - \frac{0}{60}} = 0,0035$$

Luego, se realiza la transformación de unidades para obtener la actividad enzimática en unidades de UI ($\mu\text{mol}/\text{min}$) como sigue:

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = k_{NADPH} \left[\frac{\text{mmol}}{L \cdot \text{min}} \right] \cdot 1000 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mmol}} \right] \cdot F.D \cdot V_{\text{ensayo}}$$

Donde F.D es el factor de dilución, donde en este caso corresponde a $\left(\frac{160}{60}\right)$, ya que utilizaron 60 μL de extracto purificado en un volumen de ensayo (V_{ensayo}) de 160 μL (0,00016 L). Así:

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = 0,0035 \left[\frac{\text{mmol}}{L \cdot \text{min}} \right] \cdot 1000 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mmol}} \right] \cdot \left(\frac{160}{60}\right) \cdot 0,00016 [L]$$

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = 0,0015 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]$$

Para calcular la actividad enzimática por mg de proteínas totales primero se debe hacer un cambio de unidades a la concentración encontrada anteriormente en el Anexo E.2. Luego:

$$mg_{\text{proteína}} = 0,293 \left[\frac{mg}{mL} \right] \cdot 0,06 [mL]$$

Puesto que el volumen del extracto purificado utilizado en los ensayos de actividad fue de 60 μL (0,06 mL). Así:

$$mg_{\text{proteína}} = 0,018$$

Con esto, y la actividad enzimática se obtiene la actividad enzimática por mg de proteínas totales:

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{mg_{\text{proteína}}} \right] = 0,083$$

Además, con el valor de actividad enzimática en UI se puede calcular la actividad enzimática por litro de medio de cultivo (L_{mc}). Como en este caso, los ensayos se realizaron en 200 mL (0,2 L), este valor se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{L_{mc}} \right] = \frac{\text{Act. enzimática} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{L_{mc}}$$

$$\text{Act. enzimática} \left[\frac{\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{L_{mc}} \right] = \frac{0,0015 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{0,2 [L_{mc}]} = 0,0075 \left[\frac{\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right]}{L_{mc}} \right]$$