



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

IDENTIFICACIÓN, SELECCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE IRONAS

TRINIDAD FRANCISCA PIZARRO BLACK

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
EDUARDO AGOSÍN TRUMPER

Santiago de Chile, julio, 2018
© 2018, Trinidad Pizarro Black



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

IDENTIFICACIÓN, SELECCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE IRONAS

TRINIDAD FRANCISCA PIZARRO BLACK

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

EDUARDO AGOSÍN TRUMPER

CÉSAR RAMÍREZ-SARMIENTO

FLAVIA ZACCONI

RICARDO RAINERI BERNAIN

Para completar las exigencias del grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, julio, 2018

*A mis padres, quienes me entregaron
las herramientas lograr todo lo que
me proponga.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los miembros del laboratorio de Biotecnología DIQB de la Pontificia Universidad Católica de Chile, presentes durante mis años de estudio. En particular, al profesor Eduardo Agosín Trumper, PhD, mi profesor supervisor, a Javiera López, PhD, quien me guio durante todo el proceso de mi trabajo de magíster, a Alexis Loiza, con quien trabajé el último año y quien continuó con esta línea de investigación y a todos los compañeros de laboratorio de quienes aprendí y que me ayudaron en distintas etapas del proceso.

Además, al Centro de Aromas y Sabores del DICTUC, por permitirme el uso de sus equipos de cromatografía, en particular a Conrado Camilo y María Inés Espinoza.

También agradezco al proyecto de Fondecyt N°1130822, en el cual está enmarcado y fue financiado mi proyecto.

A todos los miembros de mi comisión de tesis: Flavia Zaconni, PhD, Ricardo Raineri, PhD y en particular a César Ramírez-Sarmiento, PhD, quien me guio durante todo el transcurso del magíster.

Por último, un agradecimiento especial a mi familia, que me acompañó y apoyó durante todo el proceso.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Aromas y Sabores	3
1.2.1. Etiquetado de Productos	3
1.3. Factorías celulares	4
Capítulo 2. Ironas	6
2.1. Estructura	6
2.2. Vía Metabólica	9
2.3. Producción de Ironas	12
2.3.1. Mercado	14
2.4. Oportunidad.....	14
Capítulo 3. Estrategias de biosíntesis de ironas.....	16
3.1. Expresión de la vía metabólica nativa en una factoría celular	16
3.2. Vías metabólicas alternativas	17
3.2.1. Metiltransferasas	17
3.3. Metilación de ironas	20
3.4. Metilación de carotenos	23

3.4.1. Licopeno	23
3.4.2. Carotenos ciclados	26
3.5. Metilación de diapocarotenoides.....	29
3.6. Selección y Propuesta	30
3.7. Hipótesis y objetivos	35
Capítulo 4. Materiales y Métodos.....	36
4.1. Selección de la(s) enzima(s).....	36
4.2. Diseño de mutaciones	38
4.2.1. Estudio del bolsillo catalítico y selección de residuos significativos.....	39
4.2.2. Docking.....	39
4.2.3. Desarrollo de <i>script de docking</i> masivo y distancia	40
4.2.4. Evaluación de mutantes <i>in silico</i>	41
4.3. Construcción de vectores y cepas mutantes	42
4.3.1. Síntesis del gen mppJ y clonamiento.....	42
4.3.2. Diseño de partidores mutagénicos	44
4.3.3. Mutagénesis	47
4.3.4. Electroforesis	48
4.3.1. Medios de Cultivo.....	49
4.3.1. Transformación bacteriana	50
4.3.2. Construcción de vectores	50
4.3.3. Secuenciación	51
4.3.4. Generación de cepas mutantes para expresión enzimática	51
4.4. Expresión y purificación enzimática.....	52
4.4.1. Crecimiento de mutantes y expresión del gen mppJ.....	52
4.4.2. Lisis celular.....	52
4.4.3. Purificación.....	53
4.4.4. PAGE	54
4.5. Ensayos enzimáticos y <i>screening</i>	56
4.5.1. Ensayo enzimático	57
4.5.2. Extracción de producto y preparación de muestras	60
4.5.3. Detección por HPLC-MS.....	61
4.5.4. Identificación y cuantificación por GC-MS.....	62
4.5.5. Construcción de curvas de calibrado y análisis de datos	62
Capítulo 5. Resultados y Discusión.....	64

5.1. Selección de la enzima	64
5.2. Fenilpiruvato-C(3)-metiltransferasa.....	65
5.2.1. Bolsillo catalítico y selección de residuos significativos.....	70
5.3. Docking	74
5.3.1. S-adenosil-metionina	74
5.3.2. PPY 75	
5.3.3. (R)- α -ionona.....	76
5.3.4. <i>Docking</i> masivo y selección de mutantes	79
5.4. Generación de cepas mutantes y expresión de MppJ	86
5.5. Purificación	88
5.6. Ensayo enzimático	91
5.6.1. Ensayos con PPY como sustrato – HPLC-MS	91
5.6.2. Ensayos con Ionona como sustrato – GC-MS	96
Capítulo 6. Conclusiones.....	99
Bibliografía	102
Capítulo 7. Anexo.....	121
7.1. Isoprenoides	121
7.1.1. Carotenoides	123
7.1.2. Apocarotenoides	125
7.1.3. Diapocarotenoides	128
7.1.4. Aromas con esqueleto isoprenoide	130
7.2. Fenilpropanoides	139
7.2.1. Vainillina	139
7.2.2. Raspberry Ketone	141
7.2.3. 2-feniletanol.....	142
7.3. Lactonas	144
7.4. Producción de ironas por extracción desde rizomas	148
7.5. Producción de ironas por síntesis química	149
7.6. Enzimas involucradas en las distintas estrategias de síntesis de ironas .	154
7.6.1. Escualeno metiltransferasa	154
7.6.2. Benzoquinol metiltransferasa	157
7.6.3. 3-hidroxiantranilato-C(4)-metiltransferasa.....	159
7.6.4. L-tirosina-C(3)-metiltransferasa	160
7.6.5. Geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa.....	163

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Descripción sensorial y umbral olfativo de los enantiómeros de irona (Brenna <i>et al.</i> 2003a; Brenna <i>et al.</i> 2003b).....	13
Tabla 2: Enzimas candidatas para la metilación de iononas. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura y el código PDB de la estructura de la enzima. Estructuras obtenidas de la base de datos del <i>European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute</i> (EMBL-EBI 2017). * : Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).	21
Tabla 3: Enzimas candidatas a la metilación de licopeno. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura (Jiang <i>et al.</i> 2016). Ninguna de ellas se encuentra cristalizada por lo que no tienen asociado un código PDB. * Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).	24
Tabla 4: Enzimas candidatas a la metilación de carotenos ciclados. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura y el código PDB de la estructura de la enzima. Estructuras obtenidas de la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 2018). * Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).	28
Tabla 5: Ventajas y desventajas de cada estrategia de biosíntesis de ironas.....	33
Tabla 6: Cantidad de C-MT en cada categoría según tamaño y complejidad de su sustrato.	37
Tabla 7: Partidores utilizados en este trabajo. En rojo se señalan las mutaciones.	46
Tabla 8: Protocolo de preparación de reacciones de PCR para <i>Phusion DNA Polymerase</i>	48
Tabla 9: Preparación para 1 L de medio LB y LB-agar.	49
Tabla 10: Preparación para 1 L de medio SOB.....	50
Tabla 11: Preparación de buffer de lisis para <i>E. coli</i>	53

Tabla 12: Preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis denaturante (SDS-PAGE).	55
Tabla 13: Preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis nativa (Native PAGE).	55
Tabla 14: Buffer de carga (6X) para SDS-PAGE.	56
Tabla 15: Buffer de carga (2X) para Native PAGE.	56
Tabla 16: Nomenclatura de muestras de ensayo enzimático. Se detalla la diferencia en las condiciones experimentales de cada una.	58
Tabla 17: Preparación ensayo enzimático para probar las condiciones experimentales.	60
Tabla 18 : Características de las 4 enzimas candidatas para la producción de ironas.	64
Tabla 19: Mutaciones con distancias de C ₂ entre 2.8 y 4.8 Å del metilo SAM y W99.	79
Tabla 20: Tabla de mutaciones dobles que cumplen con el criterio de afinidad y distancia. Sobre cada columna se ve el templado con la primera mutación y luego una lista con cada segunda mutación que cumple los criterios. En rojo se destacan las mutaciones redundantes.	83
Tabla 21: Mutantes seleccionadas para ser generadas en el laboratorio. Se muestra la afinidad resultante del docking, si lograron una posición correcta de (R)- α -ionona, si promueven metilaciones indeseadas y el tamaño del bolsillo catalítico, con su aumento porcentual sobre la enzima original.	84
Tabla 22: Estructura, nombre y propiedades aromáticas de las lactonas producidas por <i>Yarrowia lipolítica</i> (Waché <i>et al.</i> 2003).	145

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructuras químicas de α -irona (derecha) y α -ionona (izquierda). En ambas estructuras se destaca el átomo de carbono 2.....	7
Figura 2: Estructura de los 3 regioisómeros de irona: α , β y γ . Estos difieren en la posición de un doble enlace.	7
Figura 3: Estructura de los 10 estereoisómeros de irona y su nomenclatura. Elaboración propia.....	8
Figura 4: Biosíntesis de iridal a partir de escualeno. En verde, se indican las enzimas que se han identificado como responsables de la reacción y en azul el nombre del compuesto. Elaboración propia.	10
Figura 5: Recopilación de las vías metabólicas propuestas desde el iridal hasta las ironas, a partir de los precursores encontrados en <i>I. pallida</i> , <i>I. florentina</i> , <i>I. germanica</i> e <i>I. hoogiana</i> (Ito <i>et al.</i> 1999; Marner 1997; Marner <i>et al.</i> 1993; Marner & Hanisch 2001; Xiong <i>et al.</i> 2006). Elaboración propia.....	11
Figura 6: Ciclo de la S-Adenosilmetionina (SAM). Nu representa cualquier nucleófilo que actúe como sustrato de las MT (Fontecave <i>et al.</i> 2004).....	18
Figura 7: Estructura terciaria y diagrama topológico de las cinco clases de MT dependientes de SAM. (a): Clase I, (b): Clase II, (c): Clase III, (d): Clase IV y (e): Clase V (Schubert <i>et al.</i> 2003).....	19
Figura 8: Estructura química de los tres regioisómeros de iononas (arriba) e ironas (abajo). En rojo se indica la diferencia estructural entre iononas y sus respectivas ironas. Elaboración propia.	20
Figura 9: Esquema de la biosíntesis <i>de novo</i> de α -irona, a partir de glucosa y biotransformación a partir de α -ionona. Elaboración propia.	22
Figura 10: Esquema de la vía de síntesis de α -ironas a partir de la metilación del licopeno. a) metilación en C ₃ y C ₃₀ , b) ciclación. Elaboración Propia.	25

Figura 11: Esquema de la ciclación α del licopeno y su versión metilada. Elaboración propia.....	26
Figura 12: Esquema de la vía de síntesis de α -ironas a partir de la metilación de ϵ -caroteno. a) metilación en C3 y C30, b) ciclación. Elaboración Propia.	27
Figura 13: Vía propuesta de síntesis de ironas a partir de la metilación de triterpenos. Elaboración propia.	30
Figura 14: Gráfico circular de la clasificación de MT según elemento a metilar (izquierda) y sustrato de las C-MT (derecha). Elaboración propia.	36
Figura 15: Esquema del vector pET28a con MppJ insertado entre los sitios de restricción NdeI y HindIII. Imagen generada en SnapGene.	43
Figura 16: Mutación sitio-dirigida según protocolo de GeneTailor (Invitrogen Life Technologies 2004).....	45
Figura 17: Esquema del vector pET28a con MppJ. Se señala la ubicación de unión de los partidores. Imagen generada en SnapGene.	47
Figura 18: (a) Estructura de la manopeptimicina, con el motivo de β MePhe destacado. (b) Esquema de la reacción de metilación de PPY a β MePPY por MppJ y ambas transaminaciones por TyrB. (Zou, Y. C. Liu, <i>et al.</i> 2014).	66
Figura 19: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de <i>mppJ</i> de 5 organismos distintos <i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. platensis</i> , <i>S. acidiscabies</i> , <i>Xenorhabdus sp. KK7.4</i> , <i>S. sp. AVP053U2</i> . Sobre el alineamiento se ilustra la estructura secundaria de MppJ ^{Sh} . Elaboración propia a través de ESPript 3.0.....	67
Figura 20: Estructura de MppJ de <i>S. hygroscopicus</i> . Cada subunidad se muestra de distinto color y está asociada a SAM. Los iones están representados por esferas: hierro de color naranja, iodo de color magenta y calcio de color verde. Elaboración propia a través de PyMOL.....	68
Figura 21: (a) Esquema del mecanismo de reacción de MppJ ^{Sh} . (b) Esquema del mecanismo catalítico de la mutante R127L/D244A/V300E de MppJ ^{Sh} (Zou, Y. C. Liu, <i>et al.</i> 2014).	69

Figura 22: Residuos en el bolsillo catalítico de MppJ ^{Sh} . En rojo se destacan aquellos que coordinan SAM, en amarillo los que participan en la catálisis y en naranja los que coordinan a Fe. Elaboración propia a través de PyMOL.	71
Figura 23: Bolsillo catalítico de MppJ. Se muestra la distancia al carbono a metilar, con respecto al metilo en SAM (3,3 Å), el átomo de hierro (4,1 Å) y el átomo de nitrógeno del W99 de MppJ (3,6 Å). Elaboración propia a través de PyMOL.	72
Figura 24: Esquema de la secuencia y estructura secundaria de MppJ. Los residuos en azul corresponden a los orientados hacia el bolsillo catalítico. De ellos, los que están asociados a la unión de SAM se señalan con un triángulo rojo, a Fe con un círculo naranja, a PPY con una estrella verde y los que participan en la catálisis con un cuadrado café. Elaboración propia a través de ESPript 3.0.....	73
Figura 25: Comparación de la posición de SAM en el cristal (color rosado) y según el <i>docking</i> realizado (color negro y blanco). Elaboración propia a través de PyMOL.	75
Figura 26: Comparación de la posición de PPY en el cristal (amarillo) y según el <i>docking</i> (negro), con la distancia respectiva al grupo metilo de SAM y al amino de W99. Elaboración propia a través de PyMOL.	76
Figura 27: Resultado <i>docking</i> con ionona como ligando en MppJ original. Abajo se ve la ubicación de (<i>R</i>)- α -ionona con una grilla de 18x18x18 y arriba con una menor de 14x10x10, obligando al sustrato a ubicarse dentro del bolsillo. Elaboración propia a través de PyMOL.	77
Figura 28: Bolsillo catalítico (gris) de MppJ original, en blanco se muestra la estructura secundaria. Se destaca W99 a la derecha, SAM a la izquierda, Fe (esfera naranja) y (<i>R</i>)- α -ionona en verde. (a) Orientación deseada de (<i>R</i>)- α -ionona, con el bolsillo original, su cadena queda fuera de la cavidad. Se muestran los residuos más cercanos al sustrato. (b) Orientación en la que (<i>R</i>)- α -ionona puede entrar al bolsillo original, dejando a C ₈ ubicado entre el metilo de SAM y W99. Elaboración propia a través de PyMOL.....	78
Figura 29: Bolsillo catalítico de las mutantes simples de MppJ. En celeste se ilustra el residuo mutado. Se puede apreciar el cambio de la forma y tamaño de la cavidad. (a) M240A, (b) M240G, (c) F287E, (d) F291A, (e) F291C, (d), F291G, (e) F291S.....	81

Figura 30: Bolsillo catalítico de las mutantes dobles seleccionadas. Se destaca en celeste los residuos mutados. (a) M240G/F287C, (b) M240G/F287D, (c) M240G/F287E, (d) M240G/F287L. Elaboración propia a través de PyMOL.	82
Figura 31: Bolsillo catalítico de las mutantes triples de MppJ. Se destaca en celeste los residuos mutados. Base M240G/F287D (a)/A273W, (b)/I139T, (c)/I139V, (d)/V328F. Base M240G/F287L (e)/I139T, (f)/I139V, (g)/V328F. Elaboración propia a través de PyMOL.....	85
Figura 32: PAGE de un lisado de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET28a (VV) y con pET28a_MppJ (MppJ). A la izquierda se muestra el <i>ladder</i> de proteínas Bio-rad con el tamaño de referencia señalado.	87
Figura 33: PAGE del lisado de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con el vector pET28a sin MppJ (VV), con MppJ original (MppJ) y con MppJ mutado (se señala la mutación). A la izquierda se muestra el <i>ladder</i> de proteínas Bio-rad con el tamaño de referencia señalado. Elaboración propia.	88
Figura 34: PAGE de las fracciones colectadas durante la purificación. De izquierda a derecha se encuentra: el estándar de proteínas, el lisado de MppJ completo, previo a la purificación y las fracciones concentradas, eluidas a 5, 40 y 250 mM de imidazol, respectivamente. Elaboración propia.	89
Figura 35: Absorbancia a 280 nm durante la elución en gradiente de imidazol de MppJ separada en FPLC utilizando una columna de afinidad para purificación de proteínas marcadas con his-tag. Se señala el punto de cambio de concentración de imidazol.	90
Figura 36: Gráfico de barras de la cuantificación de metPPY por HPLC-MS, en unidades de área detectada. Se señala la cepa utilizada y entre paréntesis las condiciones experimentales. Elaboración propia.	93
Figura 37: Gráfico de barras de la cuantificación en área de metPPY, de dos ensayos enzimáticos realizados en distintos momentos con las mutantes de MppJ, utilizando PPY como sustrato.	95
Figura 38: Curvas de calibrado para la concentración de ionona e irona en GC-MS.	97

Figura 39: Cromatograma de una muestra dopada con 10 ppm de irona. En el tiempo 23.48 se observa el <i>peak</i> correspondiente al espectro de masa de irona. Elaboración propia.	98
Figura 40: Biosíntesis de isoprenoides desde DMAPP e IPP hasta licopeno. Elaboración propia.	122
Figura 41: Biosíntesis de carotenoides C ₄₀ a partir de fitoeno. Elaboración Propia.	124
Figura 42: Corte enzimático específico de carotenoides y su producto apocarotenoide en plantas. (a) licopeno, (b) zeaxantina, (c) β-carotenoide, (d) violaxantina, (e) β-caroteno (Walter & Strack 2011).	126
Figura 43: Productos del corte de carotenoides a través de CCD1 (Auldridge <i>et al.</i> 2006).	127
Figura 44: Biosíntesis de carotenos C ₃₀ y C ₄₀ (Chae <i>et al.</i> 2010).	129
Figura 45: Vía metabólica de algunos aromas con esqueleto terpenoide (Ibaceta & Agosin 2016).	131
Figura 46: Estructura química de los C13 apocarotenoides. Las líneas punteadas representan la posición del doble enlace en los isómeros α, β y γ (Cataldo <i>et al.</i> 2016).	133
Figura 47: Vía metabólica biotecnológica de producción de iononas a partir de carotenos. Elaboración propia.	135
Figura 48: Síntesis de β-damascenona en frutos rojos (Baumes <i>et al.</i> 2002).	136
Figura 49: Esquema de la vía de formación y degradación de la vainillina (encuadrada en azul) en <i>P. fluorescens</i> BF13. Para cada reacción se indica el nombre de la enzima responsable, seguido por el gen correspondiente (Di Gioia <i>et al.</i> 2011).	140
Figura 50: Esquema de los sustratos utilizados para la bioconversión a <i>raspberry ketone</i> en distintas publicaciones. a: Fuganti & Zucchi 1998, b: Kosjek <i>et al.</i> 2003, c: Beekwilder <i>et al.</i> 2007, d: Häkkinen & Seppänen-laakso 2015, e: Lee <i>et al.</i> 2016. Elaboración propia.	142
Figura 51: Síntesis <i>de novo</i> de 2-PE a través de la vía del shikimato. En azul se encuadra la vía de Ehrlich, a partir de fenilalanina. Elaboración propia.	143

Figura 52: Esquema general de la formación biotecnológica de lactonas. Adaptado de Romero-guido <i>et al.</i> 2011.	146
Figura 53: Síntesis química de <i>cis</i> - γ -irona a partir de (\pm)- <i>cis</i> -2,3,3-trimetil-6-metilen-ciclohexilacetaldehído (Kawanobe & Kogami 1991).	150
Figura 54: (a) Estructura química de la pseudoionona. (b) Estructura química de (2,2,4-trimetil-3-ciclohexen-1-il)-metanol, utilizado como sustrato para la síntesis enzimática de <i>cis</i> - α -irona y <i>cis</i> - γ -irona. Elaboración Propia.	151
Figura 55: (a) Estructura de <i>cis</i> - (izquierda) y <i>trans</i> - (derecha) epoxi-ironas, utilizadas para separar estos diastereoisómeros previo al tratamiento enzimático (Brenna <i>et al.</i> 2003b). (b) Separación enantiomérica de <i>trans</i> -epoxi-irona en (+)- y (-)- <i>trans</i> - α -irona. i) Lipasa PS, ii) KOH en MetOH, iii) MnO ₂ en CH ₂ Cl ₂ , iv) NaI,(CH ₃) ₃ SiCl, CH ₃ CN. Adaptación de Brenna <i>et al.</i> 2003b.	152
Figura 56: Proceso de separación de enantiómeros de β -irona a partir de irodiolos (Brenna <i>et al.</i> 2003b).....	153
Figura 57: Estructura de triterpenos acumulados en levaduras expresando una escualeno-sintasa o botriococceno-sintasa, en conjunto con TMT-1, -2, o -3. 1) escualeno, 2) 3-metil-escualeno, 3) 3,22-dimetil-escualeno, 4) botriococceno, 5) 20-metil-botriococceno, 6) 3-metil-botriococceno, 7) 3,20-dimetil-botriococceno. Las flechas rojas indican las posiciones donde se ha encontrado metilaciones. Los círculos rojos muestran los metilos agregados por TMT -1, -2, o -3 (Niehaus <i>et al.</i> 2012).....	155
Figura 58: Vía propuesta de síntesis de triterpenos metilados en <i>B. braunii</i> a partir de FPP (Niehaus <i>et al.</i> 2012).	156
Figura 59: Estructura de BqMT, código PDB: 4obw. Se muestra ambas subunidades del dímero de distinto color y SAM en cada una de ellas. Elaboración propia a través de PyMOL.....	157
Figura 60: Bolsillo catalítico de Coq5, una BqMT (código PDB: 4obw). En verde se indican los primeros residuos del extremo <i>N</i> -terminal que fueron resueltos. Además, se destaca el cofactor SAM y los residuos que participan en la coordinación del sustrato y catálisis. Elaboración propia a través de PyMOL.....	158

Figura 61: Esquema de la reacción catalizada por 3-HAA-C ₄ -MT. A la izquierda, el 3-hidroxiantranilato y a la derecha, el producto 4-metil-3-hidroxiantranilato (Fawaz & Jones 1988).	159
Figura 62: Esquema de la formación de 3-hidroxi-5-metil-O-metiltirosina a partir de L-tirosina. L-TYR-C ₃ -MT forma parte de esta vía de síntesis (Fu <i>et al.</i> 2009).....	160
Figura 63: Esquema de la reacción catalizada por SibL de <i>Streptosporangium sibiricum</i> (Chen <i>et al.</i> 2015).....	161
Figura 64: Representación de la estructura de SibL (Chen <i>et al.</i> 2015).....	162
Figura 65: Esquema del alineamiento de secuencias de SibL (arriba) y SfmM2 (abajo). Sobre el alineamiento se muestra la estructura secundaria de SibL, en rojo se indican las identidades y en amarillo se destacan las coincidencias positivas. Elaboración propia a través de ESPript 3.0.	163
Figura 66: Esquema de la reacción de formación de 2-MIB a partir de GPP mediante la enzima geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa (GPP-C ₂ -MT) (Köksal <i>et al.</i> 2012)..	164
Figura 67: Estructura hexamérica de las geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa <i>Sco7701</i> (a) y <i>GdpMT</i> (b). Modificado de Köksal <i>et al.</i> (2012) y Ariyawutthipan <i>et al.</i> (2012).....	165
Figura 68: Esquema de la unión de sustrato y cofactor de la enzima geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa GdpMT. Mg ²⁺ se muestra en color magenta. (a) Forma apo de la enzima con His57 marcada en celeste. (b) Entrada del sustrato GPP. (c) Rotación de His57. (d) Entrada de SAM. Obtenido y modificado de Ariyawutthipan <i>et al.</i> (2012).....	166

RESUMEN

Las ironas son compuestos cetónicos con aroma a violeta que se utilizan industrialmente en perfumería y alimentos, mercados relevantes y en expansión. Se sintetizan químicamente o se obtienen mediante la oxidación de sus precursores, cicloiridales. Éstos están presentes en las raíces de los lirios, aunque no se ha descrito su ruta metabólica de biosíntesis. El alto valor de mercado y demanda de ironas hace que el diseño de un proceso de síntesis biotecnológica sea de gran interés.

Este trabajo propone y desarrolla un método para la síntesis de (-)-*cis*- α -irona a partir de α -ionona, mediante el uso de una enzima recombinante, modificada por mutagénesis sitio-dirigida.

No se había reportado ninguna enzima que catalizara esta reacción, por lo que se seleccionó la fenilpiruvato metiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (MppJ) como la mejor candidata mediante una comparación *in silico*. Luego, se modelaron mutaciones puntuales de MppJ para evaluar la orientación del sustrato, α -ionona, en el bolsillo catalítico, identificándose 13 mutantes apropiadas, según criterios de afinidad y distancia entre átomos relevantes. A continuación, se logró inducir la expresión de MppJ y sus 13 mutantes en *Escherichia coli* BL21(DE3). Finalmente, se evaluó la actividad de estas enzimas *in vitro*, en lisado celular, con su sustrato nativo, PPY, y con α -ionona.

Se observó actividad con PPY en la enzima nativa y en dos de las mutantes: M240G/F287L y M240G/F287L/V328F. En los ensayos con α -ionona, no se detectó formación de ironas sobre 0,5 ppm ni de otros productos metilados. De esta forma, el presente estudio da un paso adelante en el camino para descifrar la vía metabólica alternativa que permitirá sintetizarlas.

Palabras Claves: Aroma, ironas, isoprenoides, metiltransferasa, fenilpiruvato, MppJ, ionona, mutagénesis sitio-dirigida, acomplamiento, biosíntesis, ingeniería de proteínas.

ABSTRACT

Irones are violet-scented ketonic compounds that are used in the fragrance and food industries, which have relevant and expanding markets. They are chemically synthesized or obtained by the oxidation of cycloiridals, their precursors. These compounds are obtained from the roots of the iris flower, however, their biosynthetic metabolic pathway hasn't been described. Irone's high market value and demand makes that the design of a biotechnological synthesis method an attention-grabbing process.

Consequently, the present work identifies and develops a method for the biotechnological synthesis of (-)-*cis*- α -irone, from α -ionone, catalyzed by a recombinant enzyme, modified by directed mutagenesis.

Given that no enzyme had been reported with this particular activity, a phenylpyruvate methyltransferase from *Streptomyces hygroscopicus* (MppJ) was selected as the candidate for catalysis. Then, isolated mutations of MppJ were modelled through molecular docking to assess the orientation of the substrate, α -ionone, in the catalytic pocket. Herewith, the 13 mutants were identified according to a criterion of affinity and distance between relevant atoms in the reaction. Following, the expression of MppJ and its 13 mutants was induced in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Finally, the activity of these enzymes was evaluated *in vitro*, in cell lysate, with its native substrate, PPY, and with α -ionone.

The results showed activity with PPY in the native enzyme and in two of the mutants: M240G/F287L and M240G/F287L/V328F. In the α -ionone assays, irone formation wasn't detected over 0.5 ppm. Hence, the present study takes a step forward in the path to decode the alternative metabolic pathway that will allow to synthesis irons.

Keywords: Fragrance, irones, isoprenoids, methyltransferase, phenylpyruvate, MppJ, ionones, site-directed mutagenesis, docking, biosynthesis, protein engineering.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Motivación

Los aromas y las fragancias son ampliamente utilizados en distintos sectores productivos como la industria de alimentos, perfumes, productos de autocuidado e higiene. El mercado de esta industria es significativo, alcanzando más de US \$25 billones el año 2016 y un crecimiento anual del 4% (Leffingwell & Associates 2017; Carroll *et al.* 2016). En la actualidad, los aromas se obtienen principalmente mediante síntesis química y, en menor medida, a través de métodos de extracción natural. Sin embargo, los avances biotecnológicos han convertido a la síntesis biológica por fermentación en una alternativa cada día más prometedora y atractiva para este mercado (Carroll *et al.* 2016; Miks *et al.* 2016; Schempp *et al.* 2017).

En la naturaleza, estos compuestos volátiles son producidos como metabolitos intermediarios o productos finales, con fines de señales de comunicación (Carroll *et al.* 2016). En general, la concentración de aromas en plantas y frutos es baja, lo que se traduce en la necesidad de procesar grandes volúmenes de materia prima para obtener una pequeña cantidad del producto de interés (Miks *et al.* 2016; Schempp *et al.* 2017). Esta desventaja se traduce en procesos de extracción y purificación costosos que toman más tiempo para la obtención del producto (Cataldo *et al.* 2016). Sin embargo, en forma creciente los consumidores prefieren los productos naturales, en comparación con aquellos producidos sintéticamente (Serra *et al.* 2005). Así, el precio de mercado de estas fragancias es suficientemente alto para hacer rentable el proceso de extracción.

La síntesis química de aromas es un proceso cuyo inicio se remonta a hace alrededor de 200 años, con la identificación química de los extractos naturales (Carroll *et al.* 2016) y se consolidó con los primeros productos disponibles en el mercado: cumarina en 1868 y vainillina en 1874 (Serra *et al.* 2005). En el caso de metabolitos de baja complejidad, este proceso es rápido y económico, en comparación con la extracción desde fuentes

naturales (Miks *et al.* 2016). Sin embargo, como ya se ha mencionado, cada día hay menor interés en este tipo de bienes por parte de los consumidores por tratarse de productos sintéticos (Cataldo *et al.* 2016; Schempp *et al.* 2017).

La síntesis biotecnológica de compuestos químicos de alto valor agregado es una opción ventajosa frente a los procesos mencionados anteriormente. En consecuencia, la investigación y el desarrollo en esta área ha aumentado en forma exponencial en las últimas décadas (Berger, 2009). En primer lugar, en comparación con la extracción de fuentes naturales, la biosíntesis permite alcanzar concentraciones mucho mayores del producto deseado en un menor tiempo, por lo que el costo de producción es mucho menor (Cataldo *et al.* 2016; Schempp *et al.* 2017).

En segundo lugar, a diferencia de la síntesis química, la biosíntesis puede generar productos ópticamente activos, de alta pureza enantiomérica, como consecuencia de la estereo- y regio-especificidad de las enzimas (Koeller & Wong 2001; Berger 2009). Adicionalmente, los compuestos generados por biocatalizadores son considerados naturales, lo que les da un importante valor agregado en el mercado (Berger 2009; Schempp *et al.* 2017). Además, los sustratos que se utilizan son naturales y de bajo costo, como la glucosa (Berger 2009). Por último, las condiciones en las que ocurre la reacción biológica son generalmente a temperaturas y presiones cercanas a las ambientales, lo que se traduce en un bajo costo operacional (Koeller & Wong 2001).

Las ironas, el caso particular de interés para la presente investigación, son el principio aromático de los extractos de iris, el cual se utiliza principalmente como aroma a violeta en perfumería y en la industria de alimentos. Actualmente, esta fragancia con esqueleto isoprenoide, se obtiene mediante extracción de sus precursores a partir de las raíces de los lirios; o se sintetiza químicamente. El valor de los extractos naturales puede alcanzar los USD \$110.000 por kilogramo, mientras que el del producto sintético es dos órdenes de magnitud menor. Las vías de biosíntesis no se conocen, pero su precio y el interés del mercado por fuentes naturales las transforman en productos de alto interés. En este trabajo, proponemos identificar y desarrollar un método para la síntesis biotecnológica de las ironas, que presente ventajas por sobre los métodos de síntesis química actuales.

1.2. Aromas y Sabores

Desde hace miles de años, el ser humano ha sido capaz de utilizar extractos de plantas y animales para la perfumería y alimentos (Serra *et al.* 2005). En un comienzo, esto se realizaba mediante procesos de baja complejidad, como la extracción con aceites y la destilación (Surburg & Panten 2006). A partir de la segunda mitad del siglo XIX, la industria de las fragancias comienza a acelerar su crecimiento como consecuencia de la producción sintética de aromas, a partir de su caracterización química (Serra *et al.* 2005). Actualmente, debido al aumento exponencial del desarrollo de la tecnología, se ha logrado caracterizar cada uno de los compuestos responsables de estas fragancias (Surburg & Panten 2006) y se han creado diversos procesos para producirlos.

Aunque, a nivel industrial, la mayoría de estos productos son extraídos de plantas o fabricados químicamente, la síntesis biotecnológica ha aumentado en las últimas décadas (Serra *et al.* 2005). Como fue mencionado en la sección anterior, las ventajas asociadas a la producción biotecnológica son principalmente el uso de condiciones ambientales (Berger 2015) y la generación sustentable de compuestos ópticamente activos (Berger 2009); y considerados naturales ante los consumidores (Dunkel *et al.* 2014). Aunque, en la mayoría de los casos, aún no se ha alcanzado un rendimiento competitivo (Akacha & Gargouri 2015).

1.2.1. Etiquetado de Productos

En el mercado, los aromas y sabores que se encuentran en la categoría ‘natural’ son preferidos por los consumidores (Dunkel *et al.* 2014). Esta clasificación no solo depende del proceso por el cual se obtuvo el producto, sino también, del país donde se comercialice. Estados Unidos y Europa son los principales modelos a seguir en cuanto a su legislación alimenticia (Cataldo *et al.* 2016; Berger 2015). De acuerdo a sus legislaciones, los productos obtenidos por medio de procesos de síntesis química no pueden ser etiquetados

como naturales, por lo que se les califican como ‘artificiales’ o ‘idénticos al natural’, respectivamente.

Conforme a la ley europea sobre saborizantes e ingredientes en alimentos (EC 1334/2008), un aroma natural debe obtenerse por métodos físicos, enzimáticos o microbiológicos adecuados, a partir de materia prima vegetal, animal o microbiológica (The European Parliament 2008). Por su parte, la FDA de Estados Unidos clasifica como naturales los sabores y aromas que sean obtenidos por métodos físicos (extracción, destilación, entre otros - y enzimáticos) provenientes de fuentes naturales o productos fermentados (U.S. Food and Drug Administration 2017). Así, pertenecen a la categoría ‘natural’, aquellos aromas y sabores aislados a través de biotransformación enzimática de precursores naturales, fermentaciones o síntesis *de novo* y extracción a partir de plantas o animales (Serra *et al.* 2005).

1.3. Factorías celulares

Como ya se argumentó, la biotecnología ofrece una sólida alternativa a los procesos productivos convencionales mediante dos métodos: la síntesis *de novo* o fermentación y la biotransformación. En ambos casos se utiliza el metabolismo secundario de microorganismos seleccionados para producir todo tipo de compuestos, desde combustibles, hasta fármacos (Miks *et al.* 2016). Por un lado, en la síntesis *de novo* se genera el metabolito deseado a partir de fuentes de carbono simples, como la glucosa (Schempp *et al.* 2017). Por el otro, la biotransformación requiere de la adición de un precursor, relacionado estructuralmente con el producto, que es modificado por un número limitado de reacciones (Schrader & Bohlmann 2015). Este proceso puede llevarse a cabo con el microorganismo completo o con una fracción enzimática aislada (Schempp *et al.* 2017).

El acelerado avance de la tecnología y el aumento de herramientas disponibles, como los algoritmos de *machine learning* (aprendizaje automático), han permitido la construcción y la optimización de estas factorías celulares. Un ejemplo reciente es el

desarrollo del método de edición genética CRISPR/Cas9. Esta técnica ha significado una revolución en el campo de la ingeniería genómica por ser rápida, libre de marcadores, versátil y dirigida (Jakočiūnas *et al.* 2015). No solo se han perfeccionado las técnicas de construcción de cepas, como la ingeniería metabólica, ingeniería de proteínas y evolución dirigida, entre muchas otras; sino que también, se ha optimizado el proceso de cultivo a través de la ingeniería de procesos y su selección por métodos de *screening* de alto rendimiento.

Los microorganismos más utilizados como factorías celulares de aromas y sabores son la bacteria gram-negativa *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El primero, por tener un rápido crecimiento y el segundo, por ser considerado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y por ser un modelo eucarionte resistente y capaz de realizar funciones ausentes en bacterias (Ferrer-miralles *et al.* 2009). En ambos casos, se cuenta con una gran cantidad de información respecto a su fisiología, metabolismo, genoma, herramientas genéticas, técnicas de transformación y cultivo. Otros microorganismos utilizados en la producción de aromas y sabores son las levaduras *Picchia pastoris*, *Yarrowia lipolítica*.

CAPÍTULO 2. IRONAS

Estructuralmente, las ironas son cetonas volátiles, con un esqueleto isoprenoide (véase sección 7.1.4 del Anexo). Su aroma se describe como dulce, maderoso, floral (violetas y lirios) y similar a la frambuesa. Estos compuestos se utilizan como ingredientes en perfumes de lujo como el Chanel N° 19 y *So pretty* de Cartier (Brenna *et al.* 2003b). También, se utilizan como saborizantes de frutos rojos en comidas y bebidas exclusivas para diferenciarse en el mercado. Dentro de éstas se encuentran jugos, yogures y algunas bebidas alcohólicas como gin y *vermouth* (CBI 2014). Naturalmente, provienen de la maduración de los rizomas de diferentes especies de plantas del género *Iris*, entre los cuales, los más comunes son *I. germánica*, *I. pallida* e *I. florentina* (Marner & Hanisch 2001; Kaššák 2012).

2.1. Estructura

Estos isoprenoides tienen un esqueleto de 14 átomos de carbono, que consta de un ciclo de 6 átomos de carbono con 4 grupos metilo y con un grupo butanona en el átomo de carbono 6. En 1893, fueron aisladas por primera vez por Tiemann (Rautenstrauch *et al.* 1984), quien las llamó ironas y asumió que eran las responsables del aroma a violeta de los extractos de iris (Brenna, Fuganti, *et al.* 2001). En este estudio, se les atribuyó, erróneamente, la estructura de 13 átomos de carbono de las iononas (Jaenicke & Marner 1986; Brenna *et al.* 2008), otro aroma con esqueleto terpenoide, que solo difiere de las ironas en un grupo metilo, ubicado en el átomo de carbono 2 del ciclo, como se ilustra en la Figura 1.

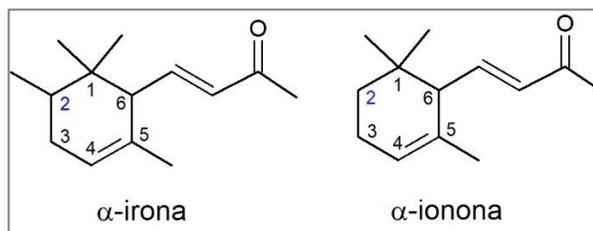


Figura 1: Estructuras químicas de α -irona (derecha) y α -ionona (izquierda). En ambas estructuras se destaca el átomo de carbono 2.

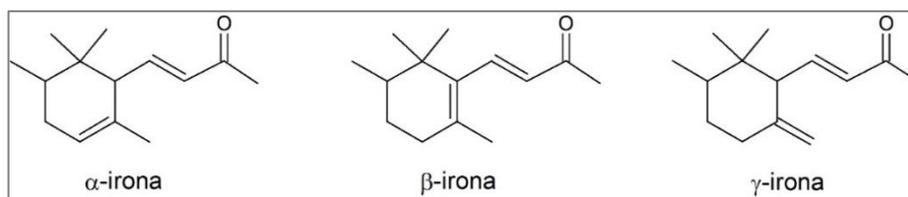


Figura 2: Estructura de los 3 regioisómeros de irona: α , β y γ . Estos difieren en la posición de un doble enlace.

Cuarenta años después, en 1933, se logró dilucidar su fórmula química correcta ($C_{14}H_{22}O$) y la estructura de los regioisómeros α , β y γ (Jaenicke & Marner 1986; Brenna *et al.* 2008) (Figura 2). No obstante, solo después de 1970 se lograron identificar todos los estereoisómeros de las ironas (Serra *et al.*, 2005) (Figura 3). Estos se clasifican, en primer lugar, según la posición del doble enlace en el ciclo (α , β o γ) (Brenna, Fuganti, *et al.* 2001). Además, se diferencian en *cis* o *trans*, dependiendo de la ubicación espacial relativa del grupo metilo y la butanona en los átomos de carbono 2 y 6, excluyendo a las β -ironas que no poseen un centro quiral en el sexto átomo de carbono. Finalmente, se clasifican por la dirección en la que el enantiómero desvía la luz polarizada (+, -) (Brenna *et al.* 2008).

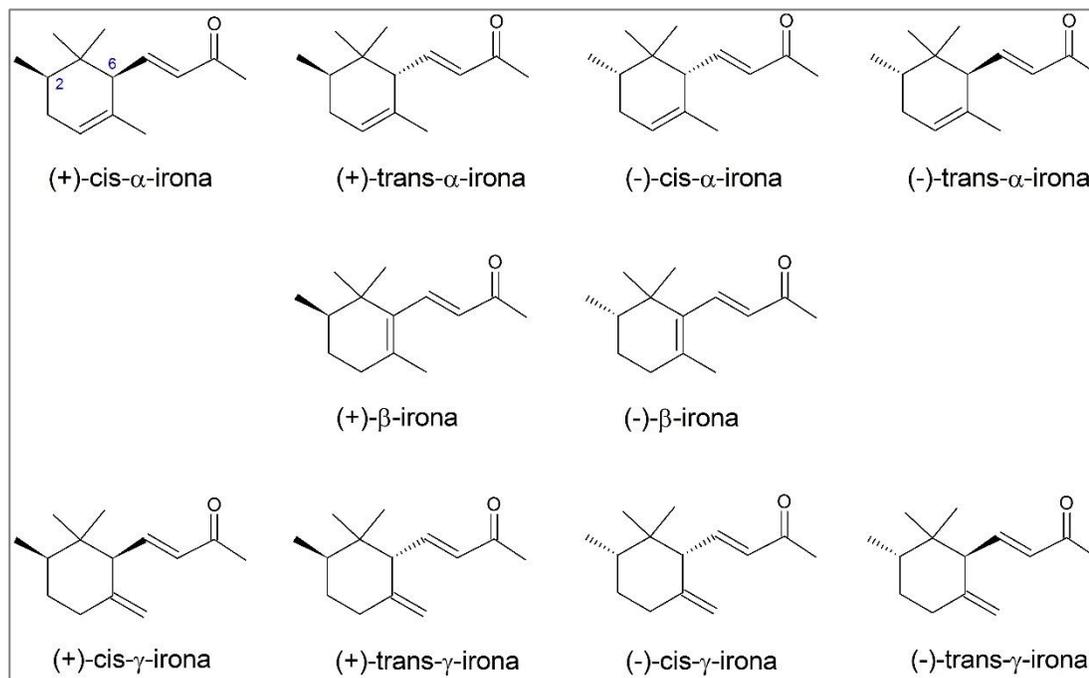


Figura 3: Estructura de los 10 estereoisómeros de irona y su nomenclatura. Elaboración propia.

En los extractos de rizomas de iris se puede encontrar los siguientes tipos de ironas: (\pm)-*cis*- γ -irona, (\pm)-*cis*- α -irona, (+)-*trans*- α -irona y (+)- β -irona (Brenna *et al.* 2003a). La concentración de cada uno de estos isómeros varía no solo según la especie de Iris, sino también dependiendo de su procedencia (Jaenicke & Marner 1986). Por ejemplo, se ha determinado que los precursores de las ironas en *I. pallida* proveniente de Alemania son principalmente levógiros; mientras que los que provienen de Italia, son dextrógiros (Jaenicke & Marner 1986; Brenna *et al.* 2008). Sin embargo, los mayores constituyentes, en ambos casos, son *cis*- γ -irona y *cis*- α -irona (Inoue *et al.* 2000).

Respecto a la diferencia en percepción olfativa, se ha demostrado que el ser humano es capaz de diferenciar cada uno de los estereoisómeros (Brenna *et al.* 2003a). También, se ha reportado que los enantiómeros levógiros (-), en el caso de *cis*- α , *cis*- γ y *trans*- γ -irona, tienen un umbral aromático mucho menor (Inoue *et al.* 2000); es decir, se pueden percibir

a concentraciones menores. Además, entre los 10 enantiómeros, se determinó que solo la (-)-*cis*- α -irona y la (-)-*trans*- γ -irona poseen el aroma característico del aceite de iris (Brenna *et al.* 2003a); mientras que las β -ironas tienen un aroma similar a las iononas (Brenna *et al.* 2003a).

2.2. Vía Metabólica

Teniendo en cuenta su claro esqueleto terpenoide y que otros aromas similares, como las iononas y damascenonas, provienen del corte oxidativo de carotenos (véase sección 7.1.4 del Anexo), se postuló que las ironas debían provenir de carotenos metilados (Marner 1997). Sin embargo, dada la conflictiva presencia del grupo metilo en el C2 del anillo, se descartó que ese fuera su origen (Buchecker *et al.* 1976). No fue hasta el año 1982 que comenzó el descubrimiento de los verdaderos precursores de las ironas, al analizar los extractos de rizomas de iris a través de cristalografía de rayos X (Marner *et al.* 1982). Desde entonces, se ha demostrado que las ironas provienen de la vía del escualeno y que algunos de sus precursores son el oxidoescualeno, marneral, marnerol, iridal y diversos cicloiridales (Figura 4 y Figura 5) (Jaenicke & Marner 1986; Marner & Hanisch 2001; Marner 1997; Xiong *et al.* 2006).

En los rizomas de los lirios se puede encontrar espiro-, ciclo- y biciclo-iridales. Su presencia se debe a la habilidad de estos compuestos para estabilizar las membranas celulares frente al estrés osmótico (Bonfils *et al.* 1995) y oxidativo (Marner 1997). Además, se ha verificado que el iridal monocíclico es el precursor de los cicloiridales α y γ , de los cuales provienen las α - y γ -ironas, respectivamente (Figura 5) (Marner *et al.* 1993). No obstante, se propone que las β -ironas provienen del hoogianal, el cual tiene como precursor un iridal bicíclico (e en Figura 5) (Marner & Hanisch 2001). En ambos casos, se requiere de una insaturación entre los carbonos 16 y 17 (a y c en Figura 5) y una metilación del carbono 22 (b y e en Figura 5) para que se lleve a cabo la ciclación en los iridales (Marner 1997; Brenna *et al.* 2008).

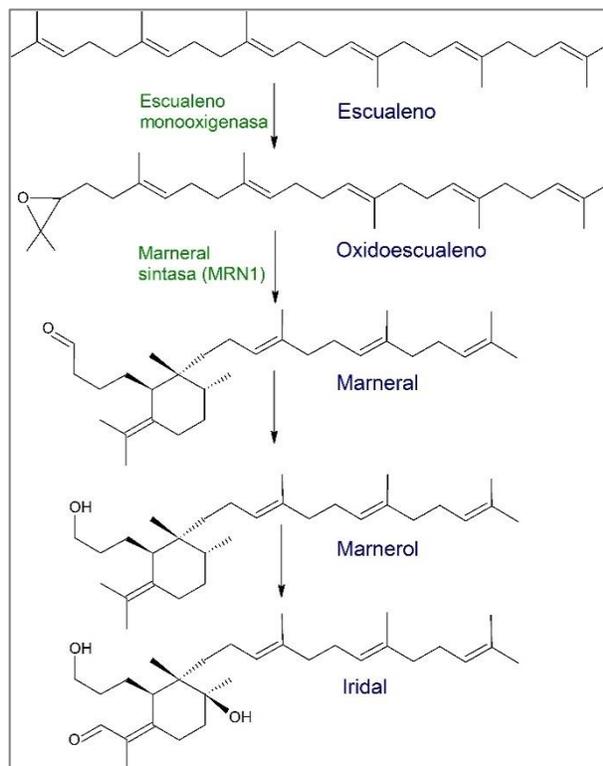


Figura 4: Biosíntesis de iridal a partir de escualeno. En verde, se indican las enzimas que se han identificado como responsables de la reacción y en azul el nombre del compuesto. Elaboración propia.

En la Figura 4 se ilustra la vía de formación del iridal a partir de escualeno. Hasta el momento, solo se han identificado dos enzimas: escualeno monooxigenasa y marneral sintasa (Xiong *et al.* 2006). Luego, la Figura 5 indica la biosíntesis de los tres regioisómeros de ironas, a partir del iridal. Todos estos precursores han sido extraídos de los rizomas de distintas especies de iris y se ha demostrado su participación en la vía (Ito *et al.* 1999; Marner 1997; Marner *et al.* 1993; Marner & Hanisch 2001; Xiong *et al.* 2006). Sin embargo, se desconoce el número de reacciones entre cada uno de ellos y los catalizadores responsables de las transformaciones.

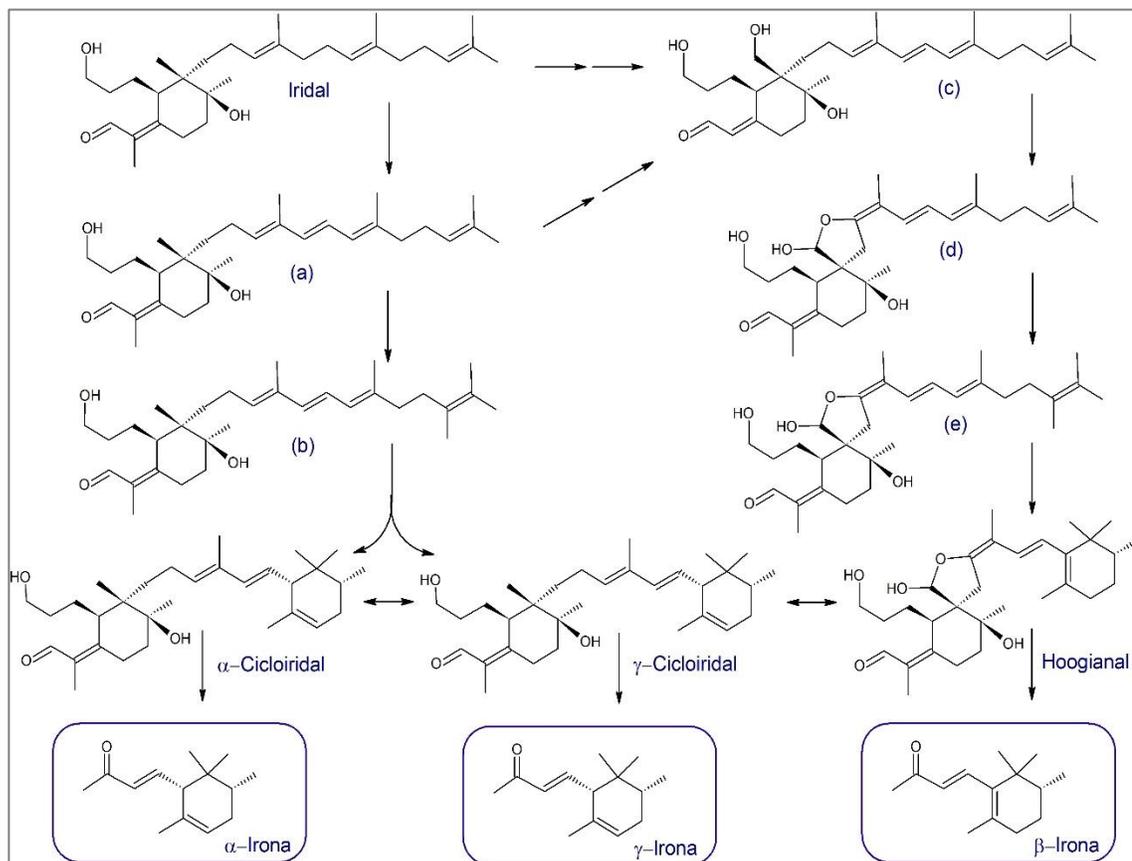


Figura 5: Recopilación de las vías metabólicas propuestas desde el iridal hasta las ironas, a partir de los precursores encontrados en *I. pallida*, *I. florentina*, *I. germanica* e *I. hoogiana* (Ito *et al.* 1999; Marner 1997; Marner *et al.* 1993; Marner & Hanisch 2001; Xiong *et al.* 2006). Elaboración propia.

Asimismo, se ha propuesto la necesidad de reacciones no enzimáticas de degradación oxidativa en los últimos pasos de la vía, para permitir el corte de los cicloiridales (Jaenicke & Marner 1986). Esta hipótesis se basa, por un lado, en que el proceso es lento produciéndose en un período aproximado de 4 años (Ehret *et al.* 2001). Por el otro, en que se ha reportado la formación de ironas en raíces expuestas a agentes oxidantes (Marner *et al.* 1982).

2.3. Producción de Ironas

La producción actual de ironas se puede dividir en dos procesos distintos. En un primer caso, se utilizan como materia prima los iridales presentes en los rizomas de lirios y se procesan de manera física, química o enzimática, seguidos por una extracción por destilación o solvente para obtener una mezcla de ironas. Este producto es reconocido como natural y tiene un alto valor comercial.

El proceso básico se inicia con un cultivo de 2 a 3 años desde los iris. Luego de este período, los rizomas alcanzan una alta concentración deseada de iridales, aunque las ironas no superan los 15 mg por kg de rizoma seco (Belcour *et al.* 1990). Para incrementar su biosíntesis, los rizomas pasan por un proceso de maduración durante un período de 3 a 5 años (Ehret *et al.* 2001; Jaenicke & Marner 1986), cuando se obtiene la máxima concentración de ironas (Marner 1997), en promedio alrededor de los 300 mg/kg de rizoma seco. Finalmente, las ironas se extraen por solvente, para generar una resina llamada *Orris butter*; o por destilación por arrastre de vapor, para formar el aceite de iris (Marner 1997). De esta manera, la cantidad total y la proporción de isómeros depende principalmente de la especie de origen (Inoue *et al.* 2000).

Dado el bajo rendimiento de producto deseado, larga duración del proceso y el costo de almacenamiento de la materia prima en el proceso de extracción básico, se han propuesto diversas soluciones alternativas al cultivo y maduración de los rizomas. El tiempo del proceso y rendimiento total dependen del método utilizado (Ehret *et al.* 2001), los cuales se describen en la sección 7.4 del Anexo.

En el segundo caso, se utilizan como materia prima distintos compuestos que son transformados en ironas mediante procesos químicos, físicos y/o enzimáticos. En general, se puede obtener una alta pureza en cuanto a los regioisómeros (>90% de α -irona en Sigma-Aldrich, MO, USA), no así en cuanto a los estereoisómeros. El resultado de esta síntesis tiene menor valor comercial y el proceso se desarrolla en menos de 5 días (Ehret *et al.* 2001). Los distintos métodos y patentes para la producción química de ironas se detalla en la sección 7.5 del Anexo.

Numerosos estudios han sido desarrollados relacionados con la separación de los enantiómeros de ironas (Brenna *et al.* 2008; Brenna, Fuganti, *et al.* 2001; Brenna, Delmonte, *et al.* 2001; Brenna *et al.* 2003b; Brenna *et al.* 1999; Brenna *et al.* 2002; Serra *et al.* 2005). Todos ellos se realizaron mediante catálisis enzimática, a partir de una mezcla racémica de α -irona comercial, producida por síntesis química por la empresa Sigma Aldrich (Irone Alpha ®).

Tabla 1: Descripción sensorial y umbral olfativo de los enantiómeros de irona (Brenna *et al.* 2003a; Brenna *et al.* 2003b).

	Descripción sensorial	Umbral olfativo
(+)- <i>cis</i> - α -irona	Violeta, con tonos maderosos y de metilionona.	100 ppm
(+)- <i>trans</i> - α -irona	El aroma más débil de los enantiómeros.	-
(-)- <i>cis</i> - α -irona	Aroma distintivo de aceite de iris.	10 ppm
(-)- <i>trans</i> - α -irona	Ligero carácter de violeta, madera y frutos rojos.	-
(+)- β -irona	Tonos de β -ionona, cálido, floral, maderoso, verde.	-
(-)- β -irona	Aroma maderoso con notas de miel, similar a ionona, frutoso y floral pero con carácter ahumado.	-
(+)- <i>cis</i> - γ -irona	Carácter floral, aceitoso, dulce, maderoso. Similar a ionona con tonos ligeramente dulces.	100 ng/L
(+)- <i>trans</i> - γ -irona	Aroma débil con tono maderoso.	114 ng/L
(-)- <i>cis</i> - γ -irona	Tonos de β -ionona, cálido, floral, maderoso, frutal, piña.	0,75 ng/L
(-)- <i>trans</i> - γ -irona	Suave aroma a aceite de iris.	26 ng/L

2.3.1. Mercado

Como se mencionó anteriormente, la tasa de crecimiento del mercado de los aromas y sabores va en aumento. En particular, las ironas son un ingrediente utilizado en productos exclusivos, dado el alto precio de su versión natural. Éste se debe a las bajas concentraciones de precursor y al largo tiempo de crecimiento y maduración de los rizomas, lo que genera un cuello de botella en el proceso (Gil & Le Petit 1992) y un estancamiento de la materia prima (Baccou *et al.* 1992).

El precio de mercado del aceite de iris natural depende de la concentración de ironas en él. Así, un aceite con un 15% de irona, cuesta alrededor de USD \$25.000 por kilogramo (CBI 2014). Por otro lado, un kilogramo de *Iris Absolute* puede costar desde USD \$60.000 con 80% de ironas (Hermitage Oils 2016); y hasta USD \$120.000, si posee sobre un 90% (CBI 2014). Por su parte, el precio de las ironas producidas por síntesis química ronda entre los USD \$1.200 (Zauba, India) y USD \$1.800 (Vigon, USA) por kilogramo. En ambos casos se asegura sobre un 90% del isómero α .

Por último, existen sustitutos artificiales, como las α y β -metil-iononas y la α -isometil-ionona que tienen un precio muchísimo menor (USD \$50/kg) (CBI 2014). Esta reducción de los precios se debe no solo al bajo costo de producción, sino que también a la baja calidad del aroma. A pesar de la diferencia de precio, los consumidores prefieren las opciones naturales y las características organolépticas del extracto de Iris a las de los sustitutos.

2.4. Oportunidad

Las técnicas actuales de síntesis de ironas presentan múltiples desventajas. En el caso del tratamiento de los precursores de los rizomas, éste puede tomar demasiado tiempo o puede ser un proceso muy caro, lo que se refleja en los altos precios del extracto. Además, la proporción de enantiómeros depende completamente de la variedad de lirio utilizada y

el rendimiento por unidad de materia prima es escaso, dada la baja concentración de precursores.

Por otro lado, la síntesis química presenta dificultades en cuanto a quiralidad y selectividad esteroisomérica. A pesar de que se han logrado sintetizar todos los enantiómeros por separado, se requiere de arduos esfuerzos y tratamientos posteriores a la síntesis. Además, operan a temperaturas y condiciones físicas alejadas de las ambientales. Más aún, en general, todos los procesos de síntesis química se utilizan solventes y reactivos que presentan riesgos para la salud y el medioambiente. Por último, este producto no puede ser etiquetado como natural, lo que disminuye su valor frente a los consumidores.

Dadas estas desventajas, se propone explorar una estrategia para la síntesis de ironas a través de la biotecnología. De esta manera se espera generar un producto natural, en corto tiempo y con un proceso amigable para el medioambiente. La siguiente sección de esta tesis, se exponen los métodos propuestos para biosintetizar ironas y la selección de uno de ellos, con el fin de ser implementado.

CAPÍTULO 3. ESTRATEGIAS DE BIOSÍNTESIS DE IRONAS

La modificación de un sistema biológico, para que sea capaz de realizar nuevos procesos, puede lograrse a través de la bioinformática y de la ingeniería genética, metabólica y de proteínas (Andrianantoandro *et al.* 2006). Estas herramientas que permiten modificar, potenciar o añadir una vía metabólica a una factoría celular (Khalil & Collins 2010; Yu Ng *et al.* 2015). Como fue mencionado en el Capítulo 1, los grandes avances en estas tecnologías han hecho posible la creación de microorganismos capaces de fabricar todo tipo de compuestos.

En este capítulo, se proponen cuatro estrategias biotecnológicas para la síntesis de ironas, alternativas a la inserción de la vía metabólica nativa en un microorganismo hospedero. Cabe destacar que ninguna de estas vías ha sido planteada en publicaciones anteriores. Posteriormente, se evalúan las estrategias y se selecciona una de ellas para ser desarrollada en este trabajo.

3.1. Expresión de la vía metabólica nativa en una factoría celular

Una de las opciones para la biosíntesis de ironas es la expresión heteróloga de la vía metabólica original de los lirios. El metabolismo endógeno de bacterias y levaduras es capaz de producir escualeno, ya que es el sustrato para la síntesis de esteroides (Abe *et al.* 2002). Más aún, levaduras como *S. cerevisiae* producen epoxiescualeno en la vía de síntesis de lanosterol (Corey *et al.* 1994). Para producir ironas a partir de estos precursores, es necesario transformar un hospedero con los genes para la expresión de las enzimas restantes de la vía original (Figura 4 y Figura 5) o sus sustitutos, en cuanto a función enzimática. Un ejemplo exitoso de la factibilidad de inserción de vías de plantas en microorganismos es la síntesis de carotenoides y apocarotenoides en levaduras (López *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2018).

Sin embargo, en el caso de los iridales, la vía no está completamente caracterizada y solo se han reportado dos de las enzimas responsables de este proceso (Brenna, Fuganti,

& Serra, 2008; Krick, Marner, & Jaenicke, 1984; Masson, Liberto, Brevard, Bicchi, & Rubiolo, 2014). Se necesitan al menos otras seis funciones enzimáticas para formar cicloiridales, los cuales, además, requieren de un corte oxidativo posterior (Jaenicke & Marner 1986). Por lo tanto, primero se requiere contar con la secuenciación, estudio del genoma y transcriptoma de los lirios (Nakao *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2010; Saulnier *et al.* 2011), aislamiento de enzimas y demostración de su actividad. Luego, es necesario insertar estas nuevas funciones enzimáticas dentro de una factoría celular adecuada, aumentando su carga metabólica y redistribuyendo el flujo de carbonos hacia la producción de ironas.

3.2. Vías metabólicas alternativas

Las ironas poseen un esqueleto isoprenoide que se diferencia en un solo átomo de carbono de la estructura basal de los apocarotenoides C₁₃ (sección 7.1.4.iv). La similitud permite proponer la modificación de estos compuestos como estrategia para la biosíntesis de ironas. Teóricamente, es posible utilizar carotenoides lineales, cíclicos o apocarotenoides como precursores. En todos los casos, se requiere añadir un carbono adicional al esqueleto isoprenoide del sustrato, en una posición específica. Las metiltransferasas (MT) son una familia de enzimas cuya función es añadir un grupo metilo a la estructura de un compuesto.

3.2.1. Metiltransferasas

Las metiltransferasas (MT) (EC 2.1.1) son una familia de enzimas que tienen como función transferir un grupo metilo desde un cofactor a un sustrato dado. Se han identificado más de 300 tipos, clasificados por su función según el *Enzyme Classification* (EC) *system* y se han reportado más de 1300 estructuras cristalinas (90 no redundantes) en el *Protein Data Bank* (PDB) (EMBL-EBI 2017). Los miembros de esta familia están presentes en todo tipo de organismos y metilan desde metabolitos pequeños hasta

biopolímeros (Bennett *et al.* 2017). Algunas MT tienen un rol importante en la regulación génica y otras son parte de la maquinaria de síntesis de distintos compuestos, como metionina, cafeína y vitamina B₁₂.

El cofactor habitualmente utilizado en las MT es la *S*-adenosil-L-metionina, también conocido como SAM o AdoMet. Este compuesto, al donar su grupo metilo, se convierte en *S*-adenosil-L-homocisteína (SAH), un metabolito que en la mayoría de los casos, actúa como inhibidor de MT (Zappia *et al.* 1969). En la Figura 6 se ilustra el ciclo celular de recuperación de SAM.

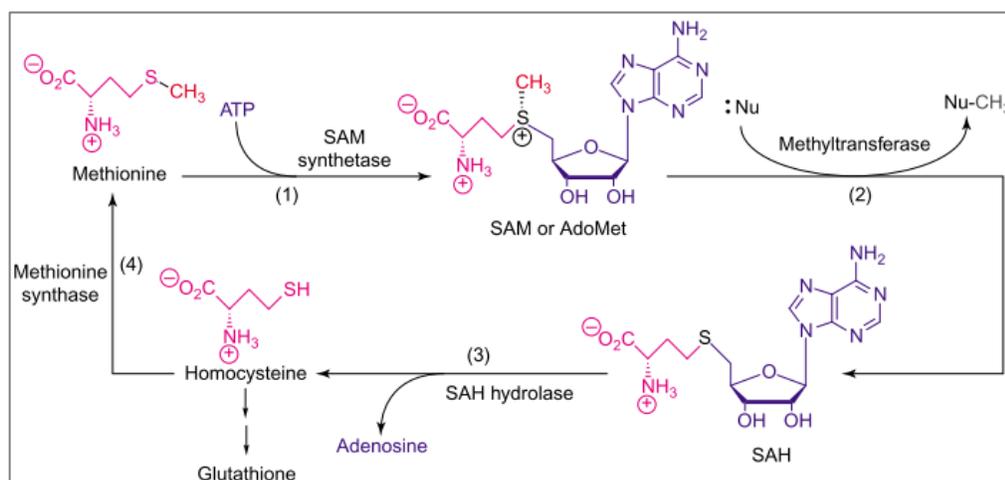


Figura 6: Ciclo de la *S*-Adenosilmetionina (SAM). Nu representa cualquier nucleófilo que actúe como sustrato de las MT (Fontecave *et al.* 2004)

Existen cinco clases estructurales de MT que utilizan SAM como cofactor. Un ejemplo de cada una de ellas se ilustra en la Figura 7 (Schubert *et al.* 2003). La Clase I es la más común y tiene un núcleo cuya estructura está altamente conservada: una lámina β de 7 hebras, con una horquilla β invertida al final y un residuo ácido en la segunda hebra, que forma puentes de hidrógeno con la ribosa de SAM (Martin & McMillan 2002).

Normalmente, esto se encuentra acompañado por diferentes estructuras de reconocimiento específicas para cada sustrato,

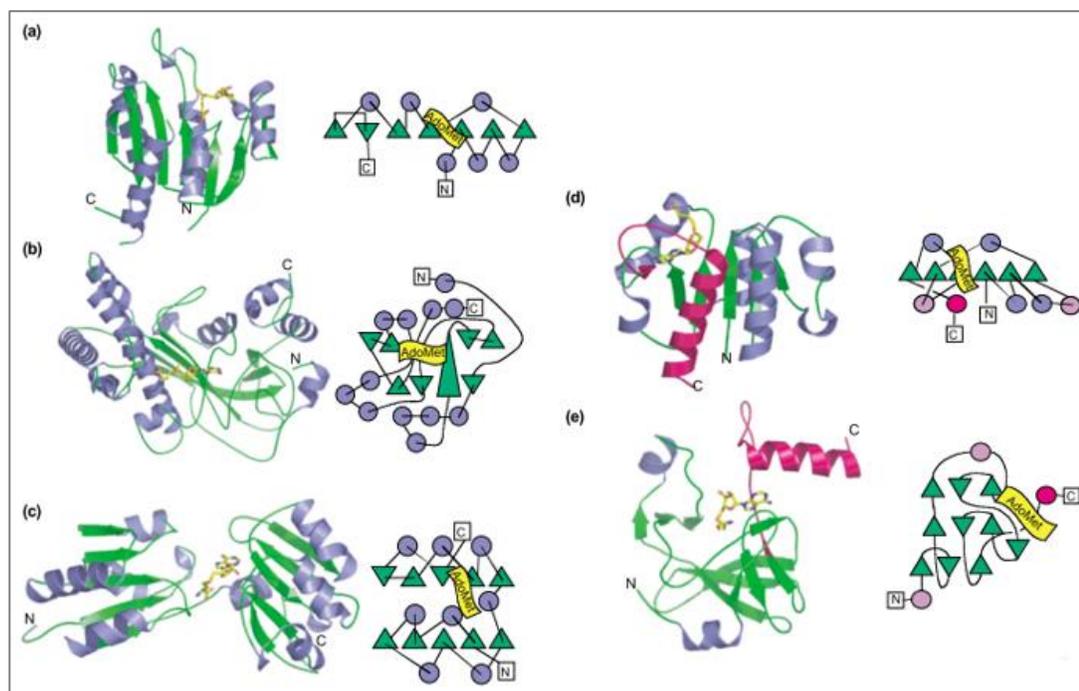


Figura 7: Estructura terciaria y diagrama topológico de las cinco clases de MT dependientes de SAM. (a): Clase I, (b): Clase II, (c): Clase III, (d): Clase IV y (e): Clase V (Schubert *et al.* 2003).

Diversas MT exhiben promiscuidad catalítica, es decir, son capaces de aceptar diferentes compuestos (Schubert *et al.* 2003). Esto les confiere la potencialidad de ser mutadas y seleccionadas con el fin de que metilen posiciones diferentes a la original o que actúen sobre otros sustratos (Bennett *et al.* 2017). Considerando esta importante capacidad, recientemente se han reportado modificaciones de distintas MT que permiten aumentar el rango de sustratos (Struck *et al.* 2016; Hao *et al.* 2015) y cofactores aceptados (Singh *et*

al. 2014), cambiar la posición de la metilación (Zou, Y.-C. Liu, *et al.* 2014) y aumentar la regio-selectividad de la enzima (Law *et al.* 2016).

3.3. Metilación de iononas

Una estrategia para la producción de ironas podría ser su biosíntesis a partir de las iononas, dada su similitud estructural. En la Figura 8 se ilustra, en la primera fila, la estructura química de cada regio-isómero de las iononas y debajo, la estructura de su respectiva irona.

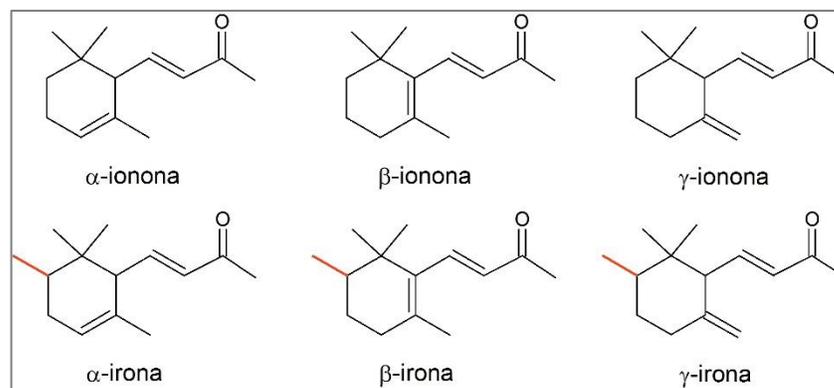
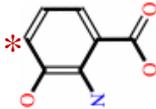
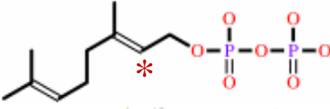
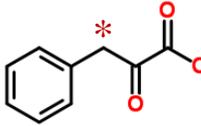
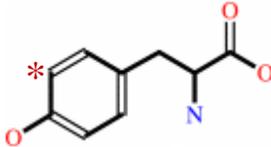


Figura 8: Estructura química de los tres regioisómeros de iononas (arriba) e ironas (abajo). En rojo se indica la diferencia estructural entre iononas y sus respectivas ironas. Elaboración propia.

Para llevar a cabo la reacción, en este caso particular, el catalizador debe ser una enzima capaz de metilar a las iononas en la posición correcta. Esta MT puede ser provista por el microorganismo *in vivo* o puede añadirse al medio en su versión purificada. Hasta el momento no se ha reportado enzimas que lleven a cabo la metilación de las iononas. Sin embargo, existe una gran cantidad de MT que han sido caracterizadas y se ha

demostrado su capacidad para aceptar sustratos diferentes. Por lo tanto, en teoría, es posible modificar una de ellas para que acepten iononas como sustrato y las metilen en el átomo de carbono requerido.

Tabla 2: Enzimas candidatas para la metilación de iononas. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura y el código PDB de la estructura de la enzima. Estructuras obtenidas de la base de datos del *European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI 2017). * : Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).

Enzima	Sustrato	Estructura en PDB	
3-hidroxiantranilato 4-C-MT (EC 2.1.1.97)	3- hidroxiantranilato		-
GPP-2-C-MT (EC 2.1.1.255)	GPP		3vc1/3vc2 4f84/4f85/4f86
Fenilpiruvato C(3)- MT (EC 2.1.1.281)	Fenilpiruvato (PPY)		4kib/4kic/4kif/4kig 4m6x/4m6y/4m71 4m72/4m73/4m74
L-tirosina C(3)-MT (EC 2.1.1.304)	L-tirosina		-

Para esto, es necesario encontrar enzimas candidatas que actúen sobre sustratos similares al que se quiere que acepte, en cuanto a tamaño y estructura. Considerando que de los 349 tipos de MT - según la clasificación EC - existen 54 que metilan átomos de carbono, de los cuales, solo 10 tienen un tamaño similar a las iononas. Teniendo en cuenta

esto, se seleccionaron 4 que poseen una estructura y complejidad similares a las iononas (Tabla 2). Este tema es desarrollado más adelante, en las secciones 4.1 y 5.1.

Las iononas, así como otros precursores y cofactores pueden ser suministrados ya sea mediante síntesis *de novo* o por biotransformación, es decir a partir de la suplementación directa del compuesto al medio. La Figura 9 ilustra ambos procesos para el caso de α -irona, tomado como ejemplo.

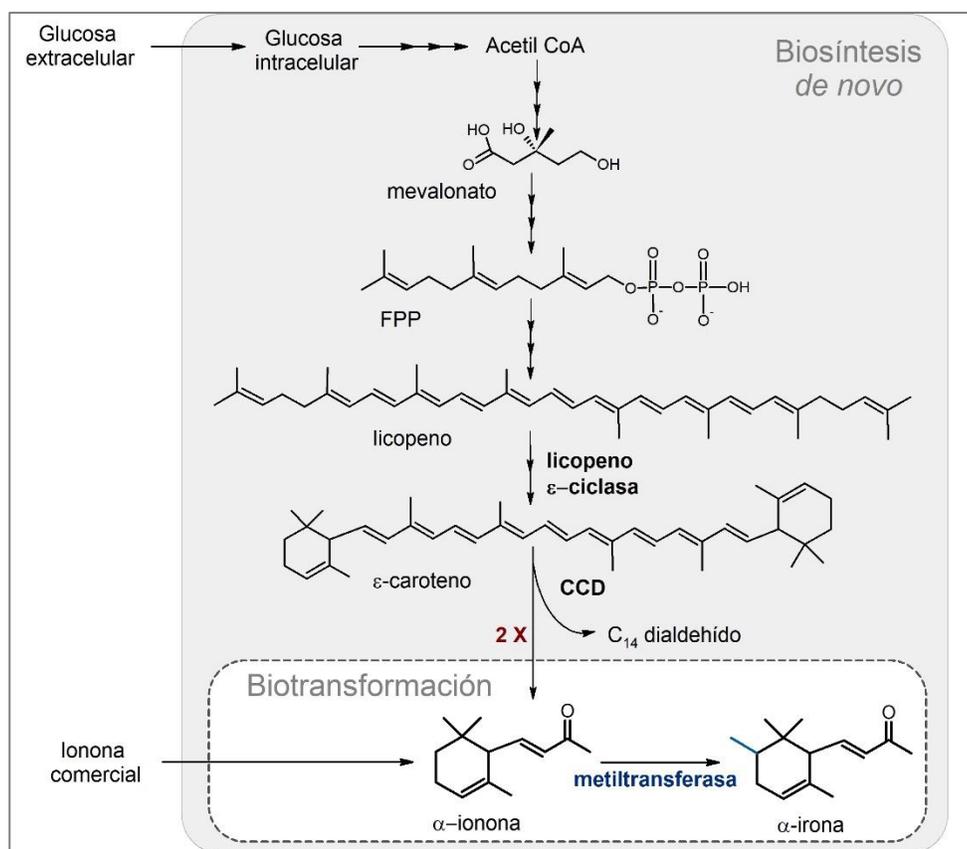


Figura 9: Esquema de la biosíntesis *de novo* de α -irona, a partir de glucosa y biotransformación a partir de α -ionona. Elaboración propia.

En el caso de la síntesis *de novo*, se requiere la formación de iononas dentro de la factoría celular seleccionada. Se ha reportado la biosíntesis de α - y β -ionona, en bacterias y levaduras a partir de la vía endógena del mevalonato, en conjunto con la expresión heteróloga de genes carotenogénicos y CCDs (Simkin *et al.* 2004; Lashbrooke *et al.* 2013; Beekwilder, Rossum, *et al.* 2014; López *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2018). A esto se le debe añadir la expresión de una MT que produzca ironas a partir de iononas.

3.4. Metilación de carotenos

Otra alternativa para la producción de ironas, es a través de la metilación de carotenoides en los átomos de carbono 3 y 30, correspondientes a lo que posteriormente es el C₂ del ciclo de las iononas. Por lo tanto, al ciclarse y ser cortados por las CCD's, se obtendrían hasta dos moléculas de irona por unidad de caroteno. Esta metilación puede ocurrir sobre los extremos lineales del licopeno (Figura 10) o sobre los extremos ciclados de los carotenoides (Figura 12).

3.4.1. Licopeno

La segunda propuesta es utilizar licopeno como sustrato. Para llegar a la producción de ironas, es necesario que este sustrato inicial sea metilado en C₃ y/o C₃₀ de su esqueleto. Para lograr esto, se proponen las enzimas TMT de *B. braunii* (véase la sección 7.4 del Anexo), que tienen funciones escualeno y botriococceno MT (SqMT y BcMT), cuyos sustratos son metabolitos con estructura similar al licopeno (Tabla 3). En efecto, estas MT son capaces de reconocer los extremos ψ del escualeno y metilarlos en C₃ y/o C₂₂, posiciones análogas a C₃ y C₃₀ del licopeno.

Posteriormente, el producto de esta reacción (metil-licopeno) debe ser aceptado y ciclado por las α - y β - ciclasas de la vía de los carotenos. Finalmente, el caroteno metilado resultante debe ser cortado oxidativamente por las CCDs. Estas enzimas reconocen el motivo central de los carotenos, por lo que su actividad no debiese ser mayormente

afectada por la metilación (Marasco *et al.* 2006; Ilg *et al.* 2014). En la Figura 10 se muestra un ejemplo de la vía propuesta para la producción de α -irona desde licopeno.

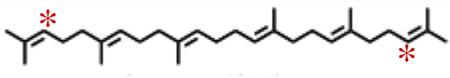
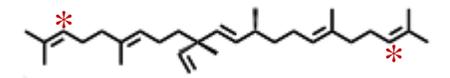
Enzima	Sustrato	Estructura en PDB	
SqMT (EC 2.1.1.262)	Escualeno		-
BcMT (EC 2.1.1.263)	C ₃₀ Botriococceno		-

Tabla 3: Enzimas candidatas a la metilación de licopeno. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura (Jiang *et al.* 2016). Ninguna de ellas se encuentra cristalizada por lo que no tienen asociado un código PDB. * Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).

Uno de los desafíos más importantes de esta vía es que las MT pueden tener baja o nula actividad con licopeno como sustrato. Además, *in vivo*, estas enzimas podrían actuar sobre el escualeno e inactivarlo, impidiendo la posterior conversión en esteroides, lo que tendría graves consecuencias a nivel de crecimiento celular. Una posible solución es utilizar la ingeniería de la enzima para que logre una mayor actividad por licopeno que por escualeno o especificidad. Por otro lado, tanto SqMT y BtMT son capaces de metilar el C₇ y C₁₈ del escualeno – C₇ y C₂₆ en licopeno – lo que resultaría en productos no deseados, y menores rendimientos; esto también podría modificarse a través de ingeniería de proteínas.

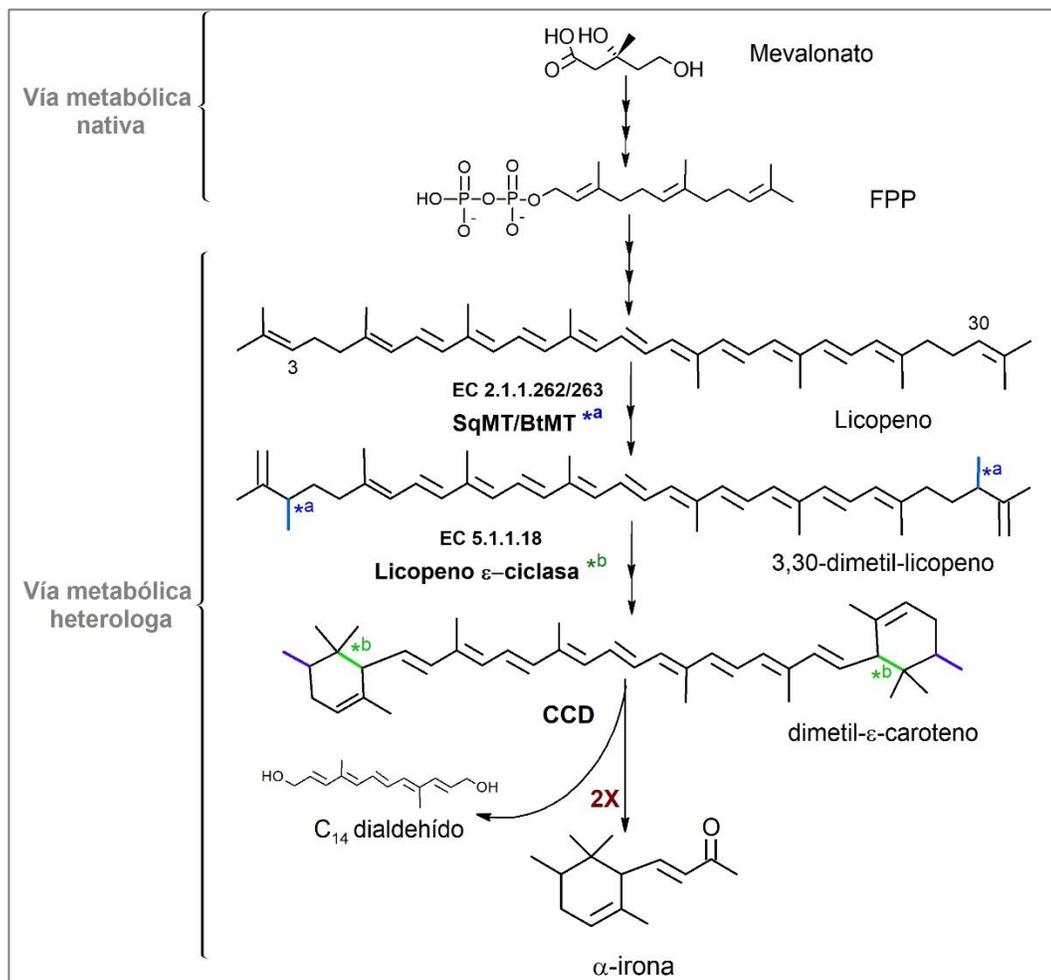


Figura 10: Esquema de la vía de síntesis de α -ironas a partir de la metilación del licopeno. a) metilación en C₃ y C₃₀, b) ciclación. Elaboración Propia.

Otro desafío es la ciclación del licopeno metilado, que puede verse perjudicada por dos razones. La primera está relacionada con la capacidad de la ciclasa de aceptar un sustrato mayor. El bolsillo catalítico debe tener el espacio suficiente y el grupo metilo no debe interferir con la estructura de la enzima o la posición en la que se ubica el sustrato. La segunda, es el efecto del grupo metilo suplementario en las propiedades químicas de los

átomos de carbono que reaccionan para formar el ciclo. Su presencia podría cambiar la capacidad de C₂ para unirse con C₇, reacción que se ejemplifica en la Figura 11.

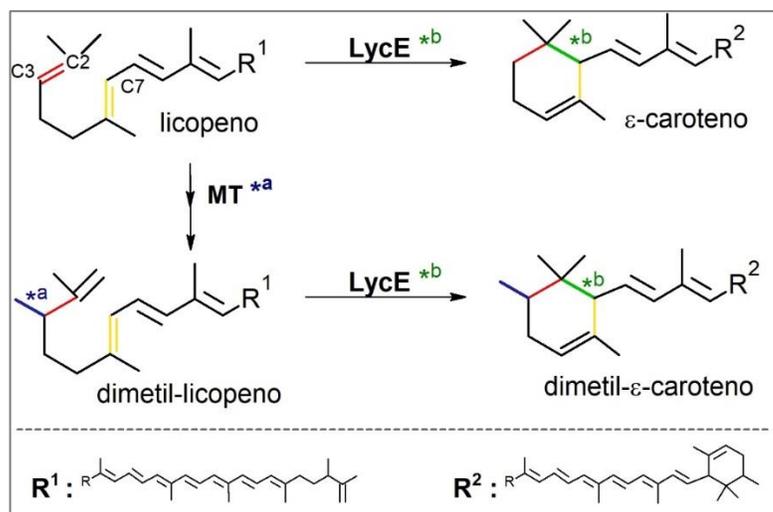


Figura 11: Esquema de la ciclación α del licopeno y su versión metilada. Elaboración propia.

3.4.2. Carotenos ciclados

La tercera propuesta es la síntesis de ironas a partir de la metilación de carotenos ciclados. Estos, al igual que el licopeno, pueden ser adicionados a la reacción *in vivo*, a través de la expresión heteróloga de enzimas carotenogénicas, o artificialmente. Este método requiere de una MT capaz de metilar un extremo ciclado en C₃ y C₃₀, numerados según el esqueleto del licopeno. La Figura 12 ilustra un ejemplo de la vía propuesta para la formación de α -ironas a partir de la metilación de ϵ -caroteno.

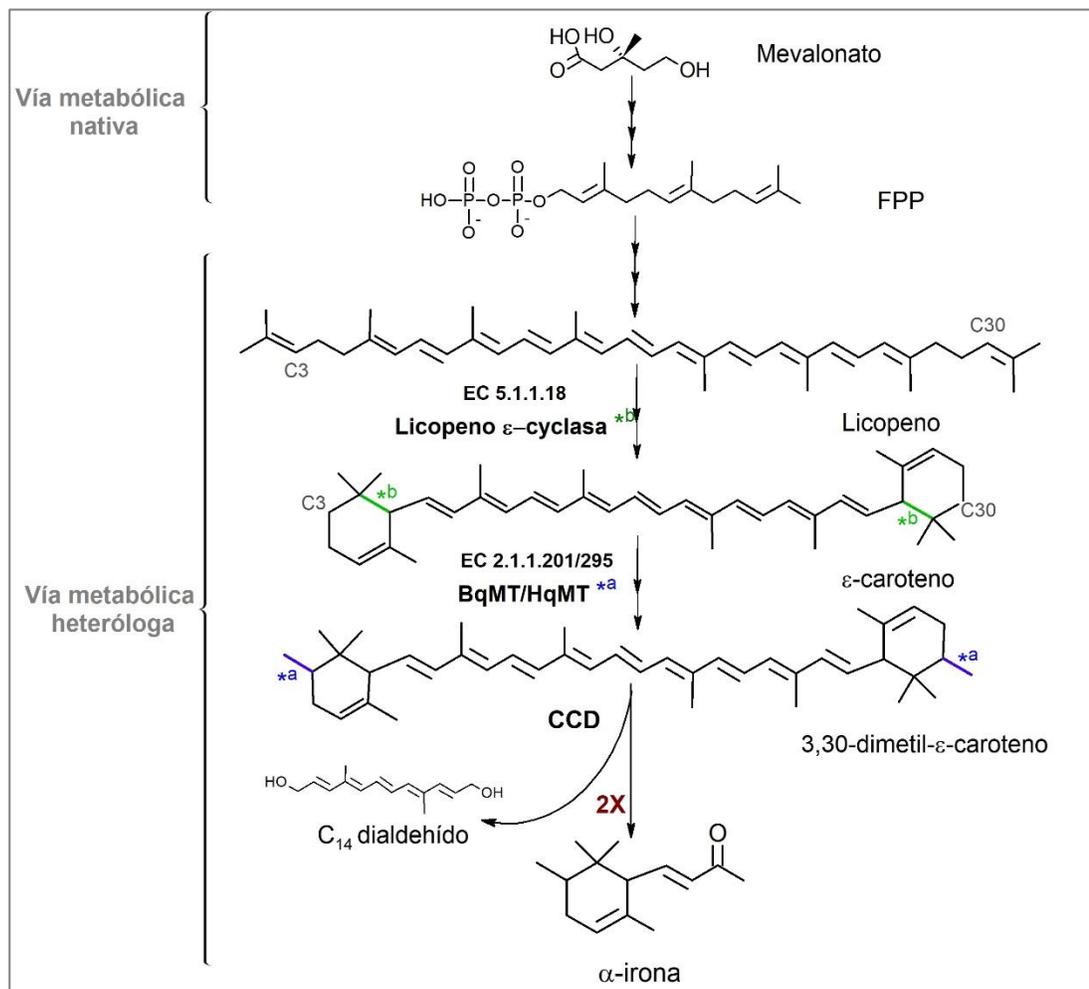
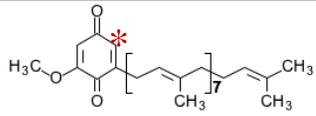
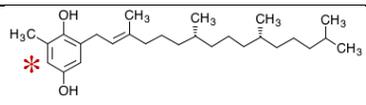
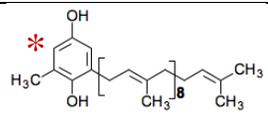
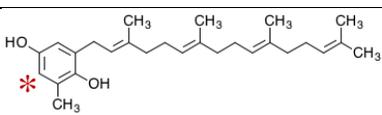
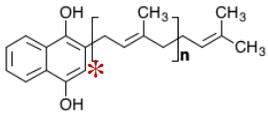
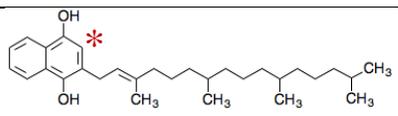


Figura 12: Esquema de la vía de síntesis de α-ironas a partir de la metilación de ε-caroteno. a) metilación en C₃ y C₃₀, b) ciclación. Elaboración Propia.

Al igual que en el caso de la metilación de iononas, no se ha reportado ninguna enzima capaz de metilar carotenos en las posiciones requeridas. Así, una solución es la búsqueda de enzimas que actúen sobre sustratos similares. En este sentido, se han reportado MT que metilan átomos de carbono de ciclos unidos a una cadena de hidrocarburos insaturada, como la benzoquinol metiltransferasa (BqMT, véase la sección 7.6.2 del Anexo) y la hidroquinona metiltransferasa (HqMT). Sin embargo, estos ciclos son diferentes al de los

carotenos, ya que algunos son bencénicos, tienen hidroxilaciones o grupos cetónicos. En la Tabla 4 se presenta las MT cuyo sustrato tiene la mayor similitud estructural con carotenos ciclados, también se detallan sus respectivos sustratos y código PDB de las estructuras disponibles.

Tabla 4: Enzimas candidatas a la metilación de carotenos ciclados. Se detalla los sustratos nativos, con su estructura y el código PDB de la estructura de la enzima. Estructuras obtenidas de la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 2018). * Posición de la metilación mediada por las enzimas (EMBL-EBI 2017).

Enzima	Sustrato	Estructura en PDB	
BqMT (EC 2.1.1.201)	2-metoxi-6- poliprenil-1,4- benzoquinol		4obw/4obx
HqMT (EC 2.1.1.295)	2-metil-6-fitolbenzen-1,4-diol		-
	2-metil-6-nonaprenilbenzen-1,4-diol		-
	6-geranilgeranil-2-metilbenzen-1,4-diol		-
MqMT (EC 2.1.1.163)	Demetilmenaquinona		-
PqMT (EC 2.1.1.329)	Demetilfiloquinol		-

3.5. Metilación de diapocarotenoides

La última alternativa propuesta es trabajar directamente con diapocarotenoides (véase sección 7.1.3 del Anexo), de manera análoga a la metilación de carotenoides lineales y cíclicos. Los diapocarotenoides son un tipo de carotenoides C₃₀ o triterpenos, cuya estructura y nomenclatura es análoga a la de los carotenos, careciendo de 5 átomos de carbono en cada extremo. Muchas de las enzimas que aceptan carotenos C₄₀, tienen actividad con su diapocaroteno equivalente C₃₀. Para este caso, se propone la metilación de dehidroescualeno por enzimas como TMT-1 y TMT-2 de *B. braunii* (Tabla 3).

Para la síntesis de dehidroescualeno se requiere de la expresión de CrtM en un microorganismo capaz de producir FPP. La metilación de dehidroescualeno, en combinación con la expresión de la desaturasa CrtN y ciclasas, podría resultar en carotenos C₃₀ ciclados y metilados (Figura 13). Estos compuestos, expuestos a CCDs, serían cortados, generando hasta dos ironas por triterpeno. Estas enzimas reconocen la estructura central de la molécula (Marasco *et al.* 2006; Ilg *et al.* 2014), motivo por el que podemos suponer que posean actividad por estos compuestos. El corte de carotenos C₃₀ biciclados, en comparación con los tetraterpenos, produce un aldehído de menor tamaño, lo que se traduce en un mayor rendimiento teórico del carbono. Sin embargo, esta vía nunca ha sido probada por lo que existen múltiples desafíos y dificultades asociados.

Para construir esta vía metabólica es necesario ensayar y poner a punto cada una de las reacciones involucradas. En primer lugar, ninguna de las enzimas de la vía heteróloga (Figura 13), a excepción de CrtM, han sido evaluadas en presencia de los sustratos propuestos, existiendo una alta probabilidad de que la actividad sea baja o nula y, de ser así, deberían ser modificadas para que logren aceptar el sustrato. Además, no se ha reportado la presencia de diapocarotenos bicíclicos en microorganismos, coexpresando CrtN y CrtM en conjunto con ciclasas (Lee *et al.* 2003). Esto resultaría en la producción de solo una irona y un alcohol C₁₈, disminuyendo el rendimiento a la mitad.

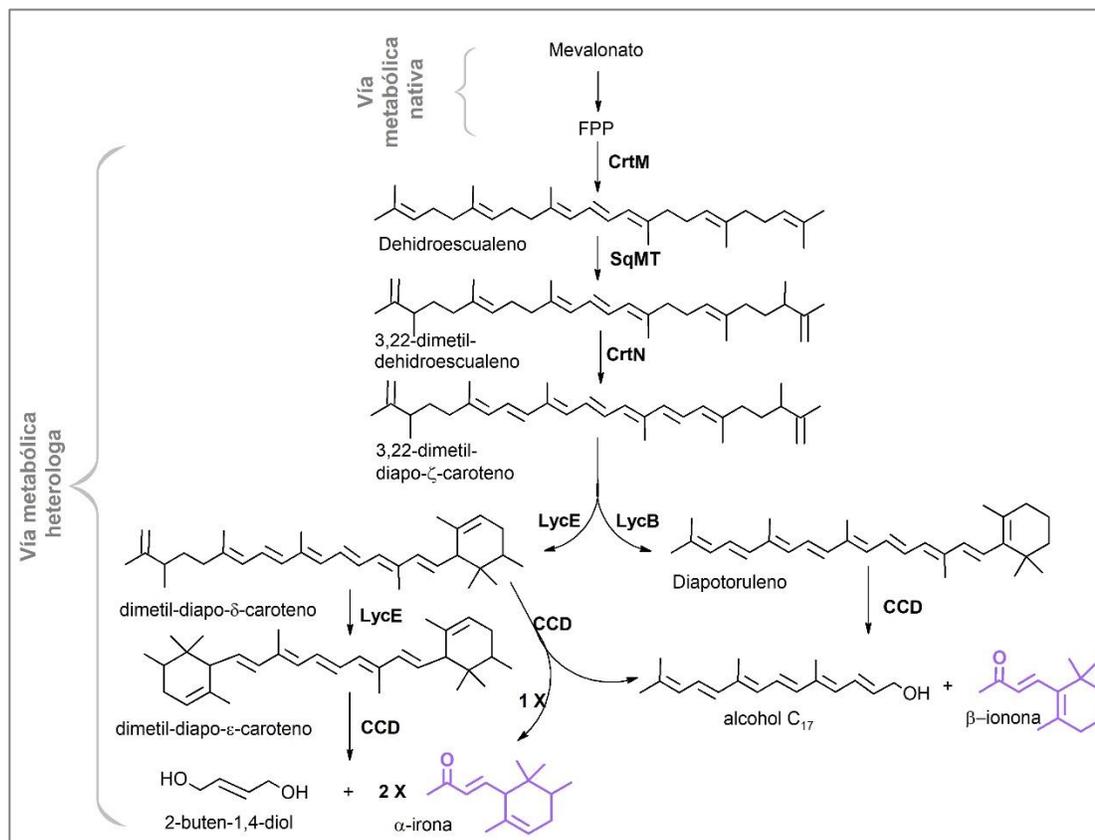


Figura 13: Vía propuesta de síntesis de ironas a partir de la metilación de triterpenos. Elaboración propia.

3.6. Selección y Propuesta

Con el objetivo de seleccionar uno de los mecanismos para desarrollar en este trabajo, se compararon las ventajas y desventajas de cada una de las estrategias propuestas anteriormente.

En primer lugar, el uso de la vía metabólica nativa tiene como ventaja que es posible encontrar enzimas nativas que tienen las funciones necesarias para la vía desde escualeno hasta todo tipo de iridales. Como las factorías celulares habitualmente utilizadas son capaces de sintetizar epoxiescualeno, este sería el punto de partida más avanzado en la vía.

Sin embargo, muchas de las enzimas involucradas no han sido identificadas aún dentro del metabolismo de los lirios y se postula que una de las reacciones podría no ser enzimática. En consecuencia, requiere un trabajo previo que consta de la identificación de la vía y genes asociados y de la secuenciación del genoma de al menos una de las especies de *Iris*. Además, tras identificar los genes responsables de esta vía que consta de al menos 6 pasos enzimáticos, éstos deberán ser clonados y expresados en un microorganismo.

En segundo lugar, la estrategia de metilación de iononas tiene como ventaja que su estructura es casi idéntica a las ironas y solo se requiere de una metilación. La única desventaja es que no se conocen enzimas que realicen esta función en iononas. Sin embargo, para esto existen diversas MT y se ha demostrado que muchas de ellas tienen actividad promiscua, siendo capaces de aceptar nuevos sustratos. De éstas, algunas se encuentran cristalizadas y su estructura disponible en la base de datos PDB, lo que permitiría realizar un diseño semi-racional de las mutaciones necesarias para la aceptación de iononas como sustrato.

Otro beneficio del desarrollo de esta técnica es que la obtención de las iononas es flexible. Por un lado, si se lleva a cabo una biotransformación, se puede utilizar ionona comercial, que tiene un valor mucho menor a la de las ironas, incluso comparando la alternativa natural de las iononas (~600 USD/kg de ionona natural, Vigon) con la química de las ironas (~1.700 USD/kg irona sintética, Vigon). Por el otro lado, para una síntesis *de novo*, ya se cuenta con cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* capaces de generar iononas. Por lo tanto, solo sería necesario añadir una enzima nueva a su metabolismo para lograr el proceso deseado.

En tercer lugar, en cuanto a la metilación del licopeno, una ventaja es su esqueleto isoprenoide y que es parte de la vía de síntesis de iononas. Esto permite que, si es metilado en la posición correcta y continúa siendo metabolizado por las enzimas de la vía, podría generar incluso dos moléculas de ironas. Además, existen enzimas capaces de metilar sustratos similares, como el escualeno, en la posición precisa, equivalente al C₂ del ciclo de las iononas.

Pese a esto, la actividad de las enzimas TMT no ha sido reportada con licopeno como sustrato y, aunque la metilación fuese exitosa, cabe la posibilidad de que el resto de las enzimas de la vía no acepten los nuevos sustratos metilados. Por último, no se conoce la estructura de ninguna de las enzimas involucradas, por lo que su modificación u optimización racional se ve dificultada.

La estrategia de metilación de carotenos ciclados tiene un potencial similar a la técnica anterior, con la ventaja de que los extremos ya se encuentran ciclados y que las CCD's reconocen el motivo central de la molécula, por lo que no debiesen verse afectadas por la metilación. Aunque existen MT que metilan compuestos cíclicos unidos a una cadena de hidrocarburos, estos ciclos difieren del caroteno debido a que son bencénicos y tienen sustituciones con átomos de nitrógeno u oxígeno. Además, la única enzima candidata que tiene su estructura cristalizada, carece de un segmento cercano al bolsillo catalítico y no está claro su mecanismo de reacción.

Por último, la metilación de diapocarotenoides tiene como beneficio que el sustrato de la MT candidata es prácticamente idéntico a hidroxiescualeno y que esta, metila en las posiciones deseadas. Además, como se mencionó en la sección anterior, es posible que CrtN sea capaz de deshidrogenar escualeno metilado, ya que tiene actividad promiscua. Al igual que con carotenos ciclados, también es probable que CCD logre reconocer el motivo central y realizar correctamente el corte oxidativo. Los obstáculos a los que se enfrenta esta estrategia es que no se ha reportado actividad de TMTs por dehidroescualeno. Asimismo, solo se ha reportado la formación de un diapocaroteno monociclado, el toruleno, al exponer estos compuestos a la acción de ciclasas de carotenos.

Tabla 5: Ventajas y desventajas de cada estrategia de biosíntesis de ironas.

Método	Ventajas	Desventajas
Vía Metabólica Nativa	<ul style="list-style-type: none"> - Enzimas nativas con función para generar iridales desde escualeno. - Factorías celulares comunes sintetizan epoxiescualeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Vía parcialmente reportada. - Reacción no enzimática. - Genoma de <i>Iris</i> no está secuenciado. - Inserción de al menos 6 funciones enzimáticas a una factoría celular.
Metilación de Iononas	<ul style="list-style-type: none"> - Estructura similar a ironas, solo requiere una metilación. - MT promiscuas y estructura PDB. - Iononas comerciales tienen un valor menor a las ironas. - Se ha reportado síntesis <i>de novo</i> de iononas. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se han caracterizado enzimas que cumplan la función requerida.
Metilación de Licopeno	<ul style="list-style-type: none"> - El sustrato tiene un esqueleto isoprenoide. - Existen enzimas capaces de metilar sustratos similares, en la posición correcta y a ambos extremos. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se ha reportado la actividad de TMTs por licopeno. - Extremos metilados pueden no ser ciclados. -Enzimas involucradas no cristalizadas.
Metilación de Carotenos Ciclados	<ul style="list-style-type: none"> - Extremos similares a ironas. - CCD's cortan en sitios correctos. - Existen MT que metilan anillos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sustratos de MT candidatos tienen anillos diferentes al caroteno. - Única MT con estructura en PDB tiene dos mecanismos putativos y le falta parte del bolsillo catalítico.
Metilación de Diapocarotenos	<ul style="list-style-type: none"> - MT candidata tiene un sustrato extremadamente similar. - Posiciones correctas de metilación. - CrtN podría desaturar metil-escualeno. - CCDs reconocen motivo central 	<ul style="list-style-type: none"> - No se ha reportado la actividad de las TMTs por dehidroescualeno. - No se ha reportado una actividad exitosa de ciclasas a excepción de la síntesis de toruleno (monocíclico).

En la

Tabla 5 se muestra un resumen de las ventajas y desventajas de cada técnica. Como se puede observar, la metilación de iononas es la estrategia que presenta más beneficios, solo es necesario trabajar con una enzima y existen estructuras en el PDB disponibles, lo que permite trabajar con ellas con una menor incertidumbre. Todas las demás técnicas requieren de la optimización o modificación de más de una enzima y la mayoría no se encuentra cristalizada, desconociendo su estructura. En consecuencia, se seleccionó la biosíntesis de ironas a través de la metilación de iononas como estrategia a desarrollar en este trabajo.

Dentro de los enantiómeros de las ironas, se propone la biosíntesis de (-)-*cis*- α -irona, dadas sus excelentes propiedades organolépticas. Además, las α -iononas naturales son mayoritariamente configuración (6*R*) y (-)-*cis*- α -irona es (2*S*,6*R*), por lo que es una opción viable. Se descarta la producción de (-)-*trans*- γ -irona, que también tiene propiedades organolépticas deseables, por tener una configuración (2*S*,6*S*) y dado que no provienen de carotenos conocidos en la naturaleza. Esto, limita su síntesis *de novo* y es posible que, para sintetizarla, sea necesario isomerizar desde otra irona.

Por último, la α -ionona puede ser sintetizada en un microorganismo a partir de la vía de los carotenos - a través del α - o ϵ -caroteno - o puede obtenerse comercialmente, llevando a cabo solo el último paso enzimático *in vivo* o *in vitro*. Este trabajo se enfocará en el diseño de la enzima que lleve a cabo la reacción de metilación, por lo que, todas estas opciones estarán disponibles.

3.7. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de este trabajo es que es posible catalizar la síntesis *in vitro* de irona a partir de ionona, utilizando metiltransferasas recombinantes mutadas, expresadas en *Escherichia coli*.

Para probar la validez de esta hipótesis se plantea, como objetivo general de esta tesis, expresar y evaluar metiltransferasas recombinantes mutadas, seleccionadas *in silico*, para la biosíntesis de (-)-*cis*- α -irona a partir de α -ionona, en *E. coli*.

Para lograrlo, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificar metiltransferasas con afinidad por sustratos similares a α -ionona en cuanto a tamaño y estructura química.
- 2) Evaluar *in silico* el efecto de mutaciones puntuales, en la(s) metiltransferasa(s) seleccionada(s), sobre la afinidad con α -ionona y la posición de ésta dentro del bolsillo catalítico.
- 3) Inducir la expresión de las enzimas recombinantes mutadas en *E. coli*.
- 4) Evaluar la actividad *in vitro* de α -ionona para cada una de las mutantes producidas.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Selección de la(s) enzima(s)

Para seleccionar enzimas como candidatos para la metilación de iononas, se llevó a cabo una revisión exhaustiva de los 349 tipos de metiltransferasas (EC 2.1.1.X), catalogadas de acuerdo a su función enzimática. En primer lugar, se estudió y clasificó cada una según elemento a metilar, cofactor y sustrato. Mediante esta clasificación se descartó aquellas enzimas que metilaban sobre átomos diferentes a carbono, ya que el mecanismo de reacción y las propiedades químicas del aceptor son muy distintas (Niehaus *et al.* 2012; Schubert *et al.* 2003). De este subgrupo de 54 C-MT resultantes se anotó su estructura, códigos PDB disponibles, publicaciones asociadas y mecanismo catalítico.

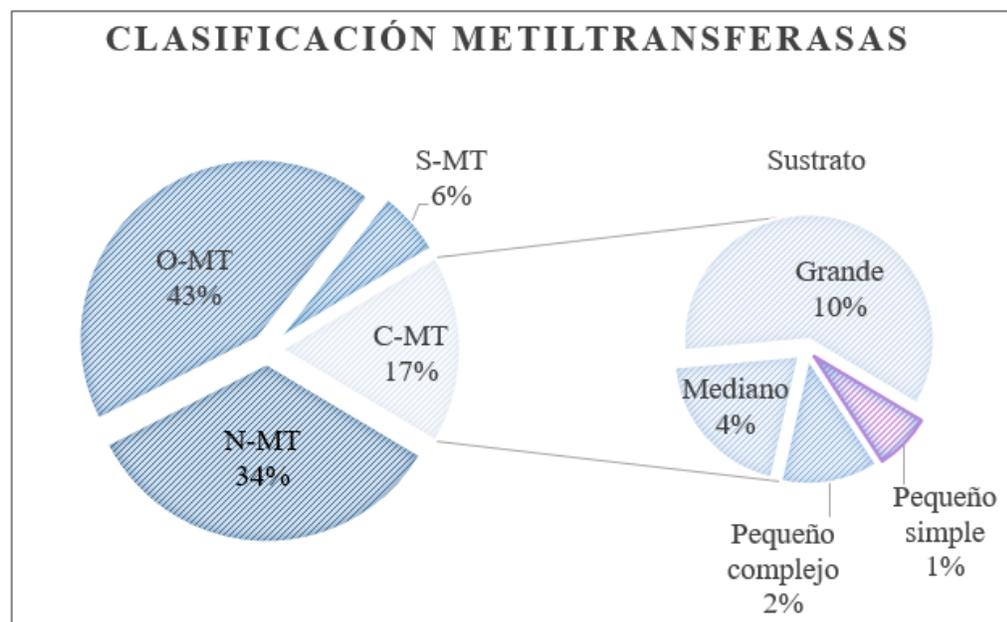


Figura 14: Gráfico circular de la clasificación de MT según elemento a metilar (izquierda) y sustrato de las C-MT (derecha). Elaboración propia.

Posteriormente, se realizó una nueva clasificación según el tamaño y complejidad del sustrato a metilar (ver Figura 14). Dentro de los de mayor tamaño se encuentra el DNA, tRNA, rRNA y proteínas, entre otros. Los sustratos de tamaño mediano varían desde fosfolípidos hasta esteroides y quinonas. Por último, los sustratos pequeños son aminoácidos y metabolitos como dUMP y fenilpiruvato (PPY). La complejidad de la estructura se midió según la cantidad de ciclos, sustituciones y tipos de elemento diferentes a carbono e hidrógeno. La Tabla 6 muestra la cantidad de funciones enzimáticas en cada grupo. Los sustratos similares a iononas son los cuatro clasificados en el grupo pequeño y simple.

Las enzimas que se encuentran dentro de esta clasificación son: 3-hidroxiantranilato 4-C-MT (EC 2.1.1.97), GPP-2-C-MT (EC 2.1.1.255), fenilpiruvato C(3)-MT (EC 2.1.1.281) y L-tirosina C(3)-MT (EC 2.1.1.304) (Tabla 2). A partir de éstas, se realizó un estudio más profundo en cuanto a su estructura y a la posibilidad de realizar un modelo por homología, en los casos donde no se ha cristalizado la proteína. Además, se analizaron los bolsillos catalíticos, los mecanismos de reacción putativos y los residuos involucrados en distintas funciones.

Tabla 6: Cantidad de C-MT en cada categoría según tamaño y complejidad de su sustrato.

Tamaño/Estructura del sustrato	Compleja	Simple
Grande	33	-
Mediano	4	7
Pequeño	6	4

Se utilizaron las bases de datos de PDB (Berman *et al.* 2000) y Uniprot (Bateman *et al.* 2017). Los alineamientos de secuencia se llevaron a cabo a través de las herramientas en línea de BLAST (Altschul *et al.* 1990), Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011), Promals3D

(Pei *et al.* 2008) y ESPript 3.0 (Robert & Gouet 2014); y la visualización de estructuras se hizo mediante los *softwares* VMD (Humphrey *et al.* 1996) y PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Finalmente, se seleccionó una enzima como candidata a la metilación de iononas. Esta selección se basó en criterios de estructura, mecanismo de reacción e información disponible para trabajar con la proteína.

4.2. Diseño de mutaciones

Una vez seleccionada la enzima (MppJ, sección 5.1), se realizó una prueba preliminar de aceptación de sustrato, mediante métodos bioinformáticos. Para esto se utilizó SwissDock (Grosdidier *et al.* 2011), una herramienta de *docking* en línea. Como receptor se seleccionó la cadena A de MppJ y como ligando, PPY o α -ionona. El programa calcula los sitios más visitados, es decir, donde hay más probabilidad de interacción entre receptor y ligando según las interacciones fisicoquímicas entre ellos; entregando una lista de posiciones en las que los sustratos podrían encontrarse.

Por medio de este análisis fue posible determinar la posición del bolsillo catalítico; y se determinó que es improbable que las iononas sean capaces de entrar en él y ser metiladas (sección 5.3.4). Por lo tanto, era necesario modificar estructuralmente la enzima de manera que se cumplan dos criterios. En primer lugar, que el compuesto quepa dentro de la cavidad; y en segundo, que se logre ubicar en la posición correcta para ser metilado en el C₂ del anillo. Para determinar esto último, se evaluó la distancia entre el átomo que recibirá el metilo (C₂) y tres puntos de referencia significativos en la catálisis: el átomo de hierro (Fe), el átomo de carbono del grupo metilo en SAM (C_{SAM}) y el átomo de nitrógeno del Trp99 de la enzima (N_{W99}), el que es responsable de iniciar la reacción catalítica (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014) (sección 5.2.1). Esta distancia se comparó con la del átomo de carbono metilado en el sustrato original: 3.3 Å de C_{SAM}, 3.6 Å de N_{W99} y 4.1 Å de Fe, determinadas a través del *software* PyMOL (Figura 23).

4.2.1. Estudio del bolsillo catalítico y selección de residuos significativos

Con el objetivo de estudiar el sitio activo de la enzima, se clasificaron todos los residuos según la estructura secundaria en la que se encuentran y según su función, descrita en estudios anteriores (Y. Huang *et al.* 2009; Zou, Y.-C. Liu, *et al.* 2014). Además, se definió la orientación, propiedades químicas, relación con iones, cofactores y sustrato original de aquellas posiciones que se encuentran a menos de 8 Å del centro del bolsillo catalítico. Asimismo, se analizó el volumen de esta cavidad, utilizando la herramienta en línea CASTp (Dundas *et al.* 2006) y la ubicación de los sustratos y cofactores, utilizando el *software* de *docking* Autodock Vina (Trott & Olson 2010).

4.2.2. Docking

Se utilizó la estructura de la cadena A del cristal con código PDB 4KIC de MppJ, que fue cristalizada con PPY y SAM en su forma dimérica. Previo a la realización del *docking* se preparó el receptor asignando cargas parciales a todos los átomos y agregando hidrógenos polares al archivo, convirtiéndolo en un archivo con formato .pdbqt. Esto se puede realizar automáticamente en el *software* Autodock Tools (ADT), que considera solo aquellos átomos de hidrógeno unidos a átomos electronegativos, como oxígeno y nitrógeno. Como ligando se utilizó PPY extraído de 4KIC y (*R*)- α -ionona, cuyo modelo fue generado en MolView, ambos sustratos fueron parametrizados en ADT. Las coordenadas del centro de la grilla fueron situadas en la mitad del bolsillo catalítico y corresponden a: x=12,0, y=-11,2, z=-16,0. El tamaño de la caja se varió entre 12 Å y 20 Å para cada coordenada. La exhaustividad de la búsqueda se fijó en 20 para las búsquedas masivas y se aumentó a 50 en mutaciones seleccionadas; se analizaron los primeros 5 resultados para cada mutante.

En primer lugar, se usó como receptor a MppJ, quitándole SAM y PPY, para utilizar como ligando a SAM y determinar la posición y afinidad del *docking* del cofactor por sí solo. Luego, se repitió el experimento, utilizando como receptor a MppJ con SAM

incorporado y como ligando a PPY, extraído de 4KIC, con el objetivo de analizar el comportamiento del sustrato original. Más adelante, se cambió el ligando por (*R*)- α -ionona y se probaron diferentes tamaños de la grilla, de manera de medir la afinidad en la posición necesaria para su metilación. Finalmente se estudió el *docking* de las distintas mutantes, de manera manual en un inicio, y a través del *script* que se describe a continuación.

4.2.3. Desarrollo de *script* de *docking* masivo y distancia

Dada la gran cantidad de combinaciones mutantes a analizar, se diseñó un *script* con el objetivo de automatizar el proceso de mutación, *docking* y medición de distancias entre átomos de interés, a fin de poder abarcar una mayor cantidad de casos en un menor tiempo. El *script* diseñado recibe como *input* la estructura de la proteína y ligando, en formato .pdb, un listado de las posiciones de los residuos a mutar, los átomos entre los cuáles se quiere medir distancia y la configuración del *docking*. Esta configuración incluye las coordenadas y tamaño del espacio a analizar (caja), la exhaustividad de la búsqueda y el número de resultados que se desea obtener, como se mencionó en la sección anterior. Los resultados se entregan como una matriz numérica, que puede ser fácilmente evaluada por un usuario u otro programa. Dentro de la matriz se encuentra la posición y el nuevo residuo de la mutación, el valor de la afinidad (kcal/mol) y distancia de C₂ a los átomos de Fe, C_{SAM} y N_{W99}.

En primer lugar, el *script* prepara el receptor y ligando, agregando cargas e hidrógenos polares y transformando los archivos desde formato .pdb a uno .pdbqt. Este tipo de archivo es una matriz que incluye el nombre de cada átomo, al residuo al cual pertenecen (si son parte de la proteína), su posición en los tres ejes cartesianos y, a diferencia del formato .pdb, un valor asociado a su carga. En segundo lugar, el programa realiza las mutaciones respectivas y acomoda los aminoácidos haciendo una minimización de energía local. Esto se lleva a cabo mediante Modeller, un *software* de modelación proteica por comparación, el cual relaja la enzima en el sector donde se efectuó el cambio y evalúa la posición en la que la energía de interacción es mínima. Por último, el programa lleva a

cabo el *docking* para cada mutante generada y mide las distancias del C₂ de la ionona a los átomos seleccionados. Esta medición se logra a través de la comparación de las coordenadas cartesianas de cada átomo involucrado de la siguiente manera, siendo 1 y 2, los átomos entre los cuales se quiere medir la distancia:

$$d_i = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

Por último, el *output* o producto del programa son: las estructuras de las mutantes y de los ligandos ajustados por el *docking*; y una matriz con los resultados de afinidad y distancia de cada caso calculado.

4.2.4. Evaluación de mutantes *in silico*

Las matrices resultantes más arriba fueron evaluadas mediante Excel(365). Como primer criterio de selección, se consideraron solo aquellos casos en los cuales la distancia a cada uno de los átomos de referencia tuviese una diferencia de hasta 0.8 Å, en comparación con la original. En segundo lugar, dado que la afinidad del ligando original es de -7,2 kcal/mol, se seleccionaron los que tuviesen una afinidad menor a -6,0 kcal/mol y cuya mutación significara una disminución en esta energía.

Por último, a pesar de que la orientación con mejor afinidad fuese la deseada, le seguían otras orientaciones con similar afinidad, o probabilidad de ocurrir, para una misma mutante. Existen ciertas orientaciones del sustrato que lo hacen susceptible a sufrir metilaciones en sitios no deseados, ya que otros átomos de carbono del esqueleto de la ionona quedan en la posición de metilación. Para evitarlas, se dio preferencia a aquellas mutaciones en las cuales la afinidad de la mejor posición encontrada en el *docking* superara en al menos en 1 kcal/mol a la segunda.

4.3. Construcción de vectores y cepas mutantes

4.3.1. Síntesis del gen *mppJ* y clonamiento

Se solicitó la síntesis del gen *mppJ* de *Streptomyces hygroscopicus* a la empresa GeneScript (Estados Unidos) clonado dentro del vector de expresión pET28a. Este vector consta de un origen de replicación pBR322 entre 15 y 20 copias, un gen de resistencia a la kanamicina y el gen *lacI* que actúa como represor. Además, su sitio de múltiple clonamiento tiene el promotor T7, activado por la T7 RNA polimerasa y el marcador *His-tag* opcional, para ambos extremos de la proteína, con un sitio de corte por trombina para su remoción luego de la purificación

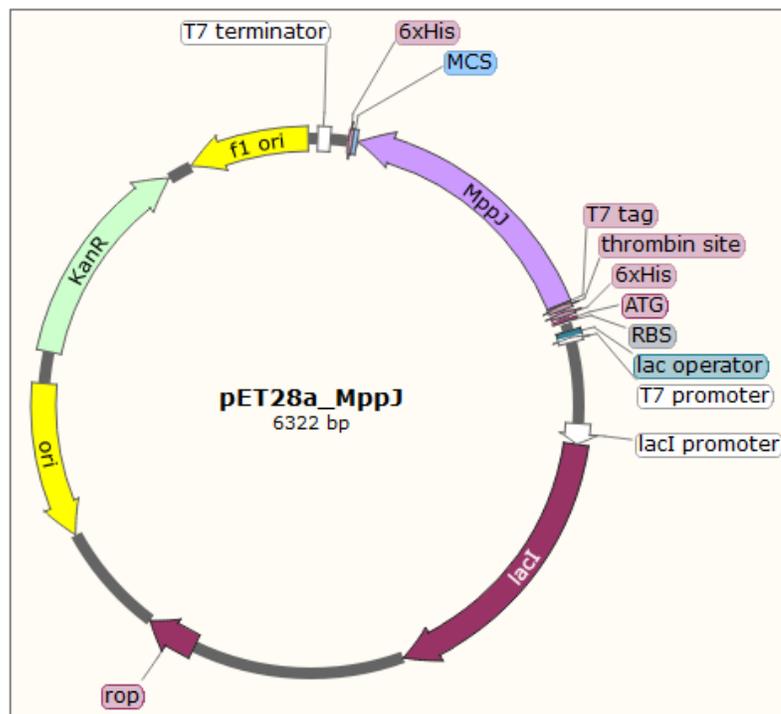


Figura 15: Esquema del vector pET28a con *MppJ* insertado entre los sitios de restricción *NdeI* y *HindIII*. Imagen generada en SnapGene.

El gen *mppJ* se ubicó entre los sitios de restricción *NdeI* y *HindIII*. Esto se traduce en una proteína que posee una cola de polihistidina en el extremo *N*-terminal, seguida inmediatamente por un sitio de corte por trombina, para removerla en caso de ser necesario. La Figura 15 muestra un esquema del vector con *mppJ* clonado.

Para inducir la expresión de pET28a, se utilizó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se transformó en conjunto con otro plásmido que contenía el gen de la T7 RNA polimerasa o en cepas que lo tengan integrado en su genoma, como *E. coli* BL21(DE3). Cabe señalar que este tipo de vectores se utiliza ampliamente para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

4.3.2. Diseño de partidores mutagénicos

Para visualizar y construir los partidores, se utilizó el *software* SnapGene o SnapGene Viewer (GSL Biotech, Chicago, IL, Estados Unidos). Estos se diseñaron siguiendo el sistema de mutagénesis sitio-dirigida de GeneTailor (Invitrogen Life Technologies, 2004), en el cual los *primers* se encuentran parcialmente solapados y solo uno de ellos lleva la mutación (Figura 16). El resultado del PCR mutagénico es un ADN de doble hebra que, al ser transformado en *E. coli*, es circularizado y ligado, sin necesidad de utilizar ligasas previamente. Esta técnica, además de ser particularmente efectiva, permite un importante ahorro de tiempo y recursos. Por último, los partidores fueron enviados a sintetizar y liofilizados por la empresa Macrogen (Corea).

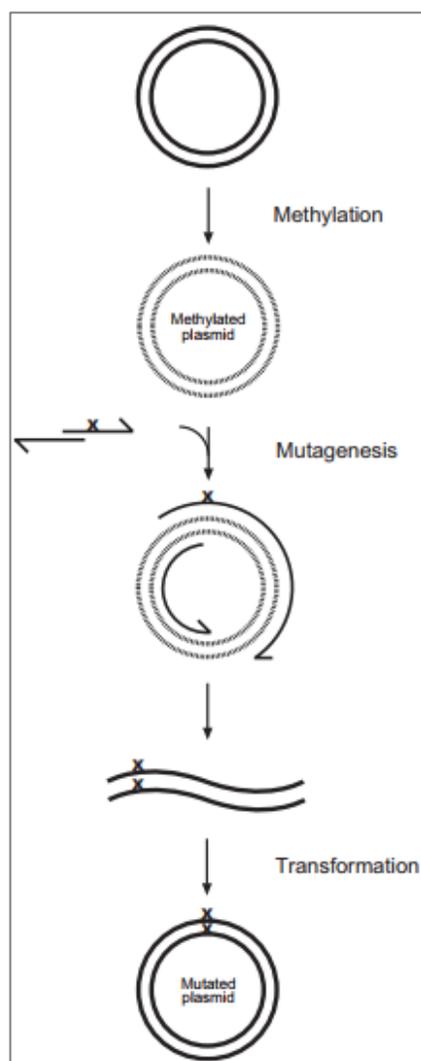


Figura 16: Mutación sitio-dirigida según protocolo de GeneTailor (Invitrogen Life Technologies 2004).

El protocolo de GeneTailor solo requiere que uno de los dos partidores lleve la mutación. En este trabajo se utilizó un partidor *reverse* para definir cada mutación y un partidor *forward* por cada posición mutada, que no incluye la mutación. En la Tabla 7 se

indica la secuencia de todos los partidores mutagénicos, de verificación y secuenciación utilizados en este trabajo.

Tabla 7: Partidores utilizados en este trabajo. En rojo se señalan las mutaciones.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Uso
A273_fw	ACCCGTACCGTTGGCATCCCGGAT	68	A273X
A273W_rv	CCAACGGTACGGGTCCAGTCACCCAGCA	60	A278W
Cheq_ATG	ATGGGCAGCAGCCATCA	56	Verificación inicio gen
Cheq_END	TTATTCCAGCTCAAACACAACGC	58	Verificación término gen
F287_fw	ACCCTGGGCTTCGAATTTGGTACGAC	67	F287X
F287C_rv	AAATTCGAAGCCCAGGGTGCACACCGGCAGC	68	F287C
F287D_rv	AAATTCGAAGCCCAGGGTATCCACCGGCAGC	61	F287D
F287E_rv	AAATTCGAAGCCCAGGGTTCCACCGGCAGC	61	F287E
F287L_rv	AAATTCGAAGCCCAGGGTCAGCACCGGCAGC	65	F287L
I139_fw	AGCGAACGTTACTTCGACCCGGC	66	I139X
I139T_rv	GAAGTAACGTTTCGCTGGTCTCACGGCAC	59	I139T
I139V_rv	GAAGTAACGTTTCGCTCTCCTCACGGCAC	53	I139V
L328_fw	AGCGTGAGCGTTGTGTTTGAGCT	65	L328X
L328F_rv	CACAACGCTCACGCTAAAGCTATCAATC	54	L328F
M240_fw	ATGGGTCACGATTTTTGGCCGCGT	67	M240X
M240A_rv	AAAATCGTGACCCATCGCGAAGCAGGTCA	56	M240A
M240G_rv	AAAATCGTGACCCATGCCGAAGCAGGTCA	52	M240G
MppJ_seq	CCTTTCGGGCTTTGTTAGCA	57	Secuenciación gen
MppJ_seq2	GCGGATAACAATCCCCTCTAG	57	Secuenciación gen
T7 Prom	TAATACGACTCACTATAGGGGAA	53	Verificación promotor
T7 Ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	56	Verificación terminador

En la Figura 17 se muestran los sitios de unión de los partidores en el vector pET28a con *mppJ*. Se puede apreciar que éstos solo se unen en un sitio del vector, por lo que no debiesen amplificar otras regiones de éste.

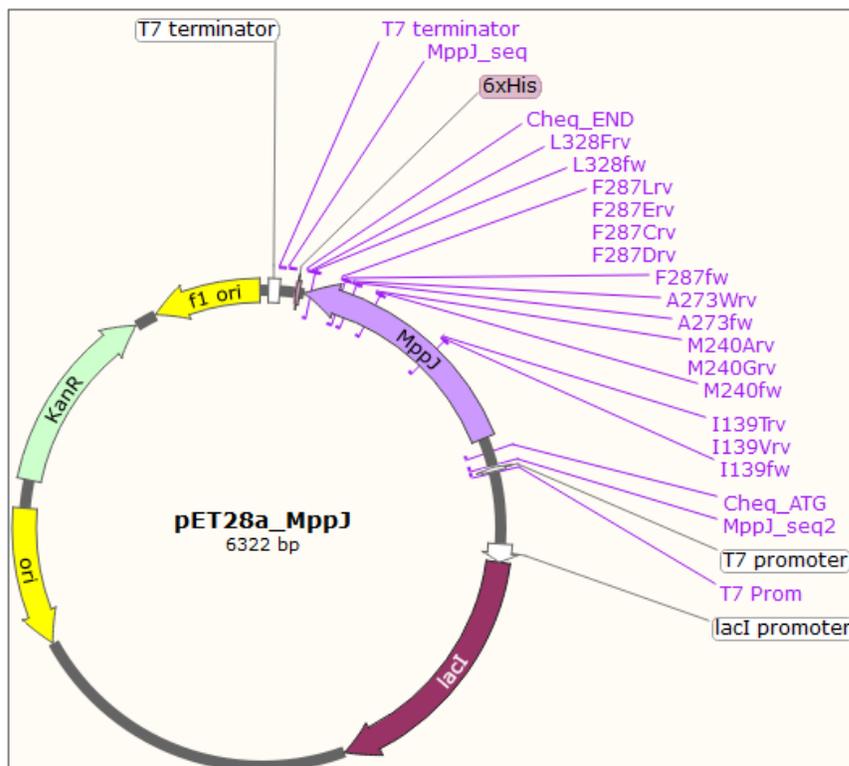


Figura 17: Esquema del vector pET28a con MppJ. Se señala la ubicación de unión de los partidores.

Imagen generada en SnapGene.

4.3.3. Mutagénesis

Para la reacción de PCR se utilizó la polimerasa *Phusion DNA Polymerase* (Thermo Fischer Scientific) con su respectiva solución tampón (*buffer*) y se preparó según el protocolo del proveedor (Tabla 8). En el caso de las mutaciones simples, se utilizó como templado el vector con el gen original. Las mutaciones múltiples fueron realizadas en serie, utilizando como templado aquellos vectores cuya mutación había sido previamente corroborada por secuenciación. También, se intentó realizar de a dos mutaciones en paralelo, agregando ambos pares de partidores a la vez.

Tabla 8: Protocolo de preparación de reacciones de PCR para *Phusion DNA Polymerase*.

	Positivo (50 µL total)	Negativo (50 µL total)
5X <i>Phusion</i> HF Buffer	10 µL	10 µL
10 mM dNTP's	1 µL	1 µL
Partidor <i>forwad</i>	0,25 µL	0,25 µL
Partidor <i>reverse</i>	0,25 µL	0,25 µL
ADN Templado (10 ng)	1 µL	-
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0,5 µL	0,5 µL
H₂O	37 µL	38 µL

El proceso fue llevado a cabo con una denaturación inicial de 30 segundos. Esta fue seguida por 30 ciclos que constan de: 1) 10 segundos de denaturación a 98 °C, 2) 30 segundos de alineamiento de los partidores a 70 °C y 3) una elongación de 3 minutos a 72 °C, correspondiente al tamaño vector (aproximadamente 6.000 pares de bases). La reacción se finalizó con 10 minutos adicionales de elongación.

4.3.4. Electroforesis

Para chequear que el tamaño del vector fuese el correcto y aislarlo del resto del ADN contenido en la reacción de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este fue teñido con SYBR *Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fischer Scientific) y corrido a 110 V durante 40 minutos, con los productos de PCR. Posteriormente, se aisló la banda correspondiente a un tamaño de alrededor de 6.000 pares de bases, lo que fue corroborado con un estándar de DNA (1 kb DNA Ladder NEB, Estados Unidos). Se extrajo el vector de esta banda con el kit de purificación de geles Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up

System (Promega). Finalmente, se digirió el ADN templado con la enzima DpnI (NEB), por 2 horas a 37 °C.

4.3.1. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano fueron LB y SOB en sus versiones líquidas y sólidas (agar). En la Tabla 9 se puede ver el protocolo de preparación de LB y en Tabla 10 el de SOB. Ambos medios deben ser disueltos en agua destilada hasta llegar a 1 L y esterilizados en autoclave a 120 °C por 20 minutos. Como medio de selección se le agregó kanamicina en una concentración de 50 µg/mL. En adelante los medios con kanamicina en esta concentración se abreviarán LBK y SOBK, respectivamente.

La preparación de placas Petri fue realizada en campana, añadiendo 25 mL de LB-agar y kanamicina 50 µg/mL (LBK-agar), a una temperatura de alrededor de 50 °C. Las placas se dejan enfriar semitapadas por 20 minutos, hasta que se solidifique el agar, antes de ser utilizadas o almacenadas.

Tabla 9: Preparación para 1 L de medio LB y LB-agar.

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar (para medio sólido)	15 g

Tabla 10: Preparación para 1 L de medio SOB.

Triptona	20 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgSO ₄	2,4 g
Agar (para medio sólido)	15 g

4.3.1. Transformación bacteriana

Se transformaron 50 μ L de *E. coli* competentes con 100 ng de vector, conteniendo el gen correspondiente. Para esto, se agregaron las bacterias competentes y el ADN, manteniéndose durante 30 minutos en hielo. Luego, se realizó un shock térmico a 42 °C por 1 minuto y se volvió a enfriar en hielo por 3 minutos. Después, se recuperaron las células en 1 mL de medio LB por una hora a 37 °C. Finalmente, se centrifugó por 2 minutos a 5.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se sembró en placas Petri con 25 mL de LBK-agar. Las colonias se dejaron creciendo por 16 horas a 37 °C y luego se conservaron a 4 °C.

4.3.2. Construcción de vectores

La construcción de los vectores con *mppJ* mutante se llevó a cabo a través de PCR mutagénico en un volumen de 50 μ L. La purificación de los vectores de la primera serie de mutaciones resultó en una pequeña cantidad de ADN de entre 5 y 20 ng/ μ L. Todo el producto fue transformado en *E. coli* TOP10, para cerrar y multiplicar el vector. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas Petri con LBK-agar como método de

selección de aquellas bacterias que habían adquirido y cerrado el vector correctamente. Se seleccionaron y crecieron, en medio LBK líquido, de 2 a 4 colonias por mutante y se extrajo el vector con *kit* de Miniprep. En paralelo, se respaldó la colonia sembrando 1 μL del cada cultivo en placas Petri. La concentración de ADN aumentó a valores de entre 15 y 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Por último, se envió a secuenciar el gen del vector de cada colonia seleccionada.

Para aumentar la concentración de ADN tras la purificación, se duplicó el volumen del PCR a 100 μL . Esto resultó en una concentración de entre 20 y 85 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en la segunda y tercera serie de mutaciones. Además, para aumentar la concentración de vector recuperado por Miniprep, se cambiaron las condiciones de crecimiento de *E. coli*. De esta manera, se aumentó el volumen de cultivo de 3 mL a 10 mL, se cambió de medio LBK a SOBK y se utilizaron tubos de mayor tamaño para favorecer la oxigenación. El resultado fue positivo, alcanzando concentraciones de entre 300 y 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de vector purificado. Esta alta concentración de vector facilita la secuenciación y la transformación de las bacterias.

4.3.3. Secuenciación

Para corroborar que las mutaciones realizadas fuesen correctas, se seleccionaron 4 colonias por cada mutante y se dejaron creciendo en 5 mL de medio SOBK por 16 horas. Luego, a cada aislado se le extrajo los plasmidios mediante el kit de MiniPrep E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II (Omega). Después, se envió a secuenciar 2 μg de vector a la empresa Macrogen (Corea) por cada colonia picada.

4.3.4. Generación de cepas mutantes para expresión enzimática

Se utilizaron los plasmidios extraídos cuya secuenciación había sido correcta (sección 4.3.3.), para transformar *E. coli* One Shot® BL21 StarTM (DE3) (Thermo Fisher Scientific) según el protocolo en la sección 4.3.1. Esto se realizó una vez por cada mutante y se

sembró en placas Petri con LBK-agar, las que fueron incubadas a 37°C por 16 horas y luego, almacenadas a 4°C.

4.4. Expresión y purificación enzimática

4.4.1. Crecimiento de mutantes y expresión del gen mppJ

Se inoculó cada mutante en matraces con medio LBK, utilizando un quinto del volumen total. Se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm, hasta alcanzar 0.6 OD₆₀₀. Luego, se centrifugó en tubos Falcon de 50 mL a 6.000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en LBK con 0.5 mM de IPTG para inducir la expresión de las enzimas. Estos cultivos se incubaron en matraces de 250 o 500 mL a 16 °C por 16 horas. Finalmente, se centrifugó en tubos Falcon de 50 mL a 6.000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet a -80 °C.

4.4.2. Lisis celular

Para romper las células y liberar la proteína expresada anteriormente, se recolectó el *pellet* y se resuspendió en buffer de lisis (5 µL/mg de *pellet*), preparado como se muestra en la Tabla 11. Se traspasó a tubos Eppendorf de 1,5 mL, a los cuales se les agregó entre 200 y 300 µL de perlas de vidrio (*glass beads*) previamente lavadas con ácido y exhaustivamente lavadas con agua. La lisis fue llevada a cabo en un disruptor por 5 minutos totales en los cuales se intercaló cada minuto con un minuto en hielo, para mantener una temperatura baja.

Para extraer el lisado sin las perlas de vidrio, se perforó el fondo del tubo con una aguja y se centrifugó por 30 segundos sobre tubos Eppendorf de 2,0 mL. Para maximizar la recuperación de proteína, se lavaron las perlas con PBS (50 mM) y se juntó esta fracción con el lisado celular. El producto fue conservado a -20 °C hasta su uso en ensayos enzimáticos, purificación o electroforesis.

Tabla 11: Preparación de buffer de lisis para *E. coli*.

Tris (pH 8)	20 mM
Imidazol	30 mM
NaCl	500 mM
β -mercaptoetanol	2 mM
Inhibidores de proteasas (Sigma)	1 tableta cada 100 mL

4.4.3. Purificación

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, con una columna de resina quelante de perlas de sefarosa, capaces de coordinar níquel. Esto se realizó, por un lado, en un equipo de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), regenerando y empacando la columna de forma manual y, por el otro, mediante una bomba peristáltica con colección de fracciones manual, con una columna previamente empacada His-Trap High Performance (Sigma Aldrich) y detección mediante lector de placas de 96 pocillos (Tecan, Suiza).

Para el caso de la regeneración manual de la columna, se lavó con 2 volúmenes equivalentes al de la columna de una solución de 200 mM de EDTA y 500 mM de NaCl. Luego, se removió el EDTA con 2 volúmenes de una solución de 500 mM de NaCl seguido por 2 volúmenes de agua destilada. Posteriormente, para regenerar la columna, se agregó un volumen de solución de níquel a 200 mM y se lavó con 2 volúmenes de agua destilada. Finalmente, se pasaron 200 mL de buffer fosfato 20mM con 300 mM de NaCl y 5mM de imidazol (BF5).

Para la elución, se preparó buffer fosfato 20 mM, 300 mM de NaCl pH 7.4 con distintas concentraciones de imidazol: 50, 100 y 200 mM (BF50, BF100 y BF200) en el caso del FPLC y 40 y 250 mM (BF40 y BF250) en el otro caso. El lisado celular previamente colectado se equilibró toda la noche en 5 veces su volumen de BF5, con agitación magnética a 4 °C. Luego, se procedió a concentrar la muestra hasta alcanzar 5 mL. Esto se realizó en una celda EMD Amicon™ Bioseparations Stirred Cells (Thermo Fischer Scientific) con un filtro de corte de peso molecular (MWCO) de 3 kDa, a temperatura de 8 °C y presión de 50 psi, aplicada a través de una corriente de nitrógeno gaseoso.

Una vez concentrada la muestra, se inyectó dentro de la columna y se procedió a purificar. Los datos recolectados por el equipo fueron transferidos a un computador y graficados en tiempo real. Las variables medidas fueron unidades de absorbancia (AU) a 280 nm de longitud de onda, temperatura, conductividad y presión. Las mediciones fueron realizadas respecto al tiempo transcurrido y al volumen, cada 200 µL. Las eluciones fueron seriadas, en concentraciones crecientes de imidazol, para cada set de *buffer*. Los cambios de *buffer* fueron realizados luego de que la absorbancia alcanzase el estado estacionario. Las fracciones eluidas a distinta concentración de imidazol fueron colectadas por separado. Luego, éstas se concentraron en filtros Amicon de ultracentrifugación de MWCO 10 kDa (Thermo Fischer Scientific) y conservadas a -20 °C.

4.4.4. PAGE

Para verificar la producción de proteínas de tamaño conocido, se llevó a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida (PAA) denaturantes (SDS-PAGE) y no denaturantes (*Native* PAGE). En ambos casos se utilizó una concentración de 10% de acrilamida en la parte separadora para obtener una mejor resolución en el rango entre 20 y 300 kDa. La preparación de los geles fue hecha como se describe en la Tabla 12 y la Tabla 13 para el gel denaturante y gel nativo, respectivamente. A cada muestra se le agregó el *buffer* de carga correspondiente (Tabla 14 y Tabla 15) y se llevó a ebullición durante 5 minutos en el caso del SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó a 110 V por el gel concentrador y a 150 V por el separador hasta que el frente de corrida llegara al borde del gel. Luego, se retiró el gel de las placas de vidrio y se desechó la fracción concentradora. La parte separadora del gel, donde permanecen las proteínas, se tiñó con azul de Coomassie por una noche y se destiñó con una solución de 10% ácido acético y 40% metanol, hasta que la base del gel estuviera transparente.

Tabla 12: Preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis denaturante (SDS-PAGE).

	Concentrador	Separador (10%)
H₂O	2,975 mL	3,8 mL
Tris-HCl	(0,5M, pH 6,8) 1,25 mL	(1,5M, pH 8,8) 2,6 mL
SDS (10% p/v)	50 µL	100 µL
PAA	670 µL	3,4 mL
Persulfato de Amonio (APS)	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Tabla 13: Preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis nativa (Native PAGE).

	Concentrador	Separador (10%)
Tris-HCl (375 mM, pH 8,8)	4,275 mL	6,49 mL
PAA	670 µL	3,4 mL
Persulfato de Amonio (APS)	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Tabla 14: Buffer de carga (6X) para SDS-PAGE.

Azul de Bromofenol	0,05% p/v
β-mercaptoetanol	10 mM
Glicerol	10% v/v
Tris pH 6,8	200 mM
SDS	10% p/v

Tabla 15: Buffer de carga (2X) para Native PAGE.

Azul de Bromofenol	1 % p/v
Glicerol	25 % v/v
Tris pH 6,8	62,5 mM

4.5. Ensayos enzimáticos y *screening*

Para llevar a cabo los ensayos enzimáticos con la mayor cantidad de enzima posible en los casos de la proteína nativa y las mutantes, se concentró el lisado celular preparado en la sección 4.4.2. Para obtener una comparación significativa, se pesaron e igualaron los *pellet* celulares obtenidos en los cultivos inducidos. Luego de la ruptura, se concentró el sobrenadante del lisado utilizando filtros para centrifuga de corte de 10 kDa MWCO (Amicon ® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit y Amicon ® Ultra-0.5 mL Centrifugal Filter Unit, Sigma Aldrich), hasta obtener un volumen menor a 1 mL en todos los casos. Finalmente, a través de estos mismos filtros, se dializaron los concentrados con PBS (50 mM, pH 7,4) para extraer el *buffer* de lisis.

4.5.1. Ensayo enzimático

La actividad de la enzima original MppJ y de cada una de las mutantes fue evaluada utilizando, por un lado, el sustrato nativo, fenilpiruvato (PPY), para estudiar el efecto de las mutaciones en la función original; y, por el otro, (*R*)- α -ionona, con el fin de comprobar la capacidad de síntesis de ironas.

i. Sustrato Nativo: PPY

Con el fin de evaluar la enzima original, se ensayó la actividad con PPY, con el fin de detectar ya sea consumo y/o formación de β -metil-fenilpiruvato (mePPY), el producto deseado. De la misma manera, se estudiaron los cambios putativos en la actividad de las mutantes. Las muestras fueron preparadas en 180 μ L de PBS (50 mM, pH 7,4) con 20 μ L del lisado celular correspondiente, 1,5 mM de SAM y 3 mM de PPY. Luego, se incubaron, dejando reaccionar a 25 °C por 4,5 horas y se conservaron en frío, hasta ser analizados, con el fin de detener la actividad de la enzima.

De cada muestra se almacenó la mitad del volumen a -20 °C, sin pasar por el periodo de incubación a 25 °C, con el fin de que actuara como control de actividad enzimática. De esta forma, se espera observar la diferencia entre la concentración de sustratos y productos antes y después del ensayo enzimático. Estas muestras fueron llamadas $t = 0h$ para las almacenadas inmediatamente y $t = 4.5h$ para las que se sometieron al ensayo enzimático.

Por otro lado, como control positivo de las mutantes, se realizó el mismo ensayo enzimático con la enzima original MppJ, esperando medir una mayor actividad. Además, se realizó ensayos con el lisado celular de una bacteria transformada con el vector pET28a sin el gen MppJ (llamado vector vacío o VV), que representa un control negativo de la actividad de la enzima. Por último, como control negativo de los cultivos, se preparó una muestra reemplazando el lisado celular por agua (C-), con lo que se espera medir las concentraciones originales de sustrato y cofactor, sin que sean metabolizados por la fracción enzimática de la bacteria.

Tabla 16: Nomenclatura de muestras de ensayo enzimático. Se detalla la diferencia en las condiciones experimentales de cada una.

	MutX_{t=0h}*	MutX_{t=4h}*	MppJ	VV	(C-)
Tiempo incubación a 25°C	0 horas	4 horas	4 horas	4 horas	4 horas
Mutación	Si (X)	Si (X)	No	-	-
MppJ en vector	Si, mutado	Si, mutado	Si, original	No	-
Lisado celular en muestra	Si	Si	Si	Si	No

***MutX**: mutante (ver sección 5.3.4).

Con el fin de optimizar las condiciones experimentales, se evaluó el comportamiento del sistema al variar ciertos parámetros en ensayos realizados con la enzima original. En primer lugar, se aumentó la concentración de SAM de 1,5 mM a 3,0 mM, para determinar si se comporta como un sustrato limitante en la reacción. También, se realizó un ensayo sin PPY, para comprobar si existe formación de este metabolito en el lisado y, si es así, si este puede ser transformado en mePPY. Finalmente, se intentó determinar la temperatura adecuada de almacenamiento de las muestras, conservándolas a -20 °C o 4 °C y observando la variación de sustrato y producto. En la

Tabla 17 se detallan las condiciones experimentales de cada muestra.

Tabla 17: Preparación ensayo enzimático para probar las condiciones experimentales.

	PPY (mM)	SAM (mM)	Sobrenadante	Temp. Ensayo (°C)	Temp. Almacen. (°C)
VV_4	3,0	1,5	VV	4	4
VV_25	3,0	1,5	VV	25	4
MppJ_4	3,0	1,5	MppJ	4	4
MppJ_25	3,0	1,5	MppJ	25	4
MppJ_-20/-20	3,0	1,5	MppJ	4	-20
MppJ_25/-20	3,0	1,5	MppJ	25	-20
MppJ_PPY-/4	0	1,5	MppJ	4	4
MppJ_PPY-/25	0	1,5	MppJ	25	4
MppJ_SAM+/4	3,0	3,0	MppJ	4	4
MppJ_SAM+/25	3,0	3,0	MppJ	25	4

ii. Iononas

En segundo lugar, para la detección de iononas e ironas por GC-MS, se realizaron ensayos enzimáticos con 10 μ L de lisado concentrado, en 90 μ L de PBS (50 mM, pH 7,4) con 1,5 mM de SAM y 5,2 mM (100 ppm) de α -ionona (Sigma Aldrich). Estos se incubaron a 25 °C por 4,5 horas y se extrajeron inmediatamente, para detener la reacción. Se utilizó el sobrenadante del lisado de cada mutante y de la enzima original. Por último, como control, se utilizó lisado celular sin enzima (VV) y reacciones sin lisado celular (-). En este caso no se midió la concentración de metabolitos previa al ensayo enzimático, por una limitación en la cantidad de muestras a medir.

4.5.2. Extracción de producto y preparación de muestras

La detección por cromatografía líquida se llevó a cabo a una dilución de 1:100 en agua destilada, para evitar la interferencia del *buffer* utilizado con la columna. Esto se realizó después del ensayo enzimático. Todas las muestras fueron almacenadas en viales de vidrio a 4 °C para su posterior análisis.

La extracción de las muestras para su detección por GC-MS se llevó a cabo a partir del ensayo enzimático. Primero se diluyó 1:10 en agua destilada, para evitar saturar la columna con concentraciones sobre los 10 ppm. Después, se extrajo con acetato de etilo en proporción 1:1 y se saturó con NaCl para obtener una mejor separación de fases y traspaso de volátiles a la fase orgánica.

Luego se prepararon todas las muestras y estándares en viales de vidrio de 20 mL, los que fueron posteriormente sellados para mantener los compuestos volátiles en el espacio de cabeza. Para esto, se agregaron 5 mL de agua saturada en NaCl (23% p/v) en el vial. Luego, se añadió 10 μ L de una solución de β -damascenona deuterada disuelta en acetato de etilo, para utilizar como estándar interno. Finalmente, se agregaron 10 μ L de la muestra correspondiente y se selló el vial inmediatamente.

4.5.3. Detección por HPLC-MS

Para cada grupo de ensayos enzimáticos se realizó una curva estándar de PPY en *buffer* PBS a las concentraciones de 0,1, 1,0, 3,0, 5,0 y 10,0 mM. Estas también fueron diluidas en la razón 1:100 para que los valores se correspondiesen con los del ensayo enzimático. Cada muestra fue realizada en triplicado para disminuir el error de medición por inyección y para que los resultados obtenidos contaran con la desviación estándar necesaria en todo ensayo analítico. Se utilizó la curva estándar para la detección y cuantificación de PPY en las muestras y se detectó metPPY según su peso molecular con el espectrómetro de masas, ya que no se dispone del estándar del compuesto.

De cada muestra se inyectó un volumen de 10 μ L en un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3.000 con detector MS plus de Thermo Fischer Scientific (Bremen, Alemania), con una columna Acquity UPLC BEH C₁₈. Las fases móviles que se utilizaron fueron una mezcla isocrática de ácido fórmico al 0.1% en agua y metanol, en proporción 5:95, a un flujo de 0.15 mL/min. Los parámetros para la detección de PPY y metPPY son: m/z de 163,0386 y 177,0552 y un tiempo de retención de 1,86 y 2,03 minutos, respectivamente.

4.5.4. Identificación y cuantificación por GC-MS.

Para la identificación y cuantificación de ironas y iononas, se construyeron curvas estándar de concentración a 0,5, 1, 12, 25, 50 y 100 ppm. Estas se prepararon e inyectaron por duplicado para calibrar la cuantificación, mientras que las muestras de ensayo enzimático solo se inyectaron una vez.

En cuanto a la inyección manual al GC-MS, cada muestra se calentó previamente a 60 °C por 5 minutos. Luego, se colectaron los volátiles del espacio de cabeza utilizando un filamento adsorbente que se encuentra dentro de la aguja de la jeringa de inyección. Después, se inyectó la muestra en el equipo y se dio inicio al programa de la cromatografía. Este método se basó en un aumento progresivo de temperatura hasta los 250 °C y luego, esta se mantuvo constante hasta el término de la lectura. Se tomaron datos desde los 10 hasta los 27 minutos, ya que las especies a medir se pueden detectar entre los 18 y los 24 minutos de cada corrida cromatográfica.

Las muestras se corrieron en modo SCAN y SIM (Specific Ion Monitoring). En modo SCAN se detectan todas las especies iónicas para poder descubrir productos no esperados de la reacción y cuantificar concentraciones mayores. En modo SIM se seleccionan iones específicos para la detección de trazas de ironas, utilizando los iones principales de su espectro de masa. Este método permite detectar concentraciones muy bajas de compuestos, ya que tiene una mayor sensibilidad que el modo SCAN.

4.5.5. Construcción de curvas de calibrado y análisis de datos

Se realizaron curvas de calibrado para la cuantificación de PPY, iononas e ironas. Para esto, se prepararon soluciones de concentración conocida con el estándar de cada metabolito. Las concentraciones seleccionadas fueron entre 0,1 y 10 mM de PPY y entre 0,5 y 100 ppm de iononas e ironas. Para la construcción de las curvas se ajustó el área de medición del equipo y el valor de la concentración. Este ajuste resultó ser siempre lineal

en el caso de iononas y PPY. Sin embargo, en el caso de ironas, un ajuste cuadrático fue necesario para disminuir el error cuadrático (R^2).

Para obtener los valores de las áreas medidas se utilizó la ecuación generada por el ajuste. En el caso de metPPY, del cual no se poseía estándar, se analizaron los datos utilizando el área del *peak* encontrado en el tiempo de retención y m/z correspondiente. Dado que no se conoce la relación entre el área del cromatograma y la concentración del metabolito, se estandarizaron los datos, dando un valor igual a 1 a la mayor área del experimento, con el fin de facilitar su análisis.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Selección de la enzima

Se realizó una caracterización previa de cada una de las enzimas candidatas, basada en su estructura y mecanismo catalítico. En la Tabla 18 se muestra cada enzima con su sustrato original, cofactores y, en caso de estar disponible, su secuencia, el organismo desde donde fue aislada, el gen, el código PDB y el mecanismo catalítico. Además, se presenta el resultado del candidato con mayor *e-Value* de BLAST, para un posible modelo por homología, en el caso de no estar cristalizada.

Tabla 18 : Características de las 4 enzimas candidatas para la producción de ironas.

Enzima	3-HAA-C₄-MT	L-TYR-C₃-MT	GPP-C₂-MT	PPY-C₃-MT
Sustrato	3-hidroxi antranilato (3-HAA)	L-tirosina (L-TYR)	Geranil difosfato (GPP)	Fenilpiruvato (PPY)
Cofactor	SAM	SAM	SAM, Mg ²⁺	SAM
Secuencia Disponible	No	Si	Si	Si
Organismo	<i>Streptomyces antibioticus</i>	<i>Streptomyces lavendulae</i>	<i>Streptomyces lasaliensis/ coelicolor</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Gen	-	<i>sfmM2</i>	<i>gdpmt/ sco7701</i>	<i>mppJ</i>
Código PDB	-	-	3VC(1/2) 4F8(4/5/6)	4KI(B/C/F/G) 4M6(X/Y) 4M7(1/2/3/4)
Mejor Match BLAST PDB (Cover/Ident)	-	4QVG 93% / 44%	N/A	N/A
Mecanismo Catalítico	desconocido	desconocido	Propuesto y avalado	Propuesto y avalado

Se descartaron las enzimas 3-HAA-C₄-MT y L-TYR-C₃-MT (secciones 7.6.3 y 7.6.4 del Anexo) por no contar con su estructura tridimensional ni su mecanismo catalítico, ya que esta información permite el análisis y el diseño de mutantes que puedan aceptar ionona como sustrato. Por otra parte, las GPP-C₂-MT a pesar de contar con ambos elementos, tienen un mecanismo catalítico activado específicamente por GPP (véase sección 7.6.5 del Anexo). Esto genera un cambio conformacional en la enzima que permite la entrada de SAM. Por lo tanto, si este cambio no ocurre, no existe la posibilidad de que el donador actúe con otro sustrato. La probabilidad de que otro sustrato como la ionona active el sitio catalítico es baja y la modificación de este mecanismo es compleja.

Por último, en cuanto a PPY-C₃-MT, se conoce su estructura, el mecanismo catalítico y los residuos involucrados. Además, ya se han realizado exitosamente mutaciones en una PPY-C₃-MT de *S. hygroscopicus* (MppJ^{Sh}), para modificar su actividad (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014). De esta manera, se seleccionó MppJ^{Sh} para su modificación racional con el objetivo de evaluar su capacidad potencial de aceptar α -ionona como sustrato.

5.2. Fenilpiruvato-C(3)-metiltransferasa

La enzima fenilpiruvato-C(3)-metiltransferasa (PPY-C₃-MT) es una C-MT dependiente de SAM que cataliza la formación de β -metil-fenilpiruvato (β MePPY) a partir de fenilpiruvato (PPY) (ver Figura 18b). β MePPY es luego transformado en (2S,3S)- β -metil-fenilalanina (β MePhe), un aminoácido no proteogénico que es uno de los bloques necesarios para la síntesis de la manopeptimicina (ver Figura 18a), un antibiótico lipoglicopeptídico, utilizado contra patógenos multirresistentes (Magarvey *et al.* 2006).

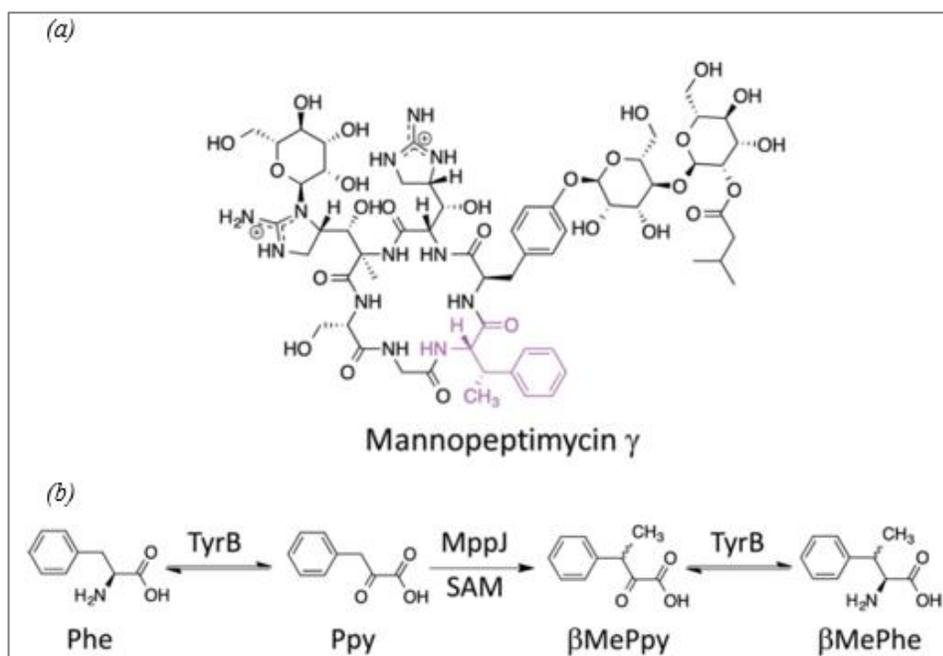


Figura 18: (a) Estructura de la mannopeptimicina, con el motivo de β MePhe destacado. (b) Esquema de la reacción de metilación de PPY a β MePPY por MppJ y ambas transaminaciones por TyrB. (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014).

El gen *mppJ*, que codifica para esta enzima, se ha identificado en al menos 6 microorganismos - *S. hygroscopicus*, *S. platensis*, *S. acidiscabies*, *Xenorhabdus sp. KK7.4*, *S. sp. AVP053U2*, *Gordonia rubripertincta* - de los cuales solo la PPY-C₃-MT de *S. hygroscopicus* (MppJ^{Sh}) ha sido cristalizada hasta el momento (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014). En la Figura 19 se ilustra el alineamiento de estas secuencias, marcando en rojo las identidades totales y en amarillo las coincidencias positivas. Como se puede apreciar, existen regiones ampliamente conservadas. La masa de esta proteína ronda los 36.000 Da en la mayoría de los casos, a excepción de MppJ^{Gr} que tiene una masa de 40.181 Da y de MppJ^{AVP} de 28.665 Da. Esta última carece de los residuos en el extremo N-terminal, que en MppJ^{Sh} se asocian con el dominio de dimerización.

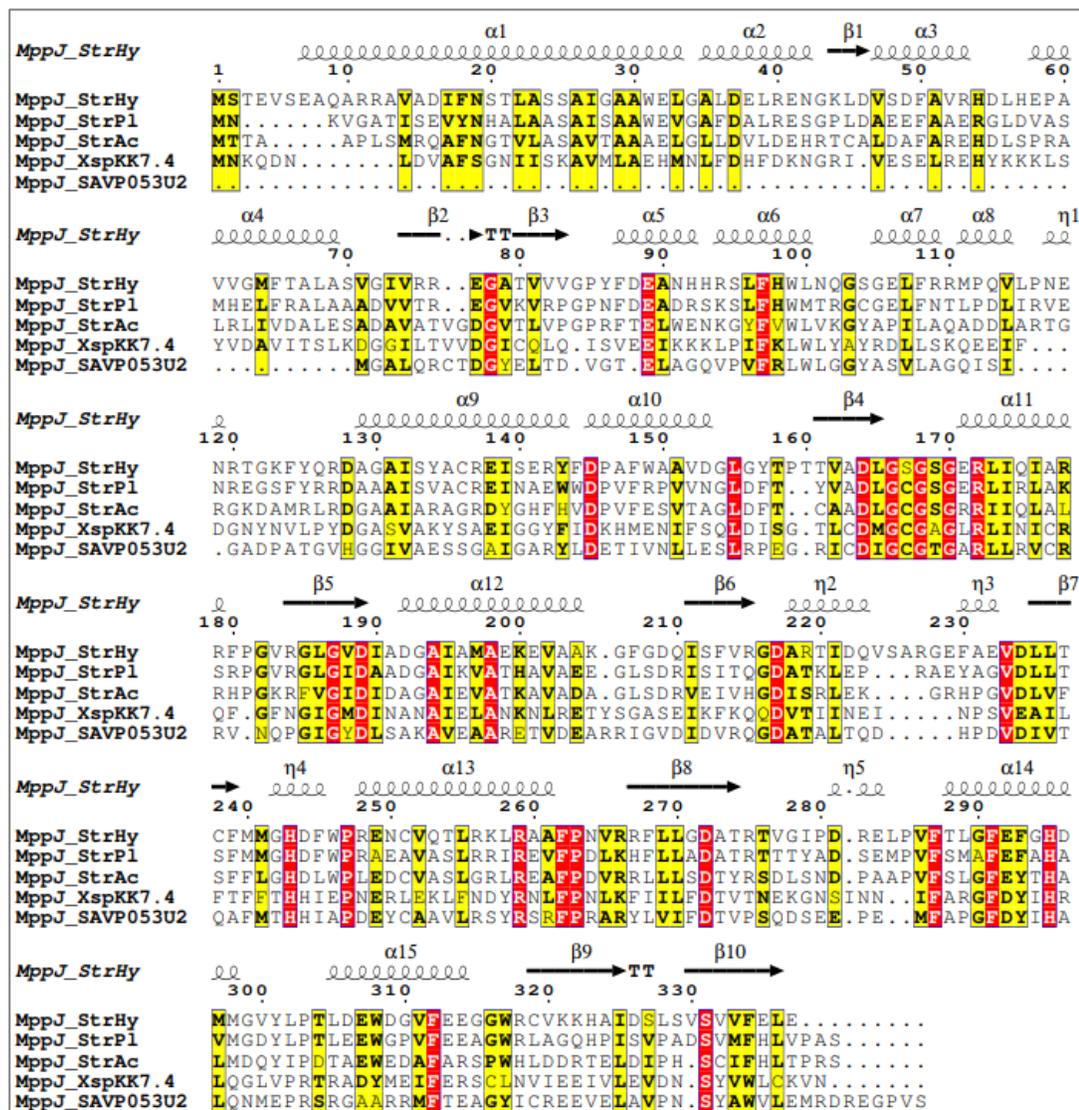


Figura 19: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *mppJ* de 5 organismos distintos *S. hygroscopicus*, *S. platensis*, *S. acidiscabies*, *Xenorhabdus sp. KK7.4*, *S. sp. AVP053U2*. Sobre el alineamiento se ilustra la estructura secundaria de *MppJ^{Sh}*. Elaboración propia a través de ESPrict 3.0.

MppJ^{Sh} es un homodímero con la estructura típica de las C-MT tipo I (Figura 20). El largo de su secuencia es de 337 residuos y posee una masa de 37.186 Da. Esta enzima cuenta con un dominio de dimerización en el extremo *N*-terminal y otro con función

metiltransferasa en el extremo *C*-terminal (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014). Cada subunidad de la enzima se encuentra coordinada por un ion de hierro en el sitio activo y seis iones calcio. Además, el dímero se estabiliza con un ion adicional de calcio y otro de yodo. Se considera que existe una regulación positiva con el sustrato, ya que se observó una molécula de PPY covalentemente unida a Cis319 en la resolución del cristal; y una disminución a 61% de la actividad original en la mutante C319A (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014). Por otro lado, se ha demostrado que MppJ es una enzima estereoespecífica, sintetizando solo (3*R*)- β MePPY.

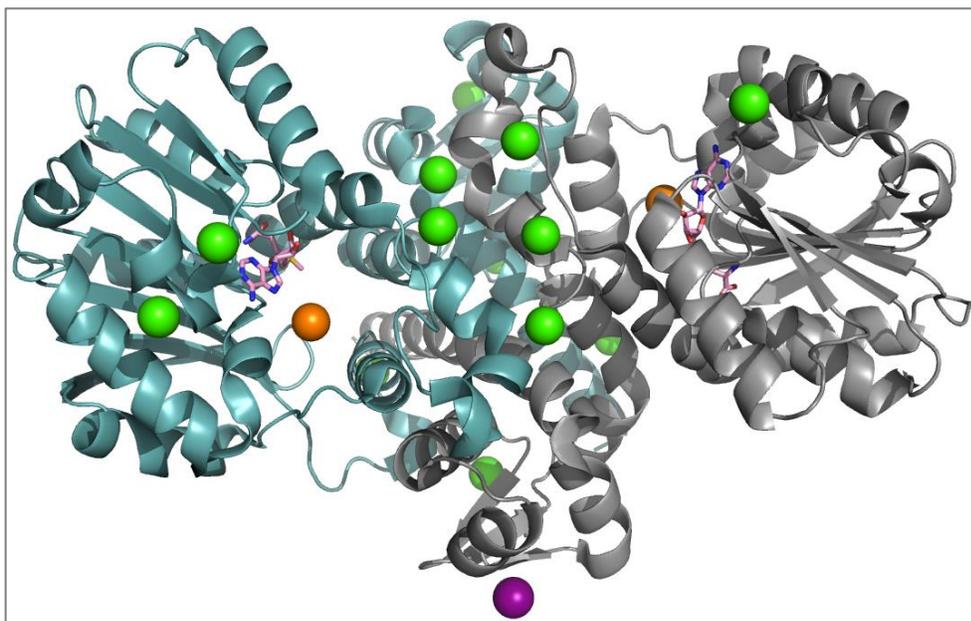


Figura 20: Estructura de MppJ de *S. hygroscopicus*. Cada subunidad se muestra de distinto color y está asociada a SAM. Los iones están representados por esferas: hierro de color naranja, yodo de color magenta y calcio de color verde. Elaboración propia a través de PyMOL.

Su mecanismo catalítico se basa en una sustitución nucleofílica bimolecular o S_N2 , en la cual se rompe y se forma un enlace simultáneamente. Para que esto suceda, el átomo de

carbono que recibirá el metilo en PPY – C β - se encuentra situado en línea justo entre el grupo metilo de SAM (3,3 Å) y el grupo amino del ciclo de Trp99 (3,6 Å). Este residuo actúa como base, desprotonando el átomo de carbono C β para iniciar la reacción. Luego, el C β ataca al carbono del grupo metilo de SAM para formar el nuevo enlace y finalizar la reacción (Figura 21a). Este mecanismo fue avalado mediante el análisis de las estructuras cristalizadas con PPY y β MePPY.

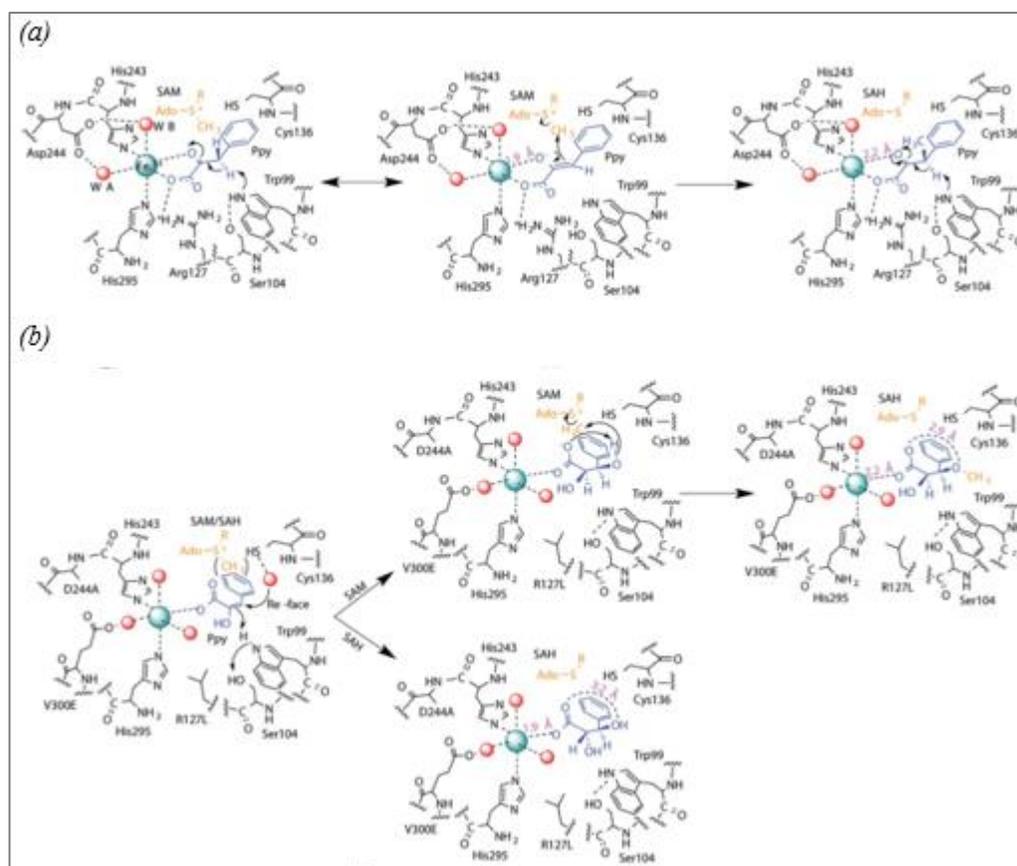


Figura 21: (a) Esquema del mecanismo de reacción de MppJ^{Sh}. (b) Esquema del mecanismo catalítico de la mutante R127L/D244A/V300E de MppJ^{Sh} (Zou, Y. C. Liu, *et al.* 2014).

Por último, en este mismo trabajo donde se resolvió su estructura tridimensional, se realizó un cambio de actividad enzimática mediante mutaciones sitio-dirigidas. Estas mutaciones permitieron hidroxilar C_{β} y luego metilar en este átomo de oxígeno, convirtiendo a la enzima en una hidratasa/O-MT (Zou *et al.* 2014). En la Figura 21b se ilustra el mecanismo catalítico de la mutante R127L/D244A/V300E, en presencia de SAM, con ambas actividades y en presencia de SAH, con actividad hidratasa únicamente.

5.2.1. Bolsillo catalítico y selección de residuos significativos

El bolsillo catalítico de MppJ^{Sh} cuenta con un ion de hierro que coordina el sustrato el cual, a su vez, está coordinado por His243, Asp244 y His295 (residuos naranja claro en Figura 22). Los residuos que interactúan con SAM son Asp164, Gly166, Gly168, Arg172, Ala191 y Phe239 (residuos rojos en Figura 22). Por otro lado, Arg127 coordina los grupos keto de PPY y Cys136 interacciona con su anillo bencénico.

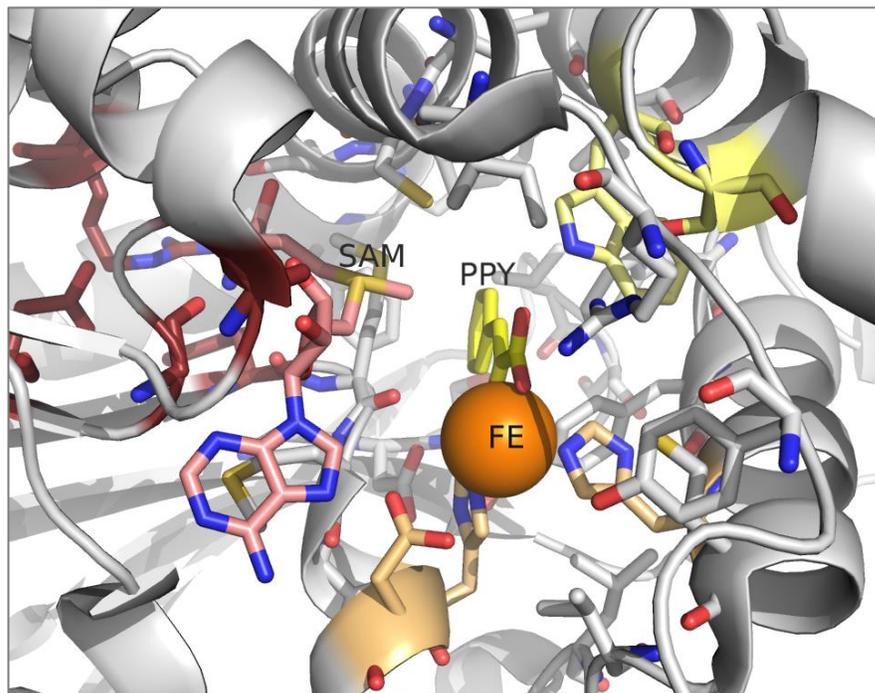


Figura 22: Residuos en el bolsillo catalítico de MppJ^{Sh}. En rojo se destacan aquellos que coordinan SAM, en amarillo los que participan en la catálisis y en naranja los que coordinan a Fe. Elaboración propia a través de PyMOL.

Otros residuos importantes en la reacción son Ser104, que extrae el protón de Trp99 para que este último actúe como base e inicie la catálisis (residuos amarillos en Figura 22). PPY se encuentra ubicado en el interior del bolsillo catalítico, entre SAM, Trp99 y Fe. La distancia de C_β de PPY al grupo metilo de SAM (C_{SAM}) es de 3,3 Å, al grupo amino de W99 (N_{W99}), de 3,6 Å y a Fe, de 4,1 Å (Figura 23).

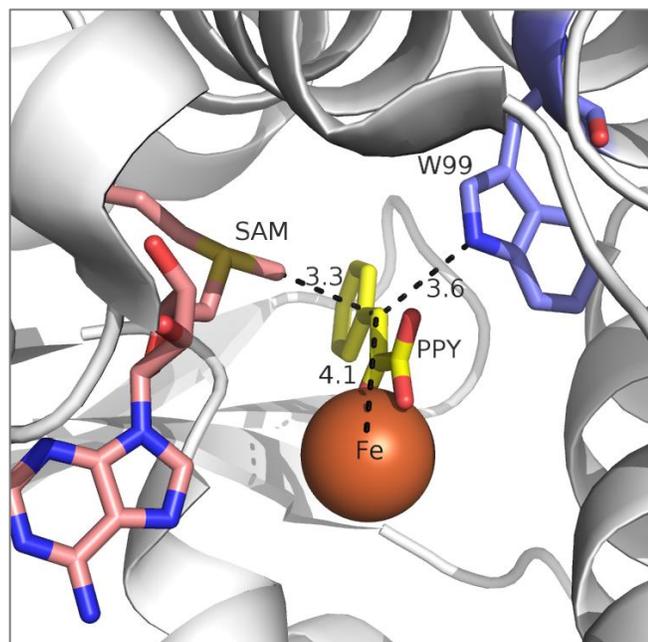


Figura 23: Bolsillo catalítico de MppJ. Se muestra la distancia al carbono a metilar, con respecto al metilo en SAM (3,3 Å), el átomo de hierro (4,1 Å) y el átomo de nitrógeno del W99 de MppJ (3,6 Å). Elaboración propia a través de PyMOL.

Se identificaron 43 residuos dentro de una esfera de 8 Å de distancia desde PPY. De ellos, 7 tenían una orientación opuesta a la dirección de PPY. Los 36 residuos restantes se consideraron como parte del bolsillo catalítico (residuos en azul en Figura 24). En la Figura 22 se aprecia el interior de la cavidad y los 36 residuos que forman parte de su superficie o que interactúan con los compuestos involucrados en la reacción.

Para determinar las posiciones en las que se considerarán mutaciones, no se consideraron los residuos que participan en la coordinación de Fe, SAM y los que inician la catálisis. Esta decisión se tomó debido a que los cambios en estos aminoácidos podrían anular la actividad de la enzima. Las 23 posiciones restantes (en blanco en la Figura 22) pueden ser modificadas, sin tener un claro efecto negativo en la capacidad de metilar de la enzima o en la coordinación de SAM y Fe, aunque posiblemente afectando la unión o

actividad de la enzima con PPY. En la Figura 24 se destacan en azul los 23 residuos que no poseen contacto con SAM (triángulo rojo), Fe (círculo naranja), ni son catalíticos (cuadrado café).

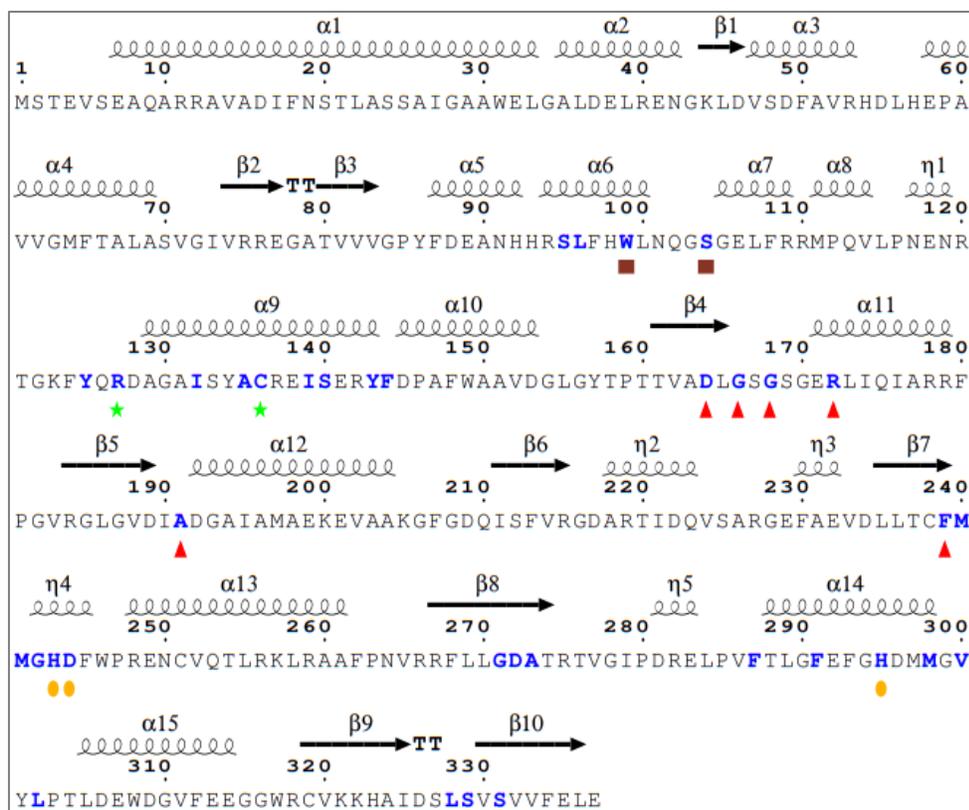


Figura 24: Esquema de la secuencia y estructura secundaria de MppJ. Los residuos en azul corresponden a los orientados hacia el bolsillo catalítico. De ellos, los que están asociados a la unión de SAM se señalan con un triángulo rojo, a Fe con un círculo naranja, a PPY con una estrella verde y los que participan en la catálisis con un cuadrado café. Elaboración propia a través de ESPrnt 3.0.

Tomando en cuenta estas 23 posiciones, si se aceptan hasta 3 mutaciones a la vez, existen 10.626 combinaciones de tripletes a mutar. Además, si en cada una de ellas se

puede cambiar por otros 19 aminoácidos, sin considerar la prolina por ser propensa a cambiar la estructura secundaria, hay 6.858 combinaciones de 3 aminoácidos, excluyendo la combinación original. Como resultado de ambas combinatorias, se generan 72.873.108 posibles mutantes a analizar. Este alto número motivó el desarrollo del *script* de creación de mutantes, docking y medición de distancias automático, que fue descrito en la sección 4.2.3.

5.3. Docking

5.3.1. S-adenosil-metionina

El acoplamiento de MppJ con su cofactor, SAM, resultó en la ubicación del ligando en la posición esperada. La Figura 25 ilustra la diferencia entre la ubicación de la molécula de SAM original, obtenida desde el cristal 4KIC y aquella encontrada por Autodock Vina. Se observaron pequeñas variaciones en las torsiones de los enlaces flexibles. El grupo adenosil de la molécula de SAM posicionada a través del *docking* fue el que presentó la menor variación, con respecto a su posición en el cristal. Mientras que, el extremo correspondiente a la metionina presenta modificaciones en los ángulos de algunos enlaces. La afinidad resultó ser de -8,5 kcal/mol para el mejor resultado, que también es el más cercano a SAM en el cristal.

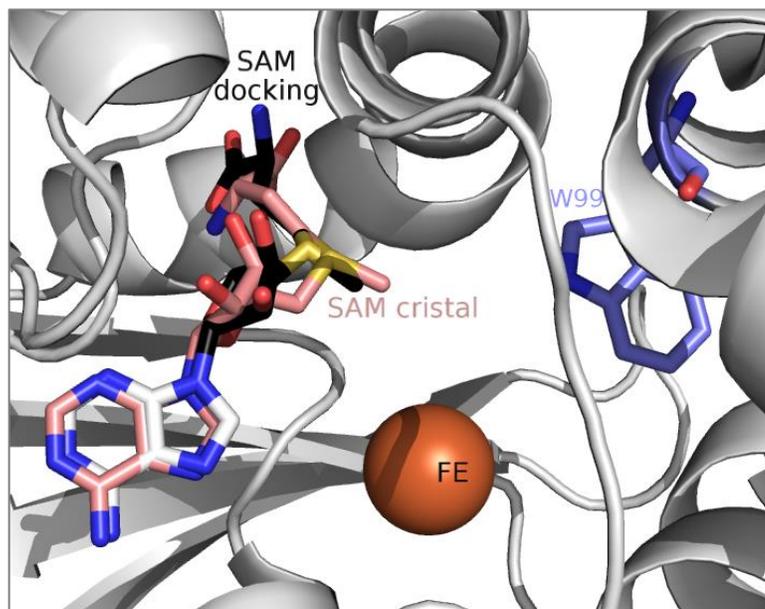


Figura 25: Comparación de la posición de SAM en el cristal (color rosado) y según el *docking* realizado (color negro y blanco). Elaboración propia a través de PyMOL.

5.3.2. PPY

En segundo lugar, se probó el docking con MppJ y SAM como receptor, utilizando PPY como ligando. En este caso, el sustrato también se situó en la posición correcta, tomando como referencia el cristal. La diferencia entre cada átomo del esqueleto de cada PPY no superó 1 Å. La energía de afinidad $\Delta G = -7,2$ kcal/mol, un poco menor a SAM, lo que era de esperar según el trabajo de Zou *et al.* (2014). Se determinó una diferencia de 0,9 Å en la distancia a SAM y de 0,4 Å en la distancia a W99 (Figura 26). Esta diferencia resulta, en cierta medida, de la capacidad de torsión de los enlaces de PPY en el *docking*; PPY se encuentra de forma plana en el cristal. Este rango será tomado como referencia más adelante en el análisis de las mutantes.

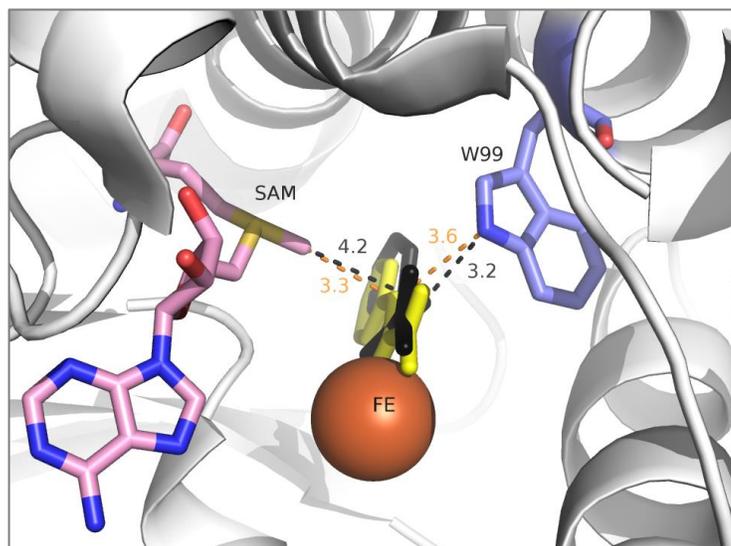


Figura 26: Comparación de la posición de PPY en el cristal (amarillo) y según el *docking* (negro), con la distancia respectiva al grupo metilo de SAM y al amino de W99. Elaboración propia a través de PyMOL.

5.3.3. (*R*)- α -ionona

Se realizó *docking* con (*R*)- α -ionona como ligando y MppJ con SAM como receptor. Inicialmente, se utilizaron las mismas condiciones que en el caso de PPY, es decir, una grilla de 18x18x18, para entregarle libertad al sustrato. De esta manera, (*R*)- α -ionona se sitúa hacia afuera del bolsillo catalítico, con el carbonilo orientado hacia el átomo de Fe y el anillo hacia afuera de la enzima (abajo en Figura 27). La afinidad en este caso es de -5,6 kcal/mol, por lo que (*R*)- α -ionona podría situarse espontáneamente en el canal de entrada hacia el sitio activo. Sin embargo, no es capaz de entrar y C₂ queda a 8,6 Å del metilo y W99.

En consecuencia, se disminuyeron las dimensiones de la grilla a 14x10x10 para que el sustrato pudiese ubicarse más cercano al metilo. Sin embargo, el resultado de energía fue positivo de 5,2 kcal/mol, confirmando que (*R*)- α -ionona no es capaz de situarse dentro de

la cavidad de forma natural. Además, la orientación de (*R*)- α -ionona es incompatible con el objetivo de este trabajo, ya que C₂, queda a 5,9 Å del metilo y a 8,0 Å de W99, dejando los átomos de la cadena alifática dentro del rango permitido para la metilación. Como se ilustra en la Figura 27, los carbonos cercanos al carboxilo de la ionona se encuentran alineados entre el metilo de SAM y el residuo W99, por lo que, son más susceptibles para posteriormente ser metilados. Por lo tanto, se intentó evitar esta orientación del sustrato, con el fin de evitar la síntesis de producto no deseado, como lo sería una 9-metil- α -ionona.

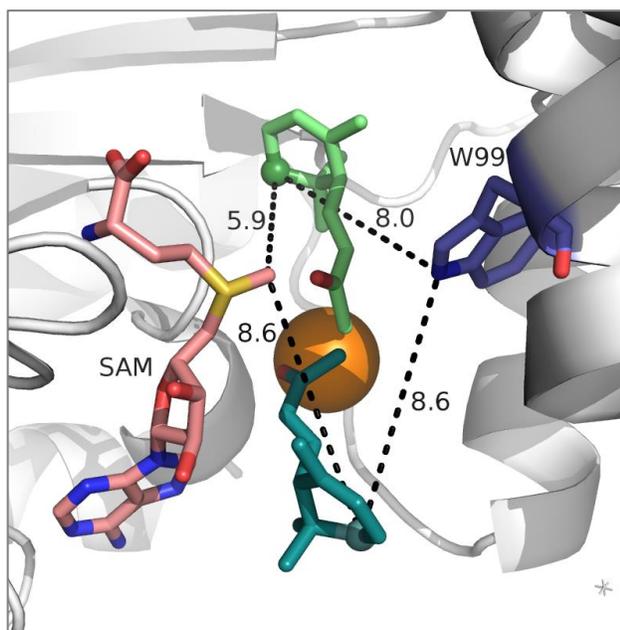


Figura 27: Resultado *docking* con ionona como ligando en MppJ original. Abajo se ve la ubicación de (*R*)- α -ionona con una grilla de 18x18x18 y arriba con una menor de 14x10x10, obligando al sustrato a ubicarse dentro del bolsillo. Elaboración propia a través de PyMOL.

Con el fin de identificar la razón de esta alta energía, se superpuso la orientación deseada de (*R*)- α -ionona dentro de la cavidad y se graficó su superficie. Los resultados

obtenidos indican que el bolsillo es muy pequeño para el tamaño del sustrato (Figura 28**b**). La corrección de impedimentos estéricos podría permitir la entrada de (*R*)- α -ionona a la cavidad catalítica. Para evaluar el efecto de estos cambios en la ubicación del sustrato y su afinidad, se realizó un set de mutaciones en serie, evaluando el resultado y eligiendo los mejores casos en cada etapa.

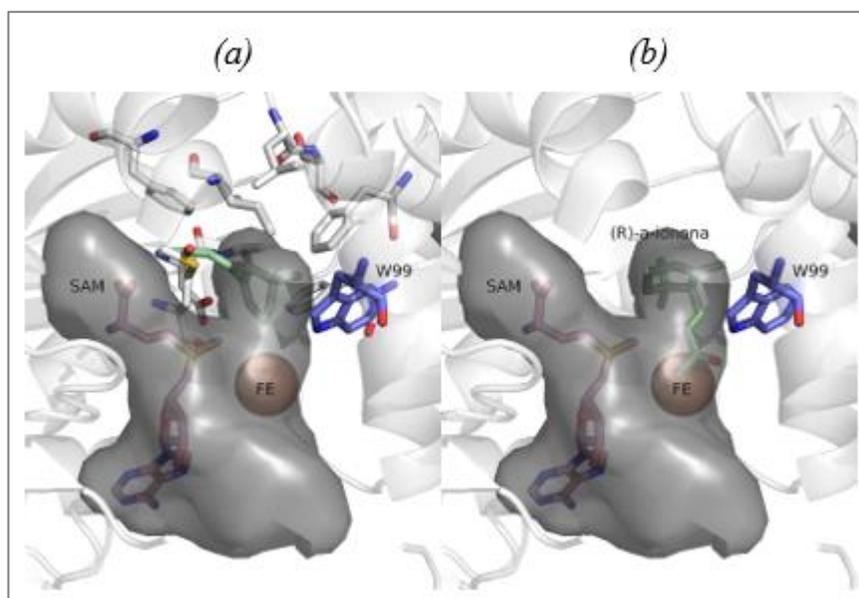


Figura 28: Bolsillo catalítico (gris) de MppJ original, en blanco se muestra la estructura secundaria. Se destaca W99 a la derecha, SAM a la izquierda, Fe (esfera naranja) y (*R*)- α -ionona en verde. (a) Orientación deseada de (*R*)- α -ionona, con el bolsillo original, su cadena queda fuera de la cavidad. Se muestran los residuos más cercanos al sustrato. (b) Orientación en la que (*R*)- α -ionona puede entrar al bolsillo original, dejando a C₈ ubicado entre el metilo de SAM y W99. Elaboración propia a través de PyMOL.

5.3.4. Docking masivo y selección de mutantes

En total, se analizaron alrededor de 60.000 resultados de afinidad y distancia, del docking de (*R*)- α -ionona en 11.000 mutantes de MppJ. Las mutaciones fueron realizadas secuencialmente, tomando los mejores resultados en cada ronda para llevar a cabo una nueva serie de mutaciones. Solo se realizaron mutaciones en las 23 posiciones relevantes determinadas en la sección 5.2.1.

Tabla 19: Mutaciones con distancias de C₂ entre 2.8 y 4.8 Å del metilo SAM y W99.

Afinidad	Negativa		Positiva
Posición	Dentro del bolsillo	Fuera del bolsillo	N/A
R127	-	W,R,K,Q	Y
I132	-	G	R,W,Y
M240	A,G	-	-
F287	E	-	-
F291	G,A,S,C	-	-

En la primera serie de mutaciones, se utilizó la MppJ original como enzima base. Se mutó de a una posición a la vez, por cada aminoácido, excluyendo prolina ya que ésta puede alterar la estructura secundaria. Así, se generaron 414 mutantes y, de cada una, se analizaron las primeras 5 orientaciones del ligando, con mejor afinidad. De esta manera, se encontraron 16 mutantes que cumplían con tener distancias entre 2,8 y 4,8 Å al metilo de SAM o a W99 (Tabla 19).

Cabe destacar que estas 16 mutaciones ocurren en solo 5 posiciones diferentes, lo que da cuenta de su relevancia para la posición de (*R*)- α -ionona. Luego, de estas enzimas, solo 13 tenían una afinidad negativa y 7 permitían la entrada de (*R*)- α -ionona al bolsillo catalítico (Tabla 19). El cambio del volumen y la forma bolsillo catalítico de estas últimas

7 mutantes se muestra en la Figura 29. Como se puede apreciar, solo las mutaciones sobre la posición 240 logran un cambio en la cavidad que permite la entrada (R)- α -ionona. Esto se puede explicar ya que, la metionina nativa interfiere con la cadena alifática de (R)- α -ionona, impidiendo que este se rote en la orientación correcta.

En la segunda serie, se utilizaron las mutantes M240A, M240G, F287E, F291G, F291A, F291S y F291C como templado para mutagénesis. Nuevamente, se cambió una posición a la vez, de las 23 relevantes, excluyendo la posición ya mutada. Al correr el *script* se generaron 2.772 mutantes nuevas y 13.860 orientaciones de (R)- α -ionona a analizar. Con cada uno de los templados se encontró al menos una nueva mutante que cumplía con ambos criterios de distancia.

A pesar de lograr ubicar a C₂ en el rango correcto de distancias, hay casos donde otro carbono de (R)- α -ionona se encuentra mejor posicionado para ser metilado Figura 28b. Dado esto, como criterio de selección se eliminaron las enzimas donde esto ocurría, con el objetivo de disminuir la probabilidad de obtener productos no deseados. Además, se descartaron los candidatos que superaban $\Delta G = -6,0$ kcal/mol en afinidad, ya que se busca llegar lo más cercano posible a $\Delta G = -7,2$ kcal/mol del sustrato original, PPY.

De acuerdo con estos requisitos, se encontraron 8 mutantes con base M240G, 6 con M240A, 2 con F287E y ninguno con mutación base en la posición 291. Cabe destacar que ambos candidatos de F287E, F287E/M240A y F287E/M240G, son redundantes, ya que también se encuentran dentro de las mutantes seleccionadas de M240A y M240G. De estas 14 enzimas, se descartó M240G/F287N y M240G/F287Q, dado que promueven orientaciones de (R)- α -ionona que favorecen otras metilaciones por sobre la correcta, principalmente sobre uno de los metilos de C₁ en el ciclo y C₇ y C₈ de la cadena.

Por último, se seleccionó M240G/F287C, M240G/F287D, M240G/F287E y M240G/F287L (Figura 30 a, b, c y d, respectivamente) para realizar un nuevo set de mutagénesis, dado que resultaron ser las con una afinidad más similar a la del sustrato original (de $\Delta G = -7,2$ kcal/mol a $\Delta G = -6,8$ kcal/mol) y tienen baja probabilidad de generar productos indeseados. En la Figura 30 se ilustran estas mutaciones y la variación en la forma del bolsillo catalítico.

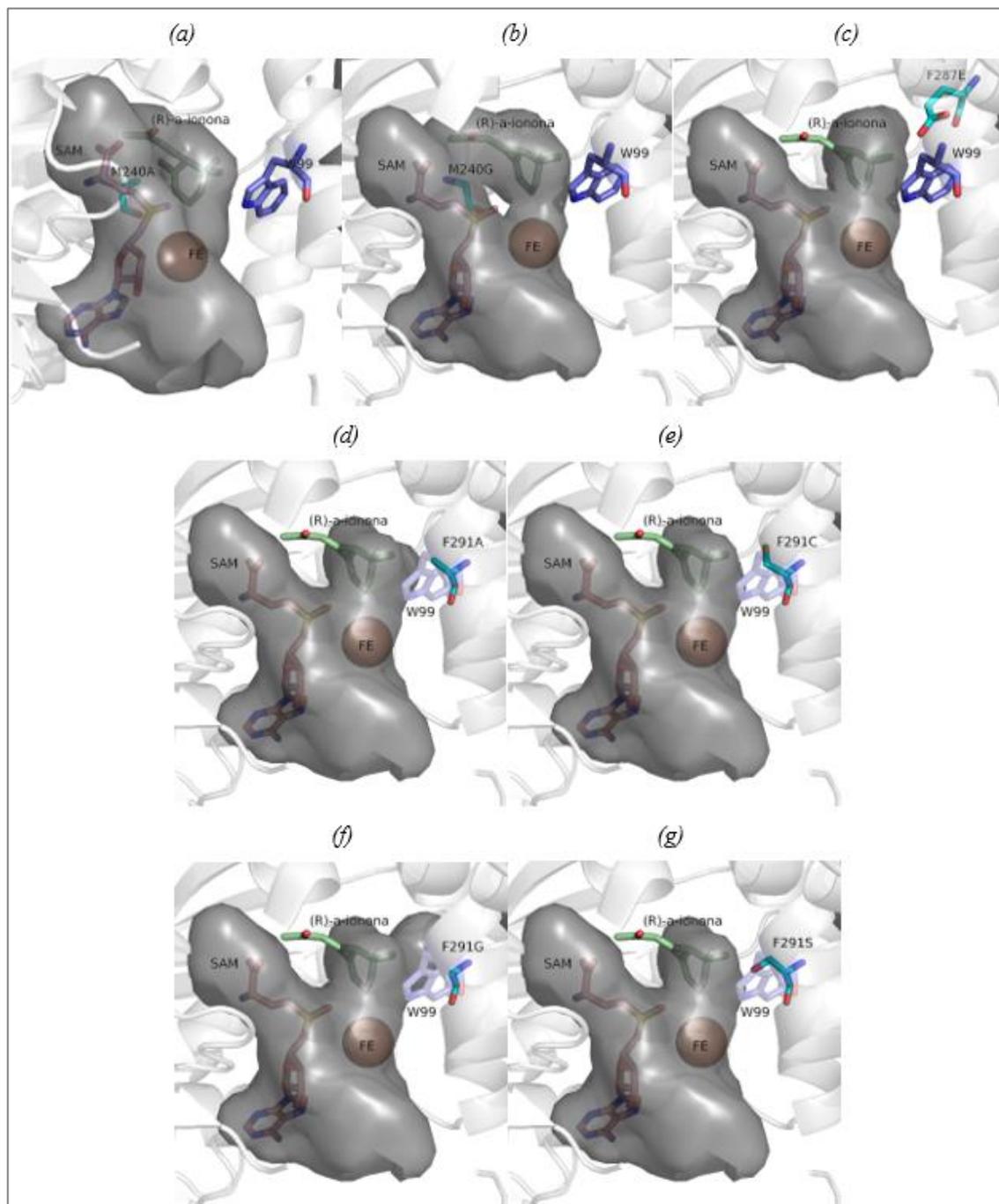


Figura 29: Bolsillo catalítico de las mutantes simples de MppJ. En celeste se ilustra el residuo mutado. Se puede apreciar el cambio de la forma y tamaño de la cavidad. (a) M240A, (b) M240G, (c) F287E, (d) F291A, (e) F291C, (d), F291G, e) F291S.

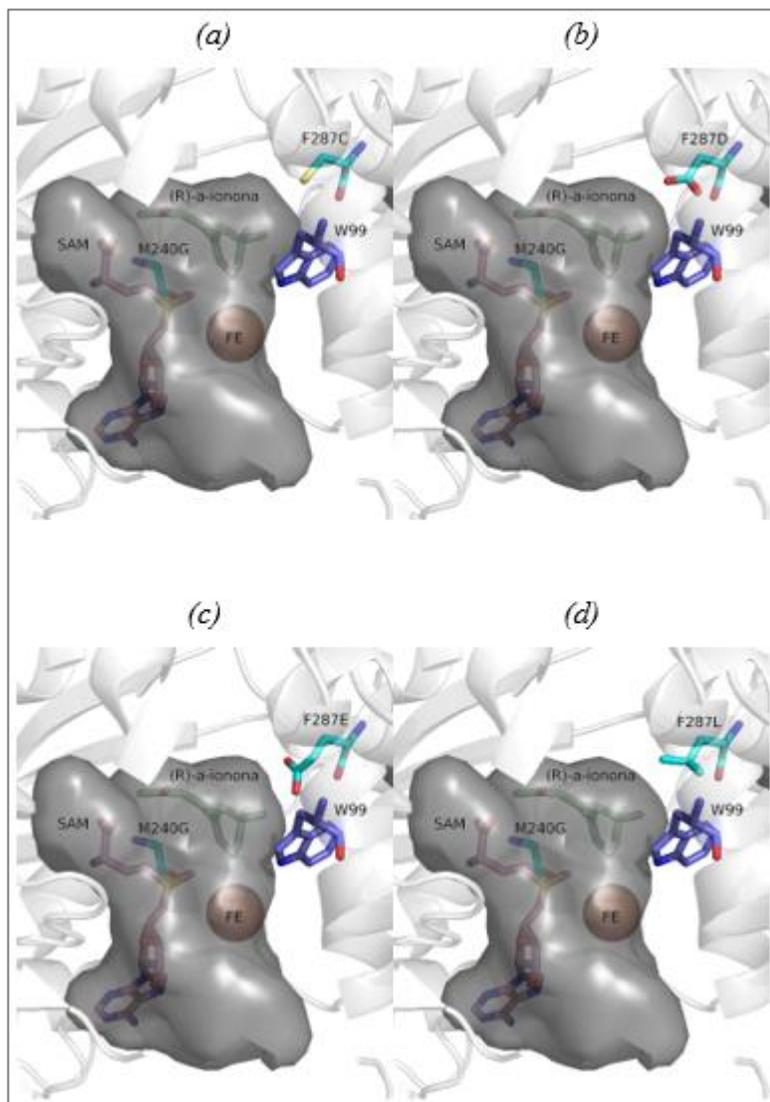


Figura 30: Bolsillo catalítico de las mutantes dobles seleccionadas. Se destaca en celeste los residuos mutados. (a) M240G/F287C, (b) M240G/F287D, (c) M240G/F287E, (d) M240G/F287L. Elaboración propia a través de PyMOL.

Todas las mutantes seleccionadas presentan una buena afinidad (entre $\Delta G = -4,0$ y $\Delta G = -6,0$ kcal/mol) cuando (*R*)- α -ionona se ubica en la entrada del canal que va hacia el sitio activo de la enzima (Figura 28c). Esto es una característica positiva, ya que le entrega una

mayor posibilidad al sustrato de entrar al bolsillo y reaccionar. Sin embargo, se considera que esta afinidad no supere la del sustrato dentro de la cavidad, ya que dificultaría su posterior movimiento hacia la zona de reacción.

Tabla 20: Tabla de mutaciones dobles que cumplen con el criterio de afinidad y distancia. Sobre cada columna se ve el templado con la primera mutación y luego una lista con cada segunda mutación que cumple los criterios. En rojo se destacan las mutaciones redundantes.

Templado	M240G	M240A	F287E
Segunda Mutación	C136G (-6.5)	C136G (-6.3)	M240G (-6.5)
	C136A (-6.6)	C136A (-6.5)	M240A (-6.3)
	F287L (-7.2)	C136E (-6.7)	
	F287E (-6.8)	C139G (-6.6)	
	F287D (-7.2)	F287E (-6.5)	
	F287N (-7.0)	F287N (-6.7)	
	F287Q (-6.8)		
	F287C (-7.1)		

En la última serie de mutaciones, se buscaron cambios que aumentaran la diferencia entre la afinidad de la orientación deseada de (*R*)- α -ionona y la de otras orientaciones que pueden causar una metilación en otro carbono de la molécula. Es decir, se aumentó la selectividad en cuanto a producto. Para esto, se escogieron solo las mutaciones con una diferencia superior a $\Delta G = 1$ kcal/mol entre la posición correcta y la indeseada.

Se ordenaron las 40 mutantes que cumplían con el requisito, según menor afinidad y mayor diferencia con la orientación no deseada y se seleccionaron los mejores candidatos. Finalmente, se optó por las 13 mutantes que se indican en la Tabla 21. Entre éstas, se encuentran las dos mutantes simples, las 4 mutantes dobles y las 7 mutantes triples más

promisorias. Cabe mencionar que las últimas 3 mutantes triples se añadieron dado que no se necesitaba de partidores adicionales para generarlas en el laboratorio.

Se analizó el cambio en el tamaño y la forma del bolsillo catalítico de cada una de las mutantes. El volumen y su variación respecto de la enzima original fueron medidos por medio de CASTp (Tabla 21). Por otra parte, la Figura 31 ilustra el cambio de forma del sitio activo de las mutantes triples y cómo las mutaciones permitieron una orientación correcta de (*R*)- α -ionona.

Tabla 21: Mutantes seleccionadas para ser generadas en el laboratorio. Se muestra la afinidad resultante del docking, si lograron una posición correcta de (*R*)- α -ionona, si promueven metilaciones indeseadas y el tamaño del bolsillo catalítico, con su aumento porcentual sobre la enzima original.

Mutación	Afinidad [kcal/mol]	Posición correcta ionona	Metilaciones indeseadas	Volumen Bolsillo [Å ³] (aumento)
-	N/A	No	Si	1.844 (0%)
M240A	N/A	No	Si	1.957 (+6%)
M240G	N/A	No	Si	1.972 (+7%)
M240G / F287E	-7,2	Si	Si	2.016 (+9%)
M240G / F287C	-7,1	Si	Si	2.081 (+13%)
M240G / F287L	-7,4	Si	Si	2.085 (+13%)
M240G / F287L / V328F	-7,9	Si	No	2.011 (+9%)
M240G / F287L / I139V	-7,7	Si	No	2.072 (+12%)
M240G / F287L / I139T	-7,6	Si	No	2.087 (+13%)
M240G / F287D	-7,2	Si	Si	2.079 (+13%)
M240G / F287D / A273W	-7,8	Si	No	2.032 (+10%)
M240G / F287D / V328F	-7,8	Si	No	2.012 (+9%)
M240G / F287D / I139V	-7,6	Si	No	2.094 (+14%)
M240G / F287D / I139T	-7,5	Si	No	2.104 (+14%)

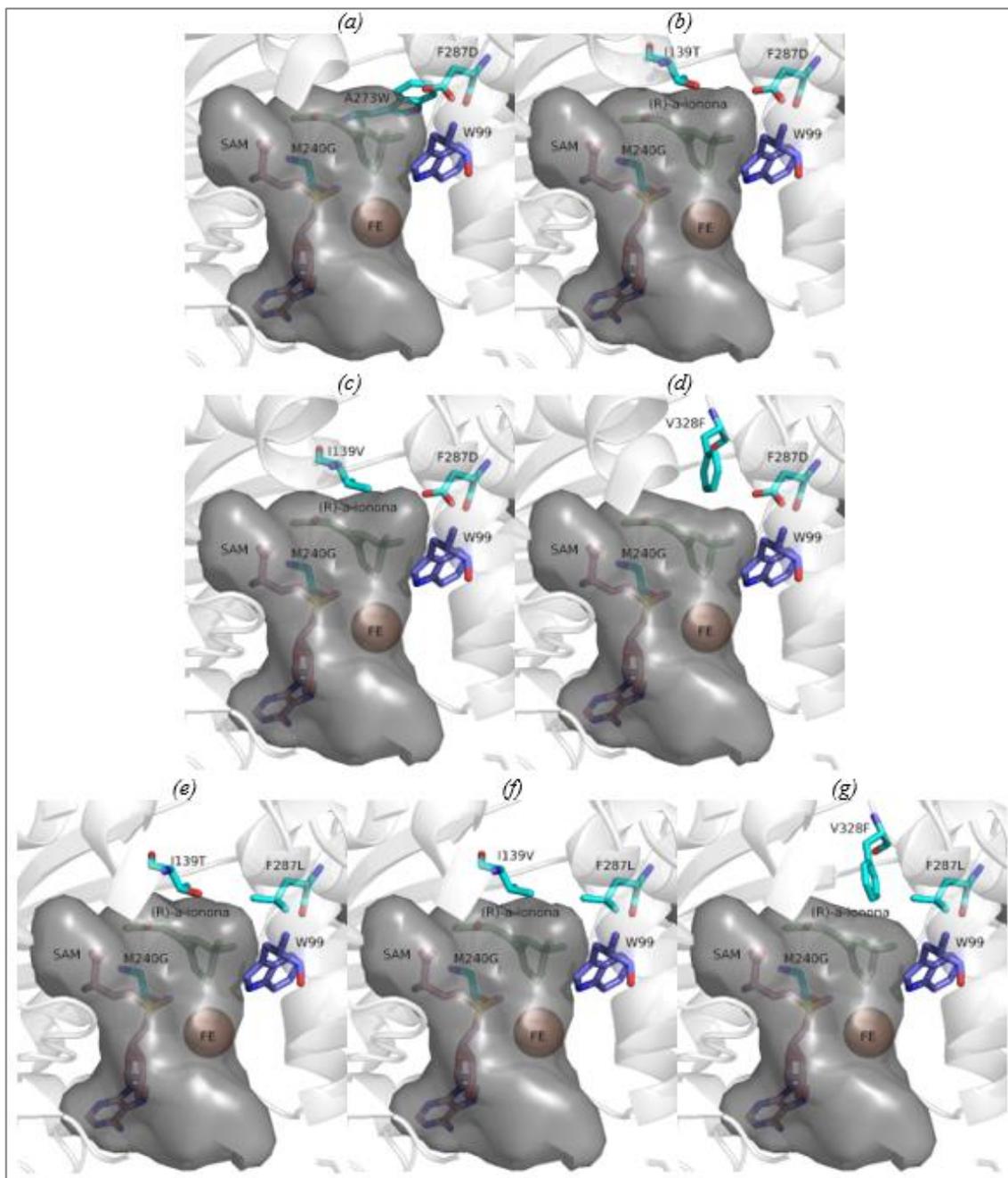


Figura 31: Bolsillo catalítico de las mutantes triples de MppJ. Se destaca en celeste los residuos mutados. Base M240G/F287D (a)/A273W, (b)/I139T, (c)/I139V, (d)/V328F. Base M240G/F287L (e)/I139T, (f)/I139V, (g)/V328F. Elaboración propia a través de PyMOL.

5.4. Generación de cepas mutantes y expresión de MppJ

Las mejores mutantes obtenidas *in silico*, mencionadas en la sección anterior, fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) para evaluar su actividad enzimática sobre el sustrato original, PPY, y sobre α -ionona. Con este fin, la próxima etapa del trabajo fue la mutación del gen *mppJ*, ya insertado en el vector de expresión pET28a, a través de PCR mutagénico. Para las mutaciones múltiples se intentó hacer mutaciones en paralelo, agregando ambos pares de partidores a la reacción y en serie, corroborando una mutación antes de llevar a cabo la segunda. Para cada mutación, se transformó la bacteria con el resultado del PCR y se extrajo y secuenció el vector de 4 colonias distintas, con el objetivo de validar el cambio realizado.

Favorablemente, en cada caso, se encontró que la secuenciación de al menos una de las colonias fue correcta. El porcentaje de éxito de las mutaciones dobles que fueron realizadas en paralelo, en un mismo PCR, fue de 12,5%, mientras que, el de la mutación seriada fue de 93%. Dado esto, se decidió que las mutaciones triples fueran realizadas en serie, tras la correcta secuenciación de las mutantes dobles.

Los vectores cuya mutación fue corroborada por secuenciación fueron transformados exitosamente en *E. coli* BL21(DE3) y cultivados en LBK agar en placas Petri. Para expresar el gen, se picó una colonia de cada mutante y se creció en 10 mL de LBK líquido en un tubo Falcon de 50 mL hasta alcanzar 0,6 OD₆₀₀. Luego, se indujo la expresión con IPTG, lo que fue comprobado a través de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), luego de lisar el cultivo. En los geles se utilizó como control el lisado celular de una cepa transformada con pET28a sin *mppj* insertado (VV).

En una primera instancia, se realizó la inducción a 37 °C, lo que resultó en una baja cantidad de proteína en los geles, observándose bandas delgadas y nula actividad enzimática. Luego, se indujo a 16 °C, lo que aumentó considerablemente la cantidad de proteína producida y se pudo observar actividad enzimática. Esto puede explicarse, ya que la enzima tiene una temperatura óptima de reacción de alrededor de 25 °C, por lo que es

probable que a los 37 °C parte de la proteína se encuentre denaturada y sea digerida por la célula.

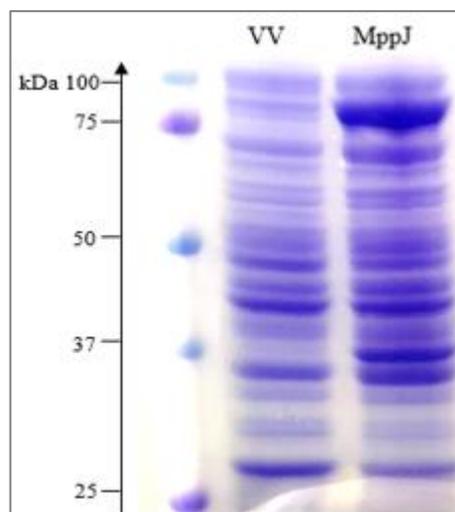


Figura 32: PAGE de un lisado de *E. coli* BL21(DE3) con pET28a (VV) y con pET28a_MppJ (MppJ). A la izquierda se muestra el *ladder* de proteínas Bio-rad con el tamaño de referencia señalado.

En la Figura 32 se muestran las bandas correspondientes al control con la cepa transformada con el vector sin MppJ (VV) y la cepa productora de MppJ silvestre. El mismo ensayo se realizó con todas las mutantes con una dilución mayor. Cinco de ellas se ejemplifican en la Figura 33, con una dilución de 1:10, para evitar la saturación del gel. Tanto para la enzima nativa, como para las mutantes existe una banda adicional en los geles, justo por sobre la banda de tamaño 37 kDa, que no se observa en el control. Esto es de esperar, ya que la enzima tiene un tamaño de 37.186 Da, sin contar la cola de polihistidina agregada al inicio de su secuencia.

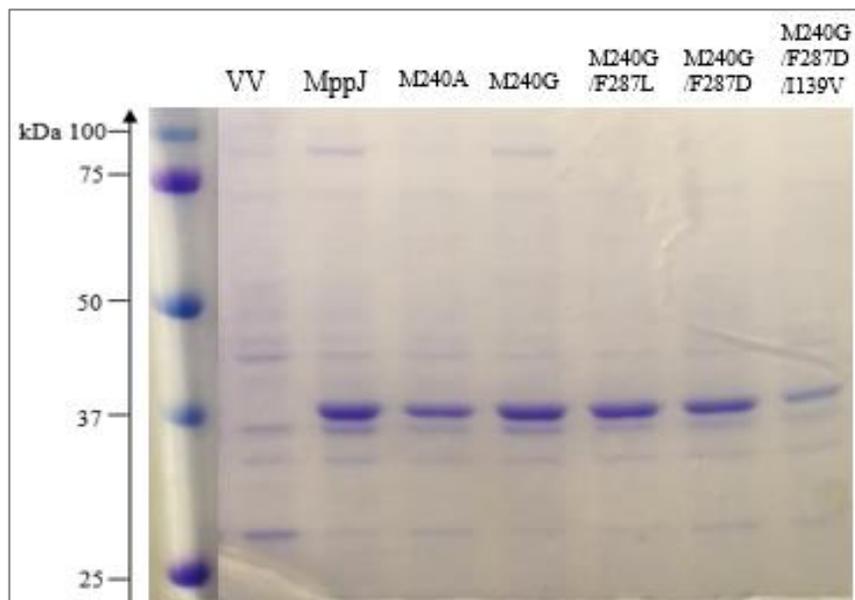


Figura 33: PAGE del lisado de *E. coli* BL21(DE3) con el vector pET28a sin MppJ (VV), con MppJ original (MppJ) y con MppJ mutado (se señala la mutación). A la izquierda se muestra el *ladder* de proteínas Bio-rad con el tamaño de referencia señalado. Elaboración propia.

Se observa una diferencia alrededor de los 75 kDa, para MppJ en la Figura 32, y para MppJ y M240G de la Figura 33. Este tamaño podría corresponder al dímero de MppJ, aunque se espera que, con la denaturación, los monómeros sean separados. Con estos ensayos es posible inferir que el gen se está expresando. Sin embargo, no es posible saber si la enzima se encuentra bien plegada o si es funcional. Para validar su síntesis se purificó la enzima y para evaluar su actividad se realizaron ensayos enzimáticos.

5.5. Purificación

La purificación logró separar exitosamente a MppJ del resto de la fracción proteica del lisado celular. Se obtuvieron los mejores resultados en el experimento con las soluciones tampón seriadas con 5, 40 y 250 mM de imidazol que, con la serie de 5, 50, 100 y 200

mM de imidazol. En el primer caso se lograba limpiar una gran parte de la columna con el buffer de 5mM de imidazol y el de 40 mM terminaba de eluir las proteínas con una afinidad mayor a la columna. Por último, el de 250 mM era capaz de eluir el total de la enzima unida a través de su cola de polihistidina, logrando una fracción pura. Mientras que, en el segundo caso, la concentración de 100 mM no era capaz de extraer la totalidad de la enzima, dividiendo su concentración entre esta fracción y la de 200 mM. Además, en ambas fracciones se observaron otras dos bandas de distinto tamaño, lo que sugiere la adhesión de otras proteínas a la columna.

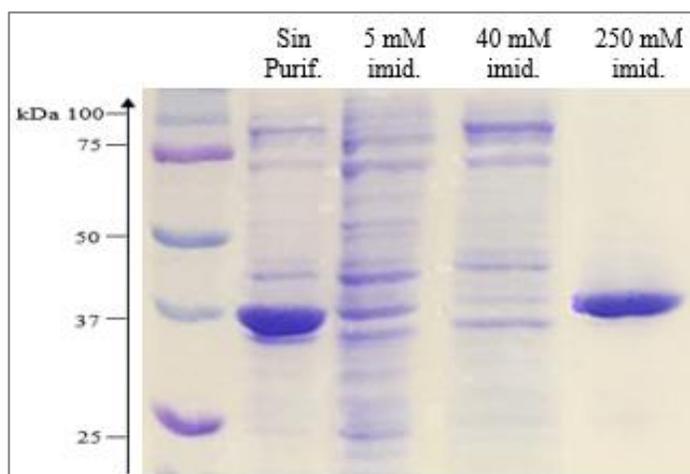


Figura 34: PAGE de las fracciones colectadas durante la purificación. De izquierda a derecha se encuentra: el estándar de proteínas, el lisado de MppJ completo, previo a la purificación y las fracciones concentradas, eluidas a 5, 40 y 250 mM de imidazol, respectivamente. Elaboración propia.

En la Figura 34 se muestra el resultado de la electroforesis de cada fracción concentrada. Como se puede observar, el carril eluido con buffer de 5 mM de imidazol contiene proteínas de diferentes tamaños, el de 40 mM tiene una variedad menor y, por último, el de 250 mM imidazol solo contiene una banda significativa sobre los 37 kDa. En este caso,

no se obtuvieron otras bandas en la última elución. Esto puede deberse al uso de una columna nueva, previamente empacada, en comparación con la regenerada manualmente, que podría haber mantenido ciertas impurezas.

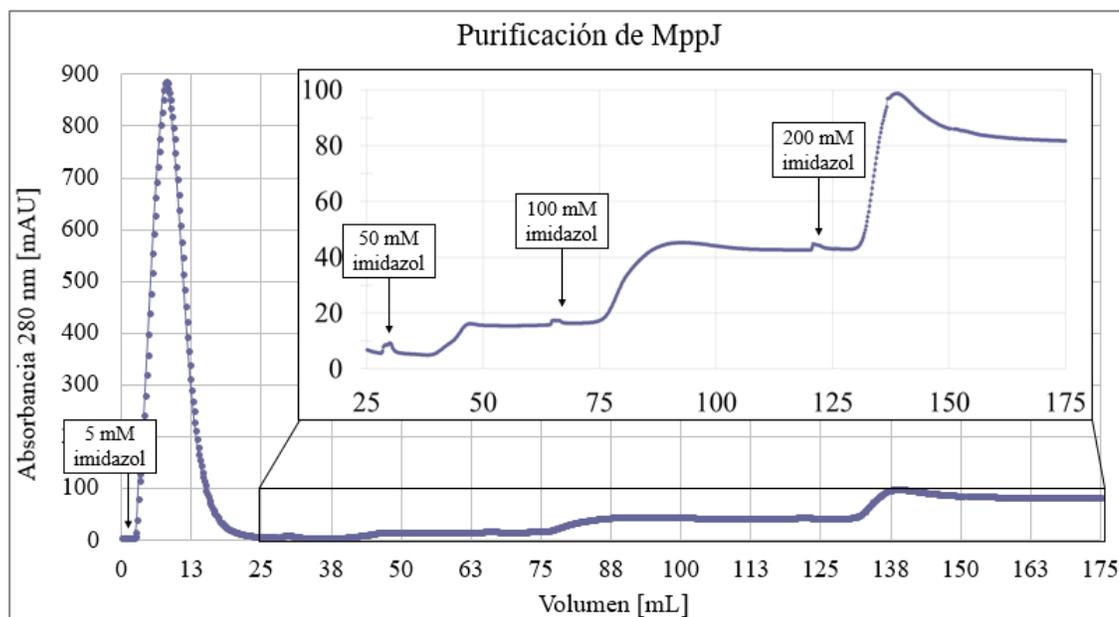


Figura 35: Absorbancia a 280 nm durante la elución en gradiente de imidazol de MppJ separada en FPLC utilizando una columna de afinidad para purificación de proteínas marcadas con his-tag. Se señala el punto de cambio de concentración de imidazol.

En la Figura 35 se ve la curva de detección del FPLC utilizando concentraciones crecientes de 5, 50, 100 y 200 mM de imidazol. El primer *peak*, que eluye a bajas concentraciones de imidazol alrededor de los 10 minutos representa todo lo que no es compatible con la columna. La mayoría de los compuestos se encuentra en esta área, debido a esto la absorbancia llega a niveles tan altos. En la misma figura, arriba, se ilustra un cambio de escala, para poder apreciar mejor la elución con las soluciones de 50, 100 y 200 mM imidazol.

La absorbancia aumenta de acuerdo con la concentración de proteínas y de imidazol. Dado esto, se busca un estado estacionario basal, posterior a la elución de proteínas, que representa la absorbancia intrínseca del imidazol. El área sobre el nivel del estado estacionario muestra la detección de las proteínas eluidas, en cada caso. Los últimos dos *peak* corresponden a la MppJ acompañada por cualquier otra proteína que hubiese logrado permanecer adherida hasta la elución con 200 mM de imidazol.

5.6. Ensayo enzimático

Para detectar actividad mediante ensayo enzimático, se midió la concentración de sustratos y/o productos en el medio. Para los casos donde se utilizó PPY como sustrato, el análisis fue efectuado por HPLC. Por otro lado, en los casos en que se utilizó ionona como sustrato, las mediciones fueron realizadas en un cromatógrafo de gases, ya que ésta es volátil. Es importante destacar que no fue posible realizar la purificación de las mutantes, previo a los ensayos enzimáticos, con el equipamiento disponible en el laboratorio. Dado esto, los ensayos fueron realizados con lisado celular, para obtener una mejor comparación entre la enzima original y las mutantes.

5.6.1. Ensayos con PPY como sustrato – HPLC-MS

Todos los resultados son el promedio de experimentos realizados por triplicado, donde cada uno se mide por separado en el HPLC. La desviación de cada set de triplicados fue de 7% para las mediciones de PPY y de 16% para metPPY, medido como la desviación estándar sobre el promedio de los tres datos.

En primer lugar, no se observó formación de metPPY en la muestra donde se reemplazó el lisado celular por agua (C-), como era de esperar. Sin embargo, hubo variaciones en la medición de la concentración de PPY, que fueron entre los 2,4 y los 3,1 mM. La diferencia con el valor definido (3,0 mM), puede deberse a errores asociados a la manipulación de

los experimentos, como diluciones, calibrado de las micropipetas, entre otros. Cabe destacar que ningún caso se agotó el PPY añadido a la reacción.

No se observó producción de metPPY en ninguno de los experimentos en que se utilizó la cepa transformada con el vector, sin MppJ (VV), como control (primer par de columnas en la Figura 36). Por lo tanto, la cepa utilizada de *E. coli* no es capaz de metilar PPY por su cuenta y VV es un buen control negativo de la enzima, considerando que tiene todo el resto del *pool* proteico de la bacteria y la resistencia a kanamicina.

Por otro lado, en MppJ se observó la formación de metPPY, sin embargo, no se logró cuantificar en unidades de concentración dado que, no se contaba con el estándar correspondiente. MetPPY fue detectado a través de su espectro de masa en el HPLC-MS y su cuantificación fue realizada en unidades de área.

En cuanto a la temperatura de conservación de muestras, se pudo observar que, hay una concentración hasta 3 veces mayor de producto metPPY en la que fue almacenada a 4 °C, en comparación con -20 °C (segundo y tercer par de columnas en la Figura 36). En la muestra que no pasó por la incubación y fue almacenada a -20 °C, se detectó un área de 55.000 correspondiente a metPPY. En la que fue incubada y luego, se almacenó a -20 °C, se detectó un área de 125.000. En el caso de las muestras almacenadas a 4 °C, la que no fue incubada, acumuló un área de 131.000 y la que fue incubada, acumuló un área de 141.000. Dado que la única diferencia entre ambas muestras fue la temperatura de almacenamiento, existen dos posibilidades no excluyentes.

La primera explicación a este fenómeno es que a -20 °C se podría perder parte del producto dada la congelación del agua. La segunda, dado que es posible que a 4 °C la enzima continúe estando activa, por lo que el tiempo de almacenamiento fue utilizado para una mayor síntesis de producto. Esta segunda teoría se respalda también en el hecho de que, en algunos casos, se pudo observar actividad de la enzima, incluso en las muestras que fueron almacenadas inmediatamente (a 4 °C y -20 °C) y no pasaron por la incubación a 25 °C. En el caso de 4 °C, si la enzima sigue activa a esta temperatura, la reacción ocurrió de todas maneras durante el tiempo que se encontró almacenada (entre 16 y 24 horas). En el caso de almacenamiento a -20 °C, las muestras fueron descongeladas previamente a la

cromatografía y la temperatura del HPLC, de alrededor de 8 °C, puede haber promovido la actividad de MppJ.

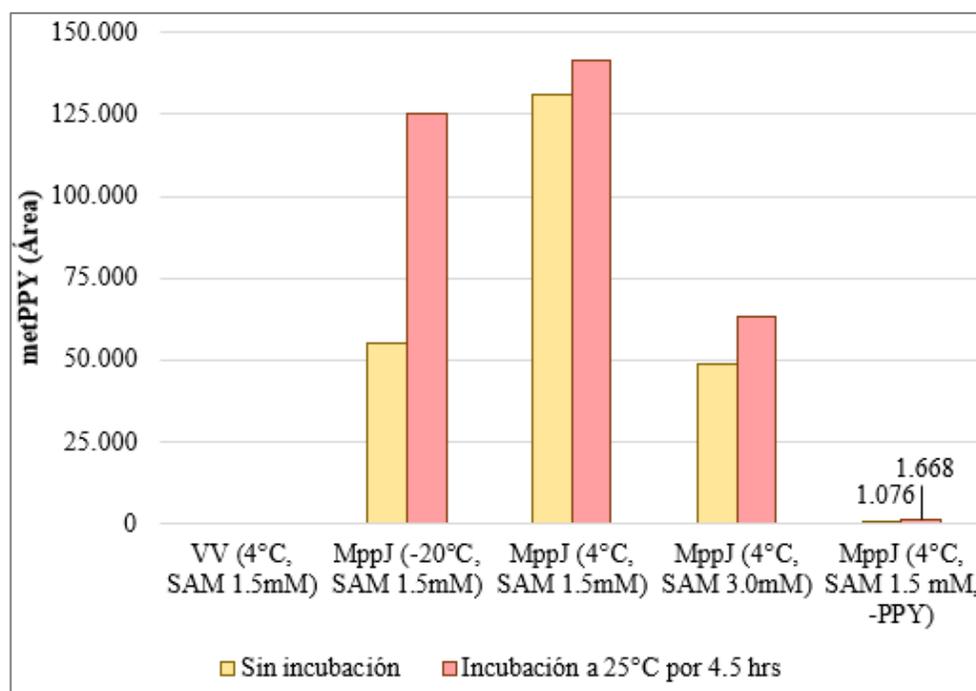


Figura 36: Gráfico de barras de la cuantificación de metPPY por HPLC-MS, en unidades de área detectada. Se señala la cepa utilizada y entre paréntesis las condiciones experimentales. Elaboración propia.

El cuarto par de columnas en la Figura 36, representa a MppJ almacenada a 4 °C con 3,0 mM de SAM, que es el doble de la concentración original. Esto resultó en una disminución promedio de 56% en la síntesis de metPPY, en comparación con el ensayo en el que se utilizó 1.5 mM de SAM. Se esperaba que un aumento en la concentración del cofactor aumentara la generación de producto, o en el peor de los casos, que no la afectara. Una posible explicación a estos resultados es la degradación de SAM a SAH en el *stock*

utilizado. Un aumento en la concentración de SAH inhibe la actividad de las MT, resultado en una retroalimentación positiva.

El ensayo enzimático que fue llevado a cabo sin sustrato (última columna en la Figura 36), mostró una leve formación de metPPY, con un área de 1.076, sin incubación, y de 1.668, con incubación. Esto demuestra que el microorganismo es capaz de sintetizar una baja concentración de PPY y que, MppJ logra utilizarlo como sustrato. Sin embargo, esta cantidad no es suficiente como para realizar los ensayos enzimáticos, sin la adición externa de sustrato.

Las mediciones de PPY no resultaron ser concluyentes ni concordantes con el aumento de metPPY. Se observaron variaciones menores al 15% en la concentración de este sustrato, en comparación con la muestra no incubada. Esto puede deberse a que la formación de metPPY es muy pequeña en comparación con la cantidad de PPY en el medio, por lo que este cambio no se vea reflejado en su concentración. Además, existen por lo menos otras 6 enzimas que se han encontrado en *E. coli*, donde PPY participa en la reacción, ya sea como sustrato, o como producto: hidroxicaboxilato hidrogenasa B (*hcxB*), aminoácido-aromático-aminotransferasa (*tyrB*), pterinato deshidratasa (*pheA*), KHG/KDPG aldolasa (*eda*), tautomerasa (*pptA*) y carboxi-S-adenosil-metionina sintasa (*cmoA*). Estas enzimas son capaces de producir y utilizar PPY, alterando la concentración del metabolito en el lisado celular. Para deshacerse de esta fuente de error es necesario purificar MppJ.

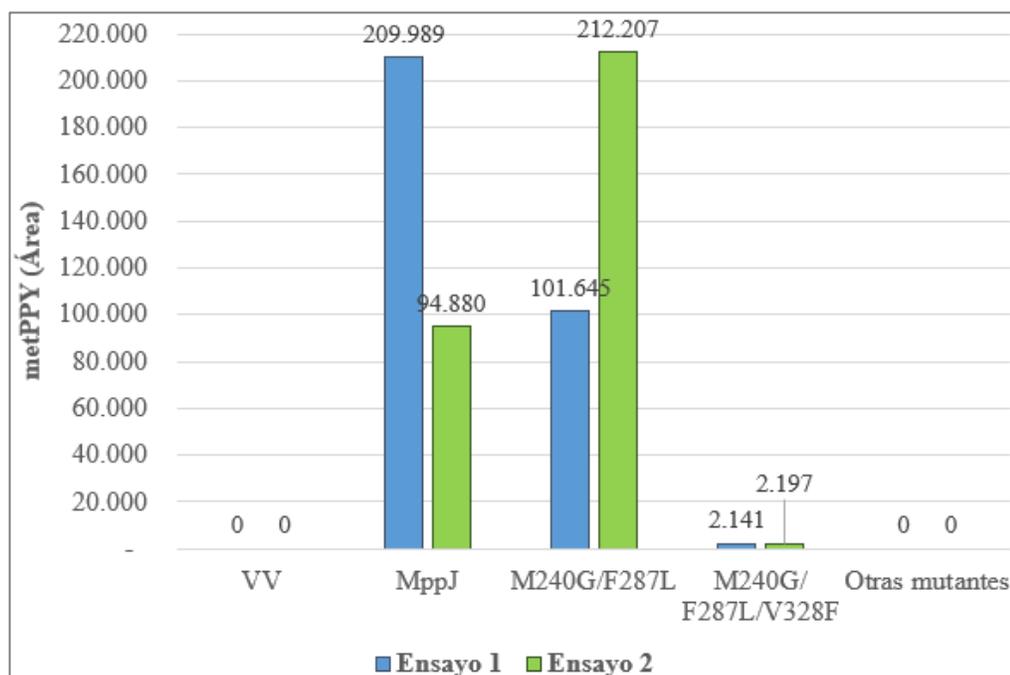


Figura 37: Gráfico de barras de la cuantificación en área de metPPY, de dos ensayos enzimáticos realizados en distintos momentos con las mutantes de MppJ, utilizando PPY como sustrato.

El ensayo enzimático de las mutantes se realizó dos veces y en ambos casos, la cepa con MppJ original, mostró actividad, mientras que en la sin MppJ (VV), la actividad fue nula (Figura 37). Además, en los dos experimentos se observó que solo se produjo metPPY en las mutantes M240G/F287L y M240G/F287L/V328F.

La nula producción de metPPY observada en la gran mayoría de las mutantes demuestra que, los cambios realizados afectan pronunciadamente la actividad de MppJ. Se preveía una disminución de la actividad en las mutantes, ya que es posible que su bolsillo catalítico no posea un ambiente afín a PPY, disminuyendo la posibilidad de que se posicione correctamente dentro de él. Esto no quiere decir que la enzima haya perdido necesariamente su función metiltransferasa, sino que no es capaz de aceptar el mismo

sustrato. No obstante, se esperaba observar actividad al menos la actividad en las mutantes simples.

El primer ensayo, dio como resultado una actividad en M240G/F287L de alrededor de un 50% de la de MppJ. Por el contrario, en el segundo, se vio el doble de actividad en la mutante que en la enzima original. En ambos casos, la mutante M240G/F287L/V328F fue capaz de producir entre 1% y 2% de metPPY que MppJ. Es posible, que la mutación M240G no permita que PPY se sitúe correctamente y que, F287L se haya vuelto a conferir la capacidad de aceptar este sustrato. Luego, V328F vuelve a convertirse en un impedimento para PPY, aunque existe una actividad residual.

5.6.2. Ensayos con Ionona como sustrato – GC-MS

Para la cuantificación de iononas e ironas se realizó una curva estándar, la que permite predecir la concentración de estas, a través del área medida en el GC-MS. En la Figura 38 se ve el ajuste para las concentraciones entre 10 y 100 ppm de cada compuesto. Como se puede observar, ambas curvas tienen un buen ajuste con un R^2 cercano a 1. Para las iononas el ajuste es lineal, mientras que, para las ironas es cuadrático.

Las muestras dopadas con α -irona, mostraron *peaks* de buena resolución desde 10 ppm, como se puede ver en la Figura 39 y fue posible detectar el compuesto desde los 0,5 ppm. La detección de α -ionona y de β -damascenona (estándar interno) también ocurrió de manera exitosa.

En todas las muestras extraídas de los ensayos enzimáticos se pudo detectar y cuantificar α -ionona y de β -damascenona. No obstante, la concentración de α -ionona medida disminuyó entre un 70 y 90%, en comparación con la añadida originalmente al ensayo. Incluso, en el control negativo, que no contenía lisado celular, se observó una disminución del 40%. Esto puede sugerir una volatilización del compuesto, gracias a su manipulación para el ensayo enzimático y a la temperatura de este. También, es posible que el rendimiento de la extracción disminuya en presencia del lisado celular. En el caso

de los ensayos enzimáticos, es posible que la ionona esté siendo metabolizada por enzimas propias de *E. coli*.

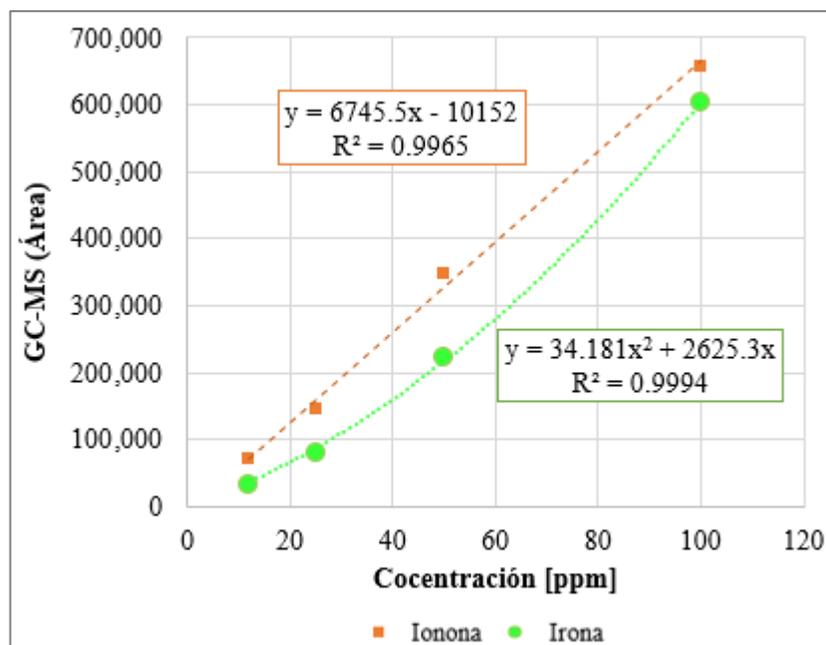


Figura 38: Curvas de calibrado para la concentración de ionona e irona en GC-MS.

En ninguna de estas muestras se pudo detectar ironas sobre 0,5 ppm. También, se buscó la formación de isometil-ionona y *N*-metil-ionona, a través de su espectro de masa. Esto se hizo con el objetivo de detectar posibles metilaciones en sitios no deseados. Ninguno de estos compuestos fue detectado en el cromatograma.

Existen diversas explicaciones para la incapacidad de detección de la formación de ironas en los ensayos enzimáticos. En primer lugar, es posible que existan y se generen otros productos no deseados, que no han sido identificados aún. En segundo lugar, podría deberse a que no se hayan optimizado las condiciones del ensayo enzimático en cuanto a cantidad de enzima, temperatura, concentración de sustrato y tiempo. Además, el uso de

lisado celular, en vez de enzima purificada añade incertidumbre y fuentes de error al ensayo. También, la regulación alostérica en C319 con PPY, propuesta por Zou, Y. C. Liu, *et al.* (2014) (véase sección 5.2), apunta a que puede ser necesaria la adición de PPY a los ensayos con iononas. PPY no debiese competir con α -ionona, ya que en los ensayos se vio que la mayoría de las mutantes no tenían actividad con este sustrato. Por último, es posible que las mutaciones sugeridas por la modelación *in silico* no sean suficientes para lograr la metilación de un sustrato diferente por la enzima. La mutación en la posición 240 podría tener un efecto negativo para la actividad de la enzima, motivo por el que sería interesante experimentar con otras combinaciones, que no incluyan a este residuo.

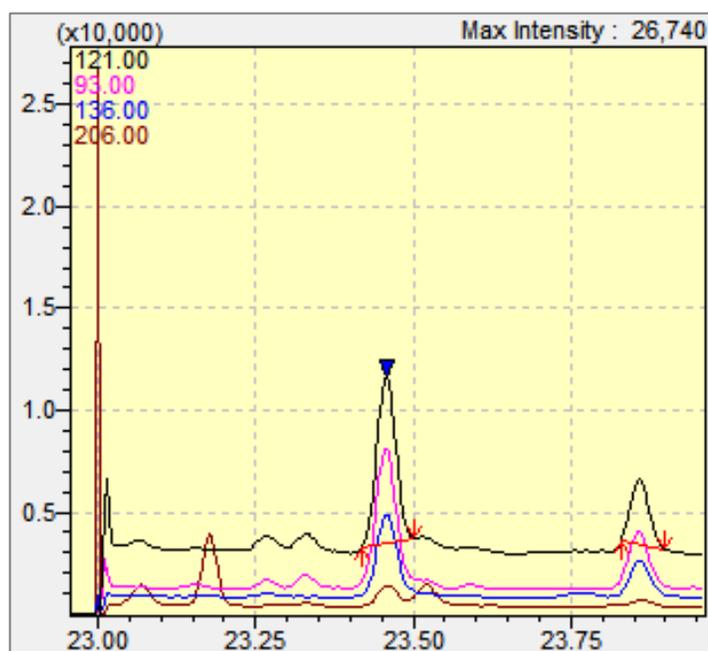


Figura 39: Cromatograma de una muestra dopada con 10 ppm de irona. En el tiempo 23.48 se observa el *peak* correspondiente al espectro de masa de irona. Elaboración propia.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Se identificaron cinco estrategias biotecnológicas para la biosíntesis de ironas. Una de ellas, se estableció utilizando la vía original en un microorganismo huésped y las otras cuatro, se diseñaron a partir de vías alternativas, basadas en el metabolismo de los carotenoides. Se estudiaron los metabolitos y enzimas responsables de cada vía y se propusieron enzimas para las reacciones faltantes. Se seleccionó la vía a partir de α -ionona para ser desarrollada durante el trabajo dado que, se concluyó que era la aproximación más factible y con el menor nivel de incertidumbre.

Se estudió el universo de las C-metiltransferasas y se encontraron candidatos para la metilación de las iononas. Se analizaron aquellos candidatos y se seleccionó a MppJ, una fenilpiruvato-C-MT, como la más adecuada para ser modificada de manera de que acepte α -ionona como sustrato.

El estudio de su bolsillo catalítico mostró que existen 34 residuos que forman parte del bolsillo catalítico, desde su canal de entrada. Tres de éstos coordinan el ion de hierro, dos coordinan al sustrato original PPY, dos son parte del mecanismo catalítico y seis se unen a SAM. De estos, se identificaron 23 residuos cuya mutación podría modificar la aceptación de α -ionona como sustrato, sin perjudicar la unión de Fe y SAM, ni la catálisis.

Se desarrolló un *script* de *docking*, que es capaz de medir distancias entre átomos para clasificar y ordenar los resultados, con el objetivo de abarcar una mayor cantidad de mutantes en el tiempo predispuesto. De esta manera, se crearon y analizaron más de 8.000 mutantes de MppJ y más de 60.000 resultados de *docking* de α -ionona. A través de una composición de análisis con programas de visualización molecular y *docking* masivo, se encontraron decenas de mutantes dobles y triples, que cumplen con los criterios de posición y orientación del sustrato. Se añadieron criterios para jerarquizar y finalmente seleccionar las 13 mutantes que fueron sintetizadas en el laboratorio.

El diseño de partidores fue efectivo en la generación de vectores mutantes. La creación de mutantes en paralelo resultó mucho menos eficiente (12,5%) que la que fue hecha en reacciones seriadas (93%), por lo que se trabajó con esta última para la generación de

mutantes triples. Las cepas de *E. coli* BL21(DE3) fueron capaces de expresar los genes para cada una de las mutantes, al ser inducidas con IPTG y de sintetizar sus respectivas proteínas. Además, se mejoró la cantidad y calidad de las enzimas al cambiar las condiciones de crecimiento e inducción.

En cuanto al trabajo hecho con la enzima y sustrato originales, se logró montar un ensayo enzimático que probara la actividad de MppJ. En primer lugar, se logró sintetizar metPPY en un lisado celular de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pET28a_MppJ, las cepas que no contienen el gen *mppJ* no son capaces de producir el metabolito. Fue posible identificar este producto, en el HPLC-MS, a partir de su espectro de masa. No obstante, no se pudo cuantificar, a falta de una solución estándar con concentración conocida. Esto demuestra que la enzima MppJ se encuentra correctamente plegada y funcional y que tanto, PPY como SAM, son capaces de interactuar con la enzima.

Sobre las condiciones experimentales, se pudo concluir que, se acumula más producto al almacenar las muestras a 4 °C. Esto puede estar ocurriendo debido a que, la enzima se mantiene activa a esta temperatura. Para corregirlo, se sugiere realizar una extracción de metabolitos posterior al ensayo, con el objetivo de que no se encuentren en contacto con la enzima. Además, al no añadir PPY al ensayo enzimático, se demostró que MppJ es capaz de metilar la baja concentración de PPY existente en el lisado.

Por otro lado, se concluyó que la medición de la disminución de PPY como sustrato, no es un buen indicador de actividad, en un ensayo hecho en lisado celular. Esto, dado que, los resultados no fueron concordantes con la producción de metPPY y ya que, hay más enzimas que producen o utilizan PPY en el metabolismo de *E. coli*. Para poder utilizar PPY como referencia de actividad es necesario trabajar con la enzima purificada.

Solo dos de las mutantes fueron capaces de producir metPPY, al utilizar PPY como sustrato: M240G/F287L y M240G/F287L/V328F. No queda claro si la mutación doble mejora la actividad enzimática de MppJ, al tener resultados opuestos en dos ensayos distintos. La mutación triple, en ambos casos, tiene una actividad relativa de menos del 2%.

Por último, se montó un método para la identificación y cuantificación de iononas e ironas en GC-MS, con el cuál se logró detectar desde 0,5 ppm. En los ensayos enzimáticos con la enzima original y las mutantes no se logró detectar la producción de ironas. Tampoco, se observó la generación de otros productos metilados como isometil-ionona y *N*-metil-ionona.

Para mejorar las condiciones del ensayo enzimático, se recomienda la purificación de las mutantes, para evitar el efecto de otras enzimas del metabolismo de la bacteria y la inactivación o remoción de MppJ luego del ensayo enzimático. Además, es posible optimizar otros factores como la temperatura, concentración y tiempo del ensayo, fácilmente, realizando experimentos modificando estas variables. También, se sugiere la adición de PPY a los ensayos enzimáticos, ya que, se ha comprobado que puede actuar como activador alostérico (Zou, Y. C. Liu, et al. 2014). Los resultados de este trabajo muestran que la mayoría de las mutantes sintetizadas no tienen actividad con el sustrato nativo, por lo que no debiese existir competencia con (R)- α -ionona.

Por otro lado, también es posible trabajar con las demás mutantes que cumplen los criterios sugeridos y que, no fueron puestas a prueba en este trabajo. En particular, se recomienda trabajar con enzimas que no incluyan la mutación M240A ni M240G ya que, es posible que este cambio tenga un efecto negativo en la actividad de la enzima.

Finalmente, en este trabajo se sugirieron otros enfoques para la biosíntesis de ironas que no fueron realizados debido a que excedían los objetivos del presente trabajo. Uno de ellos es el uso de otras enzimas para la metilación de iononas. Por otro lado, se encuentran las otras cuatro estrategias diseñadas, a partir de otras vías metabólicas. De esta manera, la amplia diversidad de técnicas a utilizar y el surgimiento de nuevas tecnologías, le entrega a la síntesis biotecnológica de ironas una gran potencialidad de éxito.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, I., Tanaka, H. & Noguchi, H., 2002. Enzymatic formation of an unnatural hexacyclic C35 polyprenoid by bacterial squalene cyclase. *Journal of the American Chemical Society*, 124, pp.14514–14515.
- Abelló, S. et al., 2007. Accelerated study of the citral – acetone condensation kinetics over activated Mg – Al hydrotalcite. *Applied Catalysis A: General*, 325, pp.121–129.
- Akacha, N. Ben & Gargouri, M., 2015. Microbial and Enzymatic Technologies used for the Production of Natural Aroma Compounds: Synthesis, Recovery Modeling, and Bioprocesses. *Food and Bioproducts Processing*, 94, pp.675–706. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>.
- Alonso, G.L. et al., 1996. Determination of Safranal from Saffron (*Crocus sativus* L.) by Thermal Desorption - Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44, pp.185–188.
- Altschul, S.F. et al., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, pp.403–410.
- Amick, J.D. et al., 2016. Modified valencene synthase polypeptides, encoding nucleic acid molecules and uses thereof.
- An, J., Joo, Y. & Oh, D., 2013. New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound γ -Dodecalactone from 10-Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer* Cells. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), pp.2636–2641.
- An, J. & Oh, D., 2013. Increased production of γ -lactones from hydroxy fatty acids by whole *Waltomyces lipofer* cells induced with oleic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, pp.8265–8272.
- An, J. ung & Oh, D. kun, 2014. New biotransformation process for production of γ -lactones from hydroxy fatty acids by permeabilized *Waltomyces lipofer* cells induced with oleic acid. *New Biotechnology*, 31, pp.6–7.
- Andrianantoandro, E. et al., 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology*, pp.1–14.

- Ariyawutthiphan, O. et al., 2012. Structure analysis of geranyl pyrophosphate methyltransferase and the proposed reaction mechanism of SAM-dependent C - methylation research papers. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68, pp.1558–1569.
- Auldrige, M.E., Mccarty, D.R. & Klee, H.J., 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, pp.315–321.
- Baccou, J.-C. et al., 1992. Process for the accelerated ageing and treatment of iris rhizomes. , pp.1–5.
- Banerjee, A. et al., 2002. Botryococcus braunii : A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3), pp.245–279.
- Bateman, A. et al., 2017. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp.D158–D169.
- Baumes, R. et al., 2002. Biogenesis of C 13 -norisoprenoid compounds : experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta*, 458, pp.3–14.
- Beekwilder, J. et al., 2007. Microbial production of natural raspberry ketone. *Biotechnology Journal*, 2, pp.1270–1279.
- Beekwilder, J., Rossum, H.M. Van, et al., 2014. Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production. *Journal of Biotechnology*, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.016>.
- Beekwilder, J., Houwelingen, V., et al., 2014. Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. *Plant Biotechnology Journal*, 12, pp.174–182.
- Belcour, B., Courtois, D. & Ehret, C., 1990. Process for the preparation of γ -irone.
- Bennett, M.R. et al., 2017. Recent advances in methyltransferase biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, pp.97–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.020>.
- Berger, R.G., 2015. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Current*

Opinion in Food Science, 1, pp.38–43.

Berger, R.G., 2009. Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnology Letters*, 31(11), pp.1651–1659.

Berman, H.M. et al., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, pp.235–242.

Böker, A., Fischer, M. & Berger, R.G., 2001. Raspberry Ketone from Submerged Cultured Cells of the Basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnol. Prog.*, 17, pp.568–572.

Bonfils, J.-P. et al., 1995. 16-Hydroxylation of Iridal (Triterpenoid from Iris Species) Mediated by Cytochrome P-450. *Natural Product Letters*, 6(1), pp.15–22. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10575639508044082>.

Boulin, B. et al., 2007. New Preparation Methods for α -Damascone, γ -Damascone, and β -Damascenone using Pyronenes. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 35(15), pp.2579–2591.

Brenna, E., Delmonte, M., et al., 2001. Enzyme-Mediated Preparation of (+)- and (-)-b-Irone and (+)- and (-)-cis-g-Irone from Ironone α . *Helv. Chim. Acta*, 84, pp.69–86.

Brenna, E. et al., 1999. Enzyme-Mediated Preparation of (+)- and (\pm)-cis-a-Irone and (+)- and (\pm)-trans-a-Irone. *Helv. Chim. Acta*, 82, pp.2246–2259.

Brenna, E., Fuganti, C., et al., 2001. Enzyme-mediated syntheses of the enantiomers of γ -irones. *Helvetica Chimica Acta*, 84(12), pp.3650–3666.

Brenna, E. et al., 2002. Optically Active Ionones and Derivatives: Preparation and Olfactory Properties. *European Journal of Organic Chemistry*, pp.967–978.

Brenna, E., Fuganti, C. & Serra, S., 2008. Applications of biocatalysis in fragrance chemistry: the enantiomers of α -, β -, and γ -irones. *Chemical Society reviews*, 37, pp.2443–2451.

Brenna, E., Fuganti, C. & Serra, S., 2003a. Enantioselective perception of chiral odorants. *Tetrahedron Asymmetry*, 14(1), pp.1–42.

Brenna, E., Fuganti, C. & Serra, S., 2003b. From commercial racemic fragrances to odour active enantiopure compounds: The ten isomers of ironone. *Comptes Rendus Chimie*, 6(5–6), pp.529–546.

Buchecker, R. et al., 1976. Carotenoids of *Anacystis nidulans*, structures of caloxanthin and nostoxanthin. *Phytochemistry*, 15(6), pp.1015–1018.

Bugoni, S. et al., 2015. Competitive Gold-Promoted Meyer – Schuster and oxy-Cope Rearrangements of 3-Acyloxy-1,5-enynes : Selective Catalysis for the Synthesis of (+) - (S) - g -Ionone and (À) - (2S, 6R) - cis - g -Irone. *Chemistry a European Journal*, 21, pp.14068–14074.

Buono, G., Gil, G. & Triantaphylides, C., 1989. Process for the preparation of natural irones. , pp.1–10.

Campagnole, M. & Delmond, B., 2007. New Straightforward Synthesis of β - Damascenone and β - Damascone Derivatives from β - Ionone via Retro - α - ionol. *Synthetic Communications : An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 37(7), pp.1077–1090.

Canhoto, O., Dunphy, P. & Verhoeven, H., 2009. Treatment of orris roots comprising steps of blanching and incubation. , pp.1–6.

Carlquist, M. et al., 2015. Process engineering for bio fl avour production with metabolically active yeasts – a mini-review. *Yeast*, 32, pp.123–143.

Carroll, A.L., Desai, S.H. & Atsumi, S., 2016. ScienceDirect Microbial production of scent and flavor compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, pp.8–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.003>.

Cataldo, V.F. et al., 2016. Chemical vs. biotechnological synthesis of C 13 - apocarotenoids: current methods, applications and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(13), pp.5703–5718.

CBI, 2014. *CBI Product Factsheet : Iris extracts in Europe*,

Chae, H.S. et al., 2010. Strain-dependent carotenoid productions in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(8), pp.2333–2344.

Chen, S.C. et al., 2015. Structure and mechanism of an antibiotics-synthesizing 3-hydroxykynurenine C-methyltransferase. *Scientific Reports*, 5(January), pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep10100>.

- Chubukov, V. et al., 2016. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals. *Systems Biology and Applications*, 2, pp.1–11.
- Cook, C. et al., 2017. Third-Generation Biofuels from the Microalga , *Botryococcus braunii*. In *Biofuels and Bioenergy*. pp. 157–171.
- Corey, E.J., Matsuda, S.P. & Bartel, B., 1994. Molecular cloning, characterization, and overexpression of ERG7, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp.2211–2215. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cunningham, F.X. et al., 1996. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell*, 8, pp.1613–1626.
- Cunningham, F.X. & Gantt, E., 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene e-cyclases. *PNAS*, 98(5), pp.2905–2910.
- Dai, Y.N. et al., 2014. Crystal structures and catalytic mechanism of the C-methyltransferase Coq5 provide insights into a key step of the yeast coenzyme Q synthesis pathway. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(8), pp.2085–2092.
- Dundas, J. et al., 2006. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res.*, 34, pp.W116–W118.
- Dunkel, A. et al., 2014. Nature s Chemical Signatures in Human Olfaction : A Foodborne Perspective for Future Biotechnology *Angewandte* . , pp.7124–7143.
- Ehret, C., Firmin, L. & Courtois, D., 2001. Process for the production of irones. , 1(12), pp.1–4.
- EMBL-EBI, 2017. EC 2.1.1- Methyltransferases. *Enzyme Structures Database*. Available at: https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=2.1.1.- [Accessed January 25, 2018].

- Endrizzi, A. et al., 1996. Production of Lactones and Peroxisomal Beta- Oxidation in Yeasts. *Critical reviews in Biotechnology*, 16(4), pp.301–329.
- Eshkol, N. et al., 2009. Production of 2-phenylethanol from L -phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp.534–542.
- Etschmann, M.M.W. et al., 2002. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, pp.1–8.
- Etschmann, M.M.W. & Schrader, J., 2006. An aqueous – organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, pp.440–443.
- Farbood, M.I. et al., 1993. Octalactone-containing composition, fermentation process for producing same and organoleptic uses thereof. , pp.1–57.
- Farhi, M. et al., 2011. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids Cytosol Lipid particles. *Metabolic Engineering*, 13, pp.474–481. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.05.001>.
- Farré, G. et al., 2011. Nutritious crops producing multiple carotenoids – a metabolic balancing act. *Trends in Plant Science*, 16(10), pp.532–540.
- Fawaz, F. & Jones, G.H., 1988. Actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*. Purification and properties of a 3-hydroxyanthranilate 4-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), pp.4602–4606.
- Fehr, C. & Galindo, J., 1986. Synthesis of (E)-1-Propenyl Ketones from Carboxylic Esters and Carboxamides by Use of Mixed Organolithium-Magnesium Reagents. Synthesis of α -Damascone, β -Damascone, and β -Damascenone. *Helvetica Chimica Acta*, 69, pp.228–235.
- Ferrer-miralles, N. et al., 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. , 8, pp.1–8.
- Flemming, M., 2017. Process for the artificial aeging of iris rhizomes for accelerated formation of irones.
- Fontcave, M., Atta, M. & Mulliez, E., 2004. S-adenosylmethionine: Nothing goes to

waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), pp.243–249.

Fráter, G. & Helmlinger, D., 1992. Process for the manufacture of a mixture of a- and b-irone. , pp.1–5.

Frusciante, S. et al., 2014. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *PNAS*, 111(33), pp.12246–12251.

Fu, C.Y. et al., 2009. Biosynthesis of 3-hydroxy-5-methyl-O-methyltyrosine in the saframycin/safracin biosynthetic pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5), pp.439–446.

Fuganti, C. & Zucchi, G., 1998. Product distribution in the microbial biogenesis of raspberry ketone from 4-hydroxybenzalacetone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, pp.289–293.

Gil, G. & Le Petit, J., 1992. Process for obtaining irone by microbiological route. , pp.1–4.

Gil, G., Le Petit, J. & Seris, J.-L., 1992. Process for obtaining irone by enzymatic route. , pp.1–3.

Di Gioia, D. et al., 2011. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *Journal of Biotechnology*, 156(4), pp.309–316. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.014>.

Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O., 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp.270–277.

Guo, Y. et al., 2012. Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production. *Microbiological Research*, 167, pp.246–252. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.003>.

Häkkinen, S.T. & Seppänen-laakso, T., 2015. Bioconversion to Raspberry Ketone is Achieved by Several Non-related Plant Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 6(November), pp.1–9.

Hao, Y. et al., 2015. Insights into Methyltransferase Specificity and Bioactivity of Derivatives of the Antibiotic Plantazolicin. *ACS Chemical Biology*, 10(5), pp.1209–1216.

- Harrison, P.J. & Bugg, T.D.H., 2014. Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases : Reaction mechanisms , inhibition and biochemical roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, pp.105–111. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.005>.
- Havkin-Frenkel, D. & Belanger, F.C., 2009. Biotechnological production of vanillin. In *Biotechnology in Flavor Production*. pp. 83–103.
- HermitageOils, 2016. Hermitage Oils. *Iris Absolute*.
- Himeno, H. & Sano, K., 1987. Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agric. Biol. Chem.*, 51(9), pp.2395–2400.
- Hua, D. et al., 2007. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. , pp.783–790.
- Hua, D. & Xu, P., 2011. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.654–660. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.001>.
- Huang, F. et al., 2009. Substrate promiscuity of RdCCD1 , a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*, 70, pp.457–464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.020>.
- Huang, Y. et al., 2009. In vitro Characterization of Enzymes Involved in the Synthesis of Nonproteinogenic Residue (2 S , 3 S) - b - Methylphenylalanine in Glycopeptide Antibiotic Mannopectimycin. , 202, pp.2480–2487.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K., 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, 14, pp.33–38.
- Ibaceta, M. & Agosin, E., 2016. *Sustainable production of bioflavours by fermentation*, Iijima, Y. et al., 2004. Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Physiology*, 134, pp.370–379.
- Ilg, A. et al., 2014. Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: Relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles. *FEBS Open Bio*, 4, pp.584–593. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2014.06.005>.

- Inoue, T., Kiyota, H. & Oritani, T., 2000. Synthesis of both enantiomers of cis- α -irone and cis- γ -irone, principal constituents of iris oil, via resolution of (+/-)-2,2,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-carboxylic acid. *Tetrahedron Asymmetry*, 11(18), pp.3807–3818.
- Invitrogen Life Technologies, 2004. *GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System*,
- Isoe, S., Katsumura, S. & Sakan, T., 1971. The Synthesis of Damascenone and P-Damascone. *Helvetica Chimica Acta*, 56(148), pp.1971–1973.
- Ito, H. et al., 1999. Iridal-type triterpenoids with ichthyotoxic activity from *Belamcanda chinensis*. *Journal of Natural Products*, 62(1), pp.89–93.
- Jaenicke, L. & Marner, F.J., 1986. The irones and their precursors. *Fortsch.Chem.Organ.Natur.*, 50, pp.1–25. Available at: %5C%5CRobsrsv-05%5Creference manager%5CArticles%5C2610.pdf.
- Jakočiūnas, T., Jensen, M.K. & Keasling, J.D., 2015. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metabolic Engineering*, 34, pp.44–59. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717615001597>.
- Jiang, Z. et al., 2016. Engineering Triterpene and Methylated Triterpene Production in Plants Provides Biochemical and Physiological Insights into Terpene Metabolism. *Plant Physiology*, 170(2), pp.702–716. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.15.01548>.
- Jo, Y., An, J. & Oh, D., 2014. γ -Dodecelactone Production from Safflower Oil via 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic Acid Intermediate by Whole Cells of *Candida boidinii* and *Stenotrophomonas nitritireducens*. *Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp.6736–6745.
- Kaššák, P., 2012. Screening of the presence of Irone (C₁₄H₂₂-0) in the rootstocks of the chosen Iris species. , pp.1487–1489.
- Kawachi, M. et al., 2012. Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal Research*, 1, pp.114–119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.003>.
- Kawanobe, T. & Kogami, K., 1991. Use of (+/-)-cis- γ -irone in perfumery and novel process for preparing same. , pp.1–19.
- Khalil, A.S. & Collins, J.J., 2010. Synthetic Biology : Applications Come of Age. , 11(5),

pp.367–379.

Kim, J. et al., 2010. Carbon sources-dependent carotenoid production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), pp.2231–2239.

Koeller, K.M. & Wong, C.H., 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409(6817), pp.232–240.

Köksal, M. et al., 2012. Structure of geranyl diphosphate C-methyltransferase from *Streptomyces coelicolor* and implications for the mechanism of isoprenoid modification. *Biochemistry*, 51(14), pp.3003–3010.

Komatsu, M. et al., 2008. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), pp.7422–7427.

Könst, W.M.B., Linde, L.M. van der & Boelens, H., 1974. A convenient synthesis of safranal. *Tetrahedron Letters*, 36, pp.3175–3178.

Kosjek, B. et al., 2003. Efficient production of raspberry ketone via “ green ” biocatalytic oxidation. *Tetrahedron*, 59, pp.9517–9521.

Kumar, A.S.S., 2017. Methods for Recombinant Production of Saffron Compounds.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), 2018. KEGG COMPOUND Database. Available at: <http://www.genome.jp/kegg/> [Accessed January 26, 2018].

Lalko, J., Lapczynski, A., Politano, V.T., et al., 2007. Fragrance material review on a - ionone. *Food and Chemical Toxicology*, 45, pp.S235–S240.

Lalko, J., Lapczynski, A., McGinty, D., et al., 2007. Fragrance material review on b - ionone. *Food and Chemical Toxicology*, 45, pp.S241–S247.

Lashbrooke, J.G. et al., 2013. Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera* L . carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biology*, 13, pp.156–173.

Law, B.J.C. et al., 2016. Effects of Active-Site Modification and Quaternary Structure on the Regioselectivity of Catechol-O-Methyltransferase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55, pp.2683–2687.

- Lee, D. et al., 2016. Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion. *Microbial Cell Factories*, pp.1–7.
- Lee, P.C. et al., 2003. Biosynthesis of Structurally Novel Carotenoids in *Escherichia coli*. *Chemistry & Biology*, 10, pp.453–462.
- Leffingwell & Associates, 2017. 2012 - 2016 Flavor & Fragrance Industry Leaders. Available at: http://www.leffingwell.com/top_10.htm [Accessed October 27, 2017].
- Legnani, L. et al., 2008. A Full Conformational Characterization of Natural Ionones and Irones, as well as 13-Alkyl-Substituted α -Ionones. *European Journal of Organic Chemistry*, pp.4755–4762. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.200800429>.
- Li, L. et al., 2008. Characterization of the saframycin a gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *Journal of Bacteriology*, 190(1), pp.251–263.
- Lie, L.J. et al., 2013. Production process and device for preparing irone by using pseudoionone. , pp.1–8.
- Liebler, D.C., 1993. Antioxidant Reactions of Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691, pp.20–31.
- López, J. et al., 2015. Production of β -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories*, 14(1), p.84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4464609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ma, X. & Daugulis, A.J., 2013. Transformation of Ferulic Acid to Vanillin Using a Fed-Batch Solid – Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor.
- Magarvey, N.A. et al., 2006. Biosynthetic Pathway for Mannopectimycins , Lipoglycopeptide Antibiotics Active against Drug-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), pp.2167–2177.
- Marasco, E.K., Vay, K. & Schmidt-Dannert, C., 2006. Identification of carotenoid

- cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with different cleavage activities. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), pp.31583–31593.
- Marner, F.-J., 1997. Iridals and cycloiridals, products of an unusual squalene metabolism in sword lilies (iridaceae). *Current Organic Chemistry*, 1, pp.153–186.
- Marner, F.-J. et al., 1982. Irigermanal and Iridogermanal: Two New Triterpenoids from Rhizomes of *Iris germanica* L. *Journal of Organic Chemistry*, 47, pp.2531–2536.
- Marner, F., Ritzdorf, I. & Johnen, G., 1993. Metabolism of iridals in plant cell cultures of *iris pallida*. *Phytochemistry*, 33(3), pp.573–579.
- Marner, F.J. & Hanisch, B., 2001. Hoogianal, a b-irone precursor from *Iris hoogiana* Dykes (Iridaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 84(4), pp.933–938. Available at: %5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C15260.pdf.
- Martin, J.L. & McMillan, F.M., 2002. SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), pp.783–793.
- Mijts, B.N., Lee, P.C. & Schmidt-dannert, C., 2005. Identification of a Carotenoid Oxygenase Synthesizing Acyclic Xanthophylls: Combinatorial Biosynthesis and Directed Evolution. *Chemistry & Biology*, 12, pp.453–460.
- Miks, M. et al., 2016. Microbial Production of Flavors and Fragrances. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*. pp. 1–19.
- Miziorko, H.M., 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 505(2), pp.131–143.
- Näf, R., Velluz, A. & Thommen, W., 1990. Isolation of a glucosidic precursor of damascenone from *lycium halimifolium* mil. *Tetrahedron Letters*, 31(45), pp.6521–6522.
- Nakahashi, H. et al., 2015. Metabolism of (-)-cis- and (-)-trans-rose oxide by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 36, pp.565–574.
- Nakao, M. et al., 1999. Genome-scale Gene Expression Analysis and Pathway Reconstruction in KEGG. *Genome Informatics. Workshop on Genome Informatics*, 10,

- pp.94–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072346>.
- Niehaus, T.D. et al., 2012. Functional Identification of Triterpene Methyltransferases from *Botryococcus braunii* Race B. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp.8163–8173.
- Ogawa, T., Takasaka, N. & Matsui, M., 1978. Preliminary communication Synthesis of (-)-cis-rose oxide from D-glucose. *Carbohydrate Research*, 60, pp.C4–C6.
- Palmerín-carreño, D.M. et al., 2016. Whole cell bioconversion of (+) -valencene to (+) -nootkatone by *Yarrowia lipolytica* using a three phase partitioning bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol*, 91, pp.1164–1172.
- Palmerín-Carreño, D.M. et al., 2015. Screening of microorganisms for bioconversion of (β) -valencene to. *Food Science and Technology*, 64, pp.788–793.
- Pei, J., Kim, B.-H. & Grishin, N. V., 2008. PROMALS3D: a tool for multiple sequence and structure alignment. *Nucleic Acids Res.*, 36(7), pp.2295–2300.
- Pelz, A. et al., 2005. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), pp.32493–32498.
- Pimentel, M.R. et al., 2012. Biotransformation of Citronellol in Rose Oxide by *Pseudomonas* Spp. *Chemical Engineering Transactions*, 27, pp.295–300.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. & Steinbüchel, A., 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, pp.296–297.
- Raisig, A. & Sandmann, G., 2001. Functional properties of diapophytoene and related desaturases of C30 and C40 carotenoid biosynthetic pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533, pp.164–170.
- Rautenstrauch, V. et al., 1984. On the Stereochemistry of the irones. *Helvetica Chimica Acta*, 67(38), pp.325–331. Available at: %5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C11055.pdf.
- Rezaee, R. & Hosseinzadeh, H., 2013. Safranal : From an Aromatic Natural Product to a Rewarding Pharmacological Agent. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), pp.12–26.
- Robert, X. & Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new

- ENDscript server. *Nucl. Acids Res.*, 42(W1), pp.W320–W324.
- Romero-guido, C. et al., 2011. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89, pp.535–547.
- Rowe, D., 2005. *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances* Blackwell Publishing, ed.,
- Sánchez-sevilla, J.F. et al., 2014. Deciphering γ -decalactone biosynthesis in strawberry fruit using a combination of genetic mapping , RNA-Seq and eQTL analyses. *BMC Genomics*, 15, pp.218–233.
- Saulnier, D.M. et al., 2011. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS ONE*, 6(4), p.e18783.
- Schempp, F.M. et al., 2017. Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. *Agricultural and Food Chemistry*, p.A-L.
- Schinz, H., 1957. Process for preparing an isomeric mixture of 6-methyl-alpha-ionone, having the odor of irone. , pp.1–3.
- Schrader, J. & Bohlmann, J., 2015. *Biotechnology of Isoprenoids* Springer, ed.,
- Schubert, H.L. et al., 1998. The X-ray structure of a cobalamin biosynthetic enzyme, cobalt-precorrin-4 methyltransferase. *Nature structural biology*, 5(7), pp.585–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665173>.
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M. & Cheng, X., 2003. Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), pp.329–335.
- Schulz, S. et al., 2015. Selective Enzymatic Synthesis of the Grapefruit Flavor. *ChemCatChem*, 7, pp.601–604.
- Sefton, M.A. et al., 2011. Occurrence , Sensory Impact , Formation , and Fate of Damascenone in Grapes , Wines , and Other Foods and Beverages. *Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.9717–9746.
- Serra, S., Fuganti, C. & Brenna, E., 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 23(4), pp.193–198.

- Sievers, F. et al., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539).
- Simkin, A.J. et al., 2013. Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpene branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry*, 85, pp.36–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.09.014>.
- Simkin, A.J. et al., 2004. Circadian Regulation of the PhCCD1 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Controls Emission of B-Ionone, a Fragrance Volatile of Petunia Flowers. *Plant Physiology*, 136(3), pp.3504–3514. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.049718>.
- Singh, S. et al., 2014. Facile Strategies for the Synthesis and Utilization of S-Adenosyl-L-Methionine Analogs. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(15), pp.3965–3969.
- Stark, D. et al., 2002. Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.*, 18, pp.514–523.
- Struck, A.W. et al., 2016. An Enzyme Cascade for Selective Modification of Tyrosine Residues in Structurally Diverse Peptides and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 138(9), pp.3038–3045.
- Surburg, H. & Panten, J., 2006. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, John Wiley & Sons: Weinheim.
- Tanaka, Y. & Ohmiya, A., 2008. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, pp.190–197.
- Tao, L., Schenzle, A. & Odom, J., 2005. Novel carotenoid oxidase involved in biosynthesis of 4, 4'-diapolycopene dialdehyde. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), pp.3294–3301. Available at: <http://aem.asm.org/content/71/6/3294.short>.
- Thapa, H.R. et al., 2016. A squalene synthase-like enzyme initiates production of tetraterpenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii* Race L. *Nature Communications*, 7, pp.1–13.
- The European Parliament, 2008. *REGULATION (EC) No 1334/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on*

flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC,

Tippmann, S. et al., 2016. Production of Farnesene and Santalene by *Saccharomyces cerevisiae* Using Fed-Batch Cultivations With RQ -Controlled Feed. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(1), pp.72–81.

Trott, O. & Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), pp.455–461.

U.S. Food and Drug Administration, 2017. Electronic Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter I, Part 101.22a. *Foods; labeling of spices, flavorings, colorings and chemical preservatives.*

Umeno, D., Tobias, A. V & Arnold, F.H., 2002. Evolution of the C 30 Carotenoid Synthase CrtM for Function in a C 40 Pathway. *Journal of Bacteriology*, 184(23), pp.6690–6699.

Volkman, J.K., 2014. Organic Geochemistry Acyclic isoprenoid biomarkers and evolution of biosynthetic pathways in green microalgae of the genus *Botryococcus*. *Organic Geochemistry*, 75, pp.36–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.06.005>.

Waché, Y. et al., 2003. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61, pp.393–404.

Wagner, A., Heitz, M.-P. & Mioskowski, C., 1989. Syntheses of tetrahydropyrans by PPh₃/CBr₄ induced cyclization of acetals Application to a synthesis of rose oxide. *Tetrahedron Letters*, 30(15), pp.1971–1974.

Walter, M.H., Floss, D.S. & Strack, D., 2010. Apocarotenoids: Hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*, 232, pp.1–17.

Walter, M.H. & Strack, D., 2011. Carotenoids and their cleavage products : Biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.*, 28, pp.663–692.

Wang, F., Jiang, J.G. & Chen, Q., 2007. Progress on molecular breeding and metabolic engineering of biosynthesis pathways of C30, C35, C40, C45, C50 carotenoids.

- Biotechnology Advances*, 25, pp.211–222. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.12.001>.
- Wang, P. et al., 2017. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol. *Metabolic Engineering*, 44, pp.143–149. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.09.013>.
- Wilson, C.W. & Shaw, P.E., 1978. Synthesis of Nootkatone from Valencene. *J. Agric. Food Chem.*, 26(6), pp.1430–1432.
- Winterhalter, P. & Rouseff, R., 2001. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*. pp. 1–17.
- Wriessnegger, T. et al., 2014. Production of the sesquiterpenoid (β) -nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 24, pp.18–29. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.04.001>.
- Xiong, Q., Wilson, W.K. & Matsuda, S.P.T., 2006. An Arabidopsis oxidosqualene cyclase catalyzes iridal skeleton formation by grob fragmentation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(8), pp.1285–1288.
- Xu, P., Hua, D. & Ma, C., 2007. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology*, 25(12), pp.571–576.
- Yamamoto, T. et al., 2002. Synthesis and odor of optically active rose oxide. *Tetrahedron Letters*, 43, pp.9077–9080.
- Yang, X. et al., 2016. Heterologous production of α -farnesene in metabolically engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 216, pp.1040–1048. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.028>.
- Yu Ng, C., Khodayari, A. & Chowdhury, A., 2015. Advances in de novo strain design using integrated systems and synthetic biology tools. *Current Opinion in Chemical Biology*, 28, pp.105–114. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.026>.
- Zappia, V., Zydek-Cwick, C.R. & Schlenk, F., 1969. The Specificity of S-Adenosylmethionine Derivatives in Methyl Transfer Reactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), pp.4499–4509.
- Zhang, C. et al., 2018. A “Plug-n-play” Modular Metabolic System for the Production of

Apocarotenoids. *Biotechnology and Bioengineering*, 115, pp.174–183.

Zhang, P. et al., 2010. Creation of a Genome-Wide Metabolic Pathway Database for *Populus trichocarpa* Using a New Approach for Reconstruction and Curation of Metabolic Pathways for Plants. *Plant Physiology*, 153, pp.1479–1491. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.157396>.

Zhang, X. et al., 2016. Overexpression and characterization of CCD4 from *Osmanthus fragrans* and β -ionone biosynthesis from β -carotene in vitro. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, pp.105–114. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.003>.

Zou, X.-W., Liu, Y.C., et al., 2014. Structure and mechanism of a nonhaem-iron SAM-dependent C-methyltransferase and its engineering to a hydratase and an O-methyltransferase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(6), pp.1549–1560.

Zou, X.-W., Liu, Y.-C., et al., 2014. Structure and mechanism of a nonhaem-iron SAM-dependent C-methyltransferase and its engineering to a hydratase and O-methyltransferase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70, p.Supplementary information.

ANEXO

CAPÍTULO 7. ANEXO

7.1. Isoprenoides

Los isoprenoides son una familia de compuestos orgánicos formados a partir de la condensación de unidades de isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Esta familia alberga más de 40.000 moléculas con diversas funciones, entre las cuales se encuentran vitaminas, pigmentos y fragancias (Schrader & Bohlmann 2015). La versatilidad de las propiedades de los isoprenoides se debe a las distintas modificaciones estructurales que pueden poseer (Ariyawutthiphan *et al.* 2012), como cortes oxidativos, fosforilaciones, ciclaciones, hidroxilaciones, epoxidaciones, entre otras.

La nomenclatura de esta familia se basa en el número de unidades de isopreno. Así, los compuestos que resultan de la unión de dos unidades de isopreno son llamados monoterpenos (C_{10}); y de tres, sesquiterpenos (C_{15}) (Schempp *et al.* 2017). Asimismo, los di- (C_{20}), tri- (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) se sintetizan a partir de dos, tres y cuatro unidades de monoterpeno, respectivamente (Schrader & Bohlmann 2015).

La síntesis de isoprenoides proviene de diferentes vías metabólicas, dependiendo del organismo u organelo donde ocurra. En eucariontes y arqueas, estos metabolitos surgen de la vía del mevalonato (MVA), que es el responsable de la formación de escualeno y ergosterol (López *et al.* 2015). En bacterias y plastidios vegetales, esto ocurre a partir de la vía del 2-metil-eritritol-4-fosfato (MEP) (Schempp *et al.* 2017). En ambos casos, se sintetizan los isómeros isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), que representan el punto de partida para la síntesis de esta familia de compuestos.

En la Figura 40 se muestra un esquema común de la biosíntesis de isoprenoides. El primer paso, es la condensación de IPP y DMAPP, que produce farnesil difosfato (FPP) (Schrader & Bohlmann 2015). A partir de FPP, surge la vía de los diapocarotenos (sección 7.1.3) y la del escualeno y ergosterol (López *et al.* 2015). Luego, la adición sucesiva de IPP permite la síntesis de GGPP y fitoeno, a través de la fitoeno sintasa CrtB. Finalmente, el fitoeno es transformado en licopeno a través de varias deshidrogenaciones (Miziorko

2011). Este último es el precursor general de los distintos tipos de carotenoides (sección 7.1.1) (Walter & Strack 2011) y apocarotenoides (sección 7.1.2) (Walter *et al.* 2010).

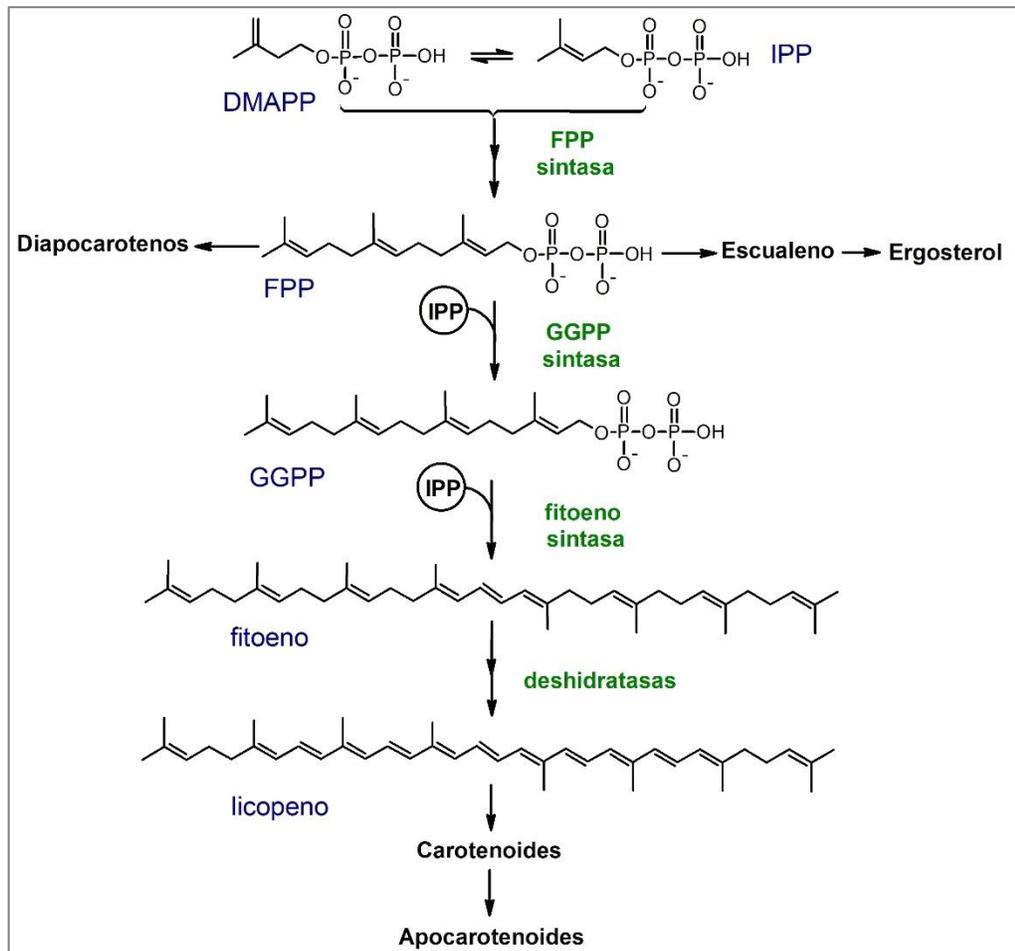


Figura 40: Biosíntesis de isoprenoides desde DMAPP e IPP hasta licopeno. Elaboración propia.

7.1.1. Carotenoides

Los carotenoides son, en su mayoría, tetraterpenos (C_{40}) derivados del fitoeno, aunque, existen algunos con esqueleto de 30 y 50 carbonos producidos por ciertas bacterias como *Staphylococcus aureus* (Walter & Strack 2011). Estos compuestos pueden ser lineales o ciclados, en uno o ambos extremos y se clasifican en xantófilas y carotenos, dependiendo de si poseen átomos de oxígeno en su estructura. Estas moléculas son producidas naturalmente por organismos fototróficos como algas, plantas y algunas bacterias (Harrison & Bugg 2014).

En la Figura 41 se ilustra un esquema de la vía metabólica de biosíntesis de algunos carotenoides a partir del fitoeno. Este último se convierte en licopeno a través de cuatro deshidrogenaciones consecutivas, que en plantas requiere la acción de tres enzimas: fitoeno desaturasa (CrtP), ζ -caroteno desaturasa (CrtQ) y ζ -caroteno isomerasa (CrtH) (Farré *et al.* 2011); mientras que en bacterias, todo es llevado a cabo por una misma fitoeno desaturasa (CrtI) (Walter & Strack 2011). Luego, el licopeno es sometido a distintos tipos de ciclaciones, en uno o ambos extremos, dando pie a toda la gama de carotenoides (Cunningham *et al.* 1996).

Existen dos tipos de enzimas que ciclan los extremos del licopeno: licopeno ε -ciclasas (LycB o CrtY en bacterias) y licopeno β -ciclasas (LycE) (Farré *et al.* 2011). Si ambos extremos son ciclados por LycB, se produce β -caroteno; y si ambos son ciclados por LycE, se obtiene ε -caroteno. El α -caroteno se obtiene cuando cada enzima cicla uno de los lados, produciendo a un caroteno asimétrico. Se ha demostrado que la LycE de *Arabidopsis thaliana* (LycE/*At*) solo es capaz de ciclar un extremo del licopeno (Cunningham *et al.* 1996), a diferencia de su homóloga en *Lactuca sativa* que es capaz de generar ε -caroteno (Cunningham & Gantt 2001). A partir del análisis de ambas enzimas, se identificó que la mutación de un residuo en LycE/*At* permitía ciclar ambos lados (Cunningham & Gantt 2001).

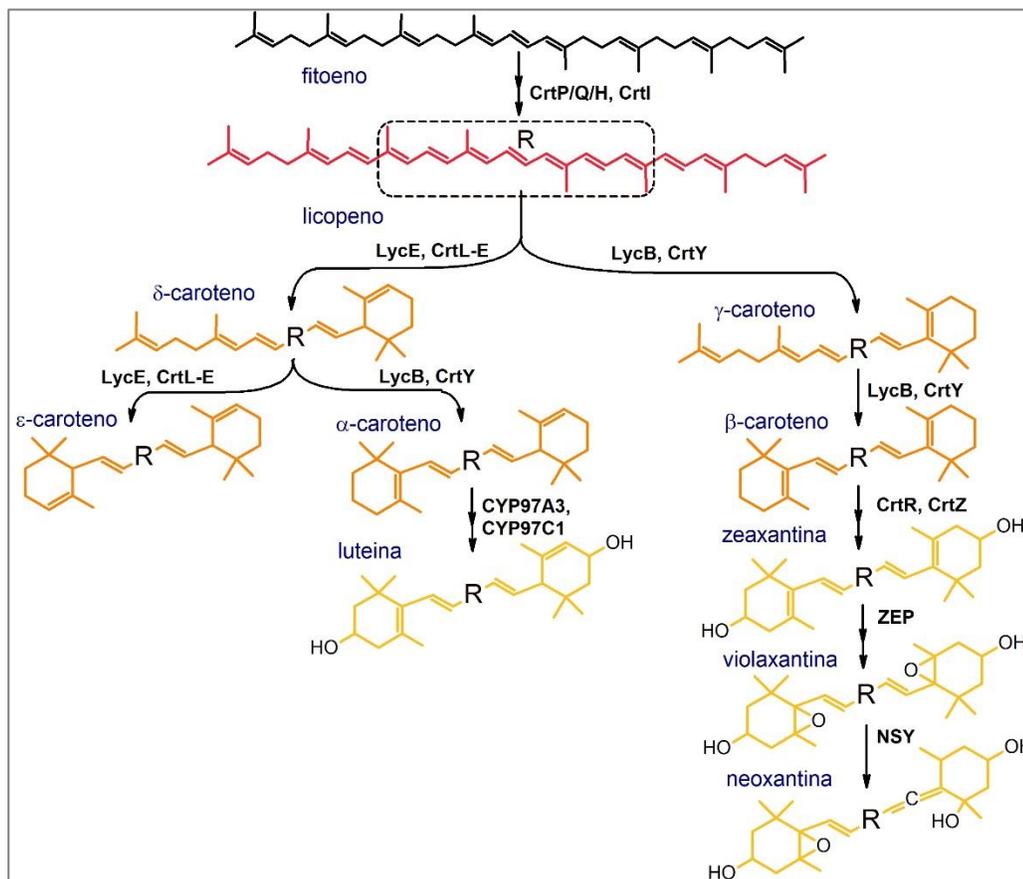


Figura 41: Biosíntesis de carotenoides C₄₀ a partir de fitoeno. Elaboración Propia.

Posteriormente, se requiere de hidroxilasas y epoxidasas para la síntesis de xantofilas. Por ejemplo, la β-caroteno hidroxilasa produce zeaxantina desde β-caroteno (CrtR o CrtZ) y luteína desde α-caroteno (CYP97AA3/C1), ambas en dos pasos (Walter & Strack 2011). Finalmente, la zeaxantina epoxidasa (ZEP) produce violaxantina y luego la neoxantina sintasa (NSY) la convierte en neoxantina (Walter & Strack 2011).

Debido al gran número de dobles enlaces de átomos de carbonos conjugados presentes, los carotenoides actúan como pigmentos, con una gama de colores que va desde el rojo hasta el amarillo (Walter & Strack 2011; Farré *et al.* 2011). Además, se ha comprobado

su efecto antioxidante, en especial del β -caroteno, al capturar radicales libres de oxígeno en sus cadenas o ciclos (Liebler 1993). Se ha postulado que, como consecuencia de la disminución de daño oxidativo, podrían prevenir enfermedades degenerativas como el cáncer (Liebler 1993). También, la ruptura de estos compuestos forma un sinnúmero de metabolitos con propiedades hormonales, aromáticas, nutricionales y medicinales (Farré *et al.* 2011).

Todas las propiedades mencionadas anteriormente les confieren a los carotenoides un alto interés en el mercado (Wang *et al.* 2007) incentivando el desarrollo y optimización de bioprocesos para su producción (Kim *et al.* 2010). Por ejemplo, se ha reportado que el nivel de producción heteróloga de carotenos en *E. coli* depende de la cepa utilizada (Chae *et al.* 2010) y de la fuente de carbono (Kim *et al.* 2010). Actualmente la síntesis química y la extracción de fuentes naturales siguen siendo comercialmente más competitivas, en la mayoría de los casos (Schempp *et al.* 2017). Algunos de los desafíos actuales son la fluidización de membrana provocada por ciertos carotenos, el aumento del pool de sustratos para la vía de isoprenoides, la competencia por el uso de carbono y nutrientes para el crecimiento y la posible citotoxicidad provocada por la alta concentración de producto, entre otros (Schempp *et al.* 2017).

7.1.2. Apocarotenoides

Los apocarotenoides son moléculas derivadas del corte oxidativo de los carotenoides. Las propiedades de estos compuestos dependen del número de cortes y la ubicación (Harrison & Bugg 2014) y pueden actuar como pigmentos, aromas (sección 7.1.4), elemento de señalización o fitohormonas (Walter *et al.* 2010). También, dependiendo de la posición del corte, los productos pueden ser aldehídos o cetonas (Harrison & Bugg 2014). Estas reacciones pueden ocurrir específicamente mediante enzimas o inespecíficamente vía oxidación fotoquímica o por la acción de lipoxigenasas y peroxidasas (Walter & Strack 2011).

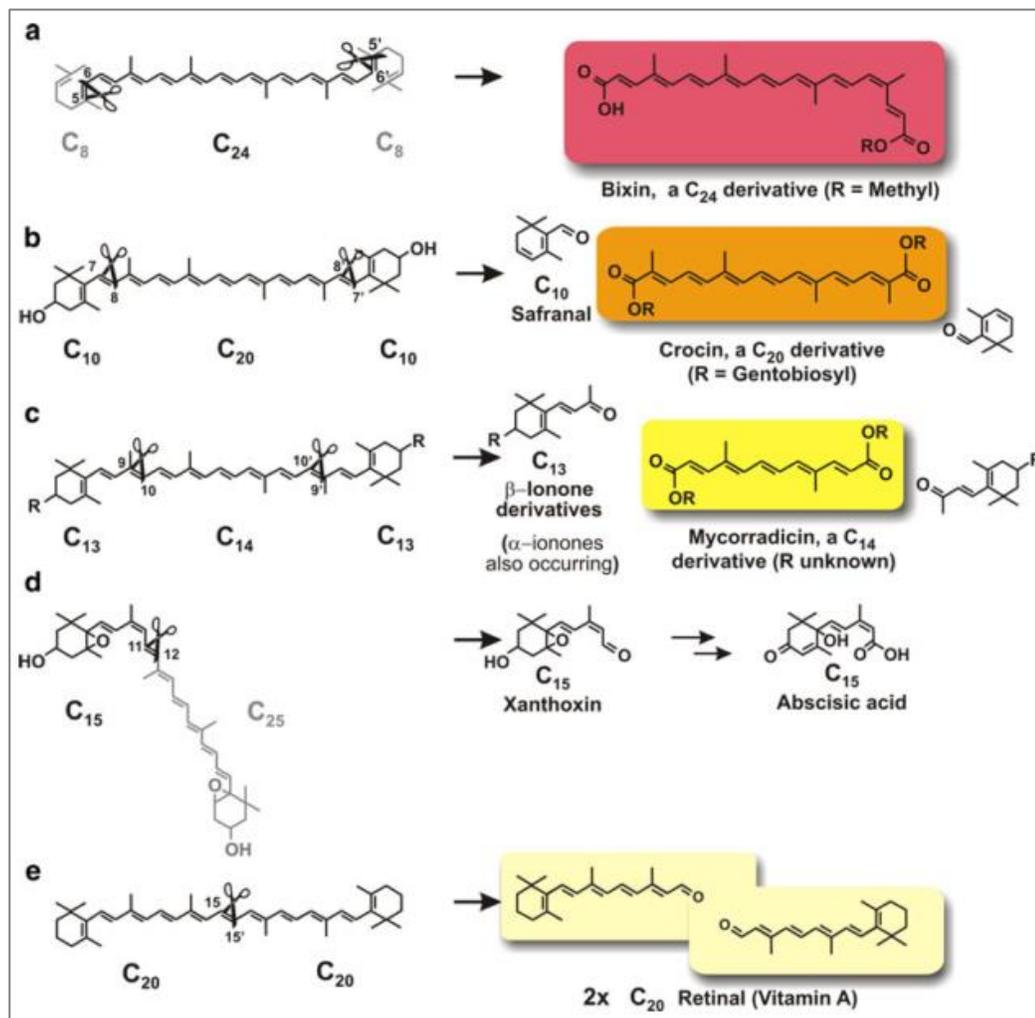


Figura 42: Corte enzimático específico de carotenoides y su producto apocarotenoides en plantas. (a) licopeno, (b) zeaxantina, (c) β-carotenoide, (d) violaxantina, (e) β-caroteno (Walter & Strack 2011).

Las enzimas regioespecíficas, que realizan cortes en sitios determinados dentro del esqueleto carotenoides, son llamadas CCOs (*carotenoid cleavage oxygenases*). En la Figura 42 se ejemplifica la acción de CCO's en diferentes carotenoides, con sus respectivos productos. Esta familia de enzimas se encuentra presente en bacterias, animales y plantas, con secuencias bastante heterogéneas entre sí; aparte de ciertos residuos específicos

conservados, como las histidinas que coordinan la unión a un átomo de hierro, existe poca similitud en la secuencia aminoacídica de los miembros de esta familia de enzimas (Walter *et al.* 2010). Sin embargo, en la estructura, siempre se conserva un ion de hierro coordinado por 4 histidinas y comúnmente, rodeado por 7 láminas β .

En las plantas, estas enzimas tienen acción dioxigenasa, por lo que, son llamadas CCD's (*carotenoid cleavage dioxigenases*) y se clasifican según su actividad. Las enzimas CCD1, CCD4 y CCD7, reconocen y cortan el motivo de doble enlace 9-10 y 9'-10' (Zhang *et al.* 2016) (caso **c** en Figura 42). De esta manera, pueden tomar como sustrato cualquier carotenoide, con distinta afinidad, generando diversos productos. Entre éstos, algunos de los más importantes son los apocarotenoides volátiles de 13 carbonos, como iononas, precursores de damascenona y geranilacetona.

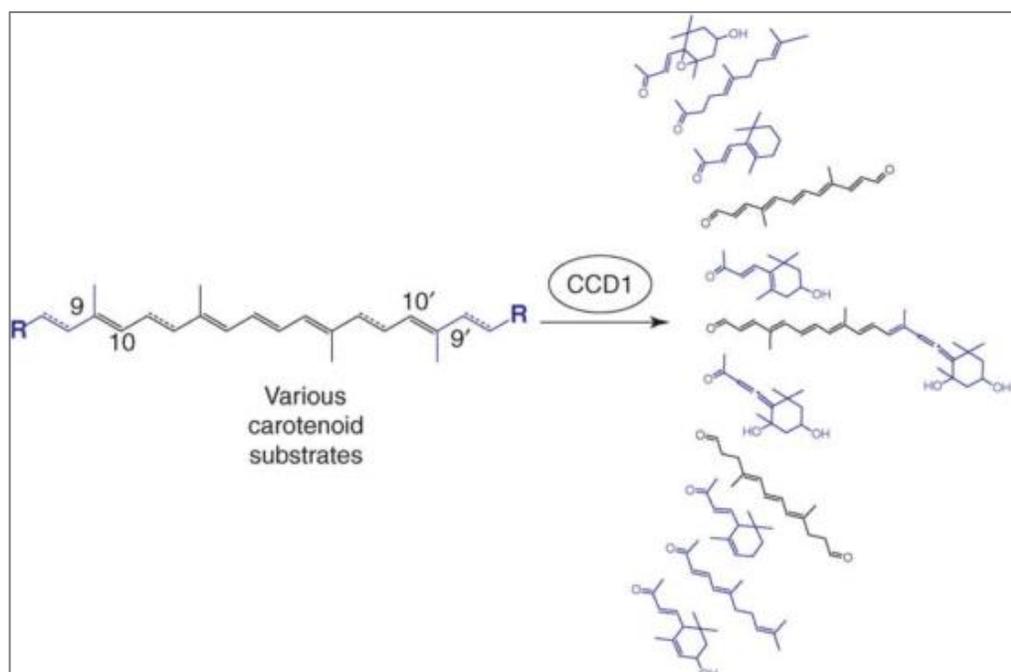


Figura 43: Productos del corte de carotenoides a través de CCD1 (Auldrige *et al.* 2006).

Particularmente, la CCD1 está localizada en el citosol, mientras que otras CCD's se encuentran asociadas a la membrana plasmática y/o plastidial (Simkin *et al.* 2004; Walter *et al.* 2010). Esta enzima tiene un parche hidrofóbico alrededor del canal de entrada del sustrato que le permite acercarse a la membrana, para acceder a los carotenos (Walter & Strack 2011). La Figura 43 muestra los productos de corte de diversos carotenoides, mediados por CCD1. Cabe mencionar que se ha co-expresado CCD1 de *Rubus idaeus* (frambuesa), *Osmanthus fragans*, *Vitis vinifer*, *Petunia hybrida* y de *Arabidopsis thaliana*, en conjunto con enzimas de la vía carotenogénica en *E. coli* y *S.cerevisiae*, para producir iononas (Beekwilder, Rossum, *et al.*, 2014; López *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

7.1.3. Diapocarotenoides

Los diapocarotenoides son carotenoides C₃₀ o triterpenos, cuya estructura y nomenclatura es análoga a la de los carotenos, careciendo de 5 átomos de carbono en cada extremo. Estos compuestos se han encontrado, en general de forma lineal, en algunas bacterias Gram-positivas no fototróficas como *Staphylococcus aureus*, *Methylobacterium rhodinium* y *Heliobacteria spp* (Mijts *et al.* 2005). Su función biológica es la protección contra la fotooxidación y peroxidación mediada por radicales libres (Wang *et al.* 2007).

Su biosíntesis proviene de la condensación cabeza-a-cabeza de dos moléculas de FPP, formando dehidroescualeno (4,4'-diapofitoeno) mediada por una dehidroescualeno sintasa (CrtM) (Pelz *et al.* 2005). Luego, la dehidroescualeno desaturasa (CrtN) es capaz de insertar insaturaciones sucesivas hasta la generación de 4,4'-diaponeurosporeno (Pelz *et al.* 2005). En la Figura 44 se ilustra la comparación de la biosíntesis de diapocarotenos C₃₀ y carotenos C₄₀.

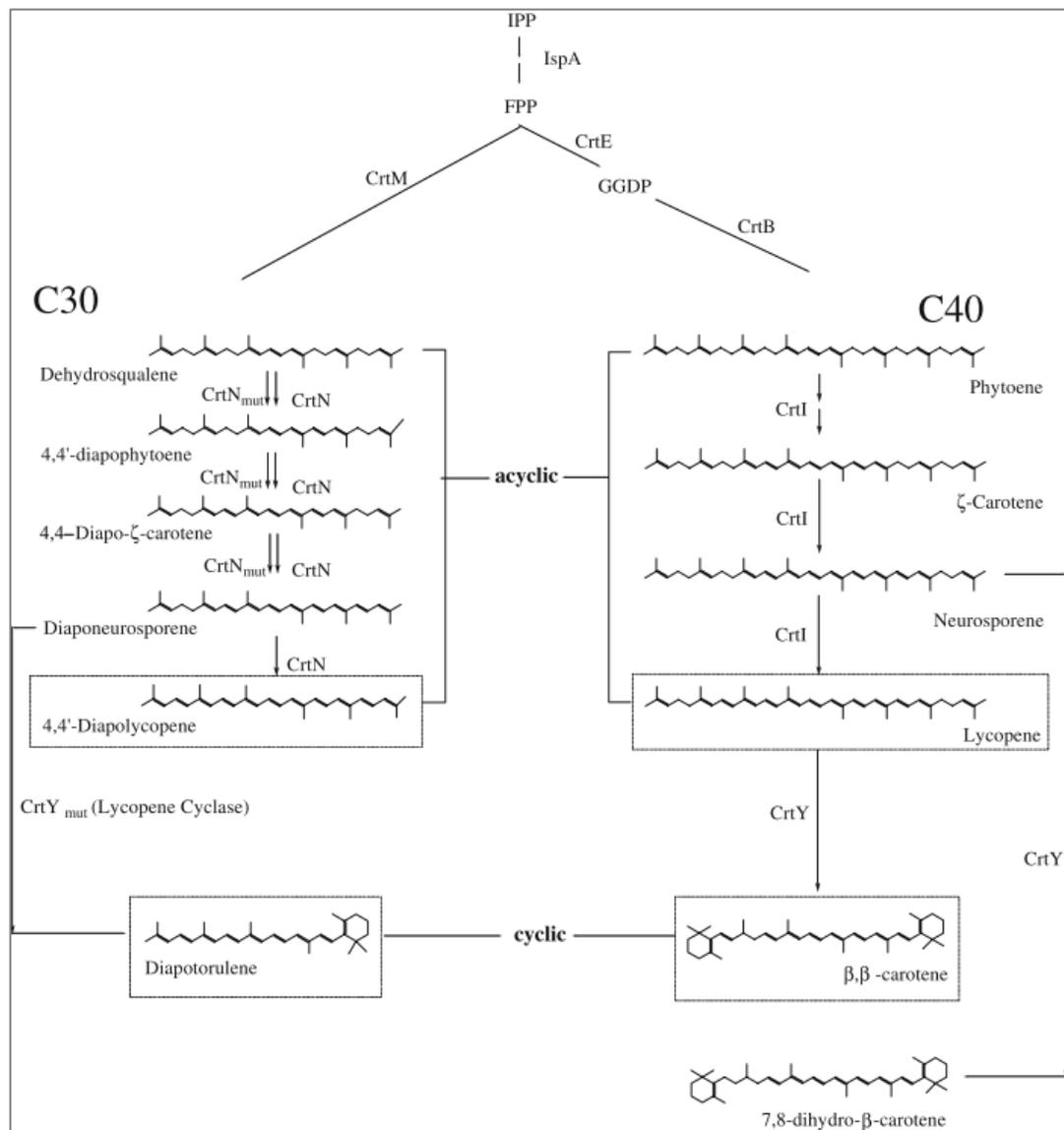


Figura 44: Biosíntesis de carotenos C₃₀ y C₄₀ (Chae *et al.* 2010).

Considerando la similitud con los carotenos, se ha analizado la actividad de las desaturasas C₄₀ al utilizar como sustrato a sus análogos C₃₀ y viceversa. Así, se reportó la capacidad de CrtI, que originalmente actúa en carotenos C₄₀, para aceptar diapofitoeno

como sustrato y convertirlo en diaponeurosporeno *in vivo* (Raisig & Sandmann 2001). De la misma manera, CrtN sintetiza neurosporeno a partir de licopeno. Además, ambas desaturasas tienen en común una mayor afinidad por su respectivo ζ -caroteno que por su fitoeno y son inhibidas por difenilamina. En cuanto a las caroteno sintasas, CrtM condensa, en forma limitada, dos moléculas de GGPP para generar licopeno; mientras que, no se observó producción de diapofitoeno a partir de FPP por parte de CrtB (Raisig & Sandmann 2001). Se han diseñado mutantes a partir de CrtM para construir carotenoides C₃₅, C₄₅ y C₅₀ (Wang *et al.* 2007) y para mejorar su actividad en la síntesis de esqueletos C₄₀ (Umeno *et al.* 2002).

Finalmente, Raisig & Sandmann, 2001 lograron ciclar y oxidar diapocarotenos con enzimas de sustrato nativo C₄₀. Por un lado, se transformó *E. coli* con los genes para la expresión de CrtM, CrtN y CrtY para comprobar la ciclación de carotenos C₃₀. La expresión de la caroteno β -ciclasa resultó en la síntesis de diapotoruleno, un carotenoide monocíclico (extremos ψ - β), a partir de diaponeurosporeno (Lee *et al.* 2003). Por otro lado, se reportó la formación de xantofilas lineales C₃₀ al expresar heterológicamente el gen *crtOx* de *S. aureus* en *E. coli* (Mijts *et al.* 2005). Asimismo, se co-expresó en *E. coli* con CrtM y CrtN, el gen *crtNb* de *Methylomonas* sp., logrando la síntesis de 4,4'-diapolicopeno dialdehído, un pigmento de color morado (Tao *et al.* 2005).

7.1.4. Aromas con esqueleto isoprenoide

A continuación, se presentan las estructuras químicas de algunos aromas con esqueleto isoprenoide. Las vías metabólicas de algunos de estos compuestos están representadas en la Figura 45, a partir de los isómeros de isoprenos fosforilados, IPP y DMAPP.

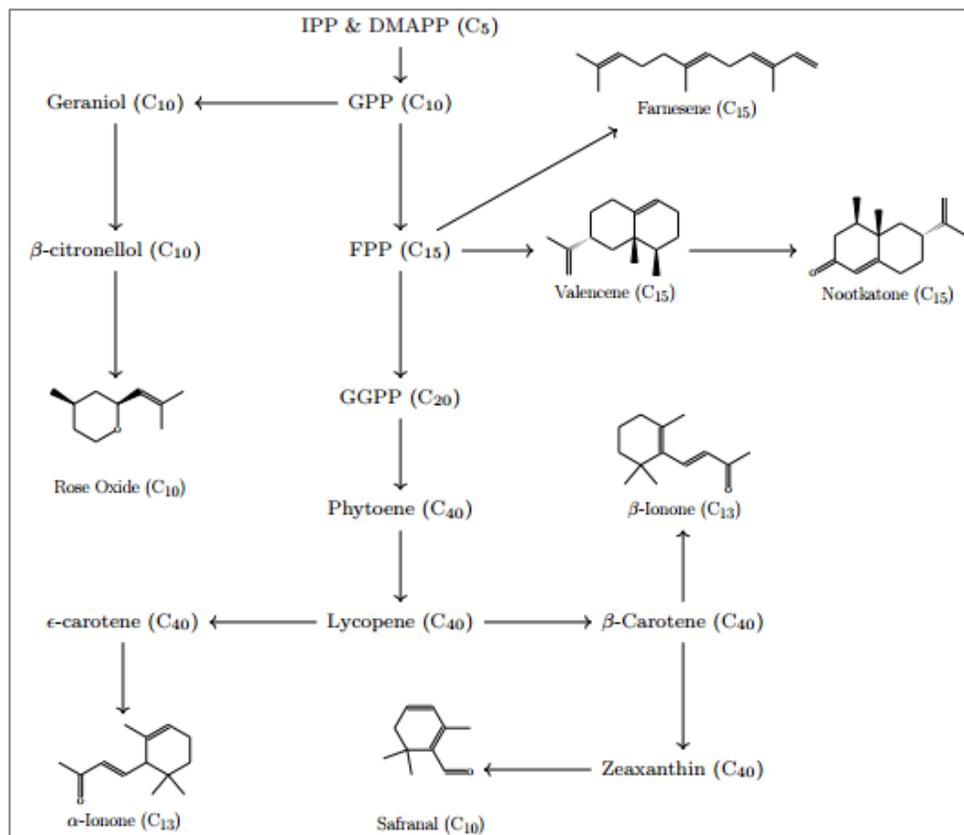


Figura 45: Vía metabólica de algunos aromas con esqueleto terpenoide (Ibaceta & Agosin 2016).

iii. C₁₀ –Óxido de Rosa y Safranal

El óxido de rosa y el safranal son monoterpenos volátiles ampliamente utilizados en la industria de aromas y sabores. El primero, se puede encontrar principalmente en el aceite esencial de rosa (Wagner *et al.* 1989) y se caracteriza por tener notas florales (Yamamoto *et al.* 2002). Sin embargo, son solo las configuraciones (-)-*cis* y (-)-*trans* las que entregan las propiedades organolépticas deseadas por los consumidores (Nakahashi *et al.* 2015; Yamamoto *et al.* 2002). Por lo tanto, una mezcla racémica de óxido de rosa tiene un valor comercial mucho menor (85-170 USD/kg, Vigon) al de los enantiómeros levógiros puros

(906-971 USD/kg, Vigon). Ambos productos se sintetizan químicamente debido a que se ha podido controlar la estereoselectividad de las reacciones mediante diversas técnicas fisicoquímicas (Ogawa *et al.* 1978; Yamamoto *et al.* 2002).

Por otro lado, se ha logrado biosintetizar óxido de rosa a través de la ciclación enzimática de β -citronelol en *Pseudomonas* spp., alcanzando una concentración cercana a los 30 mg/L, en una proporción enantiomérica *cis/trans* de 65/35 (Pimentel *et al.* 2012). Este mismo sustrato también se puede obtener *de novo* desde GPP o utilizando geranil acetona como precursor de la biotransformación (Iijima *et al.* 2004; Simkin *et al.* 2013). No se ha reportado su producción a través de biotecnología a nivel industrial.

En el caso del safranal, éste es el componente principal del aroma del azafrán, que se utiliza, en su mayoría, como saborizante de alimentos. La biosíntesis de este saborizante sucede a través de la vía de los carotenoides por el corte oxidativo de la zeaxantina (Frusciante *et al.* 2014) y su posterior glicosilación (Tanaka & Ohmiya 2008). El producto que se obtiene es la picrocrocina que, al ser expuesta a β -glicosidasas y ácido, se convierte en safranal (Himeno & Sano 1987).

La picrocrocina puede ser extraída de su fuente natural, o producida por síntesis química o biotecnológica. La extracción desde los estigmas de la flor de azafrán alcanza bajos rendimientos, de hasta 200 mg/kg y requiere de un tratamiento enzimático posterior y degradación térmica (Rezaee & Hosseinzadeh 2013; Alonso *et al.* 1996). Por otro lado, la síntesis química se lleva a cabo a partir de diversos sustratos, como por ejemplo, citral (Könst *et al.* 1974). El producto resultante en este caso tiene un valor de 1560 USD/kg (Vigon). Por último, respecto a la síntesis biológica, recientemente se ha logrado producir safranal por fermentación *de novo* en *S. cerevisiae* recombinante (Kumar 2017). Actualmente, la empresa Evolva posee la patente para este proceso y de la vía heteróloga para la síntesis de zeaxantina y picrocrocina, desde β -caroteno (Kumar 2017).

iv. C₁₃ - Iononas y β -damascenona

Los apocarotenoides de 13 átomos de carbono más estudiados son los que tienen aplicación en la industria de aromas y sabores. Dentro de éstos destacan las iononas, dihidroiononas, damasconas y la β -damascenona (Cataldo *et al.* 2016) (ver Figura 46).

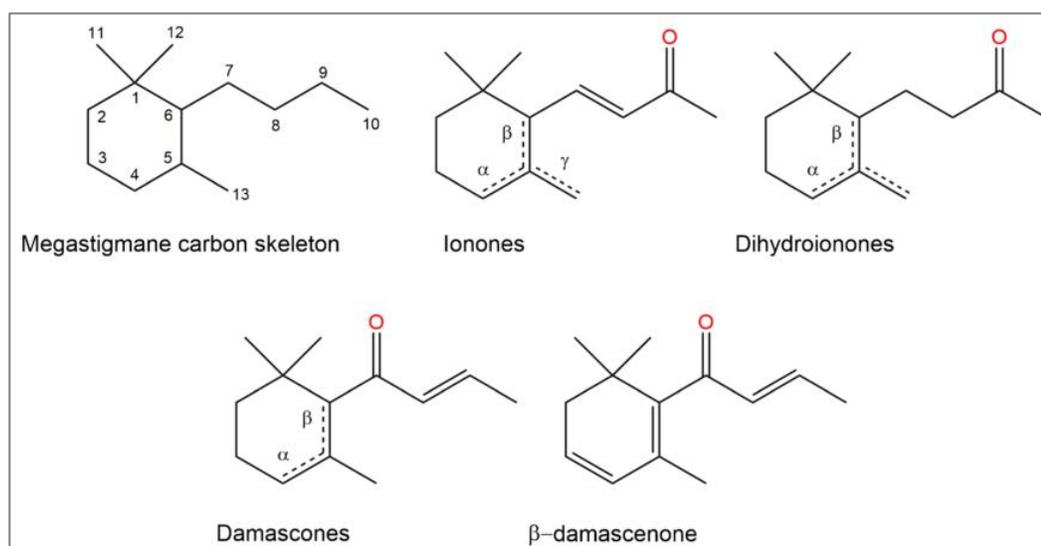


Figura 46: Estructura química de los C₁₃ apocarotenoides. Las líneas punteadas representan la posición del doble enlace en los isómeros α , β y γ (Cataldo *et al.* 2016).

Las iononas se caracterizan por tener aroma a violeta y se utilizan ampliamente en cosméticos y perfumería (Zhang *et al.* 2018). En la naturaleza, se pueden encontrar en flores y frutos como moras, duraznos y damascos (Cataldo *et al.* 2016). Este compuesto cuenta con 3 regioisómeros α , β y γ , que se diferencian por la posición de un doble enlace asociado al átomo de carbono 5 de su ciclo (Figura 46) (Bugoni *et al.* 2015). Además, las α - y γ -iononas tienen un centro quiral en el átomo de carbono 6 de su ciclo, resultando en enantiómeros *R* y *S* (Legnani *et al.* 2008). Las características organolépticas y el umbral

olfativo de cada isómero son distintas (Bugoni *et al.* 2015), por lo que la proporción de éstos en una mezcla de iononas puede afectar su valor (Lalko, Lapczynski, McGinty, *et al.* 2007; Lalko, Lapczynski, Politano, *et al.* 2007).

Su biosíntesis ocurre mediante el corte oxidativo de distintos carotenos, lo que define su estructura (Simkin *et al.* 2004). Así, la acción de una CCD sobre ϵ -caroteno y β -caroteno da como resultado dos moléculas de α -ionona y de β -ionona, respectivamente (Walter *et al.* 2010). Mientras que α -caroteno produce una molécula de cada una de las iononas mencionadas anteriormente (Figura 47). Cabe destacar que el origen metabólico de las γ -iononas no está claro, ya que no existen carotenos con anillos γ y solo se ha encontrado en dos tipos de flores (Brenna *et al.* 2002). Por esta razón, se postula que se generan por isomerización de las demás iononas presentes.

Su producción comercial ocurre principalmente por síntesis química desde citral y acetona (Brenna *et al.* 2003a; Beekwilder, Rossum, *et al.* 2014), lo que resulta en un producto racémico (Schrader & Bohlmann 2015). El precio de mercado de α - y β -ionona natural se encuentra entre 600 y 679 USD/kg (Vigon), considerablemente mayor que sus sustitutos producidos por síntesis química (22-153 USD/kg, Vigon).

En cuanto a su producción biotecnológica, se ha reportado la síntesis de novo de β -ionona en *Saccharomyces cerevisiae* (López *et al.* 2015; Beekwilder, Rossum, *et al.* 2014) y *E. coli* (Simkin *et al.* 2004). También, se demostró que la producción de α -ionona en *E. coli* es posible, a través de la expresión de CCD1 y CCD4 de *Vitis vinifera* L., alcanzando rendimientos menores a 0.5 mg/L (Lashbrooke *et al.* 2013). La optimización de la producción de α - y β -ionona en *E. coli* fue publicada este año, alcanzando rendimientos de hasta 80 veces sobre los valores reportados anteriormente (Zhang *et al.* 2018). Esto se logró modularizando la vía de síntesis de iononas y aplicando técnicas de ingeniería de proteínas, como la fusión de enzimas (Zhang *et al.* 2018).

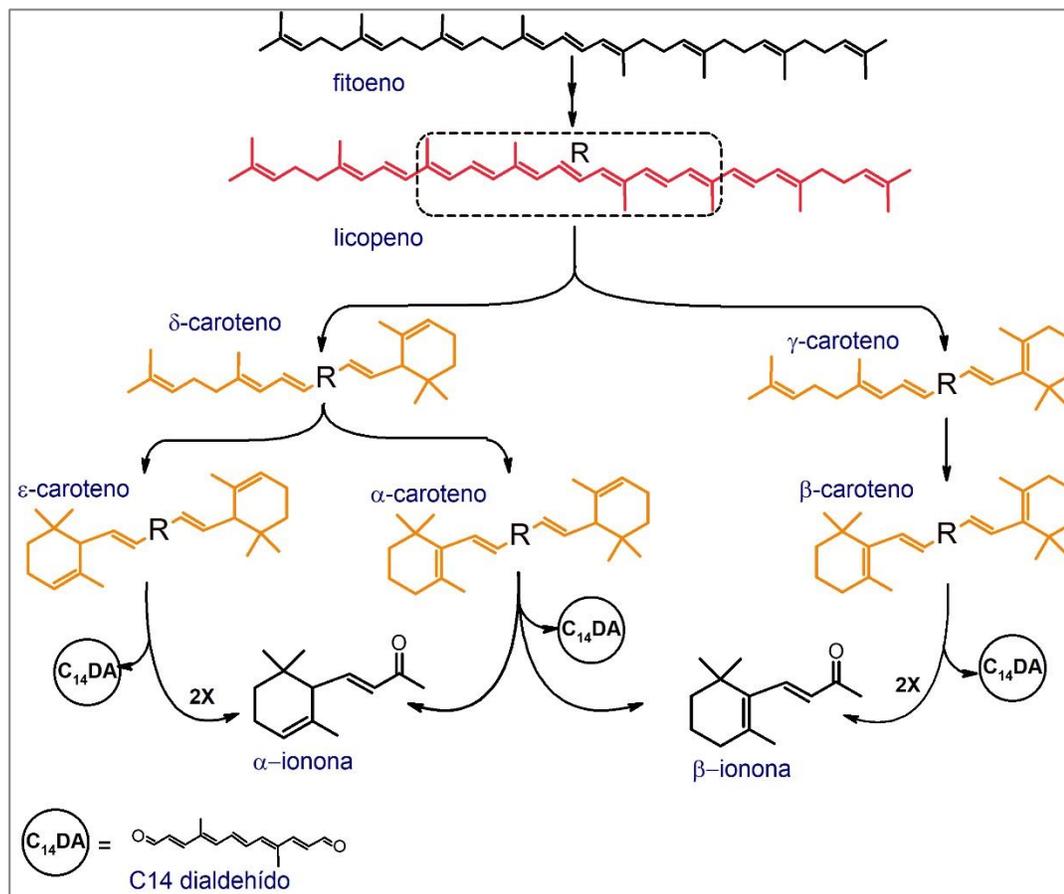


Figura 47: Vía metabólica biotecnológica de producción de iononas a partir de carotenos. Elaboración propia.

Las damasconas y la β -damascenona contribuyen de manera importante al aroma del aceite de rosas (Brenna *et al.* 2003a). También se encuentran presentes en el té, tabaco y, particularmente la β -damascenona, en ciertas frutas (Miks *et al.* 2016). Los alimentos, plantas y aceites donde se encuentran estos compuestos son, en general, procesados y no frescos (Sefton *et al.* 2011). Esto sugiere una síntesis no enzimática, a partir de precursores que sí se producen en el metabolismo de estos organismos (Cataldo *et al.* 2016). Ambas fragancias son utilizadas, principalmente, en productos de cuidado personal y, en menor

medida, en alimentos. Estos compuestos solo difieren entre sí en que β -damascenona posee un doble enlace adicional entre los átomos de carbono 3 y 4 de su estructura cíclica (Figura 46) (Rowe 2005).

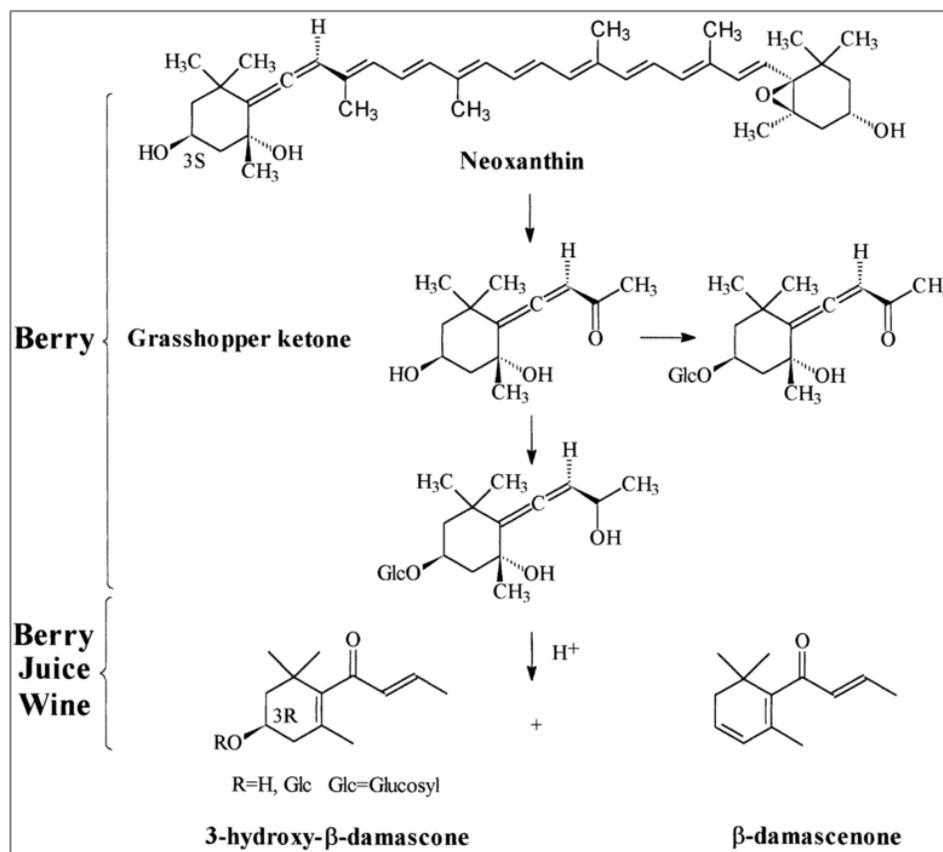


Figura 48: Síntesis de β -damascenona en frutos rojos (Baumes *et al.* 2002).

Actualmente, las damasconas y la β -damascenona se extraen de sus fuentes naturales, con bajos rendimientos (Sefton *et al.* 2011), alternativamente se producen por síntesis química a partir de pironeno y iononas, entre otros, (Fehr & Galindo 1986; Campagnole & Delmond 2007; Boulin *et al.* 2007). La β -damascenona tiene un valor comercial entre

850 y 1660 USD/kg (Vigon), dependiendo de su porcentaje de pureza. En cuanto a las damasconas, los isómeros estructurales δ - y α - son los de menor valor (150-291 USD/kg, Vigon), seguidos por el isómero β -, entre 335 y 441 USD/kg (Vigon). Finalmente, las γ -damasconas son las de mayor valor con un precio entre 1970 y 2070 USD/kg (Vigon).

En la naturaleza, la β -damascenona proviene de una cetona llamada *grasshopper ketone*, sintetizada a partir del corte oxidativo de la neoxantina, por la dioxigenasa RdCCD1 de *Rosa damascena* (Isoe *et al.* 1971; F. Huang *et al.* 2009). Luego, *grasshopper ketone* es reducido a su alcohol correspondiente y glucosilado. Como se mencionó anteriormente, existen pasos no enzimáticos que finalizan su formación a partir de los precursores encontrados en la naturaleza (F. Huang *et al.* 2009; Winterhalter & Rouseff 2001). Además, se ha observado que al calentar estos compuestos glucosilados en medio ácido se genera β -damascenona (Näf *et al.* 1990).

v. C₁₄ - Ironas

Las ironas son el principio aromático del aceite esencial de iris. Su aroma se caracteriza por ser dulce y floral (Brenna *et al.* 2003b). Estos compuestos volátiles tienen un esqueleto terpenoide similar a las iononas, sin embargo, no provienen de los carotenos, sino del escualeno, que se genera de la unión de dos moléculas de FPP (Figura 40) (Marner 1997). En el Capítulo 2, se detalla su estructura, vía metabólica, procesos de obtención y mercado.

vi. C₁₅ – Valenceno, Farneseno y Nootkatona

El valenceno, farneseno y la nootkatona son sesquiterpenos volátiles, que provienen de la vía de los isoprenoides (Figura 45). El farneseno es un isoprenoide lineal, producto de la desaturación de FPP, que presenta un aroma amaderado y floral (Miks *et al.* 2016). Este componente se puede encontrar en manzanas, naranjas y en la cáscara de las granadas. A pesar de su uso en composiciones aromáticas, el interés industrial por el farneseno se debe a su potencial reducción a farnesano, compuesto utilizado como fuente de energía

(Schrader & Bohlmann 2015; Chubukov *et al.* 2016). Actualmente, se produce farneseno en cepas de *S. cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* productoras de FPP, co-transformadas con una farneseno sintasa (FS) (Tippmann *et al.* 2016; Yang *et al.* 2016). El valor de este producto natural es de alrededor de 100 USD/kg (Amyris Corp, 2017). Uno de los mayores desafíos en la producción de este compuesto es la competencia por el uso de su sustrato FPP para la producción de ergosterol (Figura 40), un componente fundamental de las membranas celulares (Tippmann *et al.* 2016).

El valenceno es un sesquiterpeno bicíclico, que se obtiene a partir de FPP por una valenceno sintasa (VS) (Farhi *et al.* 2011). Su aroma se describe como cítrico y frutal y se asocia al de las naranjas (Miks *et al.* 2016). La producción de valenceno por fermentación está patentada por Evolva (Amick *et al.* 2016). Este proceso se realiza en *S. cerevisiae* y *E. coli* utilizando una VS de *V. vinífera* (Farhi *et al.* 2011; Beekwilder, Houwelingen, *et al.* 2014). El valor de este compuesto etiquetado como natural, se encuentra entre 550 y 1.400 USD/kg (The Good Scents Company); mientras que su sustituto químico, sólo alcanza los 400 USD/kg (Zaubal importations).

Por último, la nootkatona es un sesquiterpeno bicíclico con un grupo cetónico asociado a uno de sus anillos. Su aroma se describe como cítrico, similar a las granadas y al pomelo y se utiliza ampliamente en productos de higiene personal, perfumería y alimentos (Wilson & Shaw 1978). La nootkatona se encuentra en la cáscara de las granadas en una concentración muy baja, haciendo que su extracción natural sea inviable (Miks *et al.* 2016). Este compuesto proviene del valenceno y se sintetiza a través de un citocromo P450 reductasa de *A. thaliana*, que lo convierte en su alcohol correspondiente, y una alcohol deshidrogenasa (Wriessnegger *et al.* 2014; Schulz *et al.* 2015). Actualmente, se sintetiza por fermentación desde glucosa en *S. cerevisiae* y por biotransformación de valenceno en *Y. lipolytica*, *Picchia pastoris* y *E. coli* (Palmerín-carreño *et al.* 2016; Palmerín-Carreño *et al.* 2015; Wriessnegger *et al.* 2014). El valor de este producto natural alcanza los 5.200 USD/kg (Vigon).

7.2. Fenilpropanoides

En esta sección se destacan algunos de los aromas más importantes que se encuentran dentro de la categoría de los fenilpropanoides y sus derivados.

7.2.1. Vainillina

La vainillina es uno de los compuestos aromáticos más importantes para alimentos, bebidas, perfumes y fármacos, en cuanto a nivel de consumo (Serra *et al.* 2005; Hua *et al.* 2007). Este compuesto está presente en las vainas de la vainilla en una concentración de aproximadamente 2%, lo que no es suficiente para cubrir su alta demanda, que supera las 10.000 toneladas al año (Havkin-Frenkel & Belanger 2009). Debido a esto, la vainillina es producida principalmente por síntesis química a partir de lignina y petroquímicos (Hua *et al.* 2007). Existe una gran diferencia entre el precio del producto natural, que alcanza los 4.000 USD/kg y el artificial, de alrededor de 15 USD/kg (Ma & Daugulis 2013). Considerando lo anteriormente mencionado, en conjunto con el aumento de la demanda por productos de origen natural, ha incentivado el desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas para su fabricación (Priefert *et al.* 2001).

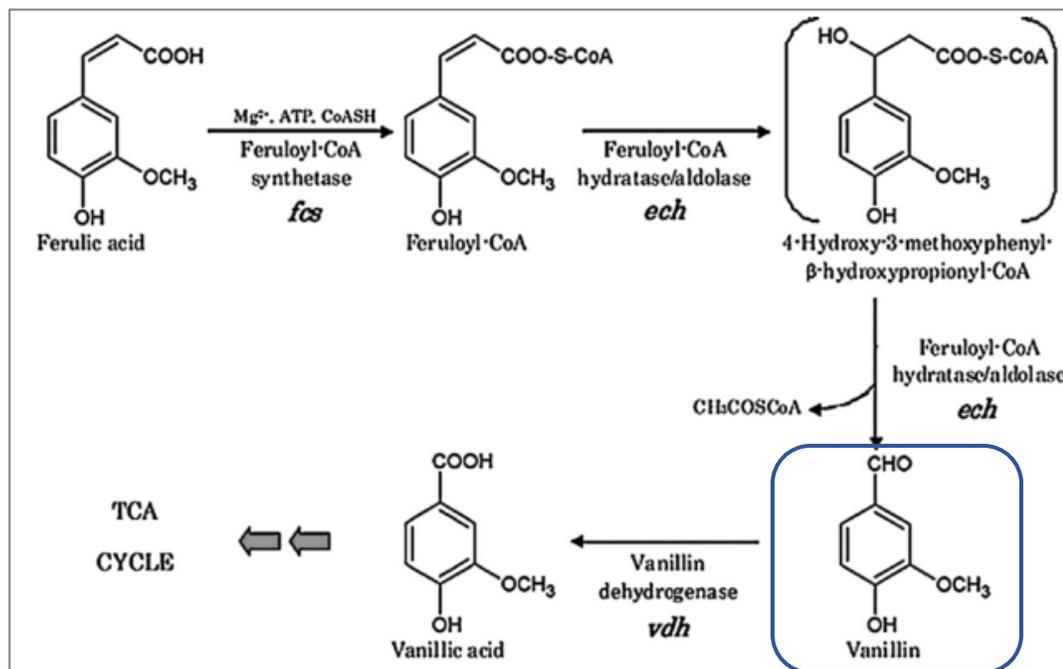


Figura 49: Esquema de la vía de formación y degradación de la vainillina (encuadrada en azul) en *P. fluorescens* BF13. Para cada reacción se indica el nombre de la enzima responsable, seguido por el gen correspondiente (Di Gioia *et al.* 2011).

La producción de vainillina se ha obtenido a través de la bioconversión de precursores como la lignina, el ácido ferúlico y el eugenol, mediante distintos organismos y enzimas (Priefert *et al.* 2001). Además, se han diseñado microorganismos para lograr la biosíntesis *de novo* de este compuesto (Priefert *et al.* 2001). No obstante, a excepción de la biotransformación del ácido ferúlico, la producción mediante estos métodos es a nivel de trazas (Hua *et al.* 2007). A continuación, se detallan algunos de los trabajos en los cuales se genera vainillina a partir de ácido ferúlico.

Di Gioia *et al.* (2011) logró alcanzar la mayor acumulación de vainillina reportada hasta ese momento, en *Pseudomonas fluorescens* (8,4 mM). El objetivo se logró inactivando la vainillina deshidrogenasa de la cepa *P. fluorescens* BF13 a través de mutagénesis dirigida,

impidiendo su posterior oxidación a ácido vanílico. Esta cepa fue cotransformada con una feruloil-CoA sintasa y una hidratasa/aldolasa en un plásmido de bajo número de copias (ver esquema en Figura 49).

Recientemente, Ma y Daugulis (2013), demostraron la toxicidad de la vainillina y su efecto inhibitorio para el crecimiento de algunos microorganismos. Esto impide la realización de cultivos con alta concentración de ácido ferúlico y disminuye el rendimiento. Algunas de las soluciones propuestas para evitar este efecto fue el uso de resina adsorbente (Hua *et al.* 2007) y un biorreactor bifásico sólido-líquido (Ma & Daugulis 2013) para extracción de vainillina *in situ*.

7.2.2. Raspberry Ketone

La 4-(*p*-hidroxifenil)-2-butanona, más comúnmente llamada *raspberry ketone*, es el compuesto clave del aroma y sabor de las frambuesas. Este compuesto es un ingrediente de alto interés en el mercado y se utiliza principalmente en la industria de alimentos (Serra *et al.* 2005). Al igual que la vainilla, su concentración en frutos y plantas es baja (3,7 mg/kg de frambuesa) (Kosjek *et al.* 2003), lo que resulta en bajos rendimientos y altos precios, alcanzando los 8.000 USD/kg. En cambio, el mismo producto resultante de síntesis química tiene un valor de aproximadamente 10 USD/kg (Böker *et al.* 2001). *Raspberry ketone* también es producida a partir de biotransformaciones y síntesis *de novo*.

Hace 20 años, Fuganti y Zucchi (1998) reportaron la reducción de 4-hidroxibenzalacetona, formando *raspberry ketone* y su alcohol correspondiente (rhododendrol, **a** en Figura 50), en 14 microorganismos diferentes. De estos, *Mucor subtilissimus* es el que obtuvo una mayor conversión y distribución enantiomérica. Más adelante, se biosintetizó *raspberry ketone* en *Rhodococcus ruber* y *R. equi*, a partir de la oxidación enzimática de rhododendrol (**b** en Figura 50), que se encuentra en abundancia en la corteza de ciertos árboles (Kosjek *et al.* 2003). También, se implementó una vía en *Escherichia coli* (BL21) desde ácido *p*-cumárico (**c** en Figura 50), el cual fue suplementado en el cultivo, logrando rendimientos de 5 mg/L (Beekwilder *et al.* 2007).

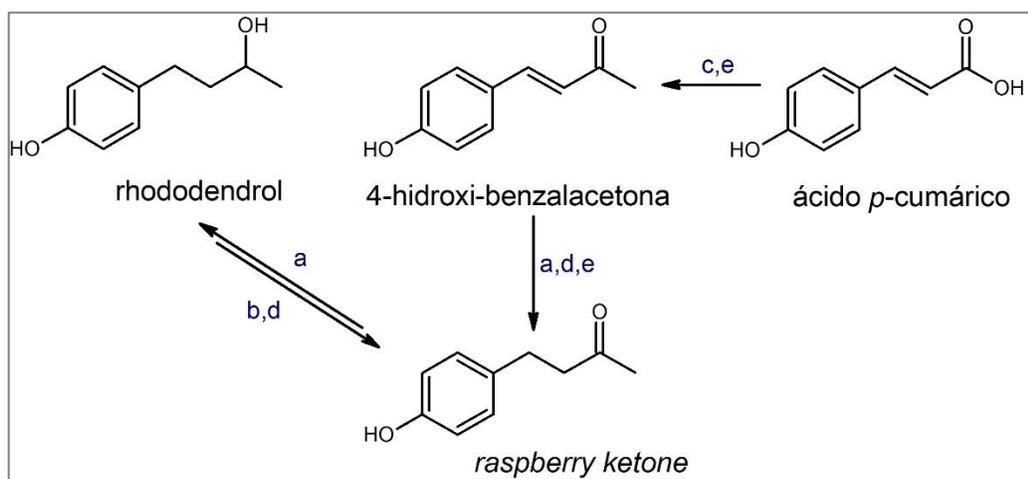


Figura 50: Esquema de los sustratos utilizados para la bioconversión a *raspberry ketone* en distintas publicaciones. **a**: Fuganti & Zucchi 1998, **b**: Kosjek *et al.* 2003, **c**: Beekwilder *et al.* 2007, **d**: Häkkinen & Seppänen-laakso 2015, **e**: Lee *et al.* 2016. Elaboración propia.

Recientemente, se logró la bioconversión a partir de 4-hidroxibenzalacetona (**d** en Figura 50) en *Nicotiana tabacum* BY-2 (Häkkinen & Seppänen-laakso 2015) y desde ácido *p*-cumárico (**e** en Figura 50) en *Saccharomyces cerevisiae* AWRI2975 (Lee *et al.* 2016), alcanzando 7,4 mg/L y 7,5 mg/L, respectivamente. En esta última publicación también lograron la síntesis *de novo* de *raspberry ketone* en *S. cerevisiae* AWRI1631, sin embargo, el rendimiento fue menor (2,8 mg/L) (Lee *et al.* 2016).

7.2.3. 2-feniletanol

El aroma de 2-feniletanol (2-PE) se describe como similar al de rosas, se encuentra en frutos y flores y es utilizado frecuentemente como ingrediente en perfumería, farmacia y artículos de cuidado personal. La extracción es poco sustentable debido a que éste se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de sus fuentes naturales, a excepción del aceite de rosa, que puede contener hasta 60% de 2-PE (Etschmann *et al.* 2002). Es

debido a esto que sobre el 97% de las 10.000 toneladas producidas al año (Hua & Xu 2011), es a partir de síntesis química (Carlquist *et al.* 2015). Actualmente, hay 3 procesos por los cuales se puede fabricar 2-PE químicamente y en todos ellos la purificación es el mayor obstáculo, debido a que algunos de los subproductos tienen aromas no deseados por los consumidores (Etschmann *et al.* 2002). El precio de mercado del compuesto producido por estas vías es de alrededor de 5 USD/kg (Hua & Xu 2011); mientras que el natural es de 1.000 USD/kg (Xu *et al.* 2007).

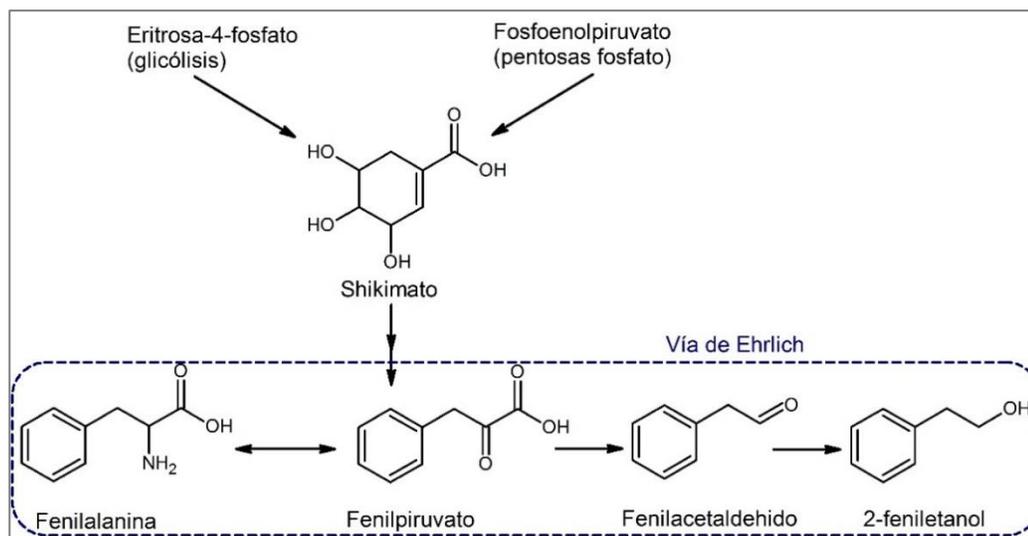


Figura 51: Síntesis *de novo* de 2-PE a través de la vía del shikimato. En azul se encuadra la vía de Ehrlich, a partir de fenilalanina. Elaboración propia.

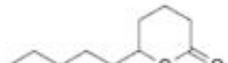
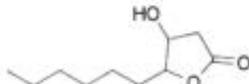
La producción de 2-PE es parte del metabolismo natural de las levaduras y otros microorganismos, siendo las primeras las que alcanzan las mayores concentraciones. 2-PE es sintetizado durante la fase exponencial de crecimiento de levaduras, su concentración depende de la fuente de nitrógeno suplementada en el cultivo (Etschmann *et al.* 2002) y está limitada por su efecto citotóxico (Stark *et al.* 2002). La síntesis *de novo*

se logra a través de la vía del shikimato, el cual es producido a partir de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato (Figura 51) (Etschmann *et al.* 2002). El aminoácido L-fenilalanina se utiliza como precursor para su biotransformación a través de la vía de Ehrlich (Figura 51) en levaduras como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Xu *et al.* 2007). Este es el enfoque biotecnológico más eficiente hasta el momento, alcanzando 6 g/L gracias a grandes esfuerzos en ingeniería metabólica y de procesos y de la aplicación de diversas técnicas de remoción de producto *in situ* (Wang *et al.* 2017; Hua & Xu 2011; Eshkol *et al.* 2009; Etschmann & Schrader 2006).

7.3. Lactonas

Las lactonas son una familia de aromas derivados de ácidos grasos, que están presentes en muchos aceites esenciales de plantas (Sánchez-sevilla *et al.* 2014). Algunos hongos son capaces de transformar estos ácidos grasos en lactonas con bajo rendimiento (Romero-guido *et al.* 2011). La descripción sensorial de estos aromas es dulce y frutosa con notas de durazno, damasco o coco, dependiendo del compuesto específico (Tabla 22) (Jo *et al.* 2014).

Tabla 22: Estructura, nombre y propiedades aromáticas de las lactonas producidas por *Yarrowia lipolytica* (Waché *et al.* 2003).

Structure	Name	Odorant notes
	γ -dodecalactone	peach, butter, fatty
	γ -decalactone	peach, fatty, fruity
	γ -nonolactone	coconut, fatty, fruity, aniseed
	δ -decalactone	peach, oily, creamy
	dec-3-en-4-olide	fruity, oily, fatty
	dec-2-en-4-olide	mushroom
	3-hydroxy- γ -decalactone	no odour

Los pasos enzimáticos para la formación de lactonas son, principalmente, la hidroxilación, β -oxidación y lactonización (Figura 52) (Endrizzi *et al.* 1996). El primer paso es el cuello de botella del proceso, debido a que se trabaja con enzimas que, en su mayoría, son inespecíficas y resultan en numerosos productos no deseados (Farbood *et al.* 1993). Para solucionarlo, se utiliza como sustrato ácidos grasos previamente hidroxilados (Jo *et al.* 2014; An & Oh 2014). Esto es poco favorable económicamente, a pesar de aumentar el rendimiento (Romero-guido *et al.* 2011).

La β -oxidación es un proceso complejo que ocurre en los peroxisomas de levaduras (An & Oh 2013) en ciclos de cuatro pasos, catalizados por tres enzimas. En cada ciclo se remueven dos carbonos de la cadena, dando como resultado lactonas de distinto largo (Sánchez-sevilla *et al.* 2014). El número de ciclos depende de la oxigenación y del pool de metabolitos y cofactores en la cepa utilizada (Romero-guido *et al.* 2011). Se han modificado levaduras para manejar la cantidad de ciclos y así, el tamaño de la lactona producida (Guo *et al.* 2012).

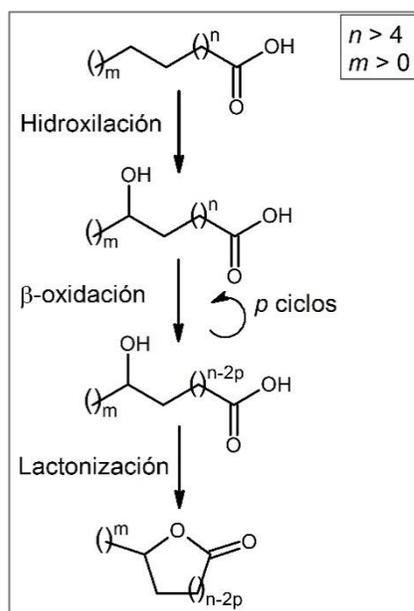


Figura 52: Esquema general de la formación biotecnológica de lactonas. Adaptado de Romero-guido *et al.* 2011.

Por último, la lactonización ocurre en ambientes ácidos y no se ha comprobado si hay enzimas involucradas en el proceso (Endrizzi *et al.* 1996). La estructura de la lactona producida depende de la posición del grupo hidroxilo original. Así, si el hidroxilo se

aproxima al carboxilo en el carbono 4, 5 o 6, éste se convertirá en una γ -, δ - o ϵ -lactona, respectivamente (Romero-guido *et al.* 2011).

Algunos de los desafíos para la producción microbiana de lactonas son la entrada de lípidos para su consumo como sustrato (An *et al.* 2013) y la oxigenación de los cultivos, lo que dificulta el escalamiento de los procesos a nivel industrial (Romero-guido *et al.* 2011). Diversas técnicas como el uso de bioemulsificantes, lipasas y la adición de canales de membrana han resultado ser una solución al primer punto (An & Oh 2014; An & Oh 2013; An *et al.* 2013). Respecto al segundo, la mejora en la transferencia de oxígeno se logra a través del aumento del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$), el cual está relacionado con la geometría del reactor, las características del medio de cultivo, la aireación y la agitación (Romero-guido *et al.* 2011).

Otra dificultad relacionada a la biosíntesis de lactonas es su toxicidad, debido a que disminuyen el pH intracelular y fluidizan las membranas (Romero-guido *et al.* 2011). De esta manera, la acumulación de lactonas puede inhibir el crecimiento del microorganismo a distintos niveles, dependiendo de la estructura y concentración del compuesto, el estado celular y la presencia de lípidos en el medio (Waché *et al.* 2003). Para disminuir la concentración de lactonas, el uso de solventes hidrofóbicos para la extracción *in situ*, surfactantes y la adsorción en matrices porosas, han demostrado tener éxito. Adicionalmente, se puede reducir la fluidización de las membranas disminuyendo la temperatura del proceso (Waché *et al.* 2003).

La γ -decalactona fue la primera lactona descubierta, en 1963 y actualmente, representa uno de los compuestos de mayor producción a través de biotecnología (Waché *et al.* 2003). La mayoría de los procesos industriales para obtener γ -decalactona se basan en la biotransformación de ácido ricinoleico en levaduras como *Yarrowia lipolytica* (Guo *et al.* 2012; Waché *et al.* 2003). El precio de mercado de este compuesto natural alcanza los USD \$1.245 por kilogramo (Vigon, Estados Unidos, 2017) que es aproximadamente 20 veces el precio del producto sintético (USD \$60/kg, Vigon 2017).

7.4. Producción de ironas por extracción desde rizomas

A continuación, se presentan las patentes correspondientes a los métodos alternativos de producción de ironas por extracción desde rizomas, donde se reduce del tiempo de maduración, con respecto al proceso original. Cabe destacar que, en todos los casos, la proporción de isómeros depende del origen de la planta de que se extraen los precursores. Además, el rendimiento se presentará en gramos de ironas totales por kilogramo de peso seco de rizomas tratados ($\text{g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$).

En 1989, la empresa francesa Elf Aquitaine patentó un proceso de oxidación de un extracto lipofílico de los rizomas, que utiliza cloruro de metileno como solvente y permanganato de potasio (KMnO_4) como oxidante. Se logra un alto rendimiento de entre 1 y 8 $\text{g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$, la reacción se realiza a temperaturas entre 20 y 60 °C en un proceso total de 4 días. (Buono *et al.* 1989).

Un año después, se le asigna a la empresa Roure S.A. los derechos sobre un tratamiento microbiológico de los precursores de las ironas. Estos son incubados por 24 horas en un medio de cultivo vegetal con bacterias de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonaceae*, previamente aisladas de los mismos rizomas. El proceso completo hasta la extracción dura menos de una semana, con un rendimiento de hasta 1 $\text{g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ y el producto es considerado natural y de excelente calidad (Belcour *et al.* 1990). La desventaja de esta opción es el alto costo del tratamiento microbiológico (Ehret *et al.* 2001).

Posteriormente, en 1992, se patentan tres procesos adicionales. El primero, consta de exponer los precursores, previamente extraídos desde los rizomas con hexano y etanol, a radiación ionizante. Luego de esto, se incuban a 25 °C durante 2 meses obteniendo un rendimiento de 0.35 $\text{g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ (Baccou *et al.* 1992).

Las otras dos patentes son asignadas a Elf Aquitaine, por los mismos inventores. En la primera, se propone el cultivo a 20 °C de rizomas molidos con hongos del género *Botryotinia* o sus fracciones enzimáticas. El mayor rendimiento se logra a las 48 horas de cultivo (el proceso completo toma 4 días), alcanzando los 2,3 $\text{g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ (Gil & Le Petit

1992). En la otra, se patentó una ruta enzimática, en la cual se tratan los precursores con enzimas peroxidadas, entre las cuales se encuentran la lipoxidasa de soya, peroxidasa de rábano, lactoperoxidasa de leche y manganeso peroxidasa de distintos microorganismos. El rendimiento es similar al anterior ($2,2 \text{ g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$) y se alcanza en el mismo tiempo a 30°C (Gil *et al.* 1992).

El proceso más rápido patentado para la síntesis de ironas desde iridales, menos de 48 horas, fue adjudicado en 1998 a las compañías Givaudan y Roure S.A.. En éste, se realiza un tratamiento con sales de nitrito a temperatura ambiente y pH ácido, en especial con NaNO_2 y KNO_2 , siendo el mayor rendimiento alcanzado es de $1,84 \text{ g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ (Ehret *et al.* 2001).

Las dos patentes más recientes para el tratamiento de rizomas utilizan procesos que se realizan en más tiempo y alcanzan bajos rendimientos. En primer lugar, Firmenich publicó el año 2009 un tratamiento que incluye el blanqueamiento, trituración e incubación por 20 días a 60°C de los rizomas, llegando a $0,7 \text{ g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ (Canhoto *et al.* 2009). Finalmente, el instituto de investigación SKH GmbH de la Universität Regensburg de Alemania patentó un proceso menos invasivo en el que se maduran los rizomas en una atmósfera de oxígeno de 5 bar a 25°C durante 8 semanas. El rendimiento reportado es de $0,5 \text{ g}^{\text{ir}}/\text{kg}^{\text{RS}}$ (Flemming 2017).

7.5. Producción de ironas por síntesis química

La primera síntesis química exitosa de ironas se le atribuye a Ruzicka (1940), al formar lo que él llamaba 6-metil-iononas desde citral. El aroma de su preparación no era similar a los extractos naturales de iris, lo que podría deberse a la mezcla de isómeros presentes (Schinz 1957). Siete años después, Schinz logra la síntesis de una mezcla de α - y β -irona con el aroma adecuado (CBI 2014). Esta se efectúa a partir de η -metilpseudoionona y ácido fosfórico variando la temperatura de reacción de -4°C a 50°C . En la patente, otorgada diez años después, también se describe la preparación de η -metilpseudoionona a partir de γ -metilinalool (Schinz 1957). Este proceso requiere varios pasos físicos y

químicos, como la adición de ácido acético a 155 °C, saponificación con hidróxido de potasio, mezcla con isopropilato de aluminio, benceno y acetona a 60 °C, hidrólisis con ácido clorhídrico y destilación fraccionada.

Luego, en 1991 la compañía japonesa Hasagawa LTD patentó un método para generar *cis*- γ -irona a partir de 3,3,4-trimetil-1-ciclohexenilmetanol y etil-vinil-eter (**a** y **b** respectivamente en Figura 53) con ácido pivalico, los que forman (\pm)-*cis*-2,3,3-trimetil-6-metilen-ciclohexilacetaldehído (**1** en Figura 53). Luego, el compuesto **1** es tratado con KCN, MeCl o PhSeNa, peróxido de hidrógeno y metililitio para formar *cis*- γ -irona, como se ilustra en la Figura 53 (Kawanobe & Kogami 1991). Aunque este proceso toma menos de un día, el rango de temperaturas es muy amplio - desde -65 °C a los 220 °C- y el rendimiento final es menor al 5%.

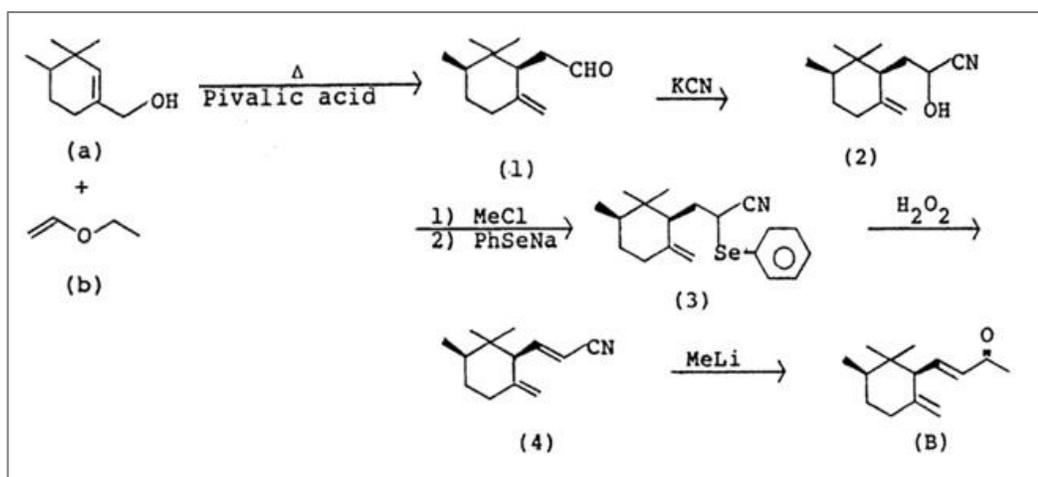


Figura 53: Síntesis química de *cis*- γ -irona a partir de (\pm)-*cis*-2,3,3-trimetil-6-metilen-ciclohexilacetaldehído (Kawanobe & Kogami 1991).

En 1992, Givaudan patentó una técnica para la producción química de α - y β -ironas. El sustrato utilizado es dehidrolinalool, el que pasa por un proceso consistente en tres etapas

con un tiempo de 145 horas y tiene un rendimiento total máximo de un 72% (Fráter & Helmlinger 1992). Finalmente, en el año 2012 se desarrolló un método para sintetizar ironas a partir de pseudoionona. El método utiliza diiodometano y la reacción es catalizada por zinc y cobre. En la etapa final, el ciclo es cerrado por medio de una reacción de catálisis ácida (Lie *et al.* 2013). Además, la pseudoionona (Figura 54a), se fabrica a partir de citral y acetona (Abelló *et al.* 2007; Brenna *et al.* 2003b).

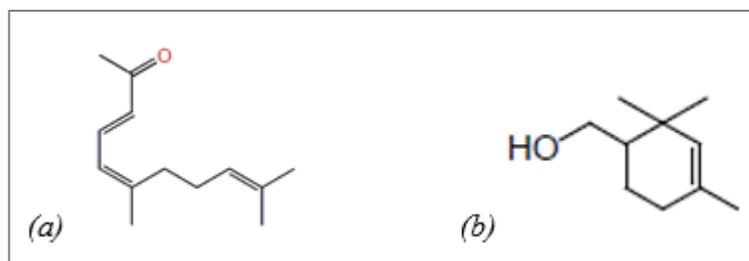


Figura 54: (a) Estructura química de la pseudoionona. (b) Estructura química de (2,2,4-trimetil-3-ciclohexen-1-il)-metanol, utilizado como sustrato para la síntesis enzimática de *cis*- α -irona y *cis*- γ -irona.

Elaboración Propia.

Por otro lado, en cuanto a reacciones enzimáticas, se ha logrado sintetizar *cis*- α -irona y *cis*- γ -irona a partir de una mezcla racémica de (2,2,4-trimetil-3-ciclohexen-1-il)-metanol (Figura 54b), utilizándose lipasa pancreática porcina (PPL), con el fin de acetilar e hidrolizar (Inoue *et al.* 2000).

Numerosos estudios han sido desarrollados relacionados con la separación de los enantiómeros de ironas a partir de una mezcla racémica de α -irona comercial de la empresa Sigma Aldrich (Irone Alpha®), mediante catálisis enzimática (Brenna *et al.* 2008; Brenna, Fuganti, *et al.* 2001; Brenna, Delmonte, *et al.* 2001; Brenna *et al.* 2003b; Brenna *et al.* 1999; Brenna *et al.* 2002; Serra *et al.* 2005). El primero de ellos se llevó a cabo en 1999 con la separación de los estereoisómeros (+)- y (-)-*cis*- α -irona y (+)- y (-)-*trans*- α -irona

(Brenna *et al.* 1999). En este trabajo, concluyen la necesidad de epoxidar las ironas (Figura 55a) para separar los isómeros *cis*- y *trans*- por cromatografía antes de la separación enantiomérica catalizada por una lipasa pancreática (PL, Amano) o por PPL (Sigma), como se ilustra en la Figura 55b (Brenna *et al.* 2003b).

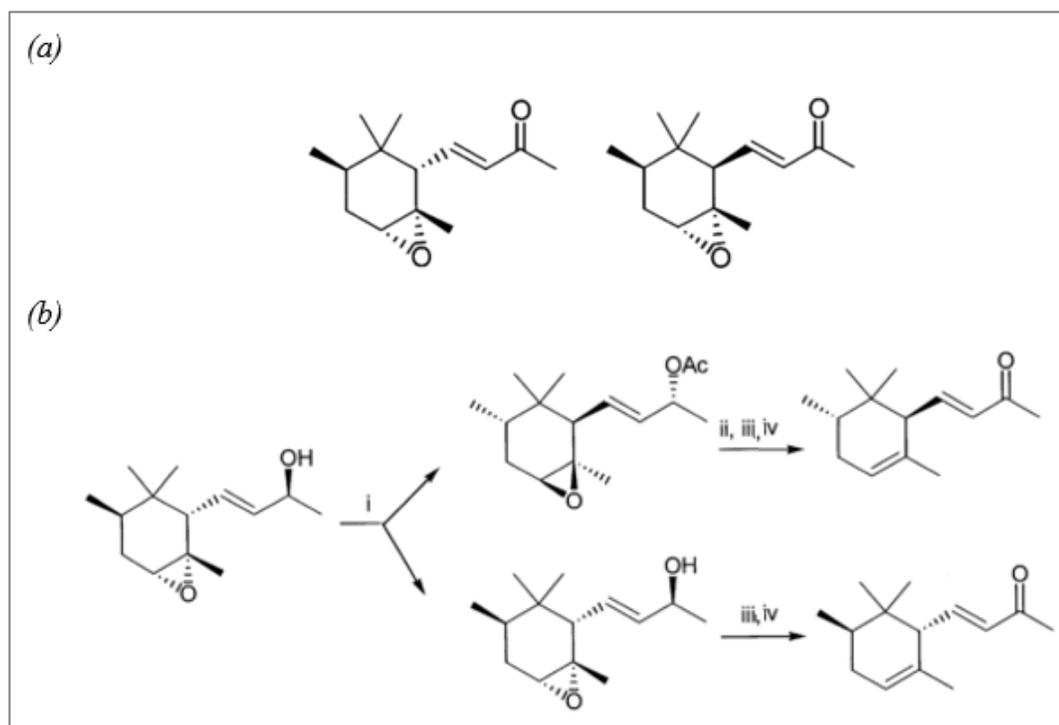


Figura 55: (a) Estructura de *cis*- (izquierda) y *trans*- (derecha) epoxi-ironas, utilizadas para separar estos diastereoisómeros previo al tratamiento enzimático (Brenna *et al.* 2003b). (b) Separación enantiomérica de *trans*-epoxi-irona en (+)- y (-)-*trans*-a-irona. i) Lipasa PS, ii) KOH en MeOH, iii) MnO₂ en CH₂Cl₂, iv) NaI, (CH₃)₃SiCl, CH₃CN. Adaptación de Brenna *et al.* 2003b.

El año 2001, los mismos autores logran transformar las epoxi-ironas en (+)- y (-)-β-ironas (Brenna, Delmonte, *et al.* 2001). Para lograrlo, se trataron las epoxi-ironas con LiAlH₄, convirtiéndolas en una mezcla racémica de dioles ((±)-**26** y (±)-**27** en Figura 56)

que pueden ser separados por cromatografía. Estos, en presencia de *t*-butilmetiléter, vinil acetato y lipasa se separan en los enantiómeros del acetato de β -irol, los que, posteriormente son convertidos en sus respectivas β -ironas (Figura 56). Finalmente, ese mismo año, lograron separar todos los enantiómeros de las γ -ironas, utilizando los precursores y técnicas comprobadas en trabajos anteriores (Brenna, Fuganti, *et al.* 2001).

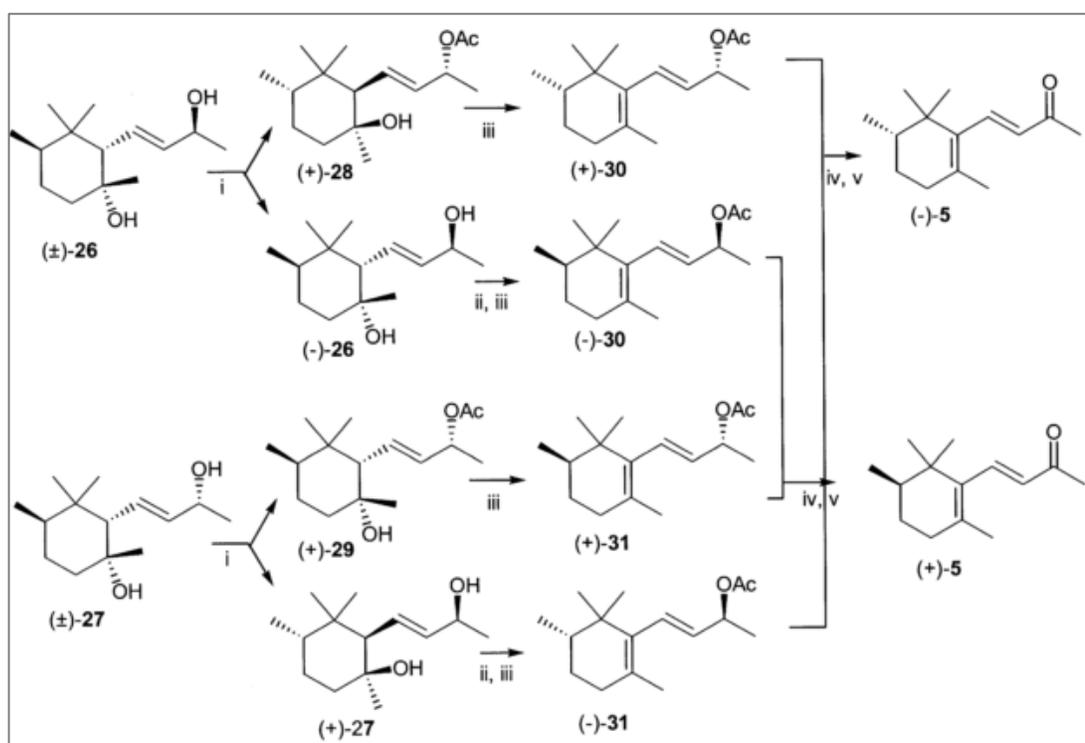


Figura 56: Proceso de separación de enantiómeros de β -irona a partir de irodioles (Brenna *et al.* 2003b).

7.6. Enzimas involucradas en las distintas estrategias de síntesis de ironas

7.6.1. Escualeno metiltransferasa

Botryococcus braunii es un tipo de microalga estudiada para la producción de biodiesel debido a su alta capacidad de sintetizar y acumular hidrocarburos (Cook *et al.* 2017). Estos compuestos son almacenados en cuerpos lipídicos dentro del alga o asociados a la matriz extracelular, lo que les confiere la propiedad de flotar en el agua y tener mayor acceso a fuentes de luz (Niehaus *et al.* 2012). Se han caracterizado 4 clases de *B. braunii*: A, B, L y S (Kawachi *et al.* 2012), en función de los compuestos que producen, el color en la fase estacionaria y el tipo de biopolímeros presentes en la pared celular (Banerjee *et al.* 2002).

La clase A es de color amarillo pálido o verde (Cook *et al.* 2017) y produce *n*-alcadienos y *n*-alcatrienos (C₂₅, C₂₇, C₂₉ y C₃₁), que constituyen hasta un 61% de su peso seco (Banerjee *et al.* 2002). La clase B produce triterpenos lineales insaturados como escualeno y botriococenos y sus derivados polimetilados (C₃₀ - C₃₇) (Niehaus *et al.* 2012), alcanzando hasta un 86% del peso seco del alga (Volkman 2014). Por su parte, la clase L produce principalmente un tetraterpeno llamado licopadieno (2% - 8% de su peso seco) (Thapa *et al.* 2016). Los tipos B y L adquieren un color café anaranjado y rojo, ya que acumulan carotenos en la fase estacionaria (Banerjee *et al.* 2002). Finalmente, la clase S produce *n*-alquenos y epoxi-alquenos C₁₈ a C₂₀ (Volkman 2014).

Se ha reportado la presencia de tres tipos de triterpeno-metiltransferasa (TMT) dependientes de SAM en *B. braunii* clase B: TMT-1, TMT-2 y TMT-3 (Niehaus *et al.* 2012). Estas son capaces de metilar sucesivamente sustratos como el escualeno y el botriococeno, en cuatro posiciones específicas. En la Figura 57 se muestra el esqueleto de ambos sustratos con sus respectivas posiciones a metilar y productos.

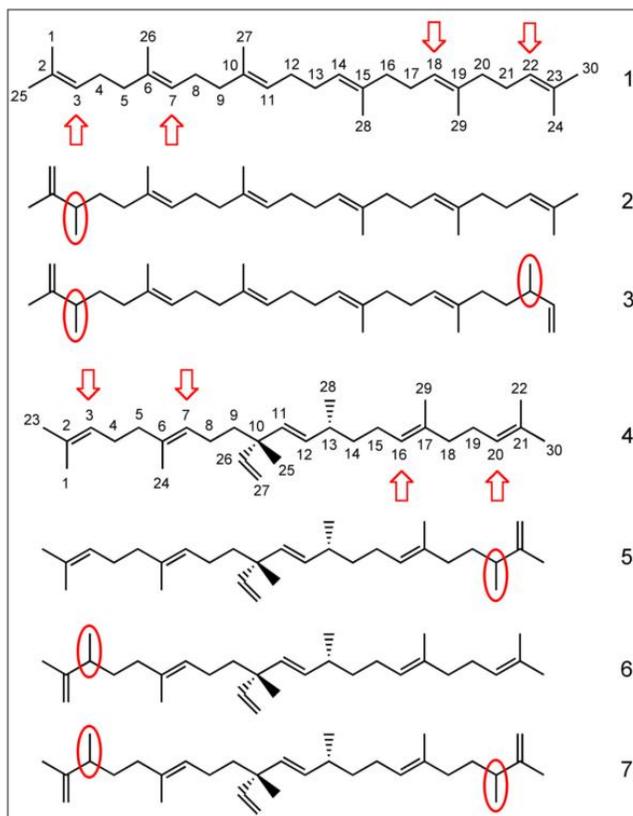


Figura 57: Estructura de triterpenos acumulados en levaduras expresando una escualeno-sintasa o botriococceno-sintasa, en conjunto con TMT-1, -2, o -3. 1) escualeno, 2) 3-metil-escualeno, 3) 3,22-dimetil-escualeno, 4) botriococceno, 5) 20-metil-botriococceno, 6) 3-metil-botriococceno, 7) 3,20-dimetil-botriococceno. Las flechas rojas indican las posiciones donde se ha encontrado metilaciones. Los círculos rojos muestran los metilos agregados por TMT -1, -2, o -3 (Niehaus *et al.* 2012).

La actividad de estas enzimas difiere según el sustrato que tienen disponible. TMT-1 y TMT-2 tienen preferencia por escualeno, mientras que TMT-3 favorece a botriococceno como aceptor de metilo (Niehaus *et al.* 2012). Por otra parte, la cantidad de metilos añadidos también varía según la enzima. Así, TMT-1 y TMT-3 tienen una alta preferencia por metilar en ambos lados equivalentes del sustrato, generando principalmente productos

bimetilados. Sin embargo, TMT-2 produce principalmente triterpenos monometilados, alcanzando bajo un 20% de compuestos con más de un metilo (Figura 58).

Cabe mencionar a este nivel que aún no se ha resuelto la estructura tridimensional de estas MT. No obstante, se han encontrado sitios conservados asociados a la unión de esteroides en otras MTs y a la unión de SAM. Esto podría permitir su modelamiento utilizando herramientas bioinformáticas. Además, se han reconocido regiones hidrofóbicas significativas, que podrían tener un rol en la asociación a membranas para facilitar el acceso al sustrato.

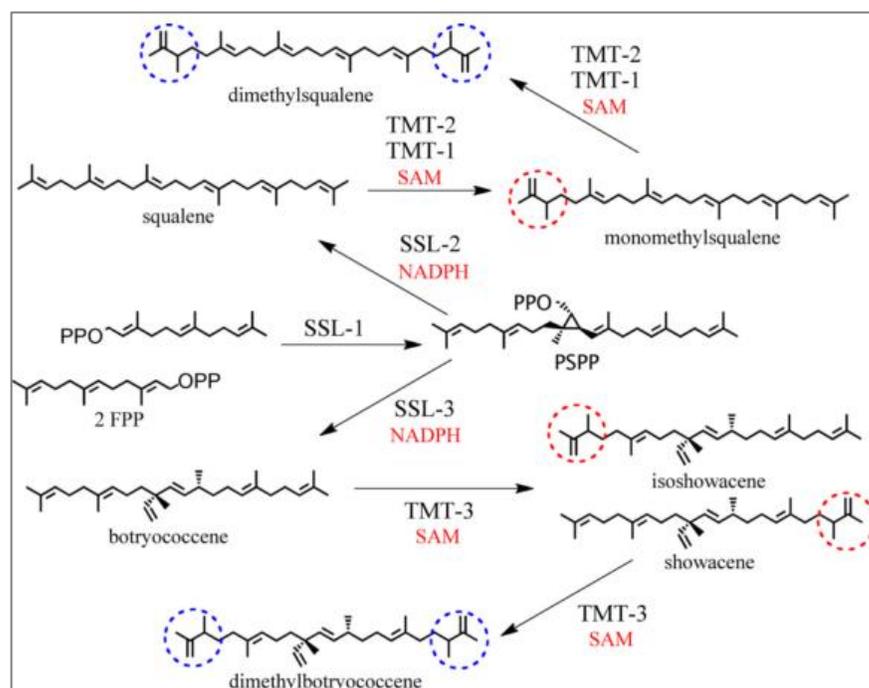


Figura 58: Vía propuesta de síntesis de triterpenos metilados en *B. braunii* a partir de FPP (Niehaus *et al.* 2012).

7.6.2. Benzoquinol metiltransferasa

Entre las enzimas candidatas para la metilación de carotenos ciclados, BqMT (2-2-metoxi-6-poliprenil-1,4-benzoquinol MT) es la única cristalizada y disponible en PDB. Esta proteína forma parte de la vía de síntesis de la Coenzima Q (CoQ), que contiene a las enzimas desde Coq1 a Coq9, las que se ubican en la parte interna de la mitocondria en *S. cerevisiae*.

BqMT actúa como dímero y su dominio de dimerización se encuentra cercano al bolsillo catalítico (Figura 59). Cada subunidad tiene la estructura típica de las MT tipo I, con sitios de unión a su cofactor (SAM) y sustrato que están altamente conservados. Aunque su mecanismo catalítico no ha sido demostrado, existen hipótesis en cuanto a su funcionamiento (Dai *et al.* 2014). Cada uno de los mecanismos propuestos involucra diferentes residuos, lo que dificulta el diseño de mutantes que puedan aceptar carotenos como sustrato.

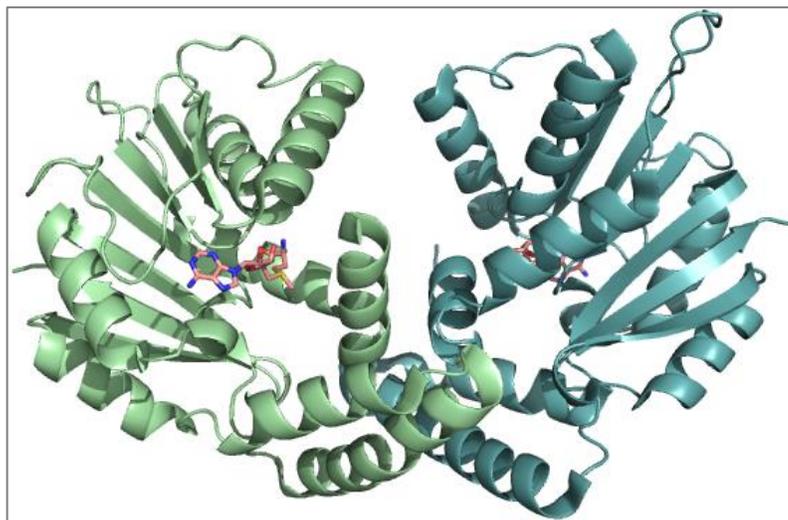


Figura 59: Estructura de BqMT, código PDB: 4obw. Se muestra ambas subunidades del dímero de distinto color y SAM en cada una de ellas. Elaboración propia a través de PyMOL.

Al cristalizar la proteína, se removió el péptido señal (primeros 26 residuos) y su estructura solo se pudo resolver desde el residuo 72 en adelante (Dai *et al.* 2014). El sector *N*-terminal, que no pudo ser resuelto, podría encontrarse cercano al sitio catalítico de la enzima como se ilustra en Figura 60. Por lo tanto, para poder caracterizar de mejor manera la unión al sustrato, se debe hacer un modelo por homología del segmento faltante. Lamentablemente, no existen estructuras con un valor de identidad adecuado en el sector requerido como para poder llevar a cabo este modelo.

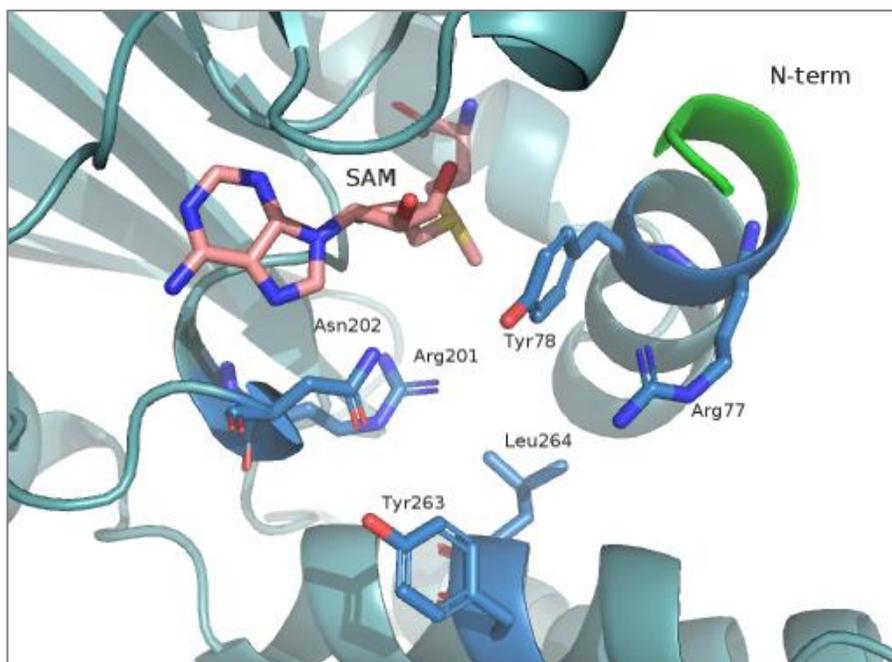


Figura 60: Bolsillo catalítico de Coq5, una BqMT (código PDB: 4obw). En verde se indican los primeros residuos del extremo *N*-terminal que fueron resueltos. Además, se destaca el cofactor SAM y los residuos que participan en la coordinación del sustrato y catálisis. Elaboración propia a través de PyMOL

7.6.3. 3-hidroxiantranilato-C(4)-metiltransferasa

La enzima 3-hidroxiantranilato-C(4)-metiltransferasa (3-HAA-C₄-MT) participa en la vía de síntesis del antibiótico actinomicina en *Streptomyces antibioticus*. Específicamente, esta enzima cataliza la formación de 4-metil-3-hidroxiantranilato (MHA) (ver reacción en Figura 61), el sustrato inicial en la polimerización de las cadenas peptídicas del antibiótico.

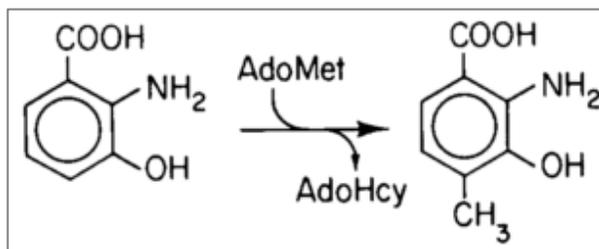


Figura 61: Esquema de la reacción catalizada por 3-HAA-C₄-MT. A la izquierda, el 3-hidroxiantranilato y a la derecha, el producto 4-metil-3-hidroxiantranilato (Fawaz & Jones 1988).

La enzima fue aislada por Fawaz y Jones (1988), quienes comprobaron su actividad enzimática y caracterizaron los parámetros cinéticos de la reacción. Sin embargo, el gen no fue aislado ni secuenciado. En este caso, la falta de información disponible en bases de datos la convierte en una alternativa poco factible. Al no disponer de su secuencia, no se pueden realizar modelos por homología ni realizar experimentos con la proteína en el laboratorio. Como consecuencia, se descartó como candidata para la producción de ironas.

7.6.4. L-tirosina-C(3)-metiltransferasa

La LfmM2 es una L-tirosina-C(3)-metiltransferasa (L-TYR-C₃-MT) que forma parte de la vía de síntesis del antibiótico saframicina A, producido por *Streptomyces lavendulae* (Li *et al.* 2008). En particular, esta enzima participa en la síntesis del aminoácido no proteínogénico 3-hidroxi-5-metil-O-metiltirosina (ver Figura 62), metilando el C₃ del ciclo bencénico de la L-tirosina (Fu *et al.* 2009). Aunque la secuencia si se encuentra disponible, esta enzima no ha sido cristalizada y su mecanismo catalítico se desconoce.

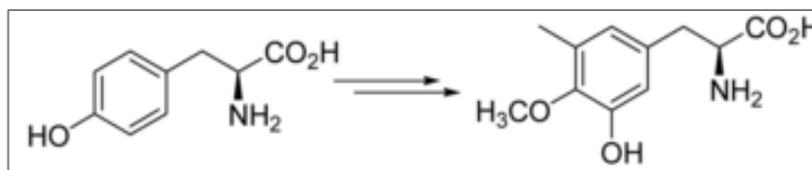


Figura 62: Esquema de la formación de 3-hidroxi-5-metil-O-metiltirosina a partir de L-tirosina. L-TYR-C₃-MT forma parte de esta vía de síntesis (Fu *et al.* 2009).

Se alineó la secuencia contra la base de datos PDB mediante BLASTp y se encontró un candidato con el que es posible realizar un modelo por homología, con una cobertura del 93% y una identidad del 44%. Esta proteína (SibL) de *Streptosporangium sibiricum* es también una C-metiltransferasa, dependiente de SAM, que metila la 3-hidroxiquinurenina (3-HK) (Figura 63), para la síntesis de un antibiótico antitumoral llamado sibiromicina (Chen *et al.* 2015).

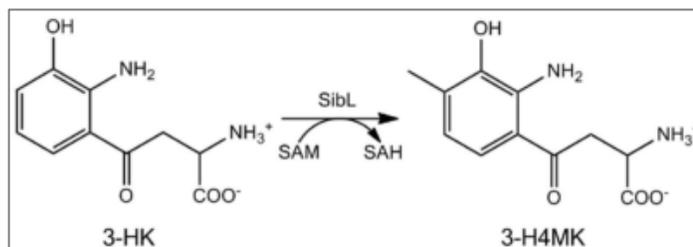


Figura 63: Esquema de la reacción catalizada por SibL de *Streptosporangium sibiricum* (Chen *et al.* 2015).

SibL es un homodímero (Figura 64), con un dominio de unión en el extremo *N*-terminal y uno catalítico con motivo de plegamiento de Rossmann (*Rossmann-fold*) en el *C*-terminal. En el trabajo de Chen *et al.* (2015), se determinó la composición del bolsillo, donde se encuentran los residuos catalíticos y otras zonas relevantes de la enzima, a través de mutagénesis sitio-dirigida y de interacción entre la enzima y ligandos. Además, en este mismo estudio se propuso y respaldó el mecanismo catalítico de la enzima.

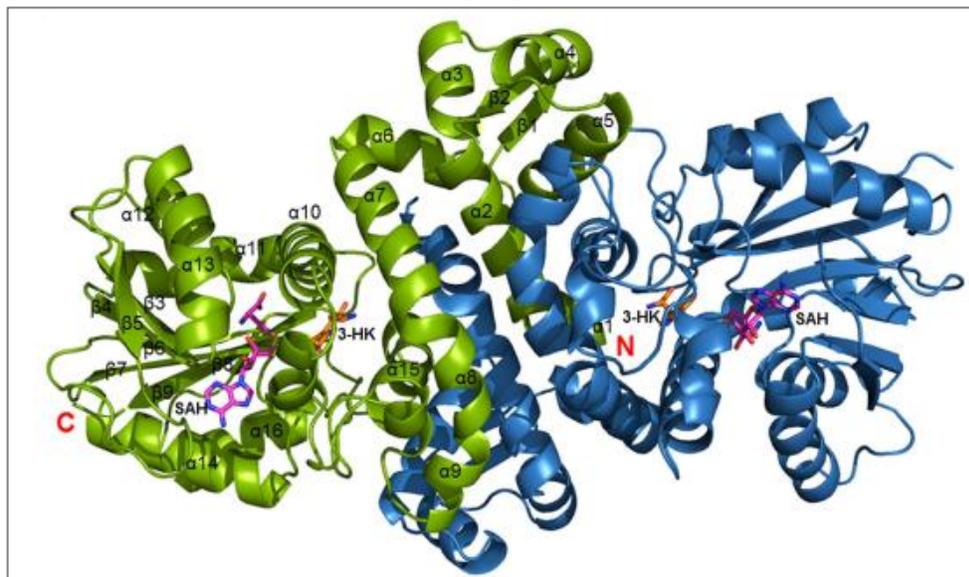


Figura 64: Representación de la estructura de SibL (Chen *et al.* 2015).

Las MT tipo I dependientes de SAM comparten una estructura altamente conservada a pesar de la diferencia en su secuencia aminoacídica (Schubert *et al.* 1998). El alto nivel de identidad (44%), apareamientos positivos (62%), cobertura (93%), similitud entre sustratos, posición de metilación y tamaño de la proteína hacen de SibL un candidato óptimo para la generación de un modelo por homología para SfmM2. En la Figura 65 se muestra el resultado de alineamiento de ambas proteínas, acompañado por la estructura secundaria de SibL.

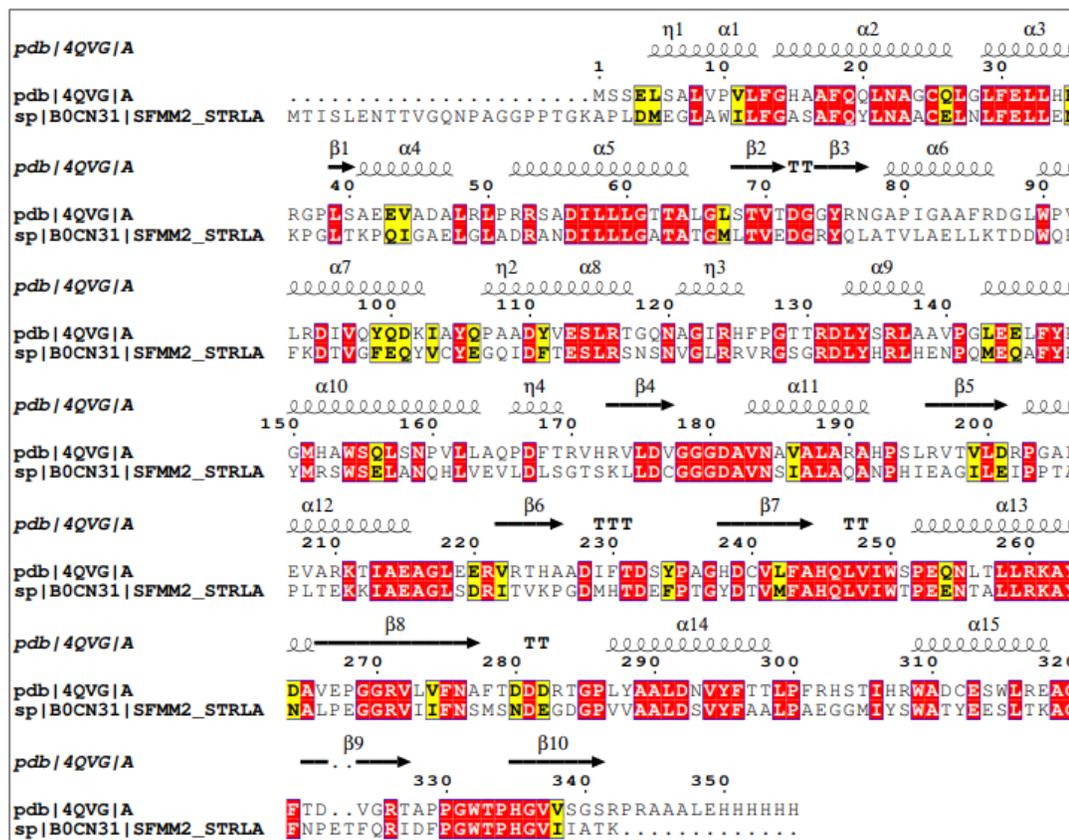


Figura 65: Esquema del alineamiento de secuencias de SibL (arriba) y SfmM2 (abajo). Sobre el alineamiento se muestra la estructura secundaria de SibL, en rojo se indican las identidades y en amarillo se destacan las coincidencias positivas. Elaboración propia a través de ESPrnt 3.0.

7.6.5. Geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa

La enzima geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa (GPP-C₂-MT) forma parte de la vía de síntesis del 2-metilsoborneol (2-MIB), un aroma terroso (Ariyawutthiphan *et al.* 2012). Este compuesto ha sido identificada en agua potable, donde no es deseable, y en quesos como Camembert y Brie, donde se considera una característica positiva (Köksal *et al.* 2012). La reacción desde GPP a 2-MIB se ilustra en la Figura 66.

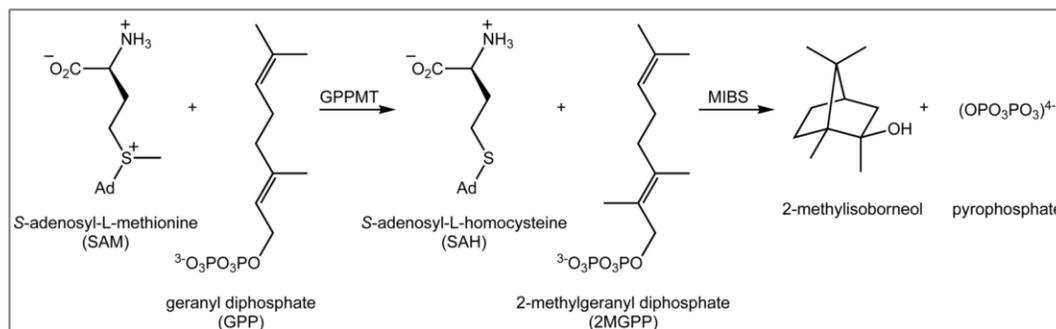


Figura 66: Esquema de la reacción de formación de 2-MIB a partir de GPP mediante la enzima geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa (GPP-C₂-MT) (Köksal *et al.* 2012).

Se han reportado GPP-C₂-MT provenientes de *Streptomyces lasaliensis* (*gdpMT*), *Streptomyces ambofaciens* (*samL0358*) y *Saccharopolyspora erythraea* (*sace_3721*) (Komatsu *et al.* 2008). Además, se cristalizaron las enzimas provenientes de *Streptomyces lasaliensis* (Ariyawutthiphan *et al.* 2012) y *S. coelicolor* (*sco7701*) (Köksal *et al.* 2012). A través de estos trabajos se propuso y avaló el mecanismo catalítico de la enzima mediante el estudio de la estructura, residuos conservados y mutagénesis sitio-dirigida.

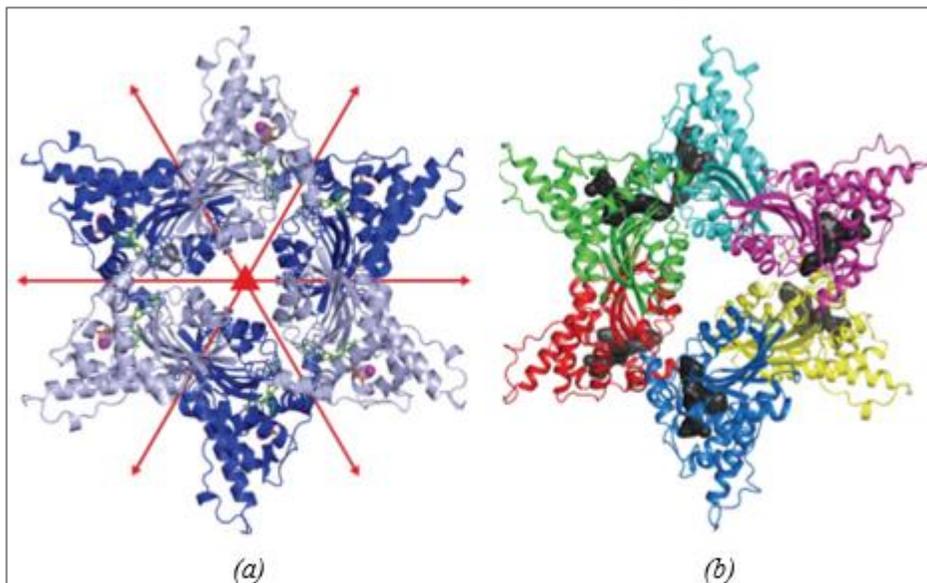


Figura 67: Estructura hexamérica de las geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa *Sco7701* (a) y *GdpMT* (b). Modificado de Köksal *et al.* (2012) y Ariyawutthipan *et al.* (2012).

Ambas estructuras revelaron la típica forma de una C-MT tipo I con plegamiento de Rossmann y un cristal formado por un trímero de dímeros (hexámero). A pesar de esto, existen dos teorías opuestas sobre la forma activa de estas enzimas. Por un lado, Köksal *et al.* (2012) propone que *Sco7701* funciona como monómero; mientras que Ariyawutthipan *et al.* (2012) concluye que *GdpMT* solo se encontraría activa actuando como hexámero. En este último estudio también se reportó un cambio conformacional de la enzima en presencia del sustrato. La coordinación del grupo fosfato de GPP con Mg^{2+} desencadena un giro de 180° de His57, lo que activa el sitio, permitiendo la entrada y el correcto posicionamiento de SAM (Figura 68). Este mecanismo le da especificidad a la enzima, ya que requiere del sustrato correcto para permitir la entrada del donador del grupo metilo

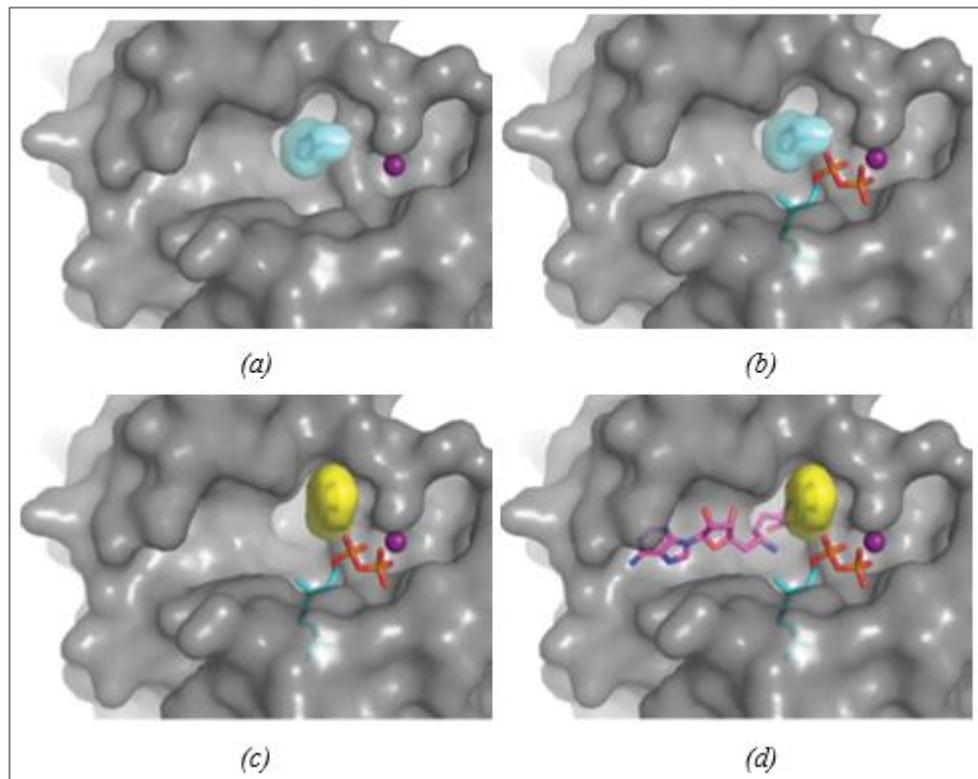


Figura 68: Esquema de la unión de sustrato y cofactor de la enzima geranildifosfato-C(2)-metiltransferasa GdpMT. Mg²⁺ se muestra en color magenta. (a) Forma apo de la enzima con His57 marcada en celeste. (b) Entrada del sustrato GPP. (c) Rotación de His57. (d) Entrada de SAM. Obtenido y modificado de Ariyawutthipan *et al.* (2012).