



Instituto de
Recursos Naturales
y Agrobiología
de Sevilla



CSIC

NUEVAS REACCIONES DE INTERÉS INDUSTRIAL CON PEROXIGENASAS FÚNGICAS

Memoria que presenta:

Andrés Olmedo Mena-Bernal

para optar al título de Doctor en
Ciencias Químicas por la Universidad
de Sevilla

Nuevas reacciones de interés industrial con peroxigenasas fúngicas

Visado en Sevilla, a 13 de Septiembre de 2018

LOS DIRECTORES



Dra. Dña. Ana Gutiérrez Suárez

Investigador Científico del CSIC
IRNAS-CSIC



Dr. D. José C. del Río Andrade

Profesor de Investigación del CSIC
IRNAS-CSIC

EL TUTOR



Dr. D. Fernando de Pablos Pons

Catedrático de la Universidad de Sevilla

Memoria que presenta:



Andrés Olmedo Mena-Bernal

para optar al título de Doctor en
Ciencias Químicas por la Universidad
de Sevilla



DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

CERTIFICA: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Nuevas reacciones de interés industrial con peroxigenasas fúngicas”, presentada por Andrés Olmedo Mena-Bernal para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), bajo la dirección de los Drs. Dña. Ana Gutiérrez Suárez y D. José Carlos del Río Andrade, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis se ha llevado a cabo en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ha sido financiada por los proyectos europeos “Novel and more robust fungal peroxidases as industrial biocatalysts” (PEROXICATS, GA-KBBE-2010-4-265397), “Industrial oxidoreductases” (INDOX, GA-KBBE-2013-7-613549), “New enzymatic oxidation /oxyfunctionalization technologies for added value bio-based products” (EnzOx2, H2020-BBI-PPP-2015-2-1-720297) y el proyecto nacional “Modificación enzimática de lignina y lípidos en las biorrefinerías de la lignocelulosa” (BIORENYMERY, AGL2014-53730-R).

Mi más sincero agradecimiento:

A los Dres. Ana Gutiérrez y José Carlos de Río, directores de esta Tesis, por darme la oportunidad de trabajar en este magnífico grupo y todos los conocimientos, recursos y tiempo dedicados durante el desarrollo de este trabajo, así como su excelente trato personal durante el mismo y la confianza que han depositado en mí en todo momento, una confianza que me ha ayudado a seguir adelante en los momentos más complicados.

Al Prof. Ángel T. Martínez, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid), por su dedicación a los proyectos europeos que han permitido el desarrollo de esta Tesis, su seguimiento de la misma y el esfuerzo dedicado a los trabajos publicados en ella.

Al Prof. Fernando de Pablos Pons, Catedrático de la Universidad de Sevilla, tutor de esta Tesis, por su dedicación y ayuda en la parte burocrática.

A los Dres. Katrin Scheibner, Glenn Gröbe y Jan Kiebitz, de la empresa JenaBios (Jena, Alemania), por suministrar las peroxigenasas de *Marasmius rotula* y *Chaetomium globosum*.

Al profesor Martin Hofrichter (TUDresden) y a la empresa Novozymes N/S por las peroxigenasas de *Agrocybe aegerita* y *Coprinopsis cinerea*, respectivamente.

Al Dr. Frank Hollmann, por la oportunidad de trabajar con él durante mi estancia en las instalaciones de la prestigiosa Universidad Técnica de Delft

(TUDelft) y por las numerosas ocasiones en las que me ha regalado tantas palabras de apoyo e inspiración.

Al grupo de la Universidad Técnica de Delft (TUDelft), Georg, Seb, Jonathan, Morten, Marine, Laura, Milja, Caroline, Florian, Steven, Hanna, Kristina, Guzmán, Wuyuan, Sandy, Gaurav, Sabry, Jia Jia, Yan Ni, Mieke, Remco, Maarten, Marc..., gracias a vosotros he vivido una historia inolvidable, os llevo conmigo.

A mi querida Elena Fernández Fueyo, un bálsamo desde que la conocí, una amiga dentro y fuera del laboratorio, gracias por todo. ¡Siempre nos quedará algún viaje por hacer!

A mi excelente grupo del IRNAS, Antonio, Jorge, Ale, Pepijn, Gisela, Alejandro, y a los que han venido por un tiempo, Carmen Fernández, Duarte, Alessandro, Fabio, Ana, además de Álvaro, nuestro compañero de desayunos, por todo vuestro apoyo y amistad desde que la ciencia nos unió. Especialmente quiero darle las gracias a Esteban, ha sido como un hermano en el laboratorio. Y que te voy a contar, Carmen, gracias por tu amistad y todos los momentos compartidos y por compartir.

A todos mis compañeros de Farmacia y del Colegio, por vuestro apoyo y cercanía incondicional, especialmente a Clara, Ricardo y Lola, que saben bien de qué va esto del doctorado.

A mi familia, mis padres únicos e inigualables, mi hermano, la persona más importante del mundo, tenerte de fondo de pantalla todo este tiempo me ha inspirado cada día la fuerza necesaria las veces que me ha faltado. A mis tíos y primos, ejemplos de esfuerzo y superación, a la abuela Rosario, la abuela Manuela y el abuelo Andrés, por vuestro cariño desde lo alto, a la abuela Encarnita, reflejo del cielo, ejemplo en todo, sois la muestra de que nuestro Dios siempre nos acompaña.

Y a ti...

pregonero, intentando en vano seguir tu ejemplo, se puede llegar algún día a ser un poquito mejor. De tu "Poti", al que sigues mirando y sonriendo como sólo tú has hecho.

ABREVIATURAS

ϵ	Coeficiente de Extinción Molar
Å	Ångström
AaeUPO	Peroxigenasa Inespecífica de <i>Agrocybe aegerita</i>
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
APO	Peroxigenasa Aromática (<i>Aromatic Peroxygenase</i>)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CPO	Cloroperoxidasa (<i>Chloroperoxidase</i>)
CfuCPO	Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>
CraUPO	Peroxigenasa Inespecífica de <i>Coprinellus radians</i>
E	Epóxido
EC	Comisión de Nomenclatura de las Enzimas (<i>Enzyme Commission</i>)
ED	Derivado Epoxidado (<i>Epoxidized Derivative</i>)
FA	Ácido Graso (<i>Fatty Acid</i>)
FAME	Éster Metílico de Ácido Graso (<i>Fatty Acid Metil Ester</i>)
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GC	Cromatografía de Gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
H₂¹⁸O₂	Peróxido de Hidrógeno marcado con oxígeno 18
HRP	Peroxidasa de Rábano (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HTP	Hemo-Tiolato Peroxidasa (<i>Heme-Thiolate Peroxidase</i>)

JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
k_{cat}	Constante Catalítica
K_m	Constante de Afinidad o de Michaelis-Menten
MCD	Monoclorodimedona (<i>Monochlorodimedone</i>)
MroUPO	Peroxigenasa Inespecífica de <i>Marasmius rotula</i>
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
P450	Citocromo p450
P450BM3	Citocromo p450 de <i>Bacillus megaterium</i>
PBD	Base de Datos de Proteínas (<i>Protein Data bank</i>)
PVC	Cloruro de Polivinilo (<i>Polyvinyle Chloride</i>)
rCciUPO	Peroxigenasa Inespecífica Recombinante de <i>Coprinopsis cinerea</i>
rpm	Revoluciones por Minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TMS	Trimetilsililo
TTN	Total Turnover Number
UPO	Peroxigenasa Inespecífica (<i>Unspecific Peroxygenase</i>)

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Reacciones de oxifuncionalización	7
1.2. Oxidorreductasas	10
1.2.1. Citocromos p450 (P450)	12
1.2.2. Oxidorreductasas que actúan con peróxido como aceptor de electrones	17
1.2.2.1. Peroxidasas	17
1.2.2.2. Peroxigenasas	20
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Enzimas	41
3.2. Sustratos	46
3.3. Reacciones enzimáticas	48
3.4. Recuperación de los productos de reacción	49
3.5. Análisis mediante GC-MS	49
4. RESULTADOS GENERALES Y DISCUSIÓN	53
4.1. Hidroxilación terminal de alcanos	54
4.2. Acortamiento de la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos saturados	56
4.3. Epoxidación del doble enlace de ácidos grasos insaturados	59
4.4. Mecanismos de oxigenación	64

5. REFERENCIAS	69
6. PUBLICACIONES	79
6.1. Artículos científicos	79
Publicación 1: A. Olmedo, C. Aranda, J.C. del Río, J. Kiebist, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2016) From alkanes to carboxylic acids: terminal oxigenation by a fungal peroxygenase. <i>Angewandte Chemie International Edition</i> 128, 12436–12439	81
Publicación 2: A. Olmedo, J.C. del Río, J. Kiebist, R. Ullrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2017) Fatty acid chain shortening by a fungal peroxygenase. <i>Chemistry – A European Journal</i> 23, 16985–16989	109
Publicación 3: C. Aranda [‡] , A. Olmedo [‡] , J. Kiebist, K. Scheibner, J. C. del Río, A. T. Martínez, A. Gutiérrez (2018) Selective epoxidation of fatty acids and fatty acid methyl esters by fungal peroxygenases. <i>ChemCatChem</i> DOI: 10.1002/cctc.201800849 ([‡] co-primeros autores)	139
6.2. Patente	177
Patente: Gutiérrez Suárez A., Olmedo Mena-Bernal A., del Río Andrade J.C., Martínez Ferrer A.T. (2017) Process for shortening the hydrocarbon chain of a carboxylic acid by a peroxygenase. EP17382211	175
7. CONCLUSIONES	181

RESUMEN

La presente Tesis plantea el estudio de la oxifuncionalización enzimática de diferentes compuestos alifáticos lineales, principalmente alcanos y ácidos grasos, catalizada por una serie de peroxigenasas fúngicas denominadas peroxigenasas inespecíficas (UPO). Se han estudiado en mayor profundidad las reacciones catalizadas por la peroxigenasa del hongo *Marasmius rotula* (*MroUPO*) y también se han llevado a cabo estudios con la peroxigenasa de *Chaetomium globosum* (*CglUPO*), comparándose con la peroxigenasa salvaje de *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*) y la peroxigenasa recombinante de *Coprinopsis cinerea* (*rCciUPO*). Estas peroxigenasas, descubiertas recientemente, son capaces de oxidar una gran variedad de sustratos orgánicos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como único co-sustrato, presentando además de ésta, otras importantes ventajas frente a los citocromos P450 (P450), las enzimas hidroxilantes más versátiles. La conversión de los diferentes sustratos por las peroxigenasas así como la identificación de los productos de reacción se llevó a cabo mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Finalmente, con objeto de estudiar y verificar el mecanismo de acción de estas reacciones enzimáticas, se llevaron a cabo estudios con peróxido de hidrógeno marcado con el isótopo de oxígeno 18 ($H_2^{18}O_2$).

Los resultados de esta Tesis demuestran que *MroUPO* cataliza la oxifuncionalización selectiva de los sustratos estudiados, revelando importantes y novedosas diferencias con respecto a las otras dos peroxigenasas (*AaeUPO* y *rCciUPO*) estudiadas anteriormente. En estudios previos se había visto que estas dos últimas peroxigenasas catalizan la hidroxilación de ácidos grasos saturados en las posiciones subterminales ($\omega-1$ y $\omega-2$) obteniéndose como productos principales los derivados monohidroxilados en dichas posiciones. Del mismo modo, estas peroxigenasas son capaces de hidroxilar las posiciones subterminales de los alcanos a ambos lados de la cadena hidrocarbonada dando lugar a derivados monohidroxilados (en las posiciones 2 y 3) y dihidroxilados (en las posiciones 2, $\omega-1$; 2, $\omega-2$ y 3, $\omega-2$). Sin embargo, la peroxigenasa *MroUPO*, además de hidroxilar las posiciones subterminales de estos

compuestos alifáticos (alcanos y ácidos grasos saturados), es capaz también de catalizar la hidroxilación terminal de los mismos, dando lugar finalmente a la producción de ácidos dicarboxílicos. Cabe mencionar la importancia de esta reacción debido a la dificultad de producir químicamente la hidroxilación terminal de compuestos alifáticos, así como el interés industrial de los productos finales, los ácidos dicarboxílicos, utilizados como “*building blocks*” o material de partida para la producción de polímeros.

Otra reacción de interés descubierta en esta Tesis es la descarboxilación de ácidos mono- y dicarboxílicos dando lugar a un ácido con un átomo de carbono menos en la cadena hidrocarbonada. Esta reacción de acortamiento de la cadena se inicia con una hidroxilación en el carbono α (adyacente al grupo carboxilo) que tras una nueva hidroxilación da lugar a un *gem*-diol, en equilibrio con el α -cetoácido, que en presencia de peróxido de hidrógeno se descarboxila dando lugar a la formación de un ácido con un carbono menos en la cadena.

Finalmente, esta Tesis también aborda el estudio de las reacciones de oxifuncionalización de ácidos grasos insaturados por peroxigenasas, incluyendo *Mro*UPO y *Cgl*UPO. En estudios previos con las peroxigenasas *Aae*UPO y *rCci*UPO se había observado que estas enzimas se comportaban de igual modo frente a sustratos saturados e insaturados, es decir hidroxilaban las posiciones ω -1 y ω -2 de los ácidos grasos insaturados “ignorando” la presencia del doble enlace. Sin embargo, se observó que *Mro*UPO y *Cgl*UPO catalizan la epoxidación (e hidroxilación en posiciones alílicas) de los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados. Esta reacción es de gran interés industrial ya que los epóxidos de ácidos grasos se utilizan industrialmente para la síntesis de un gran número de compuestos como polioles, glicoles y compuestos olefínicos, estabilizadores para polímeros y plastificantes para el desarrollo de derivados de cloruro de polivinilo (PVC).

En conclusión, en esta Tesis se han descubierto nuevas reacciones catalizadas por las UPOs, como son la hidroxilación terminal de alcanos y ácidos grasos, la descarboxilación de ácidos carboxílicos por *Mro*UPO y la epoxidación de ácidos grasos insaturados por *Mro*UPO y *Cgl*UPO. Aunque

aún queda camino por recorrer para mejorar estas reacciones, los resultados de esta Tesis han contribuido a enriquecer el mundo de la biocatálisis gracias a estas enzimas fúngicas que, secretadas por hongos, sólo necesitan la presencia de H_2O_2 para su funcionamiento.

1. Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reacciones de oxifuncionalización

La búsqueda de métodos químicos para la síntesis orgánica de compuestos de interés industrial es un reto para la investigación, y en los últimos años está adquiriendo cada vez más relevancia. Entre los diversos tipos de reacciones químicas de interés industrial se encuentran las reacciones de oxifuncionalización. Las reacciones de oxifuncionalización son aquellas en las que se introducen átomos de oxígeno en un compuesto orgánico adquiriendo éste una funcionalidad diferente, obteniéndose por tanto productos de múltiples utilidades e intereses. Entre las reacciones de oxifuncionalización de mayor relevancia industrial podemos destacar la hidroxilación de compuestos aromáticos para su utilización como herbicidas y precursores de fármacos (Ullrich and Hofrichter, 2005; Ullrich and Hofrichter, 2007; Kinne et al., 2008), la síntesis de alcoholes a partir de alcanos (Bordeaux et al., 2012), la obtención de aromas, fragancias, insecticidas y solventes mediante la oxidación de terpenos (Fuchs and Schwab, 2013), la oxidación del ciclohexano a ciclohexanona, ampliamente utilizada como solvente orgánico y para la producción de Nylon y Perlón (Peter et al., 2014) o la producción de epóxidos y alcoholes secundarios ópticamente puros, utilizados como “building blocks” para la obtención de productos de química fina, aromas y moléculas bioactivas, como productos farmacéuticos y antibióticos (Kluge et al., 2012; Peter et al., 2013).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, para que estas reacciones sean rentables industrialmente se requiere el uso de catalizadores que aceleren las mismas. Los catalizadores químicos son ampliamente utilizados, de hecho, en las últimas décadas han tenido lugar grandes avances en la catálisis mediada por metales de transición y en la organocatálisis. Sin embargo, estos catalizadores presentan ciertas desventajas frente a los catalizadores enzimáticos (Hollmann et al., 2011). Los biocatalizadores son sustancias que aceleran las reacciones químicas que se producen en los seres vivos quedando inalteradas tras el proceso. Lo hacen reduciendo la energía necesaria para llegar a un estado de activación en el cual los enlaces de los sustratos se encuentran debilitados. Estos catalizadores

1. Introducción

aceleran la velocidad de la reacción, la cual es normalmente varios órdenes de magnitud mayor que la reacción sin catalizar e incluso catalizada químicamente.

Las enzimas encargadas de procesos metabólicos o de detoxificación suelen tener un amplio rango de sustratos y son bastante estereoespecíficas, las reacciones que catalizan dan lugar a menos productos secundarios, son reacciones fácilmente regulables y por lo general se consideran menos perjudiciales para el medio ambiente debido a las condiciones suaves de temperatura, pH y presión en las que se desarrollan y a la naturaleza biodegradable de los catalizadores (Torrelo et al., 2015).

Estas ventajas hacen que la oxifuncionalización catalizada por enzimas adquiera una importancia creciente en enzimología y en química orgánica (Bormann et al., 2015), de hecho, la biocatálisis de oxidoreducción abarca un tercio de todos los procesos enzimáticos comercializados, y de ésta, la mitad aproximadamente es oxidación (Liese et al., 2006; Hollmann et al., 2011). Entre las reacciones de oxifuncionalización industriales biocatalizadas, un 40% pertenece a reacciones de hidroxilación, seguida de la oxidación de alcoholes y aminas (22%), la epoxidación (14%) y la dihidroxilación (14%), quedando un 5% para desaturación y otro 5% para la oxidación Baeyer-Villiger (Hollmann et al., 2011). Los biocatalizadores más utilizados para llevar a cabo estas reacciones tanto en la industria farmacéutica como en la química son las oxidorreductasas (Fuchs and Schwab, 2013). Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>), que clasifica a las enzimas asignándoles un número EC (Enzyme Commission), éstas se dividen en seis grandes grupos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Clasificación de las enzimas según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

EC	Nombre	Reacción	Ejemplo
EC 1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidación y reducción por transferencia de electrones o átomos de hidrógeno y oxígeno de un sustrato a otro	$ROH + O_2 \rightarrow RHO + H_2O_2$
EC 2	Transferasas	Catalizan la transferencia de un grupo funcional de un sustrato a otro	$AB + C \longrightarrow A + BC$
EC 3	Hidrolasas	Catalizan la hidrólisis de un sustrato con formación de dos productos.	$AB + H_2O \longrightarrow AOH + BH$
EC 4	Liasas	Catalizan la escisión de enlaces C-C, C-O, C-N, C-S y otros enlaces sin que haya oxidación o hidrólisis	$RCOCO_2H \rightarrow RCOH + CO_2$
EC 5	Isomerasas	Catalizan cambios internos en la molécula	$ABC \longrightarrow BCA$
EC 6	Ligasas	Catalizan la unión de dos moléculas mediante la formación de enlaces como C-C, C-O, C-N, C-S con la hidrólisis simultánea del enlace difosfato del ATP o de otro trifosfato similar	$A+B+ATP \longrightarrow AB+ADP+P$

A continuación se describen en detalle las oxidoreductasas, que son las enzimas que catalizan las reacciones de oxifuncionalización, así como un tipo particular de las mismas, las peroxigenasas, que son el objeto de estudio en esta Tesis.

1.2. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son un grupo muy amplio de enzimas distribuidas entre los organismos microbianos, vegetales y animales, que catalizan el intercambio de electrones o equivalentes redox entre moléculas donadoras yceptoras de los mismos. Dichas reacciones involucran la transferencia de un electrón, la abstracción de un protón, la extracción de un hidrógeno, la transferencia de un hidruro o la inserción de oxígeno. Normalmente tienen lugar dos semi-reacciones, una de oxidación y otra de reducción, siendo activados y/o transformados al menos dos sustratos, uno que se oxida y otro que se reduce (Xu, 2005).

El interés de estas enzimas está relacionado con diversas aplicaciones de las mismas, incluyendo **a)** Aplicaciones técnico-industriales, como la transformación de materiales lignocelulósicos, la derivatización de carbohidratos o su uso como detergente o en la industria textil; **b)** Aplicaciones en la industria alimentaria; **c)** Aplicaciones medioambientales, como la biodetoxificación de pesticidas; **d)** Biosensores, para la detección de O₂; **e)** Síntesis orgánica, como la transformación de una gran variedad de moléculas alifáticas y aromáticas, o la funcionalización de hidrocarburos mediante reacciones que pueden ser regio-, enantio-, enantiotopo- y quimioselectivas; y **f)** Aplicaciones médicas como desinfectante entre otras muchas (Xu, 2005).

Según el NC-IUBMB mencionado anteriormente, las oxidorreductasas (EC 1), se dividen en 24 subclases dependiendo del tipo de reacción que catalizan (**Tabla 1.2**).

La mayoría de las oxidorreductasas requieren cofactores, es decir, componentes no proteicos de bajo peso molecular necesarios para su funcionamiento. Los cofactores pueden ser inorgánicos u orgánicos. Estos últimos, cuando están unidos covalentemente a la apoproteína (parte proteica de la enzima) se denominan grupos prostéticos, como el grupo hemo. Por otro lado, hay otro tipo de cofactores que se unen con menos afinidad a la apoproteína, llamados coenzimas, como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) (Torres Pazmiño et al., 2010).

Tabla 1.2. Clasificación de las oxidorreductasas dependiendo de la reacción que catalizan según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

EC 1	Oxidorreductasas
EC 1.1	Actúan con grupos CH-OH como dadores
EC 1.2	Actúan con grupos aldehído o cetona como dadores
EC 1.3	Actúan con grupos CH-CH como dadores
EC 1.4	Actúan con grupos CH-NH ₂ como dadores
EC 1.5	Actúan con grupos CH-NH como dadores
EC 1.6	Actúan sobre NADH o NADPH
EC 1.7	Actúan con otros grupos nitrogenados como dadores
EC 1.8	Actúan con grupos de azufre como dadores
EC 1.9	Actúan con grupos hemo como dadores
EC 1.10	Actúan con difenoles o compuestos relacionados como dadores
EC 1.11	Actúan con un peróxido como aceptor
EC 1.12	Actúan con hidrógeno como dador
EC 1.13	Actúan con un dador con la incorporación de oxígeno molecular
EC 1.14	Actúan con dos dadores con la incorporación o reducción de oxígeno molecular
EC 1.15	Actúan con un superóxido como aceptor
EC 1.16	Actúan oxidando iones metálicos
EC 1.17	Actúan sobre grupos CH o CH ₂
EC 1.18	Actúan con proteínas de hierro-azufre como dadores
EC 1.19	Actúan con flavodoxina reducida como dador
EC 1.20	Actúan sobre fósforo o arsénico en dadores
EC 1.21	Actúan sobre la reacción $XH + YH = XY$
EC 1.22	Actúan sobre halógenos en dadores
EC 1.23	Actúan reduciendo el grupo C-O-C como aceptor
EC 1.97	Otras oxidorreductasas

Se muestran los principales grupos dadores y aceptores de electrones implicados en las diferentes reacciones (en negrita los dos grupos de mayor interés para el desarrollo de esta Tesis).

1. Introducción

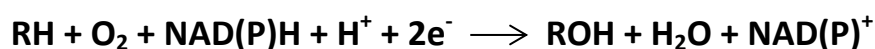
Los citocromos P450 (P450), la mayoría de los cuales están incluidos en el subgrupo EC 1.14 (**Tabla 1.2**), pertenecen al primero de los dos tipos de oxidorreductasas sobre las que se profundiza a continuación, siendo un buen ejemplo de las enzimas que requieren estos cofactores y además están distribuidas por todos los reinos biológicos catalizando una gran variedad de reacciones de oxidación. El segundo es un grupo de enzimas descubiertas recientemente (Ullrich et al., 2004), las llamadas peroxigenasas inespecíficas (*unspecific peroxygenases*, UPOs), que no requieren de los cofactores mencionados anteriormente, incluidas en el subgrupo EC 1.11 (oxidorreductasas que actúan con peróxido como aceptor de electrones) (**Tabla 1.2**).

1.2.1. Citocromos P450 (P450) (EC 1.14.x)

La mayoría de los P450 pertenecen a la clase principal de oxidorreductasas EC 1, concretamente a la que actúa con dos dadores de electrones incorporando o reduciendo oxígeno molecular (EC 1.14.x), aunque hay algunas excepciones, en la clase principal de isomerasas y liasas (EC 5.3.x y EC 4.2.x) (Degtyarenko, 2004).

Los P450 representan una de las superfamilias de proteínas enzimáticas más amplias y antiguas. Los genes que codifican estas enzimas están presentes en todos los reinos biológicos (Hannemann et al., 2007). Los P450 son pigmentos rojos que contienen grupo hemo, el cual unido a monóxido de carbono y posteriormente reducido, forma un complejo Fe^{2+} -CO que exhibe un máximo de absorción a una longitud de onda de 450 nm, a lo cual deben su nombre (Omura y Sato, 1964).

La reacción de oxidación más común de los P450 es la monooxigenación de un sustrato, siguiendo la siguiente reacción:



donde RH es el sustrato y ROH el sustrato monooxigenado. Por tanto, un átomo de oxígeno se incorpora al sustrato mientras el otro átomo se reduce a H₂O (Lewis, 2001). Dos electrones son suministrados al P450 por el NAD(P)H mediante una flavoproteína de oxidación-reducción (como la P450 reductasa) y en algunos casos una proteína de hierro-azufre (ferredoxina).

En cuanto a su estructura, los P450 son proteínas hemotiolato que contienen el grupo prostético hemo (hierro protoporfirina IX, hemo b) que consiste en un macrociclo simétrico altamente conjugado, coordinado con un átomo de hierro (Sono et al., 1996) (**Figura 1.1**).

El grupo hemo es idéntico al que se encuentra en la hemoglobina y en las hemoperoxidasas como la cloroperoxidasa (CPO) o la peroxidasa de rábano (HRP), aunque el ligando proximal varía entre ellas. En los P450 y en general en las proteínas hemotiolato, el átomo de hierro está coordinado con seis ligandos, cuatro de los cuales son átomos de nitrógeno del anillo plano de porfirina. El ligando proximal (quinto) es un azufre de un residuo de cisteína y el distal (sexto) una molécula de agua que se desplaza al unirse el sustrato al centro activo (Mueller et al., 1995). El hemo reside en un espacio hidrofóbico en el centro activo, cuyo lado distal está alineado con residuos de aminoácidos hidrofóbicos capaces de acoplar un sustrato.

Los P450 catalizan una enorme diversidad de reacciones metabólicas. En los seres vivos cumplen de forma general dos papeles fundamentales. Algunos catalizan procesos de oxidación involucrados en la biosíntesis o biodegradación de compuestos endógenos, mientras que un segundo grupo se encarga de la biotransformación oxidativa de sustancias exógenas, facilitando su eliminación del organismo (Mansuy, 1998). Se encuentran involucrados en la biotransformación de medicamentos, xenobióticos, metabolismo de carcinógenos químicos, biosíntesis de compuestos fisiológicos (esteroides, ácidos grasos, eicosanoides, vitaminas liposolubles y ácidos biliares), y en la conversión de alcanos, terpenos y compuestos aromáticos, así como en la degradación de herbicidas e insecticidas (Bernhardt, 2006).

1. Introducción

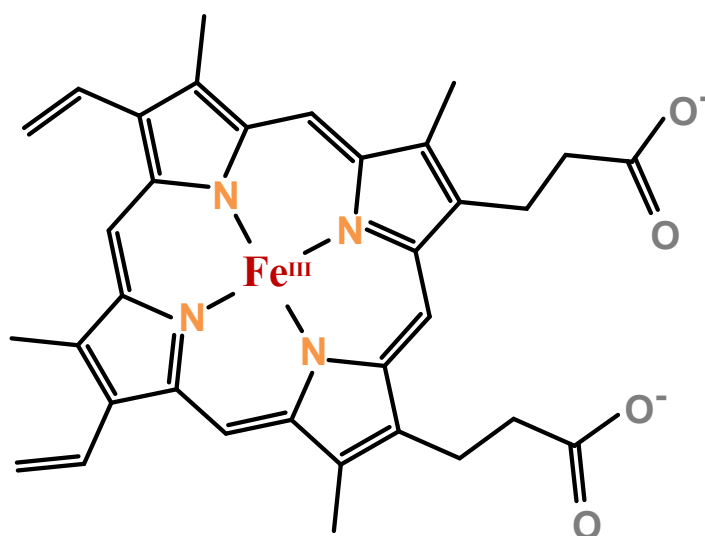


Figura 1.1. Estructura del grupo prostético hemo (complejo de hierro-protoporfirina IX, hemo b). Adaptado de Sono et al., (1996).

La mayoría de los P450 de organismos eucariotas son proteínas unidas a membrana, expresadas en la membrana del retículo endoplásmico de plantas, hongos y animales (estos últimos también las expresan en la membrana interna de las mitocondrias), y están principalmente involucradas en reacciones de biosíntesis y detoxificación (Williams et al., 2000). Por otro lado, los P450 bacterianos están implicados en el metabolismo del carbono (Fulco, 1991) y son enzimas solubles no unidas a membrana, lo cual facilita su expresión y purificación (Munro & Lindsay, 1996). La primera enzima con autosuficiencia para la actividad P450 reductasa (flavoproteína que en este caso está fusionada a la hemoproteína) se encontró en *Bacillus megaterium* y se nombró P450BM3 (CYP102A2) (Warman et al., 2005). Debido a estas características, esta enzima de gran capacidad hidroxilante, se evolucionó genéticamente mediante ingeniería de proteínas para la oxidación de alcanos, terpenos,

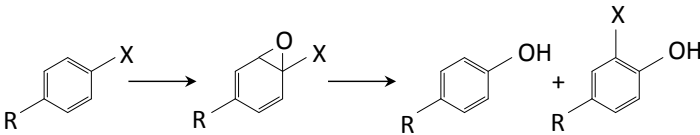
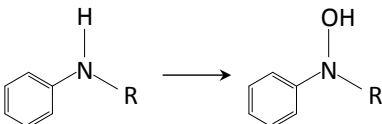
compuestos heteroaromáticos, alcaloides, esteroides y otros compuestos, mediante reacciones de hidroxilación, epoxidación o desalquilación (Jung et al., 2011).

Por tanto, la diversidad de reacciones que los P450 son capaces de catalizar es enorme incluyendo hidroxilaciones, *N*-, *O*- y *S*-desalquilaciones, sulfoxidaciones, epoxidaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones, peroxidaciones, reducciones, deshidrataciones e isomerizaciones (Bernhardt, 2006; Guengerich, 2001). En la **Tabla 1.3** se muestran diferentes tipos de reacciones de monooxigenación de los citocromos P450 (Poraj-Kobielska M, 2013).

Los citocromos P450 presentan una versatilidad catalítica muy amplia, aunque por el contrario también una serie de desventajas como biocatalizadores de elección para reacciones de interés industrial, como el hecho de ser intracelulares, por tanto poco estables, difíciles de aislar, purificar y la necesidad de cofactores y enzimas auxiliares para su funcionamiento (Hofrichter & Ullrich, 2014).

1. Introducción

Tabla 1.3. Principales reacciones de monooxigenación catalizadas por los citocromos P450. Adaptado de Poraj-Kobielska M, (2013) y Sono et al., (1996).

Reacción	Esquema
Hidroxilación de hidrocarburos	$\text{>CH} \longrightarrow \text{>C-OH}$
Epoxidación de alquenos	$\text{>C=C<} \longrightarrow \text{>C(O)-C<}$
Oxigenación de alquinos	$\text{R-C}\equiv\text{CH} \longrightarrow \left[\text{R-CH=C=O} \right] \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{R-CH}_2\text{-C(=O)OH}$
Epoxidación e Hidroxilación de aromáticos	
O-Desalquilación	$\text{R-O-CH}_3 \rightarrow \left[\text{R-O-CH}_2\text{-OH} \right] \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{C=O}$
N-Desalquilación	$\text{R-NH-CH}_3 \rightarrow \left[\text{R-NH-CH}_2\text{-OH} \right] \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{H}_2\text{C=O}$
S-Desalquilación	$\text{R-S-CH}_3 \rightarrow \left[\text{R-S-CH}_2\text{-OH} \right] \rightarrow \text{R-SH} + \text{H}_2\text{C=O}$
N-Hidroxilación	
S-Oxidación	$\text{S} \begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}^1 \end{matrix} \longrightarrow \text{O}^-\text{-S}^+ \begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}^1 \end{matrix}$
Oxidación de aldehídos	$\text{R-C} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{O} \end{matrix} \longrightarrow \text{R-C} \begin{matrix} \text{OH} \\ \text{O} \end{matrix}$
Desaminación oxidativa	$\text{R-CH} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-CH}_2\text{-OH} \rightarrow \left[\text{R-CH} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-CH}_2\text{-OH} \right] \rightarrow \text{R-C(=O)-CH}_2\text{-OH} + \text{NH}_3$
Deshalogenación oxidativa	$\text{R-CH} \begin{matrix} \text{R}^1 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-X} \rightarrow \left[\text{R-CH} \begin{matrix} \text{R}^1 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-X} \right] \rightarrow \text{R-C(=O)-R}^1 + \text{HX}$
Oxidación de alcoholes	$\text{R-CH} \begin{matrix} \text{R}^1 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-OH} \rightarrow \left[\text{R-CH} \begin{matrix} \text{R}^1 \\ \text{OH} \end{matrix} \text{-OH} \right] \rightarrow \text{R-C(=O)-R}^1 + \text{H}_2\text{O}$

1.2.2. Oxidorreductasas que actúan con peróxido como aceptor de electrones (EC 1.11.x)

Existen dos tipos de enzimas en este grupo de oxidorreductasas (EC 1.11) (**Tabla 1.2**), las peroxidasas (EC 1.11.1) y las peroxigenasas (EC 1.11.2). Las primeras catalizan preferentemente oxidaciones que involucran la transferencia de un electrón sin intercambio de oxígeno. Las segundas incorporan un oxígeno del aceptor (peróxido) al sustrato (Hofrichter et al., 2015).

1.2.2.1. Peroxidasas (EC 1.11.1.x)

Las peroxidasas son enzimas secretadas, presentes en todos los reinos, que usan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidroperóxidos orgánicos (R-OOH) como co-sustratos aceptores de electrones. En general, durante el ciclo catalítico de una hemoperoxidasa dos moléculas de sustrato se oxidan por abstracción de un electrón (sin transferencia de oxígeno) mientras que se consume una molécula de H_2O_2 y se producen dos de agua (Hofrichter & Ullrich, 2007).

Las peroxidasas catalizan oxidaciones de abstracción de un electrón que resulta en la formación de radicales libres (ej. radicales de cationes fenoxilo y arilo), cationes reactivos (ej. Mn^{3+}) o aniones (ej. OCl^-) que están involucrados en la degradación de la lignina y sustancias húmicas, la oxidación de compuestos tóxicos y en reacciones inespecíficas de defensa. Además, algunas peroxidasas pueden catalizar oxidaciones de dos electrones junto con reacciones de transferencia de oxígeno (actividad peroxigenasa), guardando semejanzas con las monooxigenasas previamente descritas (Hofrichter & Ullrich, 2010). Según el NC-IUBMB que clasifica atendiendo al tipo de reacción que catalizan, las peroxidasas se dividen en 23 tipos diferentes (**Tabla 1.4**).

1. Introducción

Tabla 1.4. Clasificación de las peroxidadas (EC 1.11.1.x) dependiendo de la reacción que catalizan según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

EC 1.11.1	Peroxidasas	Organismo
EC 1.11.1.1	NADH peroxidasa	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
EC 1.11.1.2	NADPH peroxidasa	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
EC 1.11.1.3	Ácido graso peroxidasa	<i>Arachis hypogaea</i>
EC 1.13.11.11	Triptófano 2,3 dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i>
EC 1.11.1.5	Citocromo c peroxidasa	<i>Saccharomyces cerevesiae</i>
EC 1.11.1.6	Catalasa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	<i>Armoracia rusticana</i>
EC 1.11.1.8	Yoduro peroxidasa	<i>Ascophyllum nodosum</i>
EC 1.11.1.9	Glutation peroxidasa	<i>Mammalia</i>
EC 1.11.1.10	Cloro peroxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato peroxidasa	<i>Pisum sativum</i>
EC 1.11.1.12	Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa	<i>Sus scrofa</i>
EC 1.11.1.13	Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
EC 1.11.1.15	Peroxirredoxina	<i>Haemophilus influenzae</i>
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	<i>Pleurotus eryngii</i>
EC 1.11.1.17	Glutatión peroxidasa dependiente de amida	<i>Marichromatium gracile</i>
EC 1.11.1.18	Bromuro peroxidasa	<i>Corallina pilulifera</i>
EC 1.11.1.19	Peroxidasa decolorante	<i>Geotrichum candidum</i>
EC 1.11.1.20	Prostamida/prostaglandina F2 alfa sintasa	<i>Mus musculus</i>
EC 1.11.1.21	Catalasa-peroxidasa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
EC 1.11.1.22	Hidroperóxido ácido graso reductasa	<i>Synechocystis PDD6803</i>
EC 1.11.1.23	Ácido (S)-2-hidroxiopropilfosfónico epoxidasa	<i>Streptomyces wedmorensis</i>

Sin embargo, las peroxidasas pueden aceptar diversos tipos de donadores de electrones y usar diferentes modos catalíticos de oxidación (ej. oxidación de un electrón vs. dos electrones). La definición de la reacción de EC 1.11.1.7 es muy amplia y de hecho englobaría todos los tipos de peroxidasas:



Por tanto, es razonable clasificarlas atendiendo además a otros factores, preferiblemente a las propiedades derivadas de su estructura (Hofrichter et al., 2010). Existen cinco superfamilias de peroxidasas que no contienen grupo hemo, y seis superfamilias que lo contienen. Estas seis últimas son **a)** peroxidasas-ciclooxigenasas (anteriormente animal o mamífero peroxidasas), **b)** catalasas, **c)** la di-hemo citocromo c peroxidasa, **d)** peroxidasas no animales o vegetales que dependiendo de la secuencia, el organismo hospedador y la función fisiológica, se dividen en tres clases, Clase I (peroxidasas intracelulares y/o bacterianas), Clase II (peroxidasas fúngicas secretadas incluyendo peroxidasas que modifican la lignina) y Clase III (peroxidasas secretadas de plantas involucradas en la biosíntesis de la lignina), **e)** hemo-tiolato peroxidasas (HTP) y **f)** peroxidasas decolorantes (Hofrichter et al., 2010).

El grupo prostético hemo de las hemoperoxidasas tiene un grupo protoporfirina IX con el átomo de hierro formando seis enlaces de la misma forma que en los P450, salvo que en este caso el quinto enlace es un enlace coordinado con el nitrógeno de un residuo de histidina, que sirve como catalizador ácido-base en la reacción ente el H₂O₂ y la enzima (Yarman et al., 2012; Bordeaux et al., 2012).

Sin embargo, en el caso de las HTP, el residuo es de cisteína de la misma forma que en los P450. En este grupo encontramos la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (*CfuCPO*) (EC 1.11.1.10), descubierta en 1959 (Shaw & Hager, 1959) y enzima de elección para oxidaciones realizadas con peróxido y oxifuncionalización química (Hollmann et al., 2011). Debido

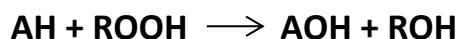
1. Introducción

a su estructura, también se incluyen en esta familia las peroxigenasas (EC 1.11.2), que se describen más adelante. *CfuCPO* es comercial y su principal actividad es la oxidación de cloruro (Cl^-) a ácido hipocloroso, que a su vez es un oxidante fuerte y puede clorar compuestos orgánicos (Hofrichter et al., 2010). Cataliza la cloración, bromación, y yodación (no fluoración) inespecífica de varios sustratos orgánicos electrofílicos vía ácido hipohaloso. Además de la halogenación, cataliza reacciones de *N*-desalquilación, oxidación de grupos amino a nitroso, epoxidación de olefinas, hidroxilaciones bencílicas y propargílicas, oxidación de alcoholes y aldehídos y sulfoxidaciones, así como reacciones de peroxidasa clásica (oxidación de un electrón del fenol); sin embargo, los anillos aromáticos no son susceptibles de la transferencia de oxígeno catalizada por CPO. En ausencia de haluros y sustratos orgánicos se observa actividad catalasa rompiendo el H_2O_2 en agua y dióxigeno (Hofrichter & Ullrich, 2006).

1.2.2.2. Peroxigenasas (EC 1.11.2.x)

Las peroxigenasas son proteínas hemo-tiolato extracelulares que catalizan reacciones de oxidación mediante la transferencia de oxígeno del aceptor de electrones (peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos) al sustrato.

La reacción puede simplificarse de la siguiente forma:



donde AH es el sustrato y ROOH el peróxido, R representa un sustituyente orgánico o hidrógeno, AOH el producto hidroxilado y ROH el peróxido reducido o agua (Hofrichter et al., 2015).

Según la clasificación NC-IUBMB, las peroxigenasas se dividen en 5 tipos diferentes (**Tabla 1.5**).

Tabla 1.5. Clasificación de las peroxigenasas (EC 1.11.2.x) dependiendo de la reacción que catalizan, según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

EC 1.11.2	Peroxigenasas	Organismo
EC 1.11.2.1	Peroxigenasa inespecífica	<i>Agrocybe aegerita</i>
EC 1.11.2.2	Mieloperoxidasa	<i>Mus musculus</i>
EC 1.11.2.3	Peroxigenasa de semillas	<i>Arabidopsis thaliana; Avena sativa</i>
EC 1.11.2.4	Ácido graso peroxigenasa	<i>Bacillus subtilis</i>
EC 1.11.2.5	3-Metil-L-tirosina peroxigenasa	<i>Streptomyces lavendulae</i>

Entre las peroxigenasas, destacan las peroxigenasas inespecíficas (UPOs, de “unspecific peroxygenases”), que son el objeto de estudio de esta Tesis y que se describen en detalle en el apartado siguiente.

1.2.2.2.1. Peroxigenasas inespecíficas (UPOs) (EC 1.11.2.1)

Este grupo de enzimas comprende una serie de proteínas extracelulares secretadas por hongos, con estructura hemotiolato y cuyo primer ejemplar fue descrito recientemente como una haloperoxidasa del hongo basidiomiceto *Agrocybe aegerita* (seta del chopo) (Ullrich et al., 2004). Las haloperoxidasas comprenden una serie de enzimas peroxidadas capaces de halogenar (brominar, clorar y yodar) ciertos sustratos y oxidar algunos haluros entre otras de sus reacciones. Los primeros estudios sobre la proteína de *Agrocybe aegerita* probaron una fuerte actividad de bromación (aunque débil cloración e iodación) de esta peculiar enzima. Además de halogenar la monoclorodimedona (MCD) (sustrato específico de CPO, aunque con menor actividad que ésta), también demostró ser capaz de oxidar algunos haluros (Cl^- , Br^- y I^-) aunque muy débilmente, así como alcoholes aromáticos, estos últimos con mayor actividad que CPO (Ullrich et al., 2004 y Ullrich et al., 2005). Debido a su habilidad para

1. Introducción

transferir oxígeno hidroxilando el naftaleno y otros compuestos aromáticos, sería clasificada poco después como una peroxigenasa aromática (APO). Finalmente, tras observarse su capacidad para catalizar también la hidroxilación de compuestos alifáticos, adquiere el nombre definitivo de peroxigenasa inespecífica (Gutiérrez et al., 2011; Peter et al., 2011; Hofrichter et al., 2015). Esta enzima sería más adelante cristalizada por el grupo del Prof. Klaus Piontek, de la Universidad de Freiburg, Alemania (Piontek et al., 2013) (**Figura 1.2**). Se trata de una proteína de 45 kDa muy glicosilada (20-40% de carbohidratos) con el grupo prostético hemo b unido a la cisteína, al igual que en la CPO y los P450, compartiendo con ellas algunas secuencias homólogas y propiedades catalíticas, aunque a diferencia de los citocromos, es extracelular y sólo requiere la presencia de H_2O_2 para las reacciones de transferencia de oxígeno (Hofrichter & Ullrich, 2014) (**Figura 1.3**).

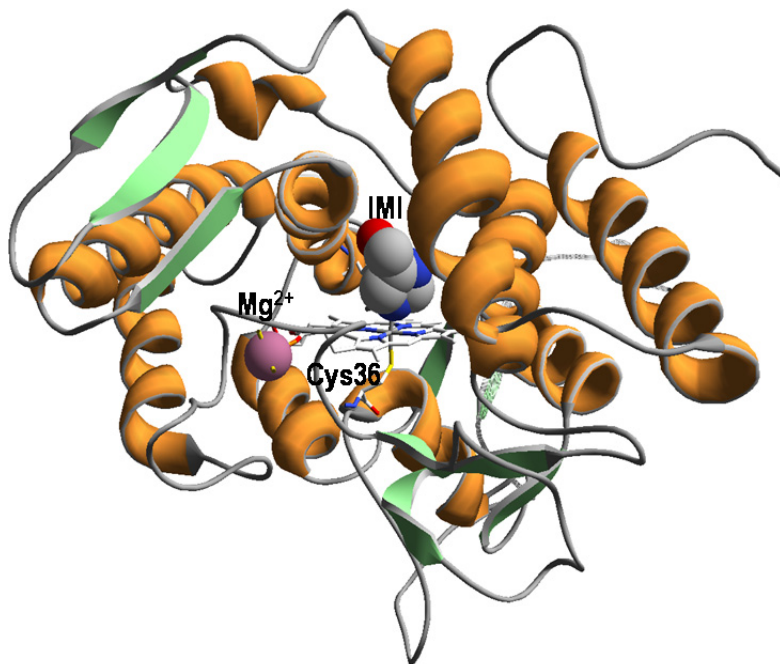


Figura 1.2. Estructura molecular tipo cinta de la peroxigenasa de *Agrocybe aegerita* (hélices en naranja y láminas β en verde) incluyendo el cofactor hemo en el centro y su ligando Cys36 (ambos como barras CPK coloreadas), una molécula de sustrato, (IMI, 2/5-hidroximetilimidazol, como esferas CPK coloreadas), y un ion Mg^{2+} (esfera rosa). Obtenido de PDB 2YOR.

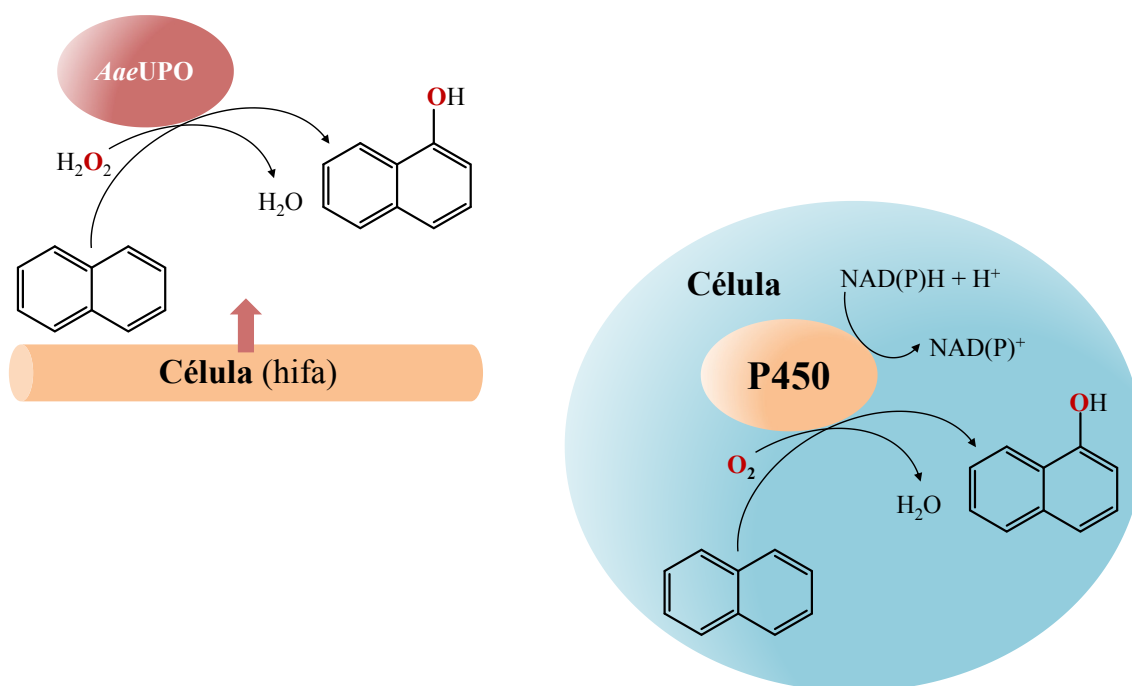


Figura 1.3. Esquema de la reacción de hidroxilación del naftaleno por la peroxigenasa de *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*, izquierda) y la monooxigenasa intracelular del citocromo P450 (derecha). Adaptado de Ullrich & Hofrichter, (2005).

De la misma forma funciona la segunda UPO descubierta (*CraUPO*), en el hongo *Coprinellus radians*, mostrando también una fuerte capacidad de bromación y débil cloración, además de oxidación del naftaleno, alcoholes aromáticos y oxidación débil del bromuro (Ahn et al., 2007 y Aranda et al., 2009). Posteriormente se descubrió la UPO de *Marasmius rotula* (*MroUPO*) (seta de molinillo), hongo subtropical de bosques caducos que crece en madera muerta, ramitas y hojas podridas. Esta enzima de 32 kDa no es capaz de oxidar los haluros y muestra menor actividad oxigenando los anillos aromáticos que *AaeUPO*, aunque mayor capacidad para oxidar sustratos voluminosos (Gröbe et al., 2011). Más tarde se obtuvo la UPO recombinante del hongo *Coprinopsis cinerea* (*rCciUPO*) expresada en *Aspergillus oryzae* (Babot et al., 2012) y posteriormente la peroxigenasa del ascomiceto *Chaetomium globosum* (*CglUPO*) (Kiebish et al., 2017).

Un análisis reciente de las secuencias de las UPOs revela la existencia de dos grandes grupos. El primero (“UPOs cortas”) comprende proteínas con

1. Introducción

un promedio de masa molecular de 29 kDa que están presentes en todas las divisiones de hongos mientras que el segundo (“UPOs largas”) (44 kDa) sólo se encuentra en basidiomicetos y ascomicetos. CPO, *Mro*UPO y *Cg*/UPO pertenecen al primer grupo y *Aae*UPO, *Cra*UPO y *rCci*UPO al segundo (Hofrichter et al., 2015). En la **Figura 1.4** se muestra un esquema del árbol filogenético de las secuencias de las UPOs y las HTP.

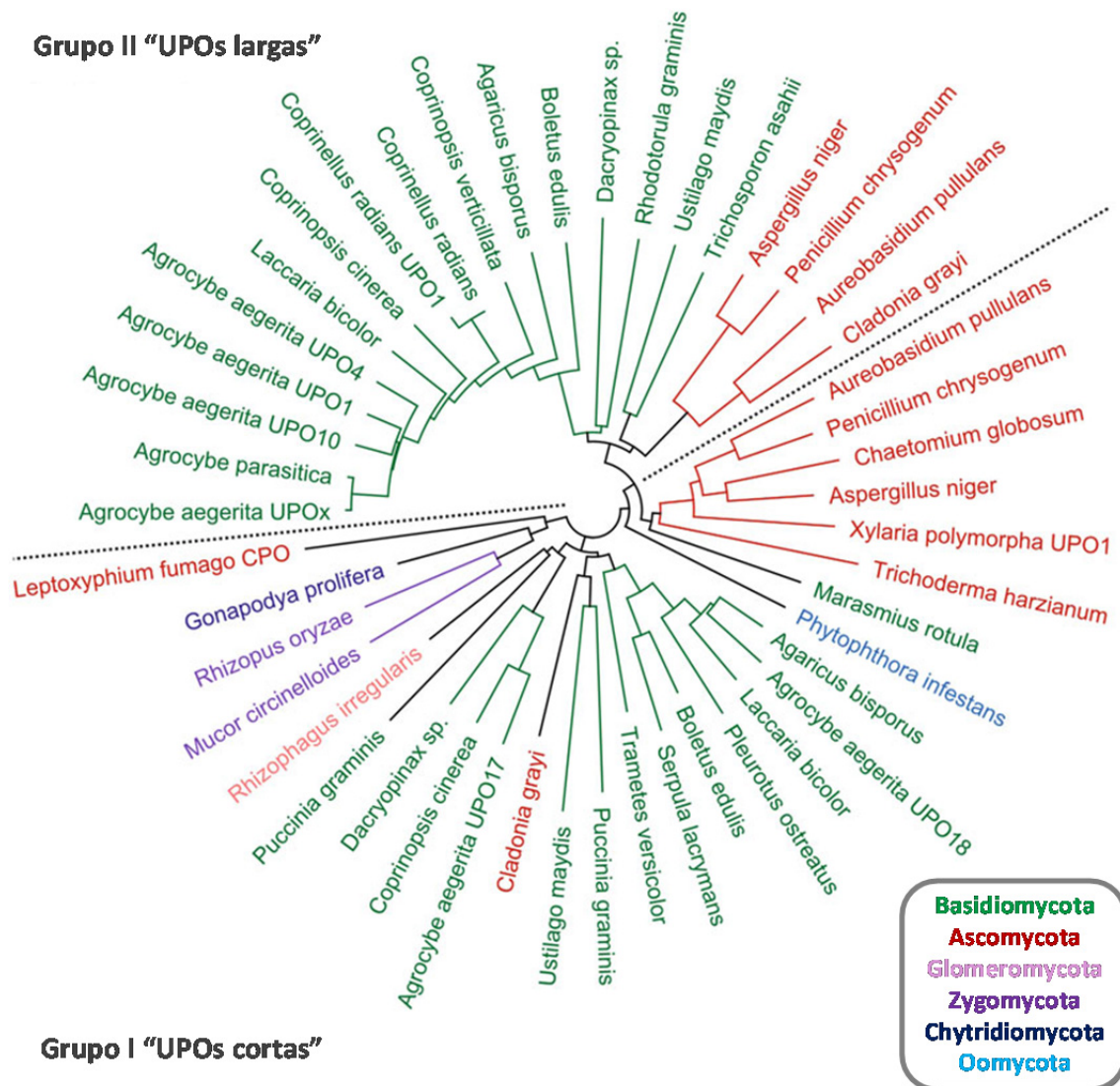
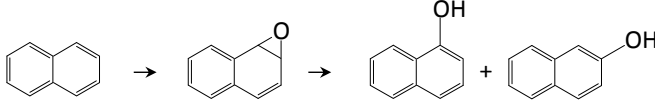
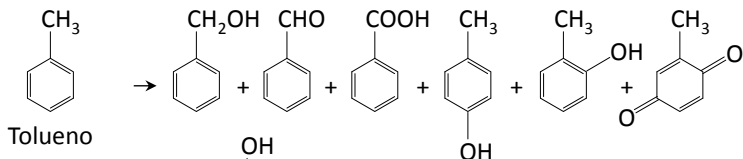
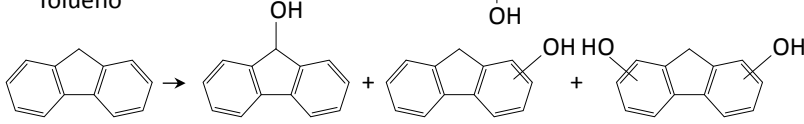
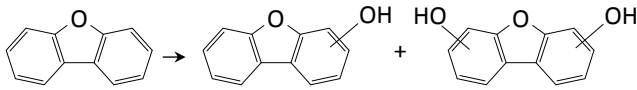
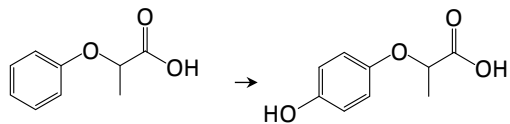
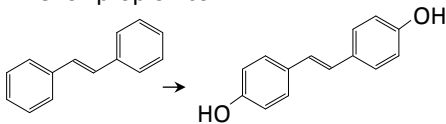
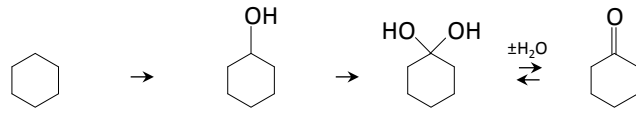


Figura 1.4. Árbol filogenético de las secuencias de UPO/HTP usando distancias genéticas de Jukes-Cantor. Verde – Basidiomycota, rojo – Ascomycota, azul – Oomycota, morado – Zygomycota, Azul oscuro – Chytridiomycota y rosa – Glomeromycota. Las líneas punteadas separan las secuencias de UPOs de los grupos I y II. Adaptado de Hofrichter et al., (2015).

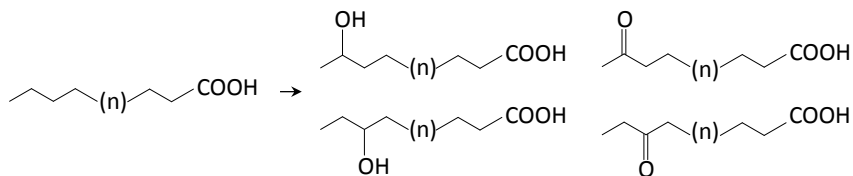
A continuación se describen las principales reacciones catalizadas por estas peroxigenasas inespecíficas (**Tabla 1.6**):

Tabla 1.6 Principales reacciones de peroxigenación catalizadas por las peroxigenasas inespecíficas.

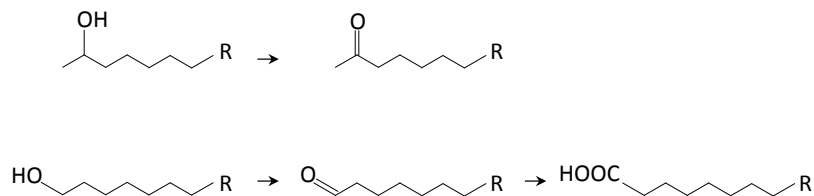
Reacción	Esquema
Oxigenación aromática & alquímica	 <p>Naftaleno</p>
	 <p>Tolueno</p>
	 <p>Fluoreno</p>
	 <p>Dibenzofurano</p>
	 <p>A. 2-fenoxipropiónico</p>
	 <p>Estilbeno</p>
	Oxigenación de alcanos
	

1. Introducción

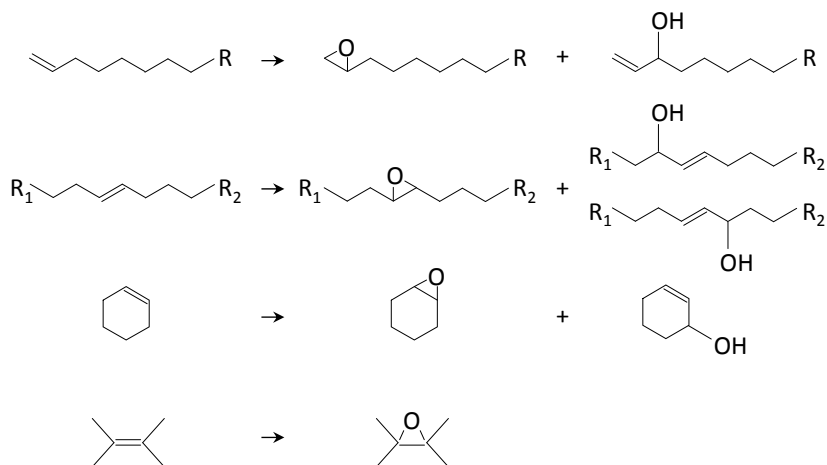
Oxigenación de ácidos grasos



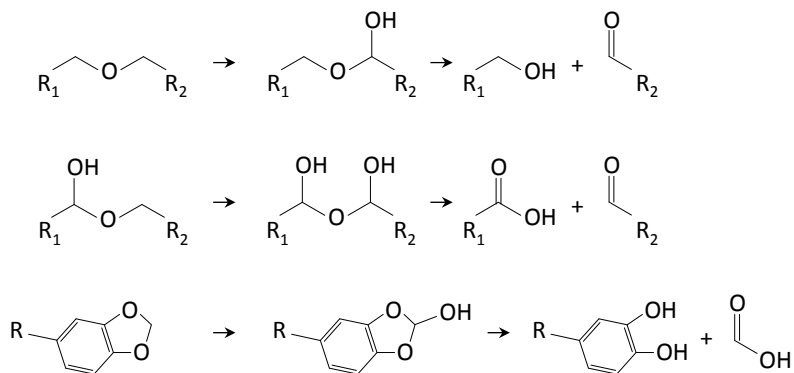
Oxigenación de alcoholes



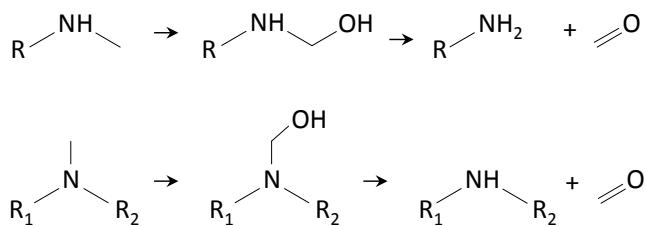
Oxigenación de alquenos

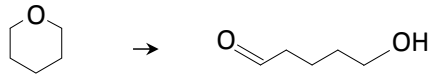


O-Desalquilación

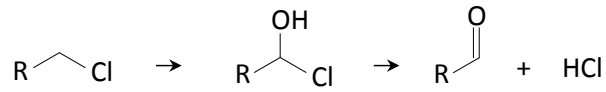


N-Desalquilación

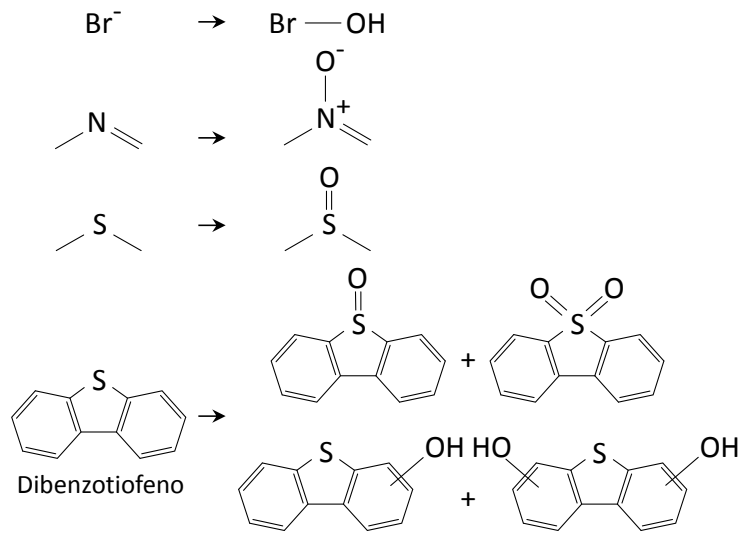




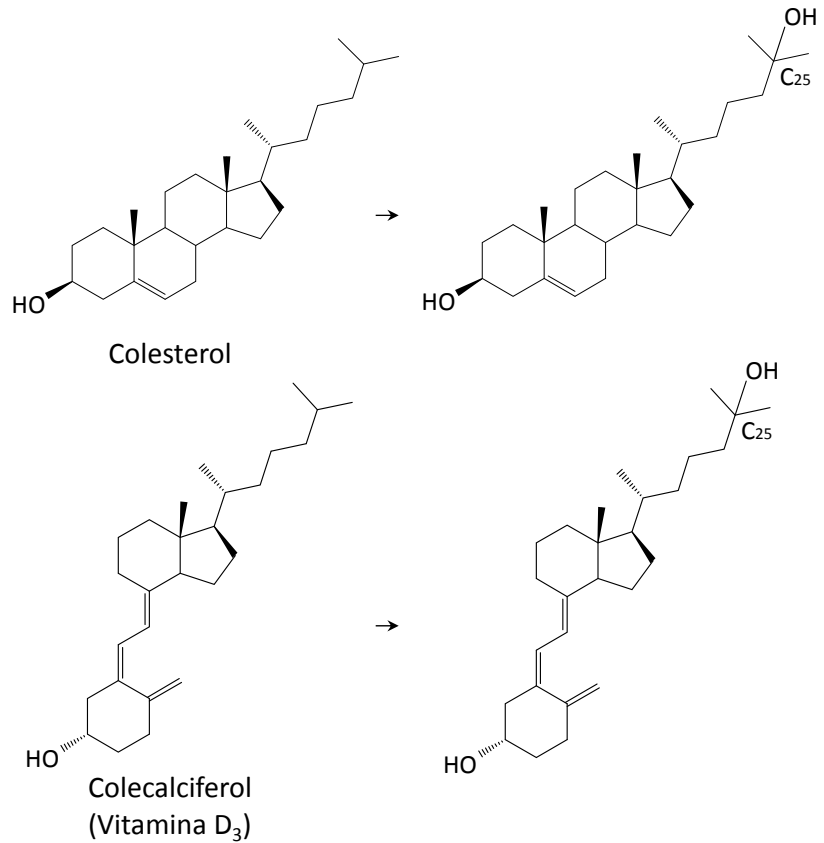
Otras escisiones



Oxigenación de heteroátomos



Oxigenación de compuestos esteroideos



Estas reacciones (**Tabla 1.6**) se describen en los apartados siguientes:

(i) Reacciones de oxifuncionalización de compuestos aromáticos

La oxigenación aromática de las UPOs se estudió inicialmente mediante el análisis del naftaleno y del tolueno como sustratos de las mismas (Ullrich & Hofrichter, 2005). El naftaleno se epoxida regioespecíficamente por diferentes UPOs a 1,2-óxido-naftaleno, que se transforma en presencia de protones ($\text{pH} < 7,5$) en 1- y 2- naftol. La proporción entre ambos alcoholes varía dependiendo del pH, el suministro de H_2O_2 y la UPO utilizada (Kluge et al., 2009; Anh et al., 2007). El tolueno por su parte se puede hidroxilar tanto en el grupo metilo como en el anillo aromático resultando en una mezcla de alcohol bencílico, benzaldehído, ácido benzoico, *p*- y *o*-cresol, y metilhidroquinona. La proporción de hidroxilación alquímica vs. oxigenación aromática es de 2:1 en el caso de *Aae*UPO y de 26:1 en el caso de *Mro*UPO, aunque la oxigenación aromática desaparece con *Aae*UPO al aumentar el tamaño de la cadena lateral de los sustratos (Gröbe et al., 2011).

Otros hidrocarburos aromáticos policíclicos como metil naftalenos, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno y dibenzofurano también se hidroxilan por las UPOs produciendo mezclas de derivados mono- y poli-hidroxilados (Aranda et al., 2010). La diferencia radica en la oxidación de los carbonos aromáticos y no aromáticos; mientras que *Aae*UPO favorece claramente el ataque en el anillo aromático, *Cra*UPO y *Mro*UPO tienden a oxidar preferentemente la cadena lateral alquímica o los grupos metilenos de anillos no aromáticos (ej. C9 del fluoreno). *Aae*UPO también cataliza la producción de fenol a partir de benzeno vía epóxido. Los productos fenólicos formados durante la peroxigenación aromática pueden ser sustratos de la actividad peroxidasa de las UPOs (oxidación de un electrón) produciendo radicales fenoxilo que tienden a polimerizar. Esto se puede prevenir mediante la adición de ácido ascórbico, que reacciona con estos radicales formando radicales ascorbilo, los cuales a su vez pueden disgregarse en ácido dehidroascórbico y ascórbico. El radical fenoxilo abstrae un electrón del ácido ascórbico seguido de un rebote protónico que vuelve a producir el fenol (Hofrichter et al., 2015).

A diferencia de lo que ocurre con el propilbenzeno, que se hidroxila en la posición bencílica (Kluge et al., 2012), el ácido 2-fenoxipropiónico no es atacado en la cadena lateral sino que se hidroxila exclusivamente en la posición *para*- del anillo aromático. Ambos enantiómeros de este compuesto se hidroxilan por la *Aae*UPO, con una mayor preferencia para el enantiómero R, mostrando que la orientación espacial de las cadenas laterales puede influir en la regioselectividad de las UPOs (Kinne et al., 2008). Por otra parte, el isómero *trans* del estilbeno se hidroxila principalmente en las posiciones 4 y 4' por estas peroxigenasas, produciendo el 4,4'-dihidroxiestilbeno, un análogo del antioxidante resveratrol (Aranda et al., 2018).

(ii) Reacciones de oxifuncionalización de compuestos alifáticos

Con posterioridad a los primeros estudios sobre la oxigenación de compuestos aromáticos, se observó que las UPOs catalizan también la hidroxilación de diferentes compuestos alifáticos como alcanos lineales, ramificados y cíclicos, alcoholes y ácidos grasos (Gutiérrez et al., 2011, Peter et al., 2011 y Peter et al., 2014). En referencia a los resultados obtenidos con los alcanos cortos, utilizados como sustrato de *Aae*UPO, los productos mayoritarios identificados fueron alcoholes en las posiciones 2 y 3, variando la proporción entre ambas según la longitud de la cadena (Peter et al., 2011). Por otro lado, en cuanto a las reacciones de *Aae*UPO con alcanos de cadena larga, ácidos grasos y alcoholes, se observaron, además de los derivados monohidroxilados en las posiciones subterminales, las respectivas cetonas (producto de su re-oxidación) y dioles, debido a la hidroxilación en ambos lados de la cadena, con sus respectivos derivados hidroxiceto y diceto (Gutiérrez et al., 2011). Los alcanos ramificados (hasta cierto punto de ramificación) también se hidroxilaron por la *Aae*UPO, preferentemente en los carbonos terciarios. Por otra parte, los cicloalcanos (de 5 a 8 carbonos) produjeron principalmente los derivados monohidroxilados y su re-oxidación a cicloalcanonas depende de las condiciones de reacción y la UPO utilizada, siendo *Mro*UPO la más efectiva. Dicha sobre-oxidación procede mediante

un intermediario *gem*-diol que pierde agua espontáneamente (Peter et al., 2014).

En el trabajo donde se estudió la epoxidación de alquenos por *Aae*UPO se observó que los alquenos lineales se epoxidan en muy pequeña cantidad mientras que los alquenos cíclicos son mejores sustratos. En ambos casos se produce además de la epoxidación del doble enlace, la hidroxilación de las posiciones alílicas (Peter et al., 2013). Algunos sustratos como el propeno, 1,3-butadieno, *cis*- y *trans*-buteno y los butenos ramificados, se epoxidan exclusivamente, mientras que los 1-alquenos (de 4 a 8 carbonos) y el ciclohexeno producen derivados tanto epoxidados como hidroxilados (ningún producto con ambas oxifuncionalizaciones). En el caso del *cis*-buteno se formó más del doble de epóxido que con el isómero *trans*, de la misma forma que con los derivados del estireno, pudiendo concluirse que la isomería *cis/trans* influye fuertemente en el posicionamiento de los alquenos en el centro activo de la enzima (Hofrichter et al., 2015).

(iii) Desalquilaciones

Las UPOs catalizan la *O*- y *N*- desalquilación de diferentes éteres y aminas secundarias y terciarias. El proceso comienza con la hidroxilación de uno de los carbonos contiguos al heteroátomo, produciendo intermediarios hemiacetales / hemiaminales inestables ($\text{-HCOH-O-CH}_2\text{-}$ / $\text{-HCOH-NH-CH}_2\text{-}$), que se disgregan espontáneamente liberando agua. De esta forma los hemiacetales producen alcoholes o fenoles y aldehídos y los hemiaminales generan aminas primarias o secundarias y aldehídos (Kinne et al., 2009; Poraj-Kovielska M, 2013).

La incorporación del oxígeno del peróxido en el sustrato, que lleva a la posterior escisión, fue demostrada usando *p*-nitrobencil éter y peróxido de hidrógeno marcado con ^{18}O ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) como sustrato y co-sustrato respectivamente (Kinne et al., 2009). El oxígeno es introducido en la posición bencílica hidroxilando el sustrato, y seguidamente se separa en metanol y *p*-nitrobenzaldehído (que contiene el oxígeno 18).

(iv) Oxigenación de heteroátomos

Las UPOs son capaces de transferir oxígeno a heteroátomos orgánicos como azufre y nitrógeno. En el caso del dibenzotiofeno el azufre se oxida produciendo los correspondientes sulfóxido y sulfona (Aranda et al., 2009). Si bien *Aae*UPO preferiblemente hidroxila los anillos de benceno de este sustrato, *Cra*UPO ataca al azufre del heterociclo. En una reacción similar, la cadena lateral del tioanisol se transforma con gran eficacia de forma enantioselectiva en el correspondiente (R)-sulfóxido. La piridina y la halo-, nitro-, y cianopiridinas son oxidadas por *Aae*UPO en el nitrógeno exclusivamente para formar los respectivos nitróxidos de piridina, sin embargo, en las piridinas metiladas se oxidan tanto el grupo metilo como el nitrógeno del anillo (Hofrichter et al., 2015).

Por otra parte, la oxidación de haluros es también una reacción de transferencia de oxígeno catalizada por las UPOs que produce hipohalitos, que a su vez pueden halogenar sustratos orgánicos como fenoles (Ullrich & Hofrichter, 2005). *Aae*UPO muestra una fuerte oxidación del bromuro, aunque a diferencia de CPO oxida débilmente el cloruro. *Mro*UPO sin embargo, prácticamente no presenta actividad oxidando el bromuro, indicando que no todas las UPOs tienen lugares de unión específicos a los haluros. Los halógenos unidos a átomos de carbono, al hidroxilarse, se liberan como haluros, ya que el primer intermediario es inestable (halohidrina geminal). Un ejemplo es la oxidación del clorometilbenceno por *Aae*UPO, que produce benzaldehído y cloruro (Kinne, 2010).

(v) Oxigenación de compuestos esteroideos

En un estudio realizado sobre la transformación de esteroides se probaron como sustratos de *Aae*UPO, *rCci*UPO y *Mro*UPO diferentes tipos de compuestos esteroideos, como esteroides libres, cetonas esteroideas, hidrocarburos esteroideos y ésteres de esteroides.

En el caso de los esteroides libres, se probaron diferentes sustratos de los cuales el colesterol fue el más transformado, siendo *rCci*UPO la única peroxigenasa que alcanzó la conversión completa del mismo. Los

productos mayoritarios observados fueron derivados monohidroxilados, principalmente en la posición 25 de la cadena lateral. En cuanto a las cetonas esteroidales, *rCciUPO* volvió a ser la enzima más eficaz oxigenando estos compuestos, predominando de nuevo el producto monohidroxilado en el carbono 25 de la cadena lateral, a excepción de la testosterona, que no fue transformada por ninguna de las tres enzimas. También se observaron algunos derivados hidroxilados en el anillo esteroideal, preferentemente por *MroUPO*. De nuevo *rCciUPO* fue la más eficiente en el caso de los hidrocarburos esteroidales, a excepción del pregnano, que sólo fue modificado por *MroUPO*. En cuanto a los productos formados se observaron además de los derivados monohidroxilados en la posición 25, productos dihidroxilados y trihidroxilados debido a la hidroxilación en el anillo esteroideal. Los mejores resultados con los ésteres de esteroides se obtuvieron con *rCciUPO* y el colesteril acetato, siendo el 25-hidroxiderivado el único producto identificado (Babot et al., 2015a).

Durante el desarrollo de otras investigaciones sobre este tipo de sustratos, además de los productos hidroxilados mencionados, en algunos casos (como el de la cortisona) se observó la eliminación de la cadena lateral (Ullrich et al., 2018).

Posteriormente, un nuevo estudio con dos secosteroides (colecalfiferol o vitamina D₃ y ergocalciferol o vitamina D₂) usados como sustratos de *rCciUPO* y *AaeUPO*, reveló que ambas enzimas son capaces de oxigenar dichos compuestos produciendo los derivados monohidroxilados 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂. En el caso de la vitamina D₃, *rCciUPO* transformó completamente el sustrato con una altísima regioselectividad, siendo el 25-hidroxiderivado el único producto observado. Sin embargo, *AaeUPO*, mostró una conversión algo menor y dio lugar a varios productos monohidroxilados, además del 25-hidroxicolecalciferol (Babot et al., 2015b).

Para concluir, cabe mencionar que atraídos por las novedosas diferencias que presenta la enzima *MroUPO* frente a otras UPOs

anteriormente estudiadas (*AaeUPO*, *CraUPO* y *rCciUPO*), durante el desarrollo de esta Tesis se ha profundizado en el estudio de esta particular enzima y su acción sobre sustratos alifáticos. Recientemente, se ha liberado su estructura cristalina (PDB entries 5FUJ and 5FUK) (**Figura 1.5**) y se han obtenido una serie de resultados novedosos que demuestran la capacidad única de esta peroxigenasa inespecífica de realizar tres reacciones hasta ahora desconocidas para estas enzimas (i) la hidroxilación terminal de alcanos, (ii) el acortamiento de la cadena de ácidos carboxílicos saturados y (iii) la epoxidación de ácidos grasos insaturados, característica que comparte con la peroxigenasa del hongo *Chaetomium globosum* (*CglUPO*), recientemente descubierta. Tres reacciones, que tras los estudios detallados desarrollados en esta Tesis, pueden añadirse al amplio espectro mencionado de reacciones de peroxigenación conocido hasta ahora para las UPOs.

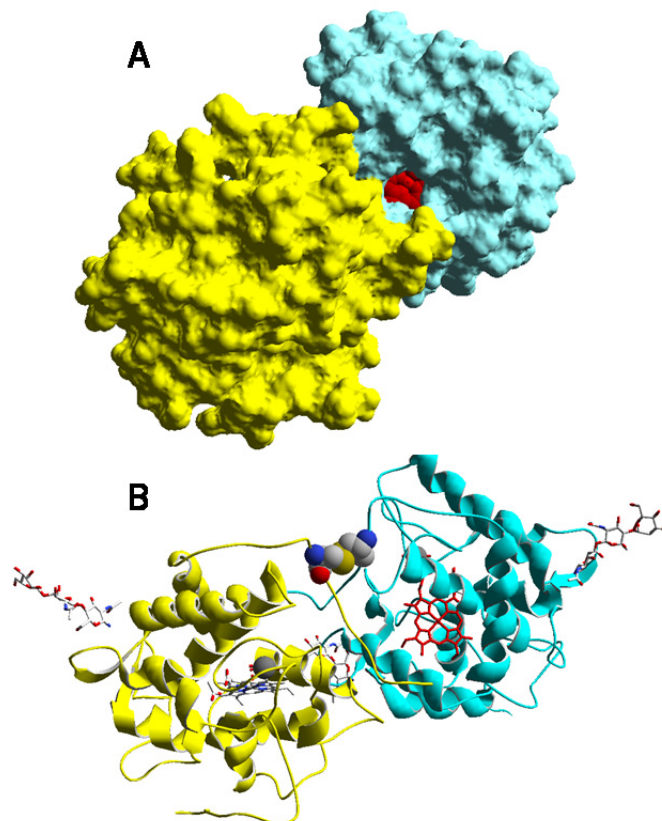


Figura 1.5. Dímero de *MroUPO*. A) Superficie de acceso a solvente con uno de los cofactores hemo (esferas rojas) visible a través de un canal de acceso. B) Modelo tipo cinta que incluye el enlace disulfuro C227-C'227 (esferas CPK coloreadas), los dos cofactores (barras rojas y CPK) y la glicosilación superficial (barras CPK). Obtenido de PDB 5FUJ.

2. Objetivos



OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis es el estudio de la oxifuncionalización enzimática de diferentes compuestos orgánicos alifáticos por peroxigenasas fúngicas, especialmente la peroxigenasa de *Marasmius rotula* (MroUPO), y comparar estas reacciones con las catalizadas por las peroxigenasas de *Agrocybe aegerita* (AaeUPO), *Coprinopsis cinerea* (rCcUPO) y *Chaetomium globosum* (CglUPO), para la producción de compuestos de interés industrial.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Estudiar la oxifuncionalización selectiva de diversos compuestos alifáticos saturados, tales como ácidos grasos libres y esterificados, alcoholes grasos y alcanos.
- Estudiar la oxifuncionalización selectiva de compuestos alifáticos insaturados, tales como ácidos grasos libres y esterificados.
- Estudiar en detalle los mecanismos de las reacciones de los distintos sustratos utilizando peróxido de hidrógeno marcado con oxígeno 18 ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$).

3. Materiales y métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Enzimas

En la presente Tesis se ha estudiado la oxifuncionalización de diferentes compuestos alifáticos catalizada por la peroxigenasa fúngica de *Marasmius rotula* (*Mro*UPO). Con propósitos comparativos también se estudiaron las reacciones de dichos compuestos con las peroxigenasas de *Chaetomium globosum* (*Cgl*UPO), *Agrocybe aegerita* (*Aae*UPO) y *Coprinopsis cinerea* (*rCci*UPO), esta última recombinante.

Peroxigenasa de *Marasmius rotula* (*Mro*UPO)

La peroxigenasa extracelular de *M. rotula* (32 kDa) se aisló y purificó en JenaBios (Jena, Alemania) (Gröbe et al., 2011). Para ello, los hongos previamente cultivados en agar con un 2% de extracto de malta a 24 °C se homogeneizaron en una solución estéril de NaCl. La suspensión micelial resultante se inoculó en cultivos líquidos (en matraces de 500 ml) con agitación de 120 rpm a 24 °C durante 3 a 4 semanas.



Figura 3.1. Imagen del hongo basidiomiceto *Marasmius rotula*, conocido como la seta de molinillo. Crece en bosques caducos sobre madera muerta y hojas podridas. Número de colección: DSM 25031 (German Collection of Microorganisms and cell cultures).

3. Materiales y Métodos

La purificación de la enzima se realizó mediante cinco pasos de cromatografía utilizando un sistema FPLC e intercambiadores aniónicos fuertes (Q-Sefarosa FF, mono Q 10/100, Source 15Q y Mono Q 5/50) así como un tamizado molecular. Por otro lado, el peso molecular de la proteína (32 kDa) (**Figura 3.2 B**) se determinó por electroforesis en gel de SDS-PAGE. La actividad específica de la enzima glicosilada es de $77 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, donde 1 unidad de actividad enzimática representa la oxidación de $1 \mu\text{mol}$ de alcohol veratrílico a veratraldehído ($\epsilon_{310} 9300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) en 1 minuto a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 5.5, en presencia de 4 mM de H_2O_2 . La velocidad de conversión de la enzima purificada sobre el alcohol veratrílico fue de 49 s^{-1} (con una constante K_m de Michaelis-Menten de 0.279 mM).

MroUPO es un dímero unido por un puente disulfuro (5FUJ) que presenta una secuencia que difiere considerablemente de las otras UPOs estudiadas, compartiendo sólo un 33% de identidad y un 49% de semejanza con *AaeUPO* (Poraj-Kobielska, 2013).

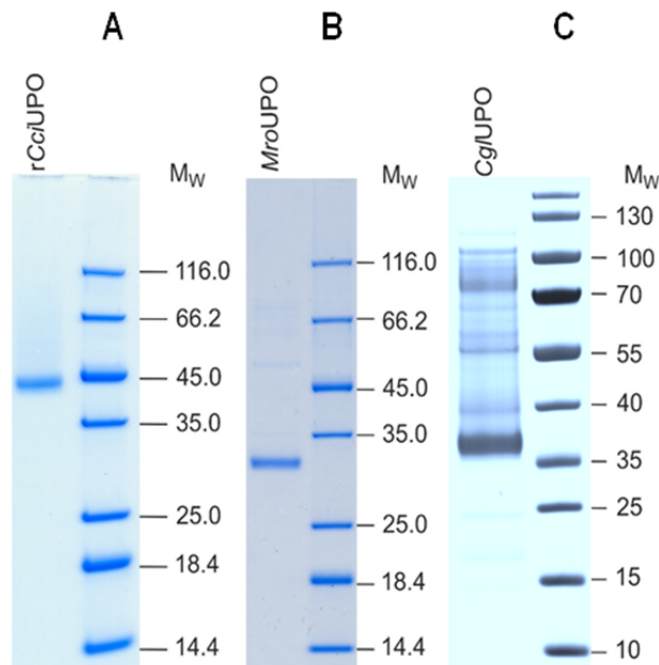


Figura 3.2. SDS-PAGE de diferentes preparaciones de UPOs: *rCciUPO* (A), *MroUPO* (B) y *CglUPO* (C). Se usó un 10-12% de Bis-Tris y las proteínas se visualizaron con una tinción azul coloidal (Invitrogen). Las condiciones (50 mM ditiotretitol) resultaron en *MroUPO* monomérica. Se incluyeron patrones de bajo peso molecular (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany).

Peroxigenasa de *Chaetomium globosum* (Cg/UPO)

Cg/UPO es una peroxigenasa salvaje aislada recientemente de cultivos de *C. globosum* DSM-62110 (German Collection of Microorganisms and cell cultures), y purificada en JenaBios (Jena, Alemania) por precipitación con sulfato de amonio y sucesivas FPLC usando columnas de Q-Sefarosa FF (intercambio iónico), Superdex75 (tamiz) y Mono Q (intercambio iónico) (Kiebist et al., 2017).

La cromatografía reveló dos fracciones enzimáticas del mismo peso molecular (36 kDa) (**Figura 3.2 C**), con una actividad específica de 4.4 U·mg⁻¹ (fracción 1) y 12 U·mg⁻¹ (fracción 2), donde 1 unidad de actividad enzimática representa la oxidación de un μmol de alcohol veratrílico a veratraldehído (ϵ_{310} 9300 M⁻¹·cm⁻¹) en un minuto a 24 °C y pH 7.0 (Kiebist et al., 2017).



Figura 3.3. Imagen del hongo ascomiceto *Chaetomium globosum*. Número de colección: DSM 62110 (German Collection of Microorganisms and cell cultures).

Peroxigenasa de *Agrocybe aegerita* (AaeUPO)

La peroxigenasa extracelular de *A. aegerita* (isoenzima II, 45 kDa) se aisló y purificó en el grupo del Prof. Martin Hofrichter (Zittau, Alemania) (Ullrich et al., 2004). Los hongos precultivados durante dos semanas en placas de agar con un 2% de extracto de malta, se homogeneizaron en una solución estéril de NaCl. La suspensión micelial resultante se inoculó en cultivo líquido (en matraces de 500 ml) y con agitación (100 rpm) a 24 °C, en oscuridad durante 14 días. La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una combinación de columnas de Q-Sefarosa, SP-Sefarosa y Mono S. El peso molecular de la proteína se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Su actividad específica es 117 U·mg⁻¹, donde 1 unidad de actividad enzimática representa la oxidación de 1 μmol de alcohol veratrílico a veratraldehído (ϵ_{310} 9300 M⁻¹·cm⁻¹) en 1 minuto a 23 °C y pH 7.0, en presencia de 2.5 mM de H₂O₂. La velocidad de conversión de la enzima purificada sobre el alcohol veratrílico fue de 85 s⁻¹ (con una constante K_m de Michaelis-Menten de 2.4 mM).



Figura 3.4. Imagen del hongo basidiomiceto *Agrocybe aegerita*, conocido como seta del chopo o del álamo. Número de colección: DSM 22459 (German Collection of Microorganisms and cell cultures).

Peroxigenasa de *Coprinopsis cinerea* (rCciUPO)

La peroxigenasa recombinante utilizada en esta Tesis se produjo y purificó en Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Esta enzima, corresponde al modelo de gen CC1G_08427T0 proveniente del genoma secuenciado de *C. cinerea* disponible en el *Joint Genome Institute* (JGI) (www.jgi.doe.gov).

La proteína correspondiente (genoma ID 7429 de *C. cinerea*) se sintetizó por expresión heteróloga usando como sistema hospedador industrial el hongo *Aspergillus oryzae* (patente WO/2008/119780) y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas de S-Sefarosa y SP-Sefarosa. La peroxigenasa recombinante resultante es una glicoproteína cromatográficamente homogénea con una masa molecular de alrededor de 44 kDa (**Figura 3.2 A**) y una actividad específica de aproximadamente 100 U·mg⁻¹, donde 1 unidad de actividad enzimática representa la oxidación de 1 μmol de alcohol veratrílico a veratraldehído (ϵ_{310} 9300 M⁻¹·cm⁻¹) en 1 minuto a 23 °C y pH 7.0, en presencia de 0.5 mM de H₂O₂.



Figura 3.4. Imagen del hongo basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*, conocido popularmente como felpudo gris.

3.2. Sustratos

Los diferentes estudios con las peroxigenasas previamente mencionadas se han realizado utilizando como sustratos de las mismas principalmente alcanos y ácidos grasos, saturados, insaturados, libres y metilados. Todos los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Alcanos

Se utilizaron dos alcanos lineales de cadena larga, el dodecano y el tetradecano (**Figura 3.5**).

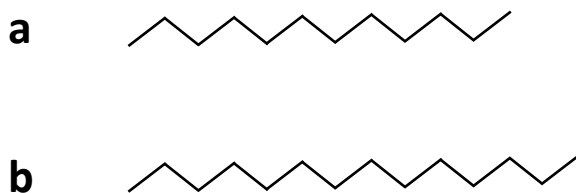


Figura 3.5. Estructuras de los alcanos usados en esta Tesis, (a) dodecano y (b) tetradecano.

Ácidos grasos saturados

Se utilizaron diversos ácidos grasos saturados, tanto mono- como dicarboxílicos, de diferente longitud de cadena, de 8 a 18 átomos de carbono en el caso de los ácidos monocarboxílicos (ácidos octanoico, nonanoico, decanoico, undecanoico, dodecanoico, tridecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico y octadecanoico) y de 10 a 15 átomos de carbono en el caso de los ácidos dicarboxílicos (ácidos decanodioico, undecanodioico, dodecanodioico, tridecanodioico,

tetradecanodioico y pentadecanodioico). Su estructura general se muestra en la **Figura 3.6**.

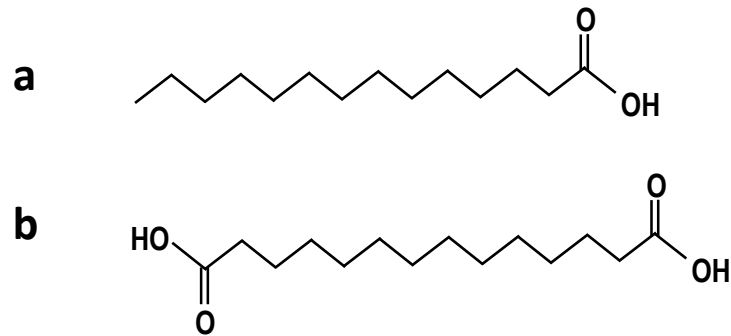


Figura 3.6. Estructuras representativas de los ácidos grasos saturados mono- y dicarboxílicos, (a) ácido mirístico y (b) ácido tetradecanodioico.

Ácidos grasos insaturados

Se estudiaron diversos ácidos grasos monoinsaturados de diferente longitud de cadena y distinta posición e isomería del doble enlace (ácidos miristoleico, palmitoleico, oleico, elaídico, gondoico, erúcico, linoleico, α -linolénico y γ -linolénico), así como diversos derivados metilados (miristoleato, oleato y linoleato de metilo). En la **Figura 3.7** se muestran las estructuras principales.

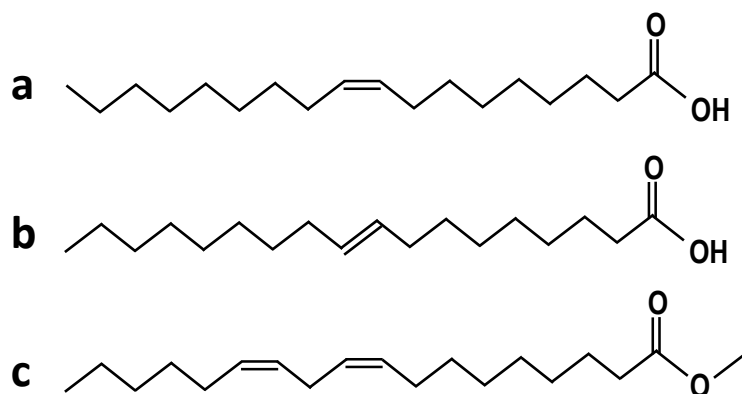


Figura 3.7. Estructuras representativas de ácidos grasos y ésteres metílicos insaturados de 18 átomos de carbonos, (a) ácido oleico, (b) ácido elaídico, y (c) linoleato de metilo.

3.3. Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas de los diversos sustratos (0,1 mM a 0,3 mM) con las peroxigenasas fúngicas (0,2 a 2,4 μ M) se llevaron a cabo en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 mM (pH 5,5 para *Mro*UPO o pH 7 para *Cg*/UPO, *Aae*UPO y *rCci*UPO) en 1 o 5 ml de volumen total de reacción, en presencia de H_2O_2 (0,5 a 30 mM), durante un tiempo variable entre 30 minutos y 72 horas, a una temperatura de 30 °C, que en algunos casos (alcanos y algunos insaturados) fue de 40 °C. El disolvente orgánico utilizado en las reacciones para solubilizar el sustrato fue acetona y se añadió en una concentración del 20%, aumentada al 40% y al 60% en algunos casos. La velocidad de agitación para las reacciones de 5 ml fue de 170 rpm en baño María, mientras que las reacciones de 1 ml se realizaron en un agitador térmico (Eppendorf® ThermoMixer®) a 600 rpm. Algunos experimentos se realizaron añadiendo el H_2O_2 con bomba y otros a pulsos.

Los experimentos control se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente pero en ausencia de enzima.

Las reacciones con peróxido de hidrógeno marcado ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) (90% de ^{18}O , Sigma-Aldrich) también se realizaron en las mismas condiciones indicadas previamente.

3.4. Recuperación de los productos de reacción

Una vez finalizadas las reacciones enzimáticas, los productos de reacción se recuperaron mediante extracción líquido-líquido con metil *tert*-butil éter (Merck). Después de agitar, se separó la fase orgánica de la fase acuosa en matraces Erlenmeyer o en viales según el volumen de reacción (5 ml o 1 ml). Con la fase acuosa resultante, se repitió el proceso dos veces más. En la fase orgánica recuperada tras las tres extracciones, que contiene el sustrato remanente y los productos de reacción formados, se agregó NaSO_4 anhidro (Panreac) con el objeto de eliminar los restos de humedad de la muestra. Finalmente, el material previamente evaporado con N_2 , se resuspendió en cloroformo para su posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello las muestras se derivatizaron previamente utilizando *N,O*-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) (Supelco) (60-90 minutos a 80 °C).

3.5. Análisis mediante GC-MS

Los análisis de los productos de reacción se llevaron a cabo mediante GC-MS en un cromatógrafo Shimadzu QP2010 Ultra, con una columna capilar de sílice fundida DB-5HT (30 m x 0.25 mm de diámetro interno, con un espesor de película de 0.1 μm), acoplado a un detector de cuadrupolo.

El programa de temperatura utilizado para analizar alcanos y ácidos grasos saturados monocarboxílicos se realizó desde 50 °C (2 min) a 80 °C (6 min) a 30 °C·min⁻¹, posteriormente hasta 250 °C (2 min) a 8 °C·min⁻¹. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C durante todo el análisis. La línea de transferencia se mantuvo a 300 °C y el gas portador utilizado fue Helio (2 ml·min⁻¹).

3. Materiales y Métodos

Por otro lado, para el análisis de ácidos grasos saturados dicarboxílicos y ácidos grasos insaturados el programa de temperatura comenzó a 120 °C (1 min) subiendo hasta 300 °C (15 min) a 5 °C·min⁻¹. El inyector se programó de 60 °C (0.1 min) a 300 °C (28 min) a 200 °C·min⁻¹. La línea de transferencia se mantuvo a 300 °C y el gas portador utilizado fue Helio (2 ml·min⁻¹).

Los compuestos se identificaron por espectrometría de masas comparando sus espectros de masas con los espectros existentes en las librerías Wiley y NIST y con estándares. La cuantificación se realizó a partir del área del pico total de iones, utilizando los factores de respuesta de los mismos compuestos o similares. Los perfiles cromatográficos de un solo ion se utilizaron para estimar la abundancia de un compuesto cuando dos picos se encontraban parcialmente solapados.

4. Resultados Generales y discusión



4. RESULTADOS GENERALES Y DISCUSIÓN

El uso de biocatalizadores en el campo de la síntesis orgánica presenta algunas ventajas frente a los catalizadores químicos usados tradicionalmente, como mejor regio- y estereoselectividad, menor formación de productos secundarios y menor impacto ambiental (Torrelo et al., 2015). Los citocromos P450 (P450) son ampliamente conocidos debido a las numerosas reacciones que pueden catalizar y al amplio espectro de sustratos que pueden transformar. Sin embargo, al ser enzimas intracelulares en su mayoría unidas a membrana, son difíciles de extraer, y además necesitan de cofactores como NADPH que cedan electrones y de un sistema de transporte de los mismos, normalmente formado por enzimas auxiliares (flavoproteínas).

Las UPOs, descubiertas recientemente (Ullrich et al., 2004), son enzimas extracelulares, por tanto más estables y sólo requieren la presencia de H_2O_2 como co-sustrato, con las correspondientes ventajas que supone frente a los P450 (Hofrichter et al., 2014). La peroxigenasa de *Marasmius rotula* (*MroUPO*) presenta además algunas diferencias respecto de las UPOs conocidas con anterioridad, como la incapacidad para oxigenar haluros o menor capacidad de oxidación de compuestos aromáticos, aunque presenta mayor actividad frente a compuestos alifáticos y la capacidad de oxigenar sustratos más voluminosos (Hofrichter et al., 2015).

Durante el desarrollo de la presente Tesis, se ha estudiado la oxifuncionalización de diferentes compuestos alifáticos (saturados e insaturados) catalizada por peroxigenasas fúngicas. Los estudios realizados se han centrado principalmente en la peroxigenasa inespecífica (UPO) de *Marasmius rotula* (*MroUPO*), que presenta varias peculiaridades respecto de las peroxigenasas fúngicas estudiadas con anterioridad, como son la peroxigenasa nativa de *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*) y la recombinante de *Coprinopsis cinerea* (*rCciUPO*), así como con la recientemente descubierta peroxigenasa de *Chaetomium globosum* (*CglUPO*).

Estas peculiaridades pueden resumirse en la capacidad de *MroUPO* para catalizar tres reacciones no descritas hasta este momento para las peroxigenasas fúngicas, como son (i) la hidroxilación terminal de alcanos,

(ii) el acortamiento de la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos saturados carbono a carbono y (iii) la epoxidación de ácidos grasos insaturados.

Por otro lado, también se han estudiado los diferentes mecanismos de las reacciones con los citados sustratos, usando como único co-sustrato peróxido de hidrógeno marcado con el isótopo de oxígeno 18 ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$).

4.1. Hidroxilación terminal de alcanos

La oxifuncionalización selectiva de hidrocarburos ha sido y sigue siendo un reto para la química orgánica (Bordeaux et al., 2012). Debido a la gran fuerza de los enlaces C-H de los alcanos lineales, que los hace considerablemente inertes, y a la ausencia de grupos funcionales para dirigir la catálisis, los catalizadores químicos necesarios para la oxifuncionalización de estos compuestos (generalmente complejos biomiméticos de metales de transición) se caracterizan por ser muy reactivos y tener bajo rendimiento y selectividad (Glieder et al., 2002; Peters et al., 2003). Además de estos inconvenientes, los alcanos son altamente hidrofóbicos, lo que dificulta su solubilización en condiciones acuosas, que por el contrario son las más favorables generalmente para los catalizadores enzimáticos.

Se estudió la reacción de *MroUPO* con diversos alcanos lineales de cadena larga, incluyendo *n*-dodecano y *n*-tetradecano. Se observó que *MroUPO* hidroxilaba ambos sustratos en la posición $\omega-1$ y, sorprendentemente, se vio que actuaba también sobre la posición terminal ω , como puede observarse en la reacción con el dodecano (**Figura 4.1**). La hidroxilación terminal de alcanos diferencia sustancialmente *MroUPO* de otras UPOs estudiadas con anterioridad, que sólo hidroxilan los alcanos en las posiciones subterminales $\omega-1$ y $\omega-2$ (Gutiérrez et al., 2011; Babot et al., 2012).

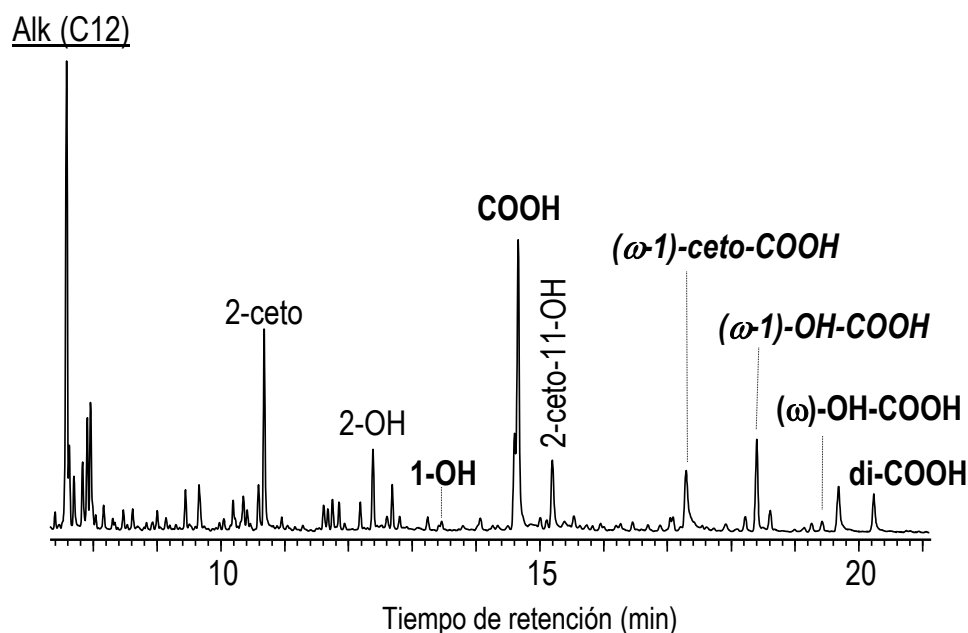


Figura 4.1. Análisis por GC-MS de la reacción (120 min) de *MroUPO* (0,5 μ M) con dodecano (Alk C12) (0,3 mM) mostrando el sustrato restante (subrayado) y los derivados oxigenados en ω (negrita) y ω -1.

Además de los productos de la oxigenación en las posiciones terminales ω , como son el alcohol (1-OH), el ácido monocarboxílico (COOH), el ω -hidroxiácido (ω -OH-COOH) y el ácido α,ω -dicarboxílico (di-COOH), y de los productos derivados de la oxigenación en la posición ω -1, como la cetona (2-ceto), el alcohol (2-OH) o el derivado hidroxiceto (2-ceto-11-OH), también se observan derivados de los productos de la oxidación terminal en posiciones subterminales ($(\omega-1)$ -keto-COOH y $(\omega-1)$ -OH-COOH) (**Figura 4.1**), entre otros.

Los porcentajes de transformación del dodecano y tetradecano (0,3 mM) con 0,5 μ M de proteína fueron del 68% y 45% respectivamente, ascendiendo al 99% en el caso del tetradecano (0,1 mM) al aumentar la concentración de *MroUPO* (1 μ M), de los cuales los productos derivados de la oxigenación terminal representan alrededor del 50%.

Estos resultados fueron objeto de publicación en la revista *Angewandte Chemie International Edition* (2016), donde se describe por primera vez la capacidad de hidroxilar la posición terminal de alcanos por una peroxigenasa fúngica, llegando a transformarlos en sus correspondientes ácidos dicarboxílicos, un producto de interés industrial como “building blocks” o material de partida para la formación de polímeros. El interés de dicha reacción no sólo se debe al interés de los productos obtenidos sino principalmente a la importancia de conseguir una hidroxilación terminal de un alcano en condiciones suaves, en un solo paso y en presencia de H₂O₂.

4.2. Acortamiento de la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos saturados

Durante el desarrollo de la presente Tesis también se observó por primera vez la capacidad de una peroxigenasa de acortar, carbono a carbono, la cadena hidrocarbonada de ácidos carboxílicos. Posteriormente a la publicación de estos resultados, también se ha descrito esta reacción en un P450 (Onoda et al., 2018).

La primera evidencia de un acortamiento de la cadena alifática surgió al estudiar un ácido dicarboxílico (ácido tetradecanodioico) (di-C14) como sustrato de *MroUPO* (**Figura 4.3**). Con una conversión de sustrato del 93%, se encontró entre los productos de reacción el ácido tridecanodioico (di-C13) (63% del total de los productos) y el ácido dodecanodioico (di-C12) (13%), así como trazas de los ácidos undecanodioico (di-C11) y decanodioico (di-C10), junto con los derivados hidroxilados del di-C14 y di-C13 en las posiciones α , β y γ .

Cuando se estudió la reacción con ácidos monocarboxílicos, el acortamiento parecía depender de la longitud de la cadena del sustrato. Así, mientras que en el caso del ácido tetradecanoico predominaban los productos de la oxigenación en las posiciones $\omega-1$ y ω , en el caso del ácido decanoico se observó una cantidad considerable de ácido nonanoico, aunque la reacción fue menos selectiva que en el caso del ácido dicarboxílico (**Figura 4.4**).

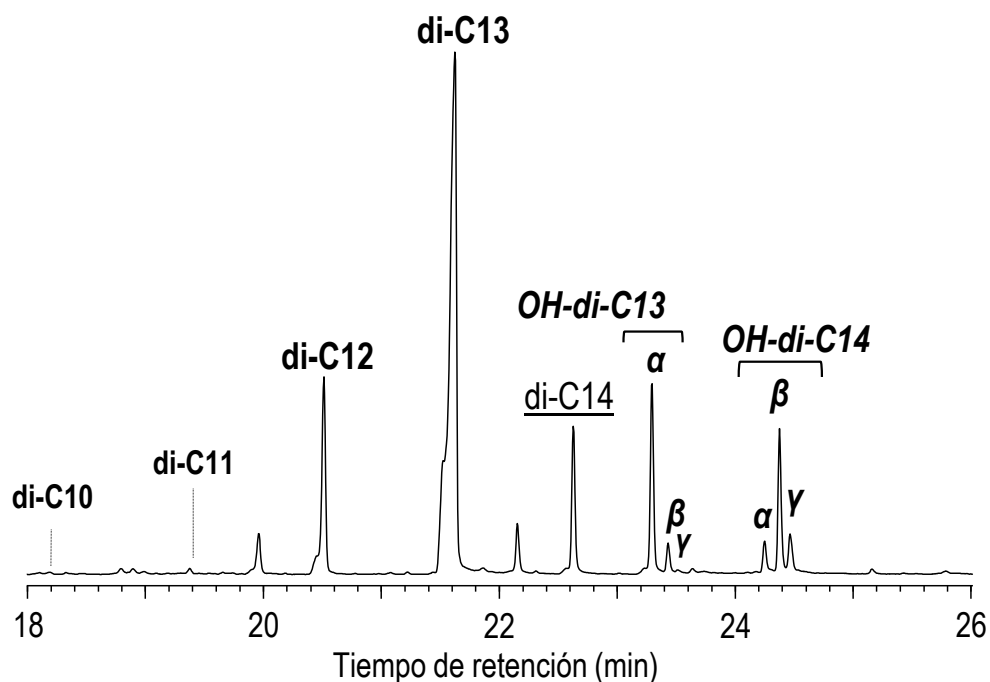


Figura 4.3. Análisis por GC-MS de la reacción de *MroUPO* (2,4 μ M) con el ácido tetradecanodioico (di C14) (0,1 mM) mostrando el sustrato restante (subrayado) y los derivados hidroxilados (α -, β - y γ -hidroxiderivados y productos del acortamiento).

La presencia de los derivados hidroxilados en las posiciones α , β y γ de los ácidos carboxílicos sugiere que son productos intermedios de la reacción del acortamiento de la cadena. Para confirmar esta hipótesis se estudiaron los ácidos α - y β -hidroxitetradecanoico como sustratos de la reacción con *MroUPO*. Los resultados revelaron que el acortamiento de la cadena se produjo sólo en el caso del ácido α -hidroxitetradecanoico, confirmando que dicho acortamiento se produce carbono a carbono tras la hidroxilación enzimática del sustrato en posición α .

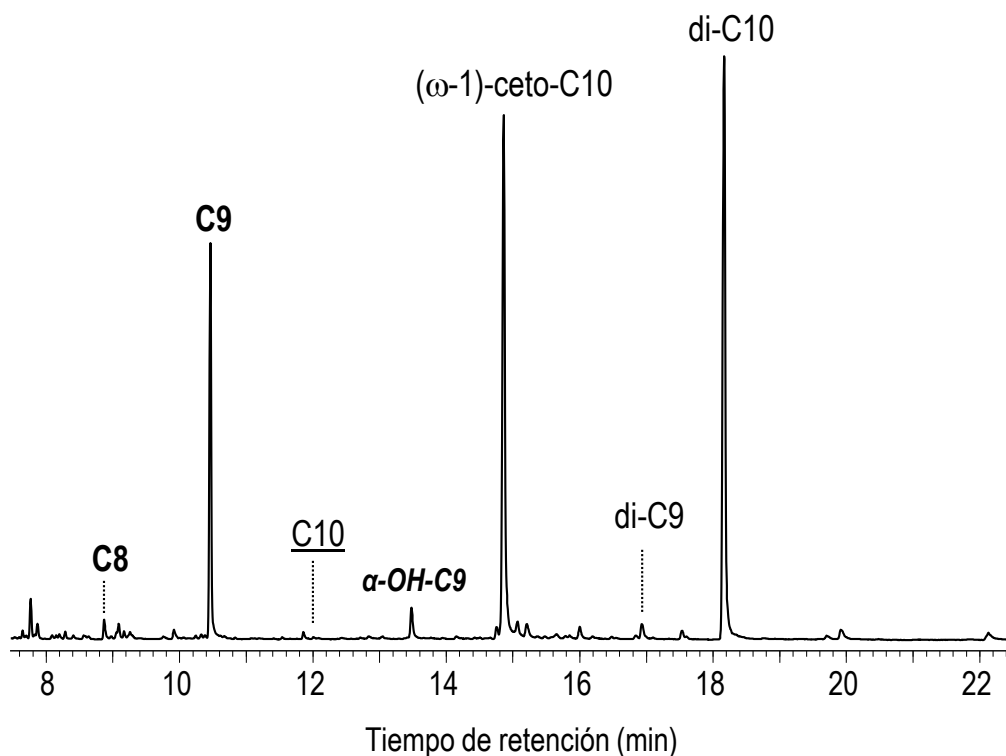


Figura 4.4. Análisis por GC-MS de la reacción de *MroUPO* (2,4 μ M) con el ácido decanoico (0,1 mM), donde se muestra el sustrato restante (subrayado) y los derivados oxigenados, siendo los mayoritarios el cetoácido subterminal ((ω -1)-keto-C10), el ácido dicarboxílico (di-C10) y el ácido graso de un carbono menos (C9).

En las plantas, hongos y animales la vía general de la β -oxidación de los ácidos grasos conlleva la formación de ácidos de dos átomos de carbono menos (Schulz, 2008) y la vía alternativa de la α -oxidación que lleva al acortamiento de un átomo de carbono requiere varios pasos y enzimas (Jansen & Wanders, 2006). Sin embargo, *MroUPO* es capaz de catalizar el proceso de acortamiento por sí sola con la única presencia de H_2O_2 . Los P450 bacterianos son capaces de descarboxilar ácidos grasos, pero en este caso formando alquenos terminales en lugar de ácidos grasos con la cadena acortada (Dennig et al., 2015).

Este acortamiento de la cadena alifática, carbono a carbono, representa una reacción novedosa que puede tener interesantes aplicaciones

biotecnológicas como la obtención de ácidos grasos “a medida” tanto pares como impares (menos abundantes en la naturaleza que los pares), además de las ventajas del efecto par-impar (“*odd-even effect*”), ya que la solubilidad en agua de un ácido dicarboxílico con un número impar de átomos de carbono es mayor que la del ácido dicarboxílico par adyacente (Zhang, 2013). Estos resultados fueron objeto de una patente y dieron lugar a una publicación en la revista *Chemistry - A European Journal* (2017).

4.3. Epoxidación del doble enlace de ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos (FA, “*fatty acids*”), presentes en aceites vegetales, pueden ser utilizados para posteriores transformaciones químicas. Una de sus aplicaciones más conocidas es su conversión en ésteres de metilo (FAME, “*fatty acid methyl esters*”), utilizados en la producción de biodiesel. Además, los FA y FAME insaturados pueden ser epoxidados para su uso en la síntesis industrial de sustancias químicas y productos intermediarios. Industrialmente, esta epoxidación se lleva a cabo mediante la reacción de Prileshajev (Prileschajew, 1909), vía ácido percarboxílico. Sin embargo, esta vía de obtención de ácidos grasos epoxidados presenta algunas desventajas, como la apertura del anillo oxirano en medio ácido, la naturaleza corrosiva de los ácidos utilizados para la generación de los perácidos y el carácter inestable de estos últimos (Danov et al., 2017). Una alternativa a esta vía de epoxidación es la síntesis quimioenzimática catalizada por lipasas en presencia peróxido de hidrógeno (Björkling et al., 1992; Tiran et al., 2008), aunque no solventa algunas de las desventajas de la epoxidación mediada por perácidos.

Los procesos puramente enzimáticos se presentan por tanto como una buena alternativa debido a su mayor selectividad y menor impacto ambiental. Varias enzimas catalizan dicho proceso, como algunos P450 y peroxigenasas de plantas (Tiran et al., 2008; Ruettinger & Fulco, 1981), aunque también presentan desventajas debido a su naturaleza intracelular y la necesidad de co-sustratos caros, como se ha mencionado anteriormente.

En la presente Tesis se describe por primera vez la epoxidación de FA y FAME catalizada por peroxigenasas fúngicas. Para ello, se estudiaron tanto ácidos grasos monoinsaturados como poliinsaturados de diferente longitud de cadena y con diferentes posiciones del doble enlace como sustratos de las peroxigenasas inespecíficas de *Marasmius rotula* (*MroUPO*) y *Chaetomium globosum* (*CglUPO*). Estos estudios revelaron que ambas enzimas son capaces de catalizar la oxigenación del doble enlace y los carbonos adyacentes a éste, a diferencia de las peroxigenasas *AaeUPO* y *rCciUPO* que sólo hidroxilan las posiciones subterminales ω y $\omega-1$ de estos sustratos. En el caso de *MroUPO*, el producto mayoritario observado generalmente fue el epóxido en el doble enlace y en menor proporción los derivados hidroxilados en las posiciones alílicas y subterminales (**Figura 4.5.b**). *CglUPO*, por su parte, mostró ser más selectiva produciendo en la mayoría de los casos únicamente el derivado epoxidado (**Figura 4.5.a**).

La alta selectividad de estas UPOs epoxidando no solo el ácido oleico sino también el palmitoleico (hasta 100%), difiere notablemente de la del citocromo p450 de *Bacillus megaterium* (P450BM3), un citocromo que presenta ciertas ventajas frente al resto debido a su naturaleza soluble y fácil expresión, pero cuya hidroxilación (mayor del 97% y 65% respectivamente) predomina sobre la epoxidación (menor del 3% y 35%) de estos sustratos (Ruettinger & Fulco, 1981).

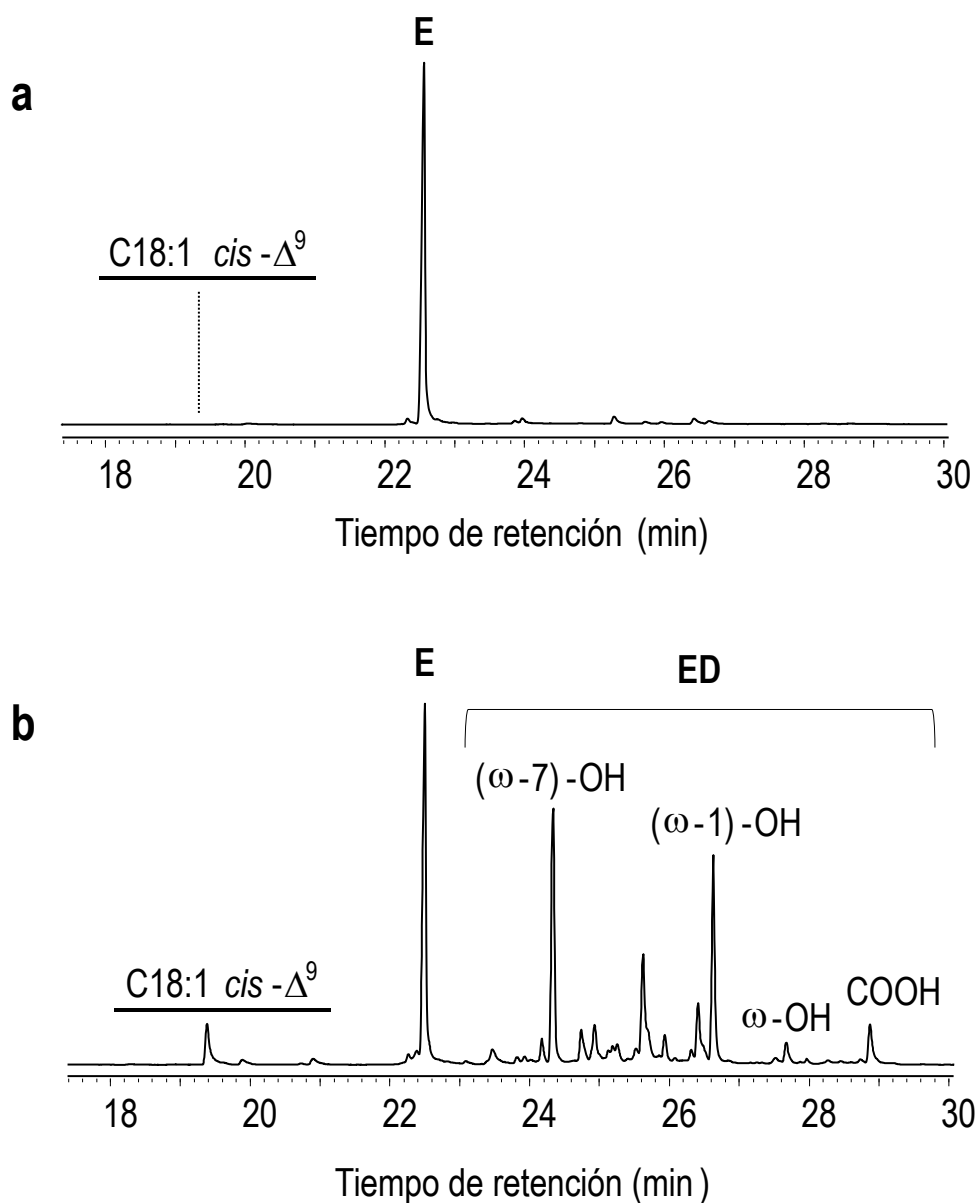


Figura 4.5. Análisis por GC-MS de las reacciones de *Cg/UPO* (a) y *Mro/UPO* (b) con el ácido oleico (C18:1 *cis*- Δ^9) mostrando el sustrato restante (subrayado) y los productos, entre los que se encuentran el epóxido (E) y los derivados epoxidados (ED). Condiciones de la reacción: (a) 63nM *Cg/UPO*, (b) 200 nM *Mro/UPO*, ambas con 0,1 mM de ácido oleico durante 30 minutos.

Además de los sustratos monoinsaturados, se estudiaron sustratos poliinsaturados como el ácido linoleico (con dos insaturaciones) y los ácidos α - y γ -linolénico (con tres insaturaciones), como sustratos de

Cg/UPO y *MroUPO*. Aunque ambas UPOs transformaron casi completamente el ácido linoleico, *Cg/UPO* fue más selectiva produciendo mayoritariamente el diepóxido (tanto el enantiómero *syn* como el *anti*) (92% del total de productos) (**Figura 4.6.a**). Por su parte, *MroUPO*, además de los diepóxidos, también produjo derivados hidroxilados de los epóxidos (**Figura 4.6.b**). Ambos ácidos linolénicos fueron transformados por las dos enzimas, produciendo monoepóxidos y diepóxidos en el caso del α -linolénico.

Los FAME, obtenidos industrialmente de aceites vegetales por transesterificación con metanol, también se estudiaron como sustratos de ambas UPOs. Se seleccionaron los ésteres de metilo de dos ácidos grasos monoinsaturados (ácidos miristoleico y oleico) y de un ácido graso poliinsaturado (ácido linoleico). En cuanto a los FAME monoinsaturados, *Cg/UPO* mostró la misma selectividad hacia la epoxidación con los ácidos grasos metilados que con los ácidos grasos libres, mientras que *MroUPO* la mejoró en el caso del ácido oleico metilado. En el caso del éster de metilo del ácido linoleico, *Cg/UPO* fue también más selectiva hacia la formación del diepóxido que *MroUPO*, en cuyo caso además también se formaron derivados hidroxilados de los epóxidos.

Este hecho contrasta con la incapacidad del P450BM3 para hidroxilar FAME (Miura et al., 1975) al parecer debido a que necesita el grupo carboxilo libre para fijar el sustrato al centro activo (Ruettinger & Fulco, 1981).

La epoxidación selectiva de FA y FAME, reacción de gran interés industrial (Corma et al., 2007) se añade al repertorio de las reacciones catalizadas por las UPOs. Estos resultados dieron lugar a una publicación en la revista ChemCatChem.

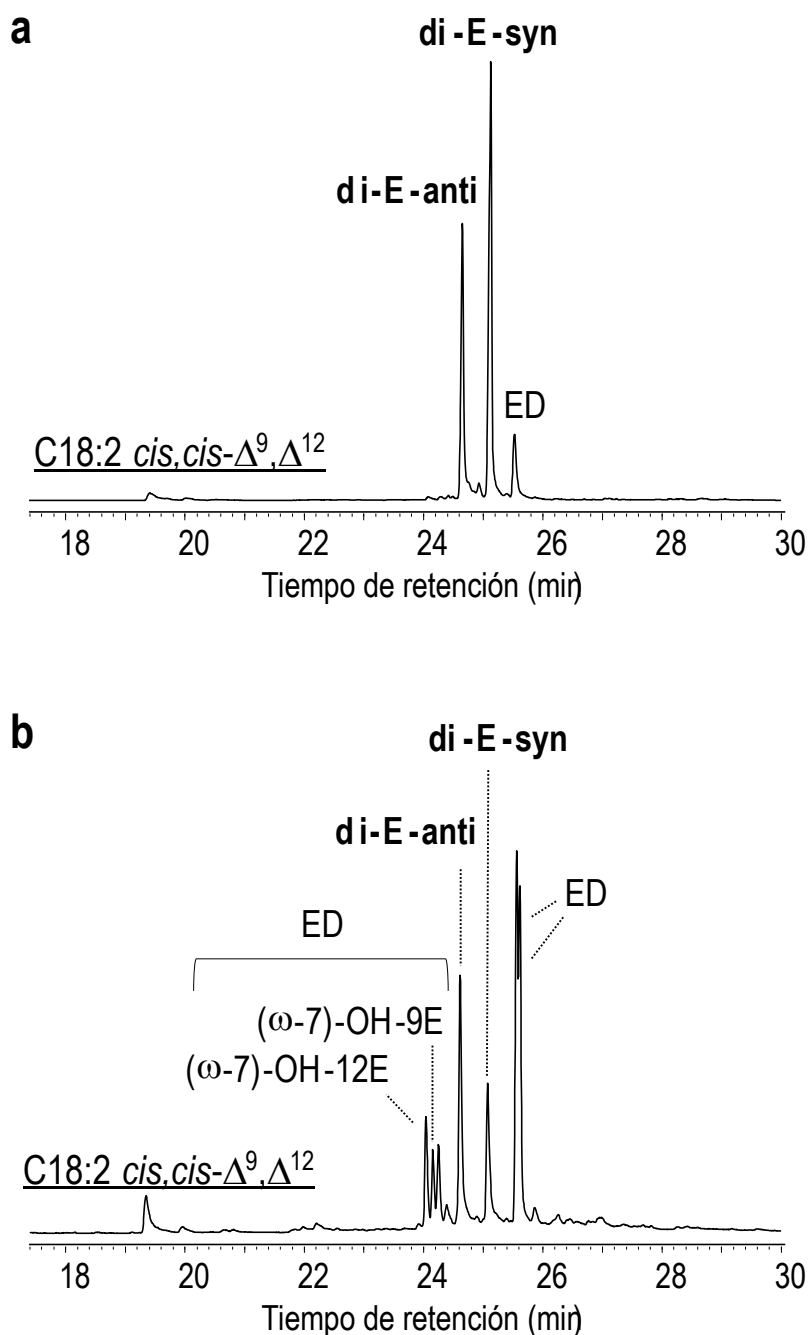


Figura 4.6. Análisis por GC-MS de las reacciones de *CgUPO* (**a**) y *MroUPO* (**b**) con el ácido linoleico (C18:2 *cis,cis*- Δ^9,Δ^{12}) mostrando el sustrato restante (subrayado) y los productos, entre los que se encuentran los diepóxidos (di-E) anti y syn, y los derivados epoxidados (ED). Condiciones de la reacción: (**a**) 125nM *CgUPO*, (**b**) 400 nM *MroUPO*, ambas con 0,1 mM de linoleico durante 30 minutos.

4.4. Mecanismos de oxigenación

Con el fin de estudiar los diferentes mecanismos de las reacciones descritas anteriormente así como el origen del oxígeno incorporado en los sustratos mencionados y comprobar la actividad peroxigenasa de estas enzimas, se realizaron reacciones en presencia de peróxido de hidrógeno marcado ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$).

Los productos de reacción, analizados por GC-MS, demostraron que el oxígeno introducido en la hidroxilación de alcanos y ácidos carboxílicos saturados e insaturados, tanto en las posiciones terminales, subterminales, alílicas y epoxidaciones, proviene del peróxido (**Figura 4.7**) y no del O_2 , a diferencia de las reacciones catalizadas por el P450 BM3 (Munro et al., 2002).

De esta forma, se comprobó que la oxigenación de los alcanos en las posiciones terminales y subterminales comienza con una hidroxilación del carbono correspondiente seguida de otra hidroxilación formando un *gem*-diol. En el caso de las posiciones subterminales, el *gem*-diol se deshidrata formando un grupo ceto, mientras que en el carbono terminal ω , tiene dos posibilidades, por un lado puede hidroxilarse directamente produciendo un *gem*-triol que se deshidrata irreversiblemente originando un grupo ácido, o bien primero se deshidrata a aldehído (el cual al estar en equilibrio con el *gem*-diol experimenta un intercambio de oxígeno con el agua del medio) y posteriormente se hidroxila formando un ácido. Dicho intercambio provoca que en los espectros de masas de los ácidos formados observemos fragmentos con ambos oxígenos ^{18}O y ^{16}O . Una vez formado el ácido carboxílico, el otro carbono terminal ω es atacado siguiendo el mismo procedimiento, que lleva a la producción de los ácidos dicarboxílicos (**Figura 4.7.a**).

En el caso de la reacción de acortamiento de la cadena alifática de ácidos grasos, el estudio de los productos de reacción sugirió que la reacción comienza con la hidroxilación del sustrato en la posición α , formándose el derivado α -hidroxiácido, que se re-oxida hasta la forma ceto, la cual reacciona con el exceso de H_2O_2 descarboxilando y formando un nuevo ácido de un átomo de carbono menos (**Figura 4.7.b**). Aunque el α -

cetoácido se descarboxila rápidamente en presencia de agentes oxidantes (incluido el H_2O_2) (Cooper, 1983) dificultando su identificación entre los productos de la reacción, sí se pudo detectar su forma enólica, con la cual se encuentra en equilibrio. Las dos primeras hidroxilaciones se deben a la acción de la enzima, como demuestran los controles negativos en ausencia de la misma, mientras que el último paso puede producirse directamente por la acción del peróxido (Vlessis et al., 1990).

En cuanto a la oxigenación de los ácidos grasos insaturados se produce la epoxidación directa del doble enlace y la hidroxilación de las posiciones alílicas (**Figura 4.7.c**), productos que vuelven a ser oxigenados formando derivados epoxidados (ED) como el hidroxiepóxido e incluso el cetoepóxido y el epoxidiácido en algunos casos.

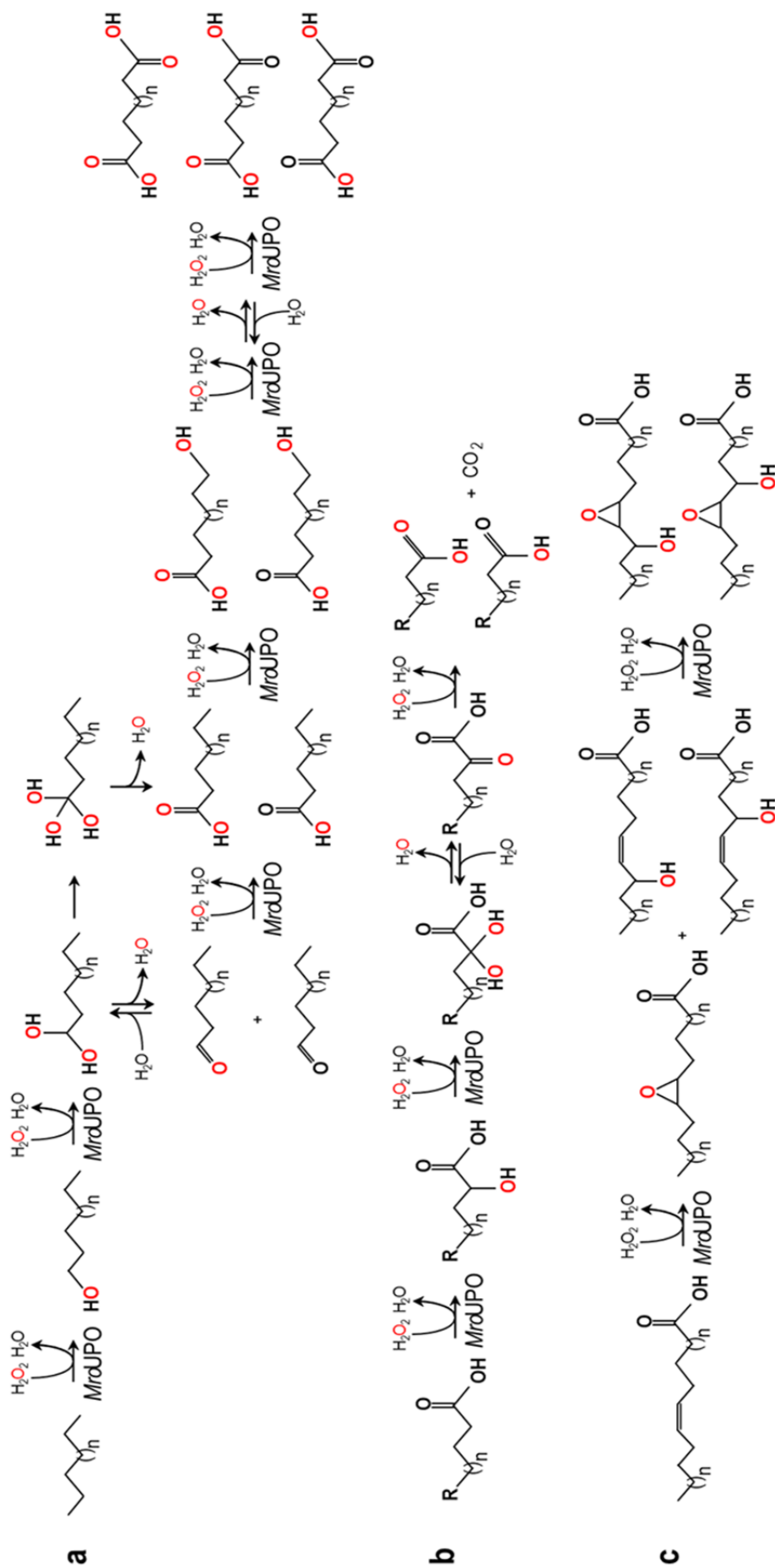


Figura 4.7. Posibles mecanismos de las reacciones de a) oxigenación terminal de alcanos por *MroUPO*, b) acortamiento de la cadena de ácidos grasos saturados por *MroUPO* y c) epoxidación de ácidos grasos insaturados por *MroUPO* y *CgUPO*. $\bullet = ^{18}O$ del H_2O_2 marcado introducido por la enzima mediante la actividad peroxigenasa. $\bullet = ^{16}O$ del sustrato o del H_2O del medio intercambiado durante el equilibrio *gem*-diol / aldehído. **R = H / COOH**.

5. Referencias



5. REFERENCIAS

- Anh DH, Ullrich R, Benndorf D, Svatos A, Muck A, Hofrichter M. 2007. The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5477–5485.
- Aranda C, Ullrich R, Kiebish J, Scheibner K, del Río J C, Hofrichter M, Martínez A T, Gutiérrez A. 2018. Selective synthesis of the resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene and stilbenoids modification by fungal peroxygenases. *Catal. Sci. Technol.* 8: 2394.
- Aranda E, Ullrich R, Hofrichter M. 2010. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation* 21: 267–281.
- Aranda E, Kinne M, Kluge M, Ullrich R, Hofrichter M. 2009. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 1057–1066.
- Babot ED, del Río JC, Cañellas M, Sancho F, Lucas F, Guallar V, Kalum L, Lund H, Gröbe G, Scheibner K, Ullrich R, Hofrichter M, Martínez AT, Gutiérrez A. 2015a. Steroid hydroxylation by basidiomycete peroxygenases: A combined experimental and computational study. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 4130–4142.
- Babot ED, del Río JC, Kalum L, Martínez AT, Gutiérrez A. 2015b. Regioselective hydroxylation in the production of 25-hydroxyvitamin D by *Coprinopsis cinerea* peroxygenase. *ChemCatChem* 7: 283–290.
- Babot ED, del Río JC, Kalum L, Martínez AT, Gutiérrez A. 2012. Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 2323–2332.
- Bernhardt R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotech.* 124: 128–145.

5. Referencias

- Björkling F, Frykman H, Godtfredsen SE, Kirk O. 1992. Lipase catalyzed synthesis of peroxy-carboxylic acids and lipase mediated oxidations. *Tetrahedron* 48: 4587–4592.
- Bordeaux M, Galarneau A, Drone J. 2012. Catalytic, mild, and selective oxyfunctionalization of linear alkanes: current challenges. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 10712–10723.
- Bormann S, Gomez Baraibar A, Ni Y, Holtmann D, Hollmann F. 2015. Specific oxyfunctionalization catalyzed by peroxygenases: opportunities, challenges and solutions. *Catal. Sci. Technol.* 5: 2038–2052.
- Cooper AJL, Ginos JZ, Meister A. 1983. Synthesis and properties of the α -keto Acids. *Chem. Rev.* 83: 321–358.
- Corma A, Iborra S, Velty A. 2007. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chem. Rev.* 107: 2411–2502.
- Danov SM, Kazantsev OA, Esipovich AL, Belousov AS, Rogozhina AE, Kanakova EA. 2017. Recent advances in the field of selective epoxidation of vegetable oils and their derivatives: a review and perspective. *Catal. Sci. Technol.* 7: 3659–3675.
- Degtyarenko K. 2004. EC numbers for P450 enzymes, website <http://www.icgeb.org/~p450srv/P450enzymes.html>
- Dennig A, Kuhn M, Tassoti S, Thiessenhusen A, Gilch S, Bülter T, Haas T, Hall M, Faber K. 2015. Oxidative decarboxylation of short-chain fatty acids to 1-alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54: 8819–8822.
- Fuchs C, Schwab W. 2013. Epoxidation, hydroxylation and aromatization is catalyzed by a peroxygenase from *Solanum lycopersicum*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 96: 52–60.
- Fulco AJ. 1991. P450BM-3 and other inducible bacterial p450 cytochromes: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31: 177–203.

- Glieder A, Farinas ET, Arnold FH. 2002. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nature Biotechnol.* 20: 1135–1139.
- Gröbe G, Ullrich M, Pecyna M, Kapturska D, Friedrich S, Hofrichter M, Scheibner K. 2011. High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express* 1: 31–42.
- Guengerich FP. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 6.
- Gutiérrez A, Babot ED, Ullrich R, Hofrichter M, Martínez AT, del Río JC. 2011. Regioselective oxygenation of fatty acids, fatty alcohols and other aliphatic compounds by a basidiomycete heme-thiolate peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 514: 33–43.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R. 2007. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1770: 330–344.
- Hofrichter M, Kellner H, Pecyna MJ, Ullrich R. 2015. Fungal unspecific peroxygenases: hemo-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 851: 341–368.
- Hofrichter M, Ullrich R. 2014. Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19: 116–125.
- Hofrichter M, Ullrich R. 2010. New trends in fungal biooxidation. En: *The Mycota. Vol. X, Industrial Applications*, M. Hofrichter (ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 425–449.
- Hofrichter M, Ullrich R. 2006. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 276–288.
- Hollmann F, Arends I, Buehler K, Schallmeyer A, Büehler B. 2011. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* 13: 226–265.

5. Referencias

- Jansen GJ, Wanders RJA. 2006. Alpha-Oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 1403–1412.
- Jung ST, Lauchli R, Arnold FH. 2011. Cytochrome P450: taming a wild type enzyme. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 809–817.
- Kiebist J, Schmidtke K, Zimmermann J, Kellner H, Jehmlich N, Ullrich R, Zänder D, Hofrichter M, Scheibner K. 2017. A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* catalyzes the selective oxygenation of testosterone. *ChemBioChem* 18: 563–569.
- Kinne M. 2010. The extracellular peroxygenase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita*: catalytic properties and physiological background with particular emphasis on ether cleavage. PhD Thesis, International Graduate School of Zittau.
- Kinne M, Poraj-Kobielska M, Ralph SA, Ullrich R, Hofrichter M, Hammel KE. 2009. Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. *J. Biol. Chem.* 284: 29343–29349.
- Kinne M, Ullrich R, Hammel KE, Scheibner K, Hofrichter M. 2008. Regioselective preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid with a fungal peroxygenase. *Tetrahedron Lett.* 49: 5950–5953.
- Kluge M, Ullrich R, Scheibner K, Hofrichter M. 2012. Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxygenase of *Agrocybe aegerita*. *Green Chem.* 14: 440–446.
- Kluge M, Ullrich R, Dolge C, Scheibner K, Hofrichter M. 2009. Hydroxylation of naphthalene by aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 1071–1076.
- Lewis DFV. 2001. *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function.* Taylor & Francis, New York.
- Liese A, Seelbach K, and Wandrey C. 2001. *Industrial Biotransformations* Wiley-VCH: 2001. DM 198 (102 Eu). 425 pp. ISBN: 3-527-30094-5.

- Mansuy D. 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol.* 121: 5–14.
- Miura Y, Fulco AJ. 1975. ω -1, ω -2 and ω -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* 388: 305–317.
- Mueller EJ, Loida PJ, Sligar SG. 1995. Twenty-five years of P450cam research: mechanistic insights into oxygenase catalysis. En: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 2nd edn., Ortiz de Montellano PR (ed.), Plenum Press, New York, pp. 83–124.
- Munro AW, Leys DG, McLean KJ, Marshall KR, Ost TWB, Daff S, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, Moser CC, Page CC, Dutton PL. 2002. P450BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends Biochem. Sci.* 27: 250–257.
- Munro AW, Lindsay JG. 1996. Bacterial cytochromes P-450. *Mol. Microbiol.* 20: 1115–1125.
- Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239: 7.
- Onoda H, Shoji O, Suzuki K, Sugimoto H, Shirod Y, Watanabe Y. 2018. α -Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding shorter-alkyl-chain fatty acids. *Catal. Sci. Technol.* 8: 434–442.
- Piontek K, Strittmatter E, Ullrich R, Gröbe G, Pecyna MJ, Kluge M, Scheibner K, Hofrichter M, Plattner DA. 2013. Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: P450. Functionality with benefits. *J. Biol. Chem.* 288: 34767–34776.
- Peter S, Karich S, Ullrich R, Gröbe G, Scheibner K, Hofrichter M. 2014. Enzymatic one-pot conversion of cyclohexane into cyclohexanone: Comparison of four fungal peroxygenases. *J. Mol. Cat. B Enz* 103: 47–51.

5. Referencias

- Peter S, Kinne M, Ullrich R, Kayser G, Hofrichter M. 2013. Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase. *Enzyme Microb. Technol.* 52: 370–376.
- Peter S, Kinne M, Wang X, Ullrich R, Kayser G, Groves JT, Hofrichter M. 2011. Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase, *FEBS J.* 278: 3667–3675.
- Peters MW, Meinhold P, Glieder A, Arnold FH. 2003. Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 13442–13450.
- Poraj-Kobielska M, Atzrodt J, Holla W, Sandvoss M, Gröbe G, Scheibner K, Hofrichter M. 2013. Preparation of labeled human drug metabolites and drug-drug interaction-probes with fungal peroxygenases. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 56: 513–519.
- Poraj-Kobielska M. 2013. Conversion of pharmaceuticals and other drugs by fungal peroxygenases. PhD Academic Dissertation of Zittau-Dresden University (Zittau, Alemania).
- Prileschajew N. 1909. Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 42: 4811–4815.
- Ruettinger RT, Fulco AJ. 1981. Epoxidation of unsaturated fatty acids by a soluble cytochrome P-450-dependent system from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 256: 5728–5734.
- Schulz H. 2008. Oxidation of fatty acids in eukaryotes. En: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th edn., Vance DE & Vance JE (eds.) Elsevier BV, Amsterdam, pp. 131–154.
- Shaw PD, Hager LP. 1959. Biological chlorination. III. β -Ketoacid chlorinase: a soluble enzyme system. *J. Biol. Chem.* 234: 2565–2569.
- Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. 1996. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2841–2887.

- Tiran C, Lecomte J, Dubreucq E, Villeneuve P. 2008. Chemo-enzymatic epoxidation of fatty compounds - Focus on processes involving a lipase-catalyzed perhydrolysis step. *Ol. Corps Gras Lip.* 15: 179–183.
- Torrelo G, Hanefeld U, Hollmann F. 2015. *Biocatalysis. Catal. Lett.* 145: 309–345.
- Torres Pazmiño DE, Winkler M, Glieder A, Fraaije MW. 2010. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J. Biotech.* 146: 9–24.
- Ullrich R, Poraj-Kobielska M, Scholze S, Halbout C, Sandvoss M, Pecyna MJ, Scheibner K, Hofrichter M. 2018. Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxygenase. *J. Inorg. Biochem.* 183: 84–93.
- Ullrich R, Hofrichter M. 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 271–293.
- Ullrich R, Hofrichter M. 2005. The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Lett.* 579: 6247–6250.
- Ullrich R, Nuske J, Scheibner K, Spantzel J, Hofrichter M. 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4575–4581.
- Vlessis AA, Bartos D, Trunkey D. 1990. Importance of spontaneous α -ketoacid decarboxylation in experiments involving peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 1281–1287.
- Warman AJ, Roitel O, Neeli R, Girvan HM, Seward HE, Murray SA, McLean KJ, Joyce MG, Toogood H, Holt RA, Leys D, Scrutton NS, Munro AW. 2005. Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 747–753.

5. Referencias

- Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell.* 5: 121–131.
- Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.* 1: 38–50.
- Yarman A, Gröbe G, Neumann B, Kinne M, Gajovic-Eichelmann N, Wollenberger U, Hofrichter M, Ullrich R, Scheibner K, Scheller FW. 2012. The aromatic peroxygenase from *Marasmius rotula* - a new enzyme for biosensor applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 405–412.
- Zhang H, Xie C, Liu Z, Gong J, Bao Y, Zhang M, Hao H, Hou B, Yin Q. 2013. Identification and molecular understanding of the odd–even effect of dicarboxylic acids aqueous solubility. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52: 18458–18465.

6. Publicaciones



6. PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis se han publicado tres artículos científicos y se ha depositado una patente, fruto de los principales resultados obtenidos.

6.1 Artículos científicos

1. A. Olmedo, C. Aranda, J.C. del Río, J. Kiebist, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2016) From alkanes to carboxylic acids: terminal oxygenation by a fungal peroxygenase. *Angewandte Chemie International Edition* 128: 12436 – 12439.
2. A. Olmedo, J.C. del Río, J. Kiebist, R. Ullrich, M.Hofrichter, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2017) Fatty acid chain shortening by a fungal peroxygenase. *Chemistry – A European Journal* 23, 16985 – 16989.
3. C. Aranda[‡], A. Olmedo[‡], J. Kiebist, K. Scheibner, J. C. del Río, A. T. Martínez, A. Gutiérrez (2018) Selective epoxidation of fatty acids and fatty acid methyl esters by fungal peroxygenases. *ChemCatChem*, DOI: 10.1002/cctc.201800849. ([‡]co-primeros autores)

6.2 Patente

Gutiérrez Suárez A., Olmedo Mena-Bernal A., del Río Andrade J.C., Martínez Ferrer A.T. (2017) Process for shortening the hydrocarbon chain of a carboxylic acid by a peroxygenase. EP17382211

6.1 Publicación 1:

A. Olmedo, C. Aranda, J.C. del Río, J. Kiebist, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2016) From alkanes to carboxylic acids: terminal oxygenation by a fungal peroxygenase. *Angewandte Chemie International Edition* 128: 12436 – 12439.

From Alkanes to Carboxylic Acids: Terminal Oxygenation by a Fungal Peroxygenase

Andrés Olmedo¹, Carmen Aranda¹, José C. del Río¹, Jan Kiebist², Katrin Scheibner², Angel T. Martínez³, and Ana Gutiérrez*¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Reina Mercedes 10, 41012 Seville (Spain)

² JenaBios GmbH Orlaweg 2, 00743 Jena (Germany)

³ Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid (Spain)

* Corresponding author

Keywords: alkanes · carboxylic acids · oxidoreductases · peroxygenase · terminal hydroxylation

Abstract: A new heme–thiolate peroxidase catalyzes the hydroxylation of n-alkanes at the terminal position—a challenging reaction in organic chemistry—with H₂O₂ as the only cosubstrate. Besides the primary product, 1-dodecanol, the conversion of dodecane yielded dodecanoic, 12-hydroxydodecanoic, and 1,12-dodecanedioic acids, as identified by GC–MS. Dodecanal could be detected only in trace amounts, and 1,12-dodecanediol was not observed, thus suggesting that dodecanoic acid is the branch point between mono- and diterminal hydroxylation. Simultaneously, oxygenation was observed at other hydrocarbon chain positions (preferentially C2 and C11). Similar results were observed in reactions of tetradecane. The pattern of products formed, together with data on the incorporation of ¹⁸O from the cosubstrate H₂¹⁸O₂, demonstrate that the enzyme acts as a peroxygenase that is able to catalyze a cascade of mono- and diterminal oxidation reactions of long-chain n-alkanes to give carboxylic acids.

The selective oxyfunctionalization of saturated hydrocarbons under mild conditions is a major challenge in modern chemistry. Among the thousands of reagents for organic synthesis, few have been developed that are capable of the selective oxidation of alkanes.^[1] The alkane C-H bond is extremely inert and difficult to hydroxylate. Additionally, the similarity of methylene C-H bond strengths in a linear alkane and the lack of functional groups that can direct catalysis make selective hydroxylation of these compounds highly challenging. On the basis of their relative bond strengths, the terminal methyl C-H bonds are inherently more difficult to oxidize than the secondary or tertiary C-H bonds in the hydrocarbon chain. Members of the cytochrome P450 monooxygenase (P450) superfamily catalyze the selective oxyfunctionalization of many organic substrates under mild and environmentally friendly conditions,^[2] and some of them are able to catalyze the terminal oxygenation of alkanes.^[3,4] However, owing to their frequent requirement for costly cosubstrates and auxiliary enzymes, among other reasons, applications of these versatile biocatalysts mainly focus on the production of drug metabolites, pharmaceutical products, and some specialty chemicals.^[2,5,6]

A new heme peroxidase type was discovered 12 years ago in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*,^[7] which efficiently transfers oxygen to various organic substrates.^[8,9] This enzyme is able to catalyze reactions formerly assigned only to P450s.^[10] It differs from classical peroxidases by the presence of a cysteine residue as the fifth ligand of the heme iron atom,^[11] and shares the heme–thiolate center with P450s and with the chloroperoxidase from the ascomycete *Leptoxyphium fumago*, which also has oxygenation activity.^[8] However, unlike P450s, which are intracellular enzymes, whose activation often requires an auxiliary enzyme or protein domain and a source of reducing power, the *A. aegerita* enzyme is a secreted protein. It is therefore far more stable, and more importantly only requires H₂O₂ for activation.^[8] In the latter sense, peroxygenase catalysis has similarities with the so-called “peroxide shunt” operating in P450s, and with a few P450s that show strictly peroxide dependent activity.^[12] However, basidiomycete peroxygenases generally have better catalytic and stability properties than the above peroxide-activated P450s.

The *A. aegerita* peroxygenase was shown to catalyze interesting oxygenation reactions on aromatic compounds, and more recently its action on aliphatic compounds was demonstrated,^[13–16] thus expanding its biotechnological interest. Therefore, the enzyme is known as an unspecific peroxygenase (UPO). After the first peroxygenase from *A. aegerita* (*AaeUPO*),^[7] similar enzymes have been found in other basidiomycetes, such as *Coprinellus radians* (*CraUPO*)^[17] and *Marasmius rotula* (*MroUPO*),^[18] and there are indications for their widespread occurrence in the fungal kingdom.^[19,20] Moreover, an UPO from the sequenced genome of *Coprinopsis cinerea* (*CciUPO*) has been expressed in an industrial host and shown to catalyze interesting hydroxylation reactions.^[15,21,22] UPOs could approach the catalytic versatility of P450s and suitably supplement them in the near future.^[8] However, there are a number of reactions that had not yet been shown for UPOs, including terminal alkane hydroxylation.^[8] Previous studies^[13,14,22] showed the hydroxylation of *n*-alkanes by *AaeUPO* and *CciUPOs*, but the reaction is always subterminal (Figure 1).

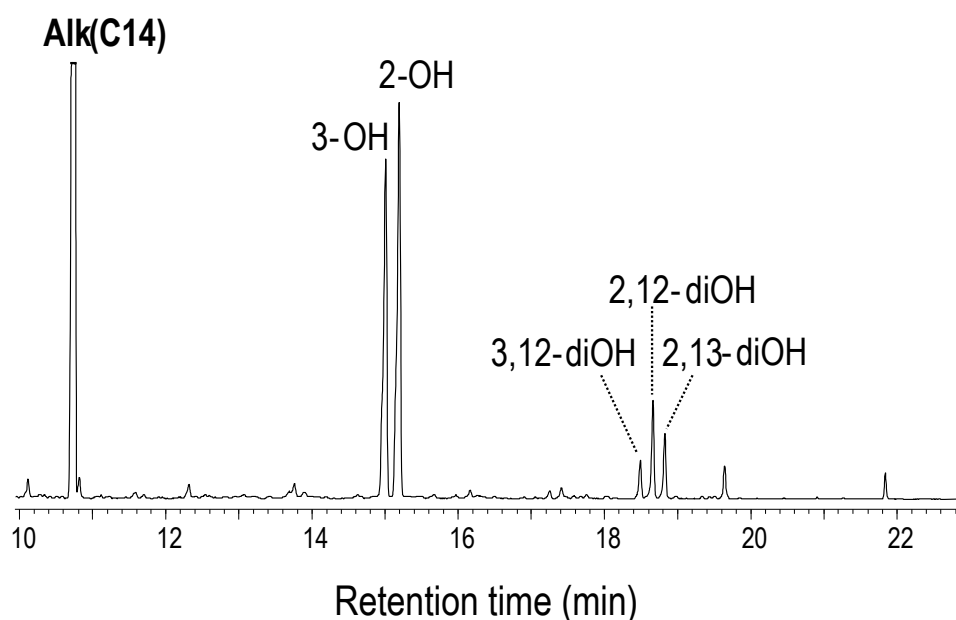


Figure 1. GC-MS analysis of *AaeUPO* reaction with tetradecane showing the remaining substrate (Alk, alkane) and the subterminal mono/di-dihydroxylated (OH) derivatives. See Supplemental material and methods for details.

The recently described *Mro*UPO presents differences with respect to the most extensively studied UPOs, such as higher activity towards aliphatic compounds, as well as the ability to oxidize bulkier substrates,^[8] and only shares approximately 30% sequence identity. It was also known that *Mro*UPO presents differences in the active site, such as a histidine residue (instead of a conserved arginine residue) as a charge stabilizer for heterolytic cleavage of the H₂O₂ O-O bond (after transient proton transfer to a conserved glutamate residue), thus resulting in compound I (CI) plus H₂O,^[8,11] although their relevance in catalysis is still to be established. Stimulated by these differences, we investigated the oxidation of *n*-alkanes with this new UPO.

With this purpose, we tested two linear saturated long-chain alkanes, *n*-dodecane and *n*-tetradecane, as *Mro*UPO substrates and identified the oxygenation products by GC-MS. With a substrate concentration of 0.3 mM (in 20% acetone), 68 and 45% conversion of dodecane and tetradecane, respectively, was observed at 120 min in reactions with *Mro*UPO (0.5 μM). Under these conditions, the enzyme is completely stable. The products of the reaction with dodecane are shown in Figure 2A (see also Table S1 in the Supporting Information), including those only formed by terminal hydroxylation/s, such as 1-dodecanol, dodecanoic acid, ω-hydroxydodecanoic acid, and 1,12-dodecanedioic acid. All the intermediates from an alkane 1 to a dicarboxylic acid 10 via the terminal fatty alcohol 2 and ω-hydroxy fatty acid 5 (Figure 3, left) were identified in the *Mro*UPO reactions, except the monoaldehyde 3 (traces) and carboxyaldehyde 9, apparently as a result of their rapid further oxidation. However, no terminal diol 6, ω-hydroxyaldehyde 7, or dialdehyde 8 (Figure 3, right) were observed. One explanation is that conversion of the diol (if formed) into the diacid is favored to such a degree that it proved impossible to observe the aldehydes. Indeed, the rapid conversion of the diol into the diacid was observed in the reaction of dodecanediol (Figure 2D) and tetradecanediol (not shown), and no dialdehyde was observed. However, the possibility that the diol 6 is not formed and the dicarboxylic acid is only produced via the monocarboxylic acid 4 seems more feasible, since in the reaction of dodecanol (Figure 2B) only dodecanoic acid and its

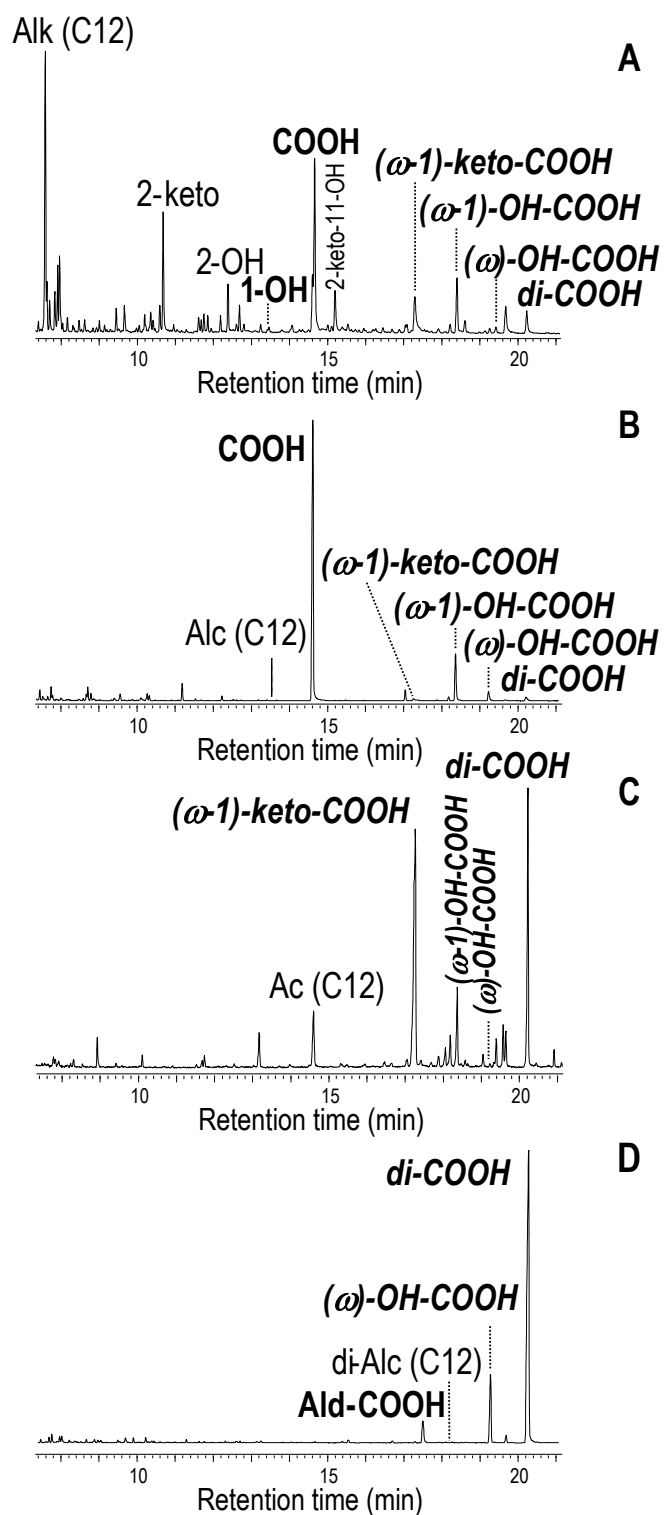


Figure 2. GC–MS analysis of *MroUPO* reactions with dodecane (A), 1-dodecanol (B), dodecanoic acid (C), and 1,12-dodecanediol (D) showing the remaining substrate (Alk, alkane; Alc, alcohol; and Ac, acid) and the terminal (**bold**), terminal/subterminal (**bold, italics**), and subterminal hydroxylated (OH) keto and carboxylic (COOH) derivatives (see the Supporting Information for details).

derivatives were identified. Indeed, the pattern of products derived from dodecanol is similar to that for dodecanoic acid (Figure 2C).

Some of the terminal-oxygenation products showed additional oxygenation at subterminal ($\omega-1$ and $\omega-2$) positions, with the formation of hydroxy and keto fatty acids (Figure 2A; see also Table S1). Therefore, in contrast with the exclusively subterminal hydroxylation reactions of *n*-alkanes by other UPOs (Figure 1), *MroUPO* is able to catalyze their terminal hydroxylation (ca. 50% of products in Figure 2). Moreover, a few products only showing subterminal oxygenation were also identified as alkane hydroxy, keto, and hydroxy/keto derivatives.

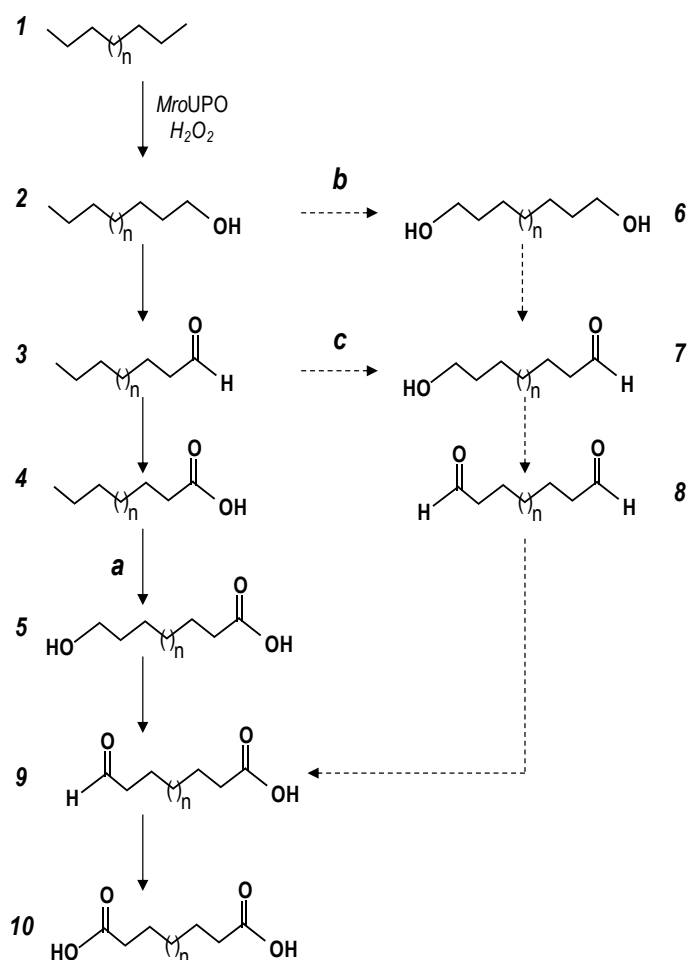
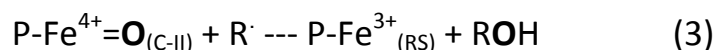
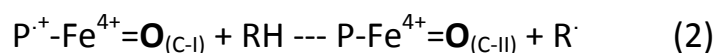
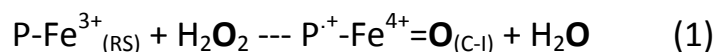


Figure 3. Pathways for the terminal oxygenation of *n*-alkanes to dicarboxylic acids, including identified and hypothetical intermediates, and three possible branch points (a, b and c) between mono- and dioxygenated compounds.

When the alkane reactions were performed at higher concentrations of acetone (40–60%) to improve solubility, the proportion of the compounds formed varied (see Table S1), probably as a result of increased relative solubility of the substrates with respect to oxidized intermediates. Finally, it was noted that higher conversion (up to 100%) was observed at lower substrate concentrations (as shown for 0.1 mM tetradecane in Figure S1 in the Supporting Information).

The most characteristic property of UPO is its ability to transfer oxygen to substrate molecules, which in the present case includes a cascade of sequential mono- and diterminal reactions of *n*-alkanes to give dicarboxylic acids. We therefore investigated the origin of the oxygen atoms introduced into the alkanes and intermediate compounds. The results of ^{18}O labeling reactions revealed that an oxygen atom from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (90% isotopic purity) is introduced into *n*-tetradecane to form 1-tetradecanol, whose diagnostic fragment (m/z 271; Figure 4A, top) appeared fully (90%) ^{18}O -labeled (m/z 273; Figure 4A, bottom). Direct evidence for the incorporation of an oxygen atom from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ in aldehyde formation could not be obtained, since the aldehyde was barely detected.

However, ^{18}O was incorporated in the carboxyl group of myristic acid, whose characteristic fragments (at m/z 285 and 117; Figure 4B, top) became ^{18}O -bilabeled (m/z 289 and 121; Figure 4B, bottom). Likewise, $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ oxygen atoms were incorporated into the fatty acid ω -hydroxylated derivative (see Figure S2A: ^{18}O -trilabeled diagnostic fragments at m/z 379 and 363) and dicarboxylic acid (see Figure S2B: ^{18}O -tetralabeled diagnostic fragment at m/z 395). In summary, the reaction of tetradecane in the presence of $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ showed ^{18}O labeling of the different hydroxy and carboxyl groups (see the Supporting Information for details). Therefore, it can be concluded that all oxygen atoms incorporated during alkane oxidation by *Mro*UPO are supplied by H_2O_2 and not from O_2 . The ^{18}O -labeling results agree with the peroxygenation mechanism depicted below,^[8,9] whereby the resting enzyme (RS), containing Fe^{3+} and a porphyrin (P), is activated by H_2O_2 to yield Cl, a $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ porphyrin cation radical (P^+) complex [Eq. (1)].



CI abstracts one H atom from the substrate (RH) to yield a radical (R[·]) plus compound II (CII), a Fe⁴⁺=O reduced porphyrin complex [Eq. (2)]. Finally, CII completes the hydroxylation reaction (R-OH formation) and returns to RS [Eq. (3)]. The initial product of n-alkane oxidation by *MroUPO* will be a terminal fatty alcohol, which is reported herein for the first time for a peroxygenase reaction.^[8,13] The product of fatty-alcohol oxidation by the peroxygenase will be a *gem*-diol from a second C1 hydroxylation, and will be either i) directly hydroxylated (even at the nascent stage) to yield a *gem*-triol intermediate, with irreversible dehydration to release the fatty acid, or ii) first dehydrated to the aldehyde and then hydroxylated to the fatty acid. Most ¹⁸O-labeling data indicate that the *gem*-diol/aldehyde is immediately hydroxylated (without hydroxyl exchange with the solvent); however, the existence of minor simple labeling of the carboxyl group in some *MroUPO* reactions (together with double labeling) suggests some hydroxyl exchange with the water at the aldehyde/*gem*-diol stage (only aldehyde traces found in the chromatograms), although the loss of ¹⁸O labeling is much lower than reported for the P450 cascade oxidation of hexadecanol.^[3] Hydroxylation of the aldehyde form was the mechanism suggested for the *AaeUPO* oxidation of benzyl alcohol to benzoic acid, in which, in contrast with our observations during this study, a substantial amount of the aldehyde accumulated.^[23] Finally, no diols or dialdehydes were detected in alkane oxidation by *MroUPO*, unlike in the oxidation of *n*-hexadecane with P450.^[3] Moreover, the pattern of products identified in the alkane (and fatty-alcohol) reactions suggests that diterminal oxyfunctionalization by *MroUPO* initiates at the monocarboxylic acid (Figure 3, reaction a) and not at the 1-alcohol or aldehyde (Figure 3,

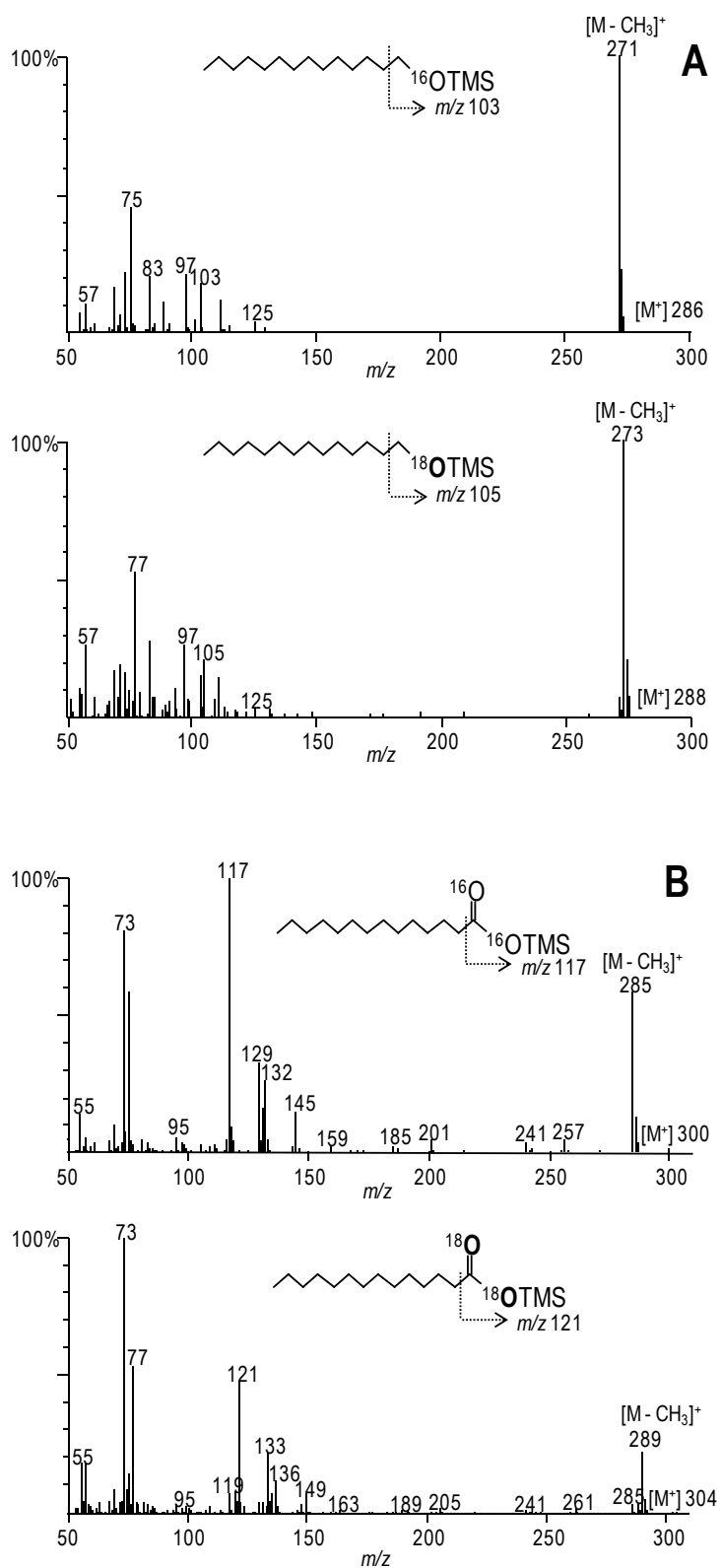


Figure 4. Mass spectra of 1-tetradecanol (A) and myristic acid (B) from *MroUPO* reactions with n-tetradecane in ^{18}O -labeling experiments (bottom) and controls (top). The formulae for the unlabeled compounds found in the $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ reactions (A and B, top) and the labeled compounds found in the $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (90% isotopic purity) reactions (A and B, bottom) are shown as trimethylsilyl (TMS) derivatives.

reactions b and c, respectively). Herein, we have described the first reaction cascade leading to reactive carboxylic acids from chemically inert alkanes with a peroxygenase. Having demonstrated the feasibility of the enzymatic terminal oxyfunctionalization of alkanes with *MroUPO*, we expect further studies to improve the regioselectivity of the enzyme, whose structure has been recently solved (PDB entry 5FUJ on hold), as reported for an engineered P450 BM3 variant that shows approximately 50% selectivity in the hydroxylation of the terminal position of a medium-chain alkane.^[24] This peroxygenase type has high industrial potential for the mild activation of alkanes, with the advantages of self-sufficient monooxygenase activity, thus enabling large-scale transformations, and the ability to hydroxylate the most unreactive terminal positions.

Acknowledgements: This study was funded by the INDOX (KBBE-2013-7-613549) EU project, and the BIORENZYMERIE (AGL2014-53730-R) and NOESIS (BIO2014-56388-R) projects of the Spanish MINECO (cofinanced by FEDER). R. Ullrich and M. Hofrichter (TU Dresden) are acknowledged for providing *AaeUPO* used for comparison, and E. D. Babot (IRNAS) for help in experimental assays.

References

- [1] M. Bordeaux, A. Galarneau, J. Drone, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 10712 – 10723; *Angew. Chem.* 2012, 124, 10870 – 10881.
- [2] P. R. Ortiz de Montellano, *Chem. Rev.* 2010, 110, 932 – 948.
- [3] U. Scheller, T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, W. H. Schunck, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 32528 – 32534.
- [4] J. B. Johnston, H. Ouellet, L. M. Podust, P. R. Ortiz de Montellano, *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 507, 86 – 94.
- [5] V. B. Urlacher, M. Girhard, *Trends Biotechnol.* 2012, 30, 26 – 36.
- [6] R. Fasan, *ACS Catal.* 2012, 2, 647 – 666.
- [7] R. Ullrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 4575 – 4581.
- [8] M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna, R. Ullrich, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 851, 341 – 368.
- [9] M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014, 19, 116 – 125.
- [10] R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* 2006, 124, 128 – 145.
- [11] K. Piontek, E. Strittmatter, R. Ullrich, G. Grobe, M. J. Pecyna, M. Kluge, K. Scheibner, M. Hofrichter, D. A. Plattner, *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 34767 – 34776.
- [12] O. Shoji, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014, 19, 529 – 539.
- [13] A. Gutiérrez, E. D. Babot, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, J. C. del Río, *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 514, 33–43.
- [14] S. Peter, M. Kinne, X. Wang, R. Ulrich, G. Kayser, J. T. Groves, M. Hofrichter, *FEBS J.* 2011, 278, 3667 – 3675.
- [15] E. D. Babot, J. C. del Río, M. Cañellas, F. Sancho, F. Lucas, V. Guallar, L. Kalum, H. Lund, G. Gröbe, K. Scheibner, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 4130 – 4142.

6. Publicaciones

- [16] F. Lucas, E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, R. Ullrich, M. Hofrichter, V. Guallar, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Catal. Sci. Technol.* 2016, 6, 288 – 295.
- [17] D. H. Anh, R. Ullrich, D. Benndorf, A. Svatos, A. Muck, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 5477 – 5485.
- [18] G. Gröbe, M. Ullrich, M. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, *AMB Express* 2011, 1, 31 – 42.
- [19] M. J. Pecyna, R. Ullrich, B. Bittner, A. Clemens, K. Scheibner, R. Schubert, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 84, 885 – 897.
- [20] D. Floudas et al., *Science* 2012, 336, 1715 – 1719.
- [21] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *ChemCatChem* 2015, 7, 283 – 290.
- [22] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 2323.
- [23] M. Kinne, C. Zeisig, R. Ullrich, G. Kayser, K. E. Hammel, M. Hofrichter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 397, 18 – 21.
- [24] P. Meinhold, M.W. Peters, A. Hartwick, A. R. Hernandez, F. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 763 – 772.

Supporting Information

From Alkanes to Carboxylic Acids: Terminal Oxygenation by a Fungal Peroxygenase

Andrés Olmedo, Carmen Aranda, José C. del Río, Jan Kiebist, Katrin Scheibner, Angel T. Martínez, and Ana Gutiérrez*

Table of contents

1. Supplemental materials and methods

1.1. Enzymes

1.2. Model substrates

1.3. Enzymatic reactions

1.4. GC-MS analyses

2. Supplemental results

2.1. *n*-Alkanes conversion: Product identification and effect of solvent concentration

2.2. Terminal hydroxylation of *n*-alkanes to dicarboxylic acids: ¹⁸O-labeling study

2.2.1. Fatty alcohol formation

2.2.2. Fatty acid formation

2.2.3. Hydroxyfatty acid formation

2.2.4. Dicarboxylic acid formation

3. Supplemental acknowledgement

4. Supplemental references

5. Complete reference cited in the main text

1. Supplemental materials and methods

1.1 Enzymes

The *Mro*UPO enzyme is a wild-type peroxygenase isolated from cultures of *M. rotula* DSM 25031, a fungus deposited at the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). *Mro*UPO was purified by FPLC to apparent homogeneity, confirmed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions, and showed a molecular mass of 32 kDa and isoelectric point of pH 5.0-5.3. The UV-visible spectrum of the enzyme showed a characteristic maximum at 418 nm (Soret band of heme-thiolate proteins).^[1] All media and columns used for enzyme isolation were purchased from GE Healthcare Life Sciences.

The *Aae*UPO included in the present study for comparative purposes (*A. aegerita* isoform II, 46 kDa) was provided by R. Ullrich and M. Hofrichter (Technical University of Dresden, Germany) after its isolation from cultures of *A. aegerita* grown in soybean-peptone medium, and subsequent purification using a combination of Q-Sepharose and SP-Sepharose and Mono-S ion-exchange chromatographic steps^[2].

One UPO activity unit is defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmol of veratryl alcohol to veratraldehyde (ϵ_{310} 9300 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) in 1 min at 24 °C, pH 7 (the optimum for peroxygenase activity) after addition of 2.5 mM H_2O_2 .

1.2 Model substrates

Two alkanes, namely *n*-dodecane and *n*-tetradecane (from Sigma-Aldrich), were studied as substrates of *Mro*UPO (and *Aae*UPO). Additionally, reactions using dodecanol and tetradecanol, dodecanoic and tetradecanoic acids (lauric and myristic acids, respectively) and dodecanediol and tetradecanediol as substrates (all of them from Sigma-Aldrich) were also studied to get further insight into the reactions of alkanes.

1.3 Enzymatic reactions

Reactions of the two model alkanes at 0.3 mM concentration (except in Figure S1 where 0.1 mM was used for complete conversion) with *MroUPO* (0.5-1 μ M) were performed in 5-mL vials containing 50 mM sodium phosphate (pH 5.5) at 40 °C and 30-120 min reaction time, in the presence of 2.5 mM H₂O₂, except for Figure S1 (10 mM), Figure 2A and dodecane reaction in Table S1 (5 mM in the two latter cases), where higher H₂O₂ concentrations yielded higher conversion rates. Prior to use, the substrates were dissolved in acetone and added to the buffer to give a final acetone concentration of 20% (v/v), although concentrations of 40% and 60% were also tested. A 120 min incubation in the presence of 20% acetone did not affect the activity of *MroUPO* while 40% and 60% acetone caused an activity loss of about 25%. In control experiments, substrates were treated under the same conditions (including 0.5-5 mM H₂O₂) but without enzyme.

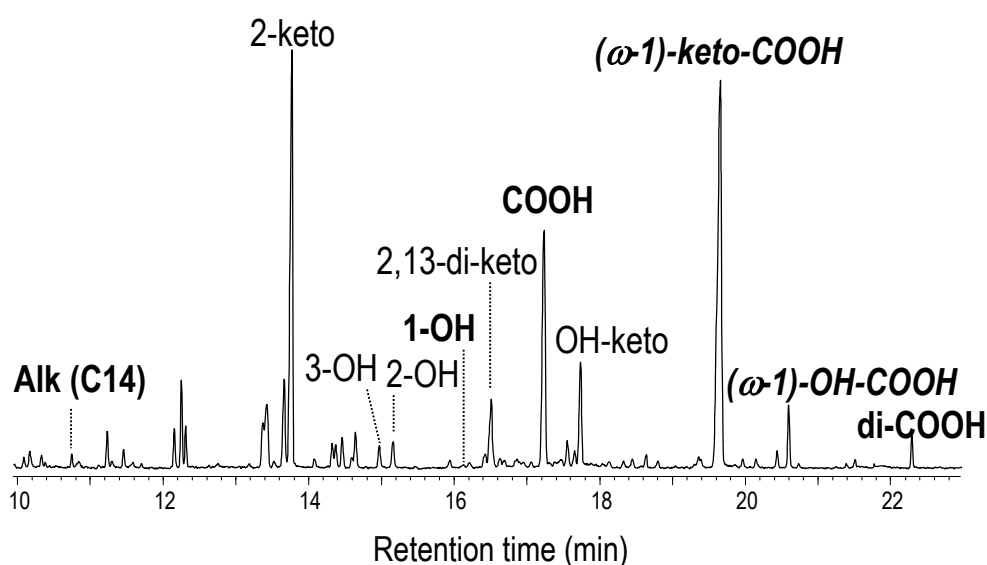


Figure S1. GC-MS analysis of *MroUPO* reaction with tetradecane showing the remaining substrate (Alk, alkane) and the terminal (bold), terminal/subterminal (bold italics), and subterminal carboxylic (COOH), hydroxylated (OH) and keto derivatives. Reactions with 0.1 mM substrate, 40% acetone, 10 mM H₂O₂ and 1 μ M of enzyme, incubated for 120 min.

Enzymatic reactions with ^{18}O -labeled hydrogen peroxide ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, 90% isotopic content) from Sigma-Aldrich (2% w:v solution) were performed under the same conditions described above. Likewise, *Mro*UPO (0.5 μM) reactions with 0.1 mM of dodecanol and tetradecanol, dodecanoic and tetradecanoic acids and dodecanediol and tetradecanediol, 20% (v/v) acetone, and 2.5 mM H_2O_2 (incubated for 30-60 min) were also performed. Reactions of tetradecane (0.3 mM) with *Aae*UPO were performed in 40% (v/v) acetone, at pH 7 and 2.5 mM H_2O_2 (incubated for 120 min). Products were recovered by liquid-liquid extraction with methyl *tert*-butyl ether and dried under N_2 . *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Supelco) was used to prepare trimethylsilyl (TMS) derivatives that were analyzed by GC-MS.

1.4 GC-MS analyses

The analyses were performed with a Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra, using a fused-silica DB-5HT capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter, 0.1 μm film thickness) from J&W Scientific. The oven was heated from 50 $^\circ\text{C}$ (1.5 min) to 90 $^\circ\text{C}$ (2 min) at 30 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, and then from 90 $^\circ\text{C}$ to 250 $^\circ\text{C}$ (15 min) at 8 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The injection was performed at 250 $^\circ\text{C}$ and the transfer line was kept at 300 $^\circ\text{C}$. Compounds were identified by mass fragmentography, and comparing their mass spectra with those of the Wiley and NIST libraries and standards. Quantification was obtained from total-ion peak area, using response factors of the same or similar compounds. Data from replicates were averaged and, in all cases (substrate conversion and relative abundance of reaction products), the standard deviations were below 3.5% of the mean values.

2. Supplemental results

2.1 *n*-Alkanes conversion: Product identification and effect of cosolvent concentration

n-Dodecane and *n*-tetradecane were tested as *Mro*UPO substrates. The substrate conversion and identification of reaction products were

6. Publicaciones

Table S1. Abundance (relative percentage) of the oxygenated derivatives (with alcohol, ketone and acid groups) identified by GC-MS in the reactions of *n*-dodecane and *n*-tetradecane (0.3 mM) with *M. rotula* peroxygenase (1 μ M) at 120 min reaction times using different acetone concentrations (20%, 40% and 60%).

	Dodecane		Tetradecane		
	20%	20%	40%	60%	
<i>Alcohols</i>					
1-OH	0.8	0.5	-	7.9	
2-OH	5.6	2.6	8.4	45.9	
3-OH	1.7	1.5	4.5	12.8	
4-OH	1.7	-	5.2	9.7	
5-OH	1.2	-	4.7	7.3	
6-OH	1.7	-	4.5	6.0	
<i>Aldehydes/ketones</i>					
aldehyde	-	-	-	-	
2-keto	20.3	3.9	17.0	-	
3-keto	4.6	2.0	3.8	-	
4-keto	2.2	1.1	1.2	-	
5-keto	1.6	1.3	1.1	-	
6-keto	-	1.3	1.4	-	
7-keto	-	1.5	1.6	-	
<i>Acids</i>					
fatty acid	22.6	8.0	24.0	10.4	
<i>Hydroxy-ketones</i>					
2-OH, 11-keto	10.3	-	7.8	-	
2-OH, 10-keto	1.1	-	1.8	-	
3-OH, 11-keto	1.5	-	2.0	-	
<i>Di-keto</i>					
di-keto	-	19.9	-	-	
<i>Hydroxy-acids</i>					
ω -OH	0.9	1.0	0.6	-	
(ω -1)-OH	7.5	0.6	1.2	-	
(ω -2)-OH	1.3	0.3	0.2	-	
(ω -3)-OH	0.9	-	-	-	
(ω -4)-OH	0.2	-	-	-	
(ω -5)-OH	0.4	-	-	-	
α -OH	-	1.7	-	-	
<i>Keto-acids</i>					
(ω -1)-keto	8.2	35.9	7.7	-	
(ω -2)-keto	-	5.7	0.9	-	
(ω -3)-keto	-	5.0	-	-	
(ω -4)-keto	-	3.0	-	-	
<i>Di-acids</i>					
di-COOH	3.9	3.4	0.4	-	
<i>Total terminal derivatives</i>	46.7	65.1	26.4	27.4	
<i>Conversion rate</i>	68%	45%	50%	22%	

obtained by GC-MS (Table S1). Since the enzymatic oxidation of alkanes in aqueous solutions can be limited by their low solubility in water, these reactions were studied using different acetone:water ratios. The conversion of tetradecane by *MroUPO* was similar (45 and 50% substrate conversion) in the reactions with 20% and 40% acetone, respectively, and higher than in the reaction with 60% acetone.

On the other hand, the relative proportion of the derivatives formed was definitely different (Table S1). The predominance of primary oxidation products (monohydroxylated derivatives) or further oxidized derivatives (aldehydes/ketones, acids, hydroxy/ketone acids) seems related to the higher or lower proportion of acetone in the reaction. With 60% acetone, the monohydroxylated derivatives were predominant (over 80% of total derivatives) after 120 min of reaction, whereas in the reactions with 20% acetone most derivatives (over 80%) were fatty acids and fatty acid derivatives and only a very minor proportion of monohydroxylated derivatives were identified at that reaction time. The reaction with 40% acetone gave similar results as that at 20% although with more presence of monohydroxylated derivatives.

The predominance of more oxidized derivatives over the monohydroxylated ones observed in the reactions with 20% acetone, could be due to the higher solubility of the primary oxidation products (monohydroxylated derivatives) in the reaction medium compared with the substrate (alkane) that favored the additional hydroxylation of the alcohols over the alkanes. At higher concentration of acetone in the reaction medium the alkanes become more soluble and both reactions are competing.

The above results were attained in the reactions using 0.3 mM substrate. However, higher conversion rates (up to 100%) were attained in reactions using lower substrate concentration (0.1 mM) as shown in Figure S1 for tetradecane.

The presence of the different terminal oxygenation products described above in the alkane reactions with *MroUPO* contrasts with their complete absence in parallel reactions with *AaeUPO*, where only subterminal

hydroxylated derivatives were found (2- and 3-tetradecanol and 2,12-, 2,13- and 3,12-tetradecanediol in the tetradecane reactions shown in Figure 1) in agreement with previous reports.^[3-5]

2.2 Terminal hydroxylations of *n*-alkanes to dicarboxylic acids: ¹⁸O-labeling study

An ¹⁸O-labeling study, using *n*-tetradecane and *n*-dodecane as substrates, and either H₂¹⁸O₂ or H₂¹⁶O₂ as enzyme cosubstrate, was performed to investigate the origin of the oxygen incorporated during the oxygenation of *n*-alkanes. The identification by GC-MS of the different oxidation products at terminal positions in the reaction of *n*-tetradecane is discussed below, and similar results were obtained in the *n*-dodecane reactions.

2.2.1 Fatty alcohol formation

A terminal alcohol was identified for the first time in the reaction of an *n*-alkane with a peroxygenase. The position of the hydroxyl group was determined by the mass spectra of their trimethylsilyl derivatives, as illustrated in Figure 4A (*top*) for 1-tetradecanol. This spectrum shows a prominent fragment at *m/z* 271 corresponding to the loss of a methyl from the trimethylsilyl group [M - CH₃]⁺ and other characteristic fragments (e.g. at *m/z* 103).

In the reaction using H₂¹⁸O₂, mass spectral analysis of the resulting monohydroxylated alkanes showed that characteristic fragments for the 1-tetradecanol had ~90% shifted from the natural abundance *m/z* 271 (and *m/z* 103) found in the unlabeled peroxide reaction to *m/z* 273 (and *m/z* 105) (Figure 4A, *bottom*). Therefore, it was evidenced that one oxygen atom derived from H₂¹⁸O₂ was introduced into the 1-methyl group of *n*-tetradecane during the first hydroxylation step, as verified by the nearly complete transformation (90%) of the ¹⁶O-containing diagnostic fragment ion at *m/z* 271 to the ¹⁸O-containing ion at *m/z* 273 (~10% of the original

fragments remained in the $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ reactions due to the 90% ^{18}O isotopic purity of the labeled peroxide used).

2.2.2 Fatty acid formation

The fatty acids (lauric and myristic acids) were some of the main products identified in the reactions of *Mro*UPO with dodecane and tetradecane, respectively. Incorporation of ^{18}O from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ to the carboxyl group was observed during the oxidation of *n*-tetradecane to myristic acid (Figure 4B). Mass spectral analysis of the myristic acid formed, showed that the characteristic fragment at $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ had shifted from the natural abundance m/z 285 found in the unlabeled peroxide reaction (Figure 4B, *top*) to m/z 289 (incorporation of two ^{18}O atoms at the carboxyl group) (Figure 4B, *bottom*). Likewise, the characteristic fragment at m/z 117 had shifted to m/z 121 (incorporation of two ^{18}O atoms at the carboxyl group). The small fragment at m/z 300 corresponding to molecular ion also shifted to m/z 304. Finally, 10% unlabeled acid was also formed due to the partial isotopic purity of the peroxide used.

2.2.3 Hydroxyfatty acid formation

The ω -hydroxyfatty acids (12-hydroxylauric and 14-hydroxymyristic acids) were identified in the reactions of *Mro*UPO with dodecane and tetradecane, respectively, although they were present in minor amounts.

The incorporation of ^{18}O from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ was evidenced in the mass spectra of the 14-hydroxymyristic acid (Figure S2A). The characteristic fragments at $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ had shifted from the natural abundance m/z 373 found in the unlabeled peroxide reaction (Figure S2A, *top*) to m/z 379 (incorporation of three ^{18}O atoms) (Figure S2A, *bottom*). Likewise, the fragments at $[\text{M} - 31]^+$ and $[\text{M} - 105]^+$, resulting from trimethylsilyl and hydrogen transfers during EI mass spectral fragmentation of hydroxycarboxylic acid trimethylsilyl derivatives^[6] shifted from the natural abundance m/z 357 and m/z 283, respectively, found in the unlabeled peroxide reaction to m/z 363 and m/z 287.

6. Publicaciones

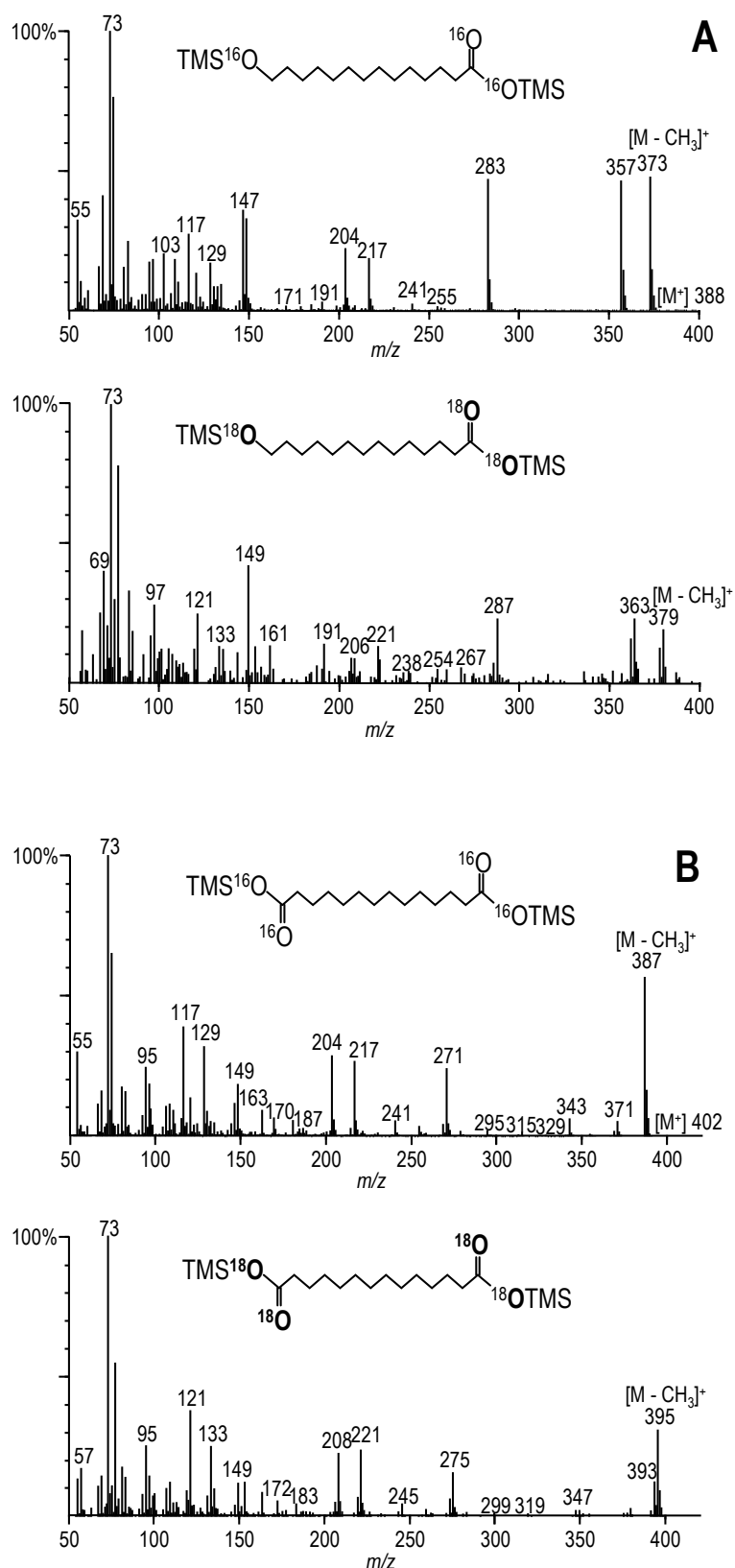


Figure S2. Mass spectra of ω -hydroxymyristic (A) and tetradecanedioic (B) acids from *Mro*UPO reactions with *n*-tetradecane in ^{18}O -labeling experiments (*bottom*) and controls (*top*).

2.2.4 Dicarboxylic acid formation

The dicarboxylic acids (dodecanedioic and tetradecanedioic acids) were identified in the reactions of *Mro*UPO with dodecane and tetradecane, respectively, although in lower amount than the corresponding monocarboxylic acids.

The incorporation of ^{18}O from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ was evidenced in the mass spectra of the tetradecanedioic acid (Figure S2B). The characteristic fragments at $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ had shifted from the natural abundance m/z 387 found in the unlabeled peroxide reaction (Figure 4B, *top*) to m/z 395 (incorporation of four ^{18}O atoms) (Figure S2B, *bottom*).

3. Supplemental acknowledgement

René Ullrich and Martin Hofrichter (Technical University of Dresden, Zittau, Germany) are acknowledged for the *Aae*UPO sample used for comparative purposes.

4. Supplemental references

- [1] G. Gröbe, M. Ullrich, M. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, *AMB Express* 2011, *1*, 31-42.
- [2] R. Ullrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, *70*, 4575-4581.
- [3] A. Gutiérrez, E. D. Babot, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, J. C. del Río, *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, *514*, 33-43.
- [4] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, *110*, 2332.
- [5] S. Peter, M. Kinne, X. Wang, R. Ulrich, G. Kayser, J. T. Groves, M. Hofrichter, *FEBS J.* 2011, *278*, 3667-3675.

[6] J. F. Rontani, C. Aubert, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 2008, 19, 66-75.

5. Complete reference cited in the main text

[23] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martínez, R. Otilar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav, A. Aerts, I. Benoit, A. Boyd, A. Carlson, A. Copeland, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. Ferreira, K. Findley, B. Foster, J. Gaskell, D. Glotzer, P. Górecki, J. Heitman, C. Hesse, C. Hori, K. Igarashi, J. A. Jurgens, N. Kallen, P. Kersten, A. Kohler, U. Kües, T. K. A. Kumar, A. Kuo, K. LaButti, L. F. Larrondo, E. Lindquist, A. Ling, V. Lombard, S. Lucas, T. Lundell, R. Martin, D. J. McLaughlin, I. Morgenstern, E. Morin, C. Murat, M. Nolan, R. A. Ohm, A. Patyshakuliyeva, A. Rokas, F. J. Ruiz-Dueñas, G. Sabat, A. Salamov, M. Samejima, J. Schmutz, J. C. Slot, F. St.John, J. Stenlid, H. Sun, S. Sun, K. Syed, A. Tsang, A. Wiebenga, D. Young, A. Pisabarro, D. C. Eastwood, F. Martin, D. Cullen, I. V. Grigoriev, D. S. Hibbett, *Science* 2012, 336, 1715-1719.

6.1 Publicación 2:

A. Olmedo, J.C. del Río, J. Kiebist, R. Ullrich, M.Hofrichter, K. Scheibner, A.T. Martínez, A. Gutiérrez (2017) Fatty acid chain shortening by a fungal peroxygenase. *Chemistry – A European Journal* 23, 16985 – 16989.

Fatty Acid Chain Shortening by a Fungal Peroxygenase

Andrés Olmedo¹, José C. del Río¹, Jan Kiebist², René Ullrich⁴, Martin Hofrichter⁴, Katrin Scheibner², Angel T. Martínez³, and Ana Gutiérrez*¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Reina Mercedes 10, 41012 Seville (Spain)

² JenaBios GmbH Orlaweg 2, 00743 Jena (Germany)

³ Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid (Spain)

⁴ TU Dresden Markt 23, 02763 Zittau (Germany)

* Corresponding author

Keywords: carboxylic acids · chain shortening · enzymes · hydrogen peroxide · oxidation

*Abstract: A recently discovered peroxygenase from the fungus *Marasmius rotula* (MroUPO) is able to catalyze the progressive one-carbon shortening of medium and long-chain mono- and dicarboxylic acids by itself alone, in the presence of H₂O₂. The mechanism, analyzed using H₂¹⁸O₂, starts with an α -oxidation catalyzed by MroUPO generating an α -hydroxy acid, which is further oxidized by the enzyme to a reactive α -keto intermediate whose decarboxylation yields the one-carbon shorter fatty acid. Compared with the previously characterized peroxygenase of *Agrocybe aegerita*, a wider heme access channel, enabling fatty acid positioning with the carboxylic end near the heme cofactor (as seen in one of the crystal structures available) could be at the origin of the unique ability of MroUPO shortening carboxylic acid chains.*

The use of biocatalysts for organic synthesis replacing traditional metal catalysts has several advantages, such as better regio- and stereoselectivity, fewer side products, and potentially lower environmental impact. Enzymes that catalyze the transfer of an oxygen atom from peroxide to substrates are classified as peroxygenases (EC.1.11.2). Unspecific peroxygenase (UPO, EC 1.11.2.1) is the most prominent member of this group because of its versatility for oxygen transfer reactions^[1] that makes it highly attractive as industrial biocatalyst.^[2-4]

The first UPO was described in the basidiomycetous fungus *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*)^[5] catalyzing reactions formerly assigned only to P450 monooxygenases (P450s). However, unlike P450s that are intracellular enzymes and often require a flavincontaining auxiliary enzyme or protein domain and a source of reducing power [NAD(P)H], UPO is a secreted protein, therefore far more stable, and only requires H₂O₂ for activation.^[2] *AaeUPO* was shown to catalyze oxygenation reactions on aromatic compounds,^[6] and later, the action on aliphatic compounds was demonstrated,^[7,8] expanding its biotechnological relevance. Since then, similar UPO proteins have been purified from other basidiomycetes and ascomycetes such as *Coprinellus radians*,^[9] *Marasmius rotula*^[10] and *Chaetomium globosum*;^[11] and almost 3000 related sequences (from sequenced genomes and environmental samples) are currently available in databases.^[1,11]

The peroxygenase from *M. rotula* (*MroUPO*) shows several special features compared to other UPOs, for example, the inability to oxidize halides, less pronounced capacity to oxygenate aromatics,^[10] and the unique ability for terminal hydroxylation of n-alkanes.^[12] Despite the widespread occurrence of peroxygenases and related heme-thiolate peroxidases, only two molecular structures have been reported to date, corresponding to the classic ascomycete chloroperoxidase (CPO),^[13] and *AaeUPO*.^[14]

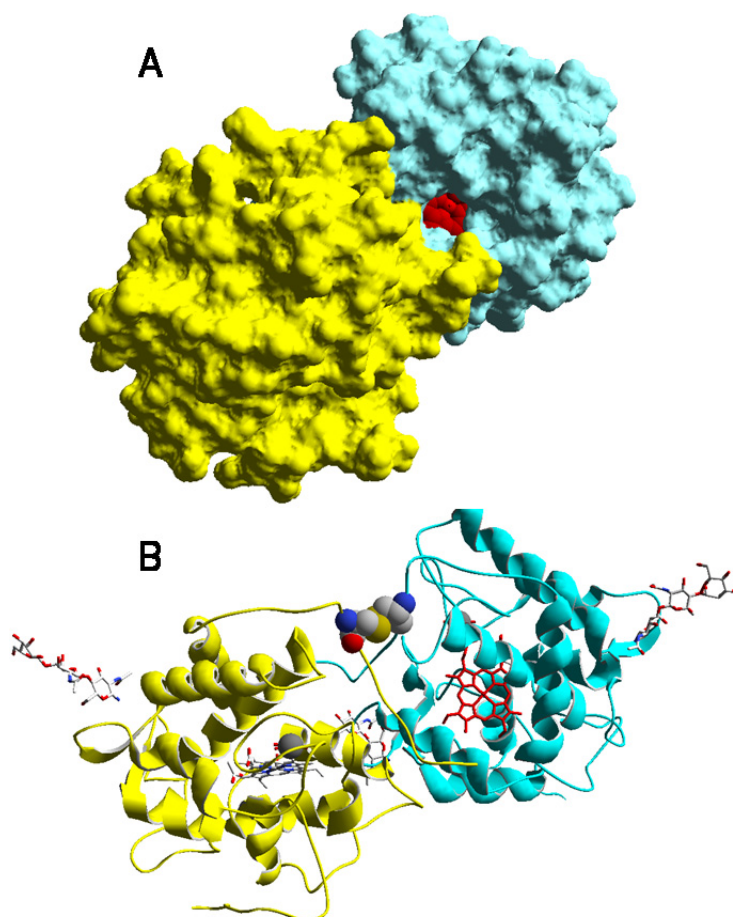


Figure 1. Dimeric *MroUPO*. A) Solvent-access surface with one of the heme cofactors (red spheres) visible through an access channel. B) Ribbon-like model including the C227-C'227 disulfide bond (CPK-colored spheres), the two cofactors (red and CPK sticks), and surface glycosylation (CPK sticks). From 5FUJ.

Fortunately, the crystal structure of *MroUPO* has just been made available (PDB entries 5FUJ and 5FUK). Interestingly, although *MroUPO* is a dimeric protein due to an inter-monomer disulfide bond (Figure 1B, whereas *AaeUPO* and *CPO* are monomers), this fact does not affect the accessibility to the heme channel and cofactor (Figure 1A).

Here, the one-carbon shortening of carboxylic acids, a fascinating reaction catalyzed by *MroUPO*, is revealed. This reaction was first evidenced when a dicarboxylic acid (tetradecanedioic acid) was tested as substrate of the enzyme, and the products were analyzed by gas chromatography–mass

spectrometry (GC-MS) (Figures 2A, B, S1 and S2). High (93%) substrate (0.1 mm) conversion by *MroUPO* (≈ 2 mM) was attained in 24 h, yielding a series of chain-shortened dicarboxylic acids, such as tridecanedioic (63% of products) and dodecanedioic (13%) acids, together with α -, β - and γ -hydroxyderivatives. The reaction was also studied with *AaeUPO* (Figure 2C), which failed to convert the substrate.

When monocarboxylic fatty acids were studied as *MroUPO* substrates, the shortening reaction seemed to be chain-length dependent. With tetradecanoic acid, terminal and subterminal oxygenations (forming the dicarboxylic and $[\omega-1]$ -keto derivatives, respectively) were predominant (Figure 3A). However, with decanoic acid, a relevant amount of nonanoic acid was generated (Figure 3B), although the reaction was less selective than with dicarboxylic acids.

To explore the role of α -, β - and γ -hydroxy-derivatives as intermediates in the chain-shortening mechanism, we studied the reactions of α - and β -hydroxytetradecanoic acids with *MroUPO*. With the α -hydroxy-derivative, tridecanoic acid was one of the main products (Figure S3 A), but no chain shortening was accomplished with the β -hydroxy-derivative (Figure S3 B). This confirms that both even and odd chain fatty acids are produced by successive removal of one carbon atom after α -oxidation (although, under some forced reaction conditions, some two-carbon shortenings of β -hydroxy acid could be observed as well; Figure S4).

Despite the difficulties for GC-MS estimation of initial rates in the above *MroUPO* reactions, apparent kinetic constants could be obtained for the products: i) resulting in chain-shortening; and ii) of other oxygenation reactions (Table 1). Concerning shortening, the *MroUPO* had higher catalytic efficiency (kcat/Km) on C10 than on di-C14, due to the almost 10-fold higher catalytic constant (kcat), although it was less selective as shown by the ratios (0.8 and 2.0, respectively) between the catalytic efficiencies of shortening and other reactions. The chain-shortening of both mono- and dicarboxylic acids, and the α -hydroxylation of carboxylic acids by a peroxygenase are reported here for the first time.

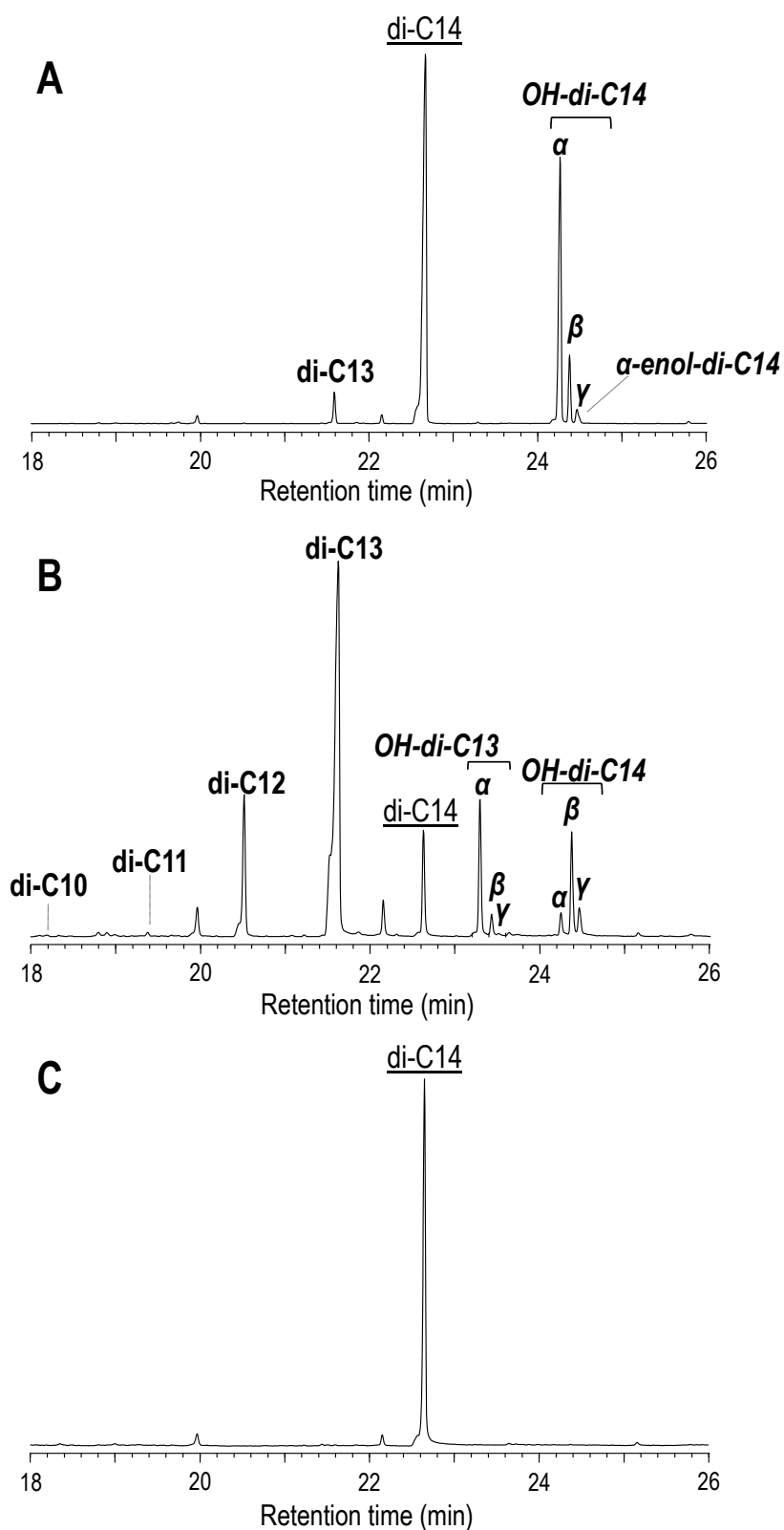


Figure 2. GC-MS of 1 h (A) and 24 h (B) reactions of tetradecanedioic acid (underlined) with *MroUPO*, and with *AaeUPO* after 24 h (C), showing the shortened dicarboxylic acids, and the *α*-, *β*-, and *γ*-hydroxylated and *α*-enol derivatives (*italics*) (see mass spectra in Figures S1 and S2).

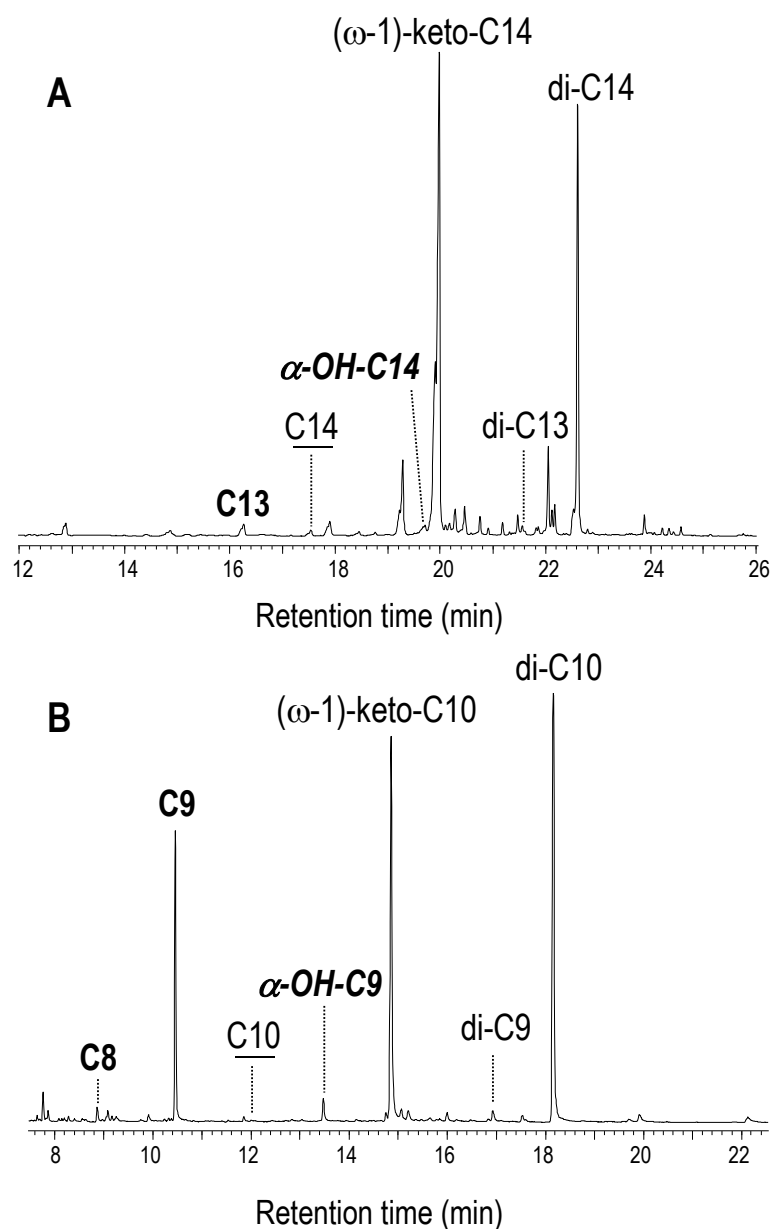
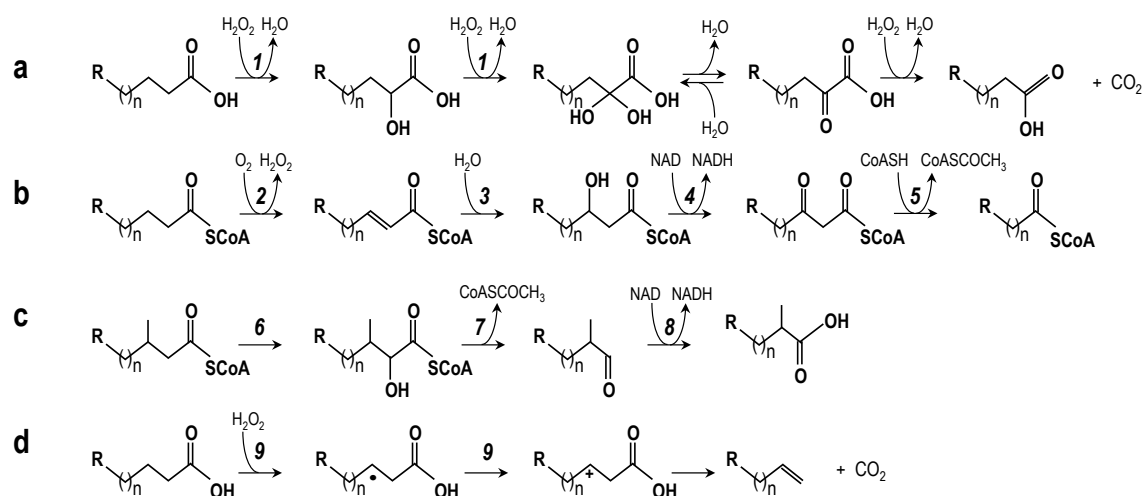


Figure 3. Comparison of tetradecanoic acid (A) and decanoic acid (B) reactions (2 h) with *MroUPO* showing the remaining substrate (underlined), the shortened monocarboxylic acids, and the α -hydroxy, (ω -1)-keto and dicarboxylic derivatives.

To get additional insight into the chain shortening mechanism, ^{18}O -labeling studies with $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (90% isotopic purity) were performed using tetradecanedioic acid as target substrate (Figures S1 and S2). Overall, our data led to the chain shortening mechanism depicted in Scheme 1a.

Table 1. Apparent kinetic constants for tetradecanedioic acid (di-C14) and decanoic acid (C10) reactions with *MroUPO*.

	k_{cat} [min^{-1}]	K_{m} [μM]	$k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ [$\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$]
Chain shortening ^[a]			
di-C14	32 ± 9	557 ± 295	58 ± 4
C10	293 ± 98	703 ± 549	420 ± 350
Other oxygenations ^[b]			
di-C14	7 ± 1	239 ± 42	28 ± 5
C10	337 ± 92	649 ± 430	520 ± 370

[a] After oxygenation at α position. [b] At β , γ , ω and $\omega-1$ positions.**Scheme 1.** Comparison of fatty-acid shortening reactions: a) α -oxidation and decarboxylation by *MroUPO*; b) usual β -oxidation (multienzymatic) pathway; c) α -oxidation (multienzymatic) pathway for β -methylated acids; and d) decarboxylation and alkene formation by P450; (R, H or COOH; enzymes: 1, *MroUPO* 2, acyl-CoA oxidase; 3, enoyl-CoA hydratase; 4, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; 5, 3-ketoacyl-CoA thiolase; 6, phytanoyl-CoA hydroxylase; 7, 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase; 8, aldehyde dehydrogenase; and 9, P450 fatty-acid decarboxylase).

The initial product of *Mro*UPO reaction will be the α -hydroxy acid, as demonstrated by incorporation of $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ oxygen to form α -hydroxytetradecanedioic acid, whose diagnostic fragment (m/z 373, Figure S1 A, top) appeared fully (90%) ^{18}O -labeled (m/z 375, Figure S1 A, bottom). Its oxidation will yield a *gem*-diol (ketone hydrate) from a second C_α hydroxylation by *Mro*UPO that will be in equilibrium with the ketone by dehydration, and then will react with excess H_2O_2 decarboxylating and forming a new carboxyl group (chain shortening) as explained below.

Direct evidence for involvement of $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ -borne oxygen into the *gem*-diol/ketone formation yielding α -ketotetradecanedioic could not be obtained, since α -keto acids rapidly decarboxylate in the presence of oxidizing agents including H_2O_2 .^[15] However, evidence of their transient formation was obtained, as the enolic form was detected (Figures 2A, S3A and S5 A). ^{18}O -labeling also illuminated the formation of tridecanedioic acid after incorporation of two or one ^{18}O -atoms (Figure S1 B, bottom). The co-existence of single and double ^{18}O -labeling in the carboxylic group suggests that a *gem*-diol, with some hydroxyl exchange with the water (labelling loss), may occur prior to decarboxylation and chain shortening. This second α hydroxylation is clearly provoked by the enzyme and not by the H_2O_2 , as revealed by the negative control with α -hydroxytetradecanoic acid and H_2O_2 in the absence of enzyme (Figure S6). However, the final reaction step can directly be produced by the H_2O_2 present in the UPO reaction set-up, mediated by a hydroperoxide intermediate, as reported for other α -ketoacids.^[16]

The different reactivity of *Mro*UPO and *Aae*UPO regarding α -hydroxylation could be explained by the only recently available crystal structure of *Mro*UPO (PDB entries 5FUJ and 5FUK) compared with the previously reported *Aae*UPO structure.^[14] *Mro*UPO is a smaller protein but it has a wider heme-access channel (Figure 4A) than *Aae*UPO (Figure 4B), the channel of which is flanked by several bulky phenylalanine residues (a narrow access channel also exists in CPO). This wider heme channel directly exposes the reactive $\text{Fe}=\text{O}$ of H_2O_2 -activated *Mro*UPO (compound I) to the entering substrate, enabling oxygenation at the α -position of carboxylic acids.

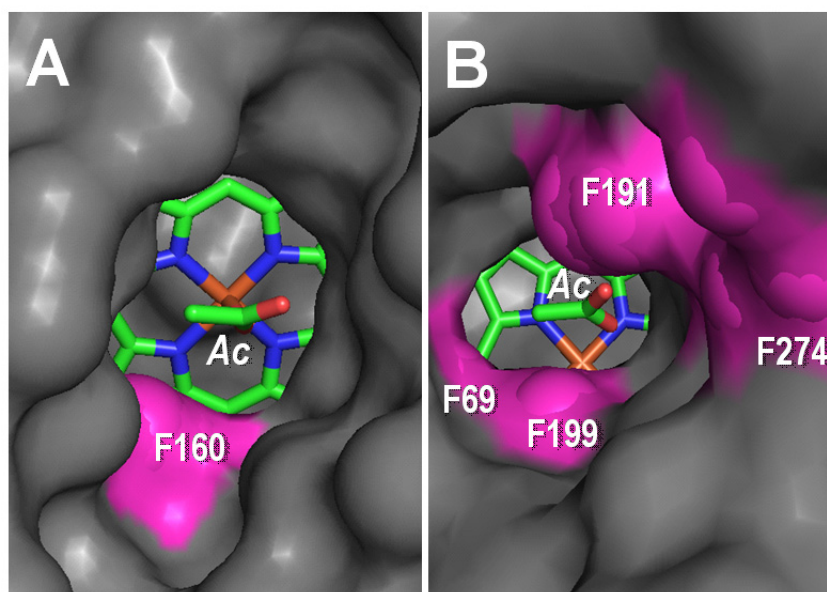


Figure 4. Different sizes of the heme-access channel in *MroUPO* (A) and *AaeUPO* (B), and bulky phenylalanine residues (magenta) (an acetate occupies the substrate-binding site). From 5FUJ (A) and 2YP1 (B).

Interestingly, one of the *MroUPO* crystal structures available (5FUK) includes a bound palmitic acid molecule along the heme access channel with one of the carboxylate oxygens at coordination distance of the heme iron (Figure 5A) (while an acetate occupies this position in 5FUJ, Figure 5B). Sub-terminal oxygenation by most UPOs implies fatty-acid binding with the carboxyl located at the channel entrance. However, the palmitic acid position found in the 5FUK crystal is in agreement with the unique chain-shortening ability reported here for *MroUPO*.

In summary, we show the ability of *MroUPO* to catalyze the stepwise chain shortening of carboxylic acids through a chemo-enzymatic reaction cascade (Scheme 1a). In plants, fungi and animals, the general β -oxidation pathway, leads to two-C shorter acids (Scheme 1b)^[17] and the alternative α -oxidation pathway (Scheme 1c), leading to one-C shorter fatty acids, typically includes several steps (hydroxylation, activation, cleavage of the C1-C2 bond and aldehyde dehydrogenation) with several enzymes involved.^[18]

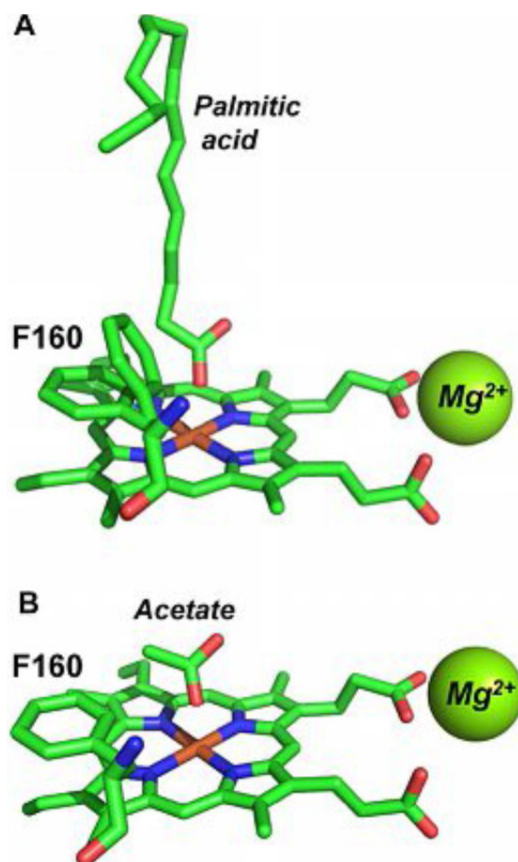


Figure 5. Palmitic acid (A) and acetate (B) ligands in *MroUPO* crystal structures. Ligands, heme cofactor and neighbor Phe160 are shown as sticks (CPK colors) while Mg^{2+} cations are shown as spheres (when palmitic acid is present in the crystal, the Phe160 side-chain adopts two different conformations). From PDB entries 5FUK (A) and 5FUJ (B).

However, *MroUPO* is capable of catalyzing all these reactions self-sufficiently (i.e. alone), in the presence of H_2O_2 . Bacterial P450s are also known to decarboxylate fatty acids, but in this case n-1 terminal alkenes (Scheme 1d), instead of chain-shortened fatty acids, are formed.^[19]

This carbon-by-carbon chain-shortening reaction represents a novel chemistry that may be used in biotechnological applications including the

obtainment of tailor-made acids such as odd-numbered dicarboxylic or monocarboxylic fatty acids (less abundant in nature than the even-numbered ones). The “oddeven” effect on the aqueous solubility of dicarboxylic acids^[20] could be used for product isolation, and in the synthesis of *ad hoc* polymers.^[21] The chain-shortening reaction described here must be added to the repertoire of reactions that versatile fungal peroxygenases catalyze on linear^[12,22] and cyclic aliphatic compounds,^[23,24] in addition to aromatic compounds.^[1,2] The availability of a heterologous expression system for *MroUPO* will permit to improve the catalytic properties of this promising enzyme, for example, in chain-shortening and/or alkane terminal hydroxylation reactions,^[12] using the protein engineering tools recently applied to *AaeUPO*.^[25]

Acknowledgements: This work was supported by the EnzOx2 (H2020-BBI-PPP-2015-2-1-720297) EU-project, and the BIOENZYMERY (AGL2014-53730-R) and NOESIS (BIO2014-56388-R) projects of the Spanish MINECO (co-financed by FEDER). E.D. Babot (IRNAS) is thanked for experimental help.

References

- [1] M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna, R. Ullrich, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 851, 341–368.
- [2] M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014, 19, 116–125.
- [3] S. Bormann, A. G. Baraibar, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *Catal. Sci. Technol.* 2015, 5, 2038–2052.
- [4] A. T. Martínez, F. J. Ruiz-Dueñas, S. Camarero, A. Serrano, D. Linde, H. Lund, J. Vind, M. Tovborg, O. M. Herold-Majumdar, M. Hofrichter, et al., *Biotechnol. Adv.* 2017, 35, 815–831.
- [5] R. Ullrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 4575–4581.
- [6] M. Hofrichter, R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 871–897.
- [7] A. Gutiérrez, E. D. Babot, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, J. C. del Río, *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 514, 33–43.
- [8] S. Peter, M. Kinne, X. Wang, R. Ulrich, G. Kayser, J. T. Groves, M. Hofrichter, *FEBS J.* 2011, 278, 3667–3675.
- [9] D. H. Anh, R. Ullrich, D. Benndorf, A. Svatos, A. Muck, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 5477–5485.
- [10] G. Gröbe, M. Ullrich, M. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, *AMB Express* 2011, 1, 31–42.
- [11] J. Kiebist, K. U. Schmidtke, J. Zimmermann, H. Kellner, N. Jehmlich, R. Ullrich, D. Z-nder, M. Hofrichter, K. Scheibner, *ChemBioChem* 2017, 18, 563–569.
- [12] A. Olmedo, C. Aranda, J. C. del Río, J. Kiebist, K. Scheibner, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 12248–12251; *Angew. Chem.* 2016, 128, 12436–12439.
- [13] M. Sundaramoorthy, J. Turner, T. L. Poulos, *Structure* 1995, 3, 1367 – 1377.

- [14] K. Piontek, E. Strittmatter, R. Ullrich, G. Gröbe, M. J. Pecyna, M. Kluge, K. Scheibner, M. Hofrichter, D. A. Plattner, *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 34767 – 34776.
- [15] A. J. L. Cooper, J. Z. Ginos, A. Meister, *Chem. Rev.* 1983, 83, 321–358.
- [16] A. A. Vlessis, D. Bartos, D. Trunkey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 170, 1281–1287.
- [17] H. Schulz in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Vol. 5, (Eds.: D. E. Vance, J. Vance), Elsevier, Amsterdam 2008, 131–154.
- [18] G. A. Jansen, R. J. A. Wanders, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2006, 1763, 1403–1412.
- [19] A. Dennig, M. Kuhn, S. Tassoti, A. Thiessenhusen, S. Gilch, T. Belter, T. Haas, M. Hall, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 8819–8822; *Angew. Chem.* 2015, 127, 8943–8946.
- [20] H. Zhang, C. Xie, Z. Liu, J. Gong, Y. Bao, M. Zhang, H. Hao, B. Hou, Q. Yin, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52, 18458–18465.
- [21] S. Huf, S. Krugener, T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113, 548–561.
- [22] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 2323.
- [23] E. D. Babot, J. C. del Río, M. Cañellas, F. Sancho, F. Lucas, V. Guallar, L. Kalum, H. Lund, G. Gröbe, K. Scheibner, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 4130–4142.
- [24] F. Lucas, E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, R. Ullrich, M. Hofrichter, V. Guallar, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Catal. Sci. Technol.* 2016, 6, 288 – 295.
- [25] P. Molina-Espeja, M. Canellas, F. J. Plou, M. Hofrichter, F. Lucas, V. Guallar, M. Alcalde, *ChemBioChem* 2016, 17, 341 – 349.

Supporting Information

Fatty Acid Chain Shortening by a Fungal Peroxygenase

Andrés Olmedo, José C. del Río, Jan Kiebist, René Ullrich, Martin Hofrichter, Katrin Scheibner, Angel T. Martínez, and Ana Gutiérrez*

Table of contents

1. Supplemental materials and methods
 - 1.1. Enzymes
 - 1.2. Model substrates
 - 1.3. Enzymatic reactions
 - 1.4. Enzyme kinetics
 - 1.5. GC-MS analyses
2. Supplemental figures
3. Supplemental references

1. Supplemental materials and methods

1.1. Enzymes

The *Mro*UPO enzyme is a wild-type peroxygenase isolated from cultures of *M. rotula* DSM 25031, a fungus deposited at the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). *Mro*UPO was purified by fast protein liquid chromatography (FPLC) to apparent homogeneity, confirmed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions, and showed a molecular mass of 32 kDa and an isoelectric point of pH 5.0-5.3. The UV-visible spectrum of the enzyme showed a characteristic maximum at 418 nm (Soret band of heme-thiolate proteins).¹ All media and columns used for enzyme isolation were purchased from GE Healthcare Life Sciences.

The *Aae*UPO included in the present study for comparative purposes (*A. aegerita* isoform II, 46 kDa) was isolated from cultures of *A. aegerita* grown in soybean-peptone medium, and subsequently purified using a combination of Q-Sepharose and SP-Sepharose and Mono-S ion-exchange chromatographic steps.²

One UPO activity unit is defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmol of veratryl alcohol to veratraldehyde (ϵ_{310} 9300 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) in 1 min at 24 °C, pH 7 (the optimum for peroxygenase activity) after addition of 2.5 mM H_2O_2 .

1.2. Model substrates

Dicarboxylic acids, such as tetradecanedioic acid, and monocarboxylic acids, such as tetradecanoic and decanoic acids (all from Sigma-Aldrich), were used as substrates of *Mro*UPO. Additionally, reactions using α - and β -hydroxytetradecanoic acids were also studied to get further insight into the reactions of dicarboxylic acids with peroxygenases.

1.3. Enzymatic reactions

Reactions of fatty acids (0.1 mM) with *Mro*UPO and *Aae*UPO were performed in vials (1 mL or 5 mL reaction volume) containing 50 mM sodium phosphate (pH 5.5) at 30 °C in the presence of H₂O₂. Particularly, reactions with tetradecanedioic acid were performed with 1.8 μM *Mro*UPO and 2.5 mM H₂O₂ (1 h), and 2.3 μM *Mro*UPO/*Aae*UPO and 15 mM H₂O₂ (24 h). On the other hand, reactions with tetradecanoic acid were performed with 0.5 μM *Mro*UPO and 2.5 mM H₂O₂ (2 h), and those of decanoic acid were performed with 0.8 μM *Mro*UPO and 2.5 mM H₂O₂ (2 h). Prior to use, the substrates were dissolved in acetone and added to the buffer to give a final acetone concentration of 20% (v/v). In control experiments, substrates were treated under the same conditions (including 2.5-30 mM H₂O₂) but without enzyme. Enzymatic reactions with ¹⁸O-labeled hydrogen peroxide (H₂¹⁸O₂, 90% isotopic content) from Sigma-Aldrich (2% w:v solution) were performed under the same conditions described above. Likewise, *Mro*UPO (0.25 μM) reactions with 0.1 mM of α- and β-hydroxytetradecanoic acid, 20% (v/v) acetone, and 2.5 mM H₂O₂ (incubated for 2 h) were performed, and reactions of β-hydroxytetradecanoic acid using more enzyme (2 μM), more peroxide (30 mM) and more reaction time (5 h) were also carried out. Products were recovered by liquid-liquid extraction with methyl *tert*-butyl ether and dried under N₂. *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Supelco) was used to prepare trimethylsilyl (TMS) derivatives that were analyzed by GC-MS, as described below.

1.4. Enzyme kinetics

The kinetics of mono- and dicarboxylic acid hydroxylations and their conversion into the one-less carbon acids were studied in stirred reactions using 0.4 μM *Mro*UPO with 0.1-0.8 mM of tetradecanedioic acid, and 0.1 μM *Mro*UPO with 0.2-1.6 mM of decanoic acid. The reactions were run with 2.5 mM H₂O₂ and stopped with 200 μL of 50 mM sodium azide solution after 10 min (dicarboxylic acids reactions) and 30 s (monocarboxylic acids). The chain-shortening (i.e. α-hydroxylated and

new dicarboxylic acids) and other oxygenation products (including β , γ , ω and ω -1 hydroxylated acids) were quantified by GC-MS, and the apparent k_{cat} and K_m values for the two reactions were separately obtained by nonlinear regression using SigmaPlot program.

1.5. GC-MS analyses

The analyses were performed with a Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra, using a fused-silica DB-5HT capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.1 μm film thickness) from J&W Scientific. The oven was heated from 50 $^{\circ}\text{C}$ (1.5 min) to 90 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) at 30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, and then from 90 $^{\circ}\text{C}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ (15 min) at 8 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The injection was performed at 250 $^{\circ}\text{C}$ and the transfer line was kept at 300 $^{\circ}\text{C}$. Compounds were identified by mass fragmentography, and comparing their mass spectra with those of the Wiley and NIST libraries and standards (dicarboxylic acids from nonadienoic to tetradecanedioic acids, monocarboxylic acids from octanoic to tetradecanoic acids, and α - and β -hydroxytetradecanoic acids). Quantification was obtained from total-ion peak area, using response factors of the same or similar compounds mentioned above. Data from replicates were averaged and, in all cases (substrate conversion and relative abundance of reaction products), the standard deviations were below 3.5% of the mean values.

2. Supplemental figures

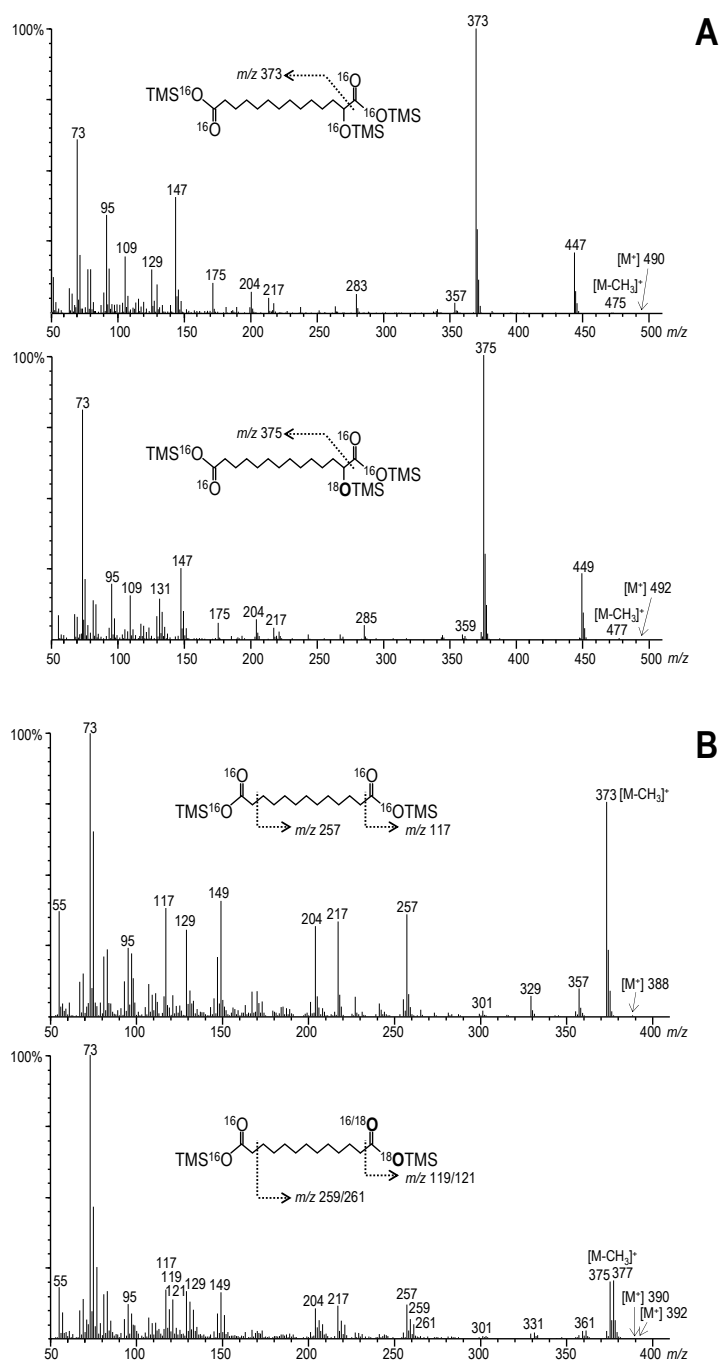


Figure S1. Mass spectra of α -hydroxytetradecanedioic (**A**) and tridecanedioic (**B**) acids from *Mro*UPO reactions as trimethylsilyl (TMS) derivatives and formulae/fragmentations from the H₂¹⁶O₂ (top) and H₂¹⁸O₂ (bottom) reactions. It is shown the H₂¹⁸O₂ oxygen incorporation in tetradecanedioic acid to form α -hydroxytetradecanedioic acid, whose diagnostic fragment (m/z 373, Fig. S1A, top) appears fully (90%) ¹⁸O-labeled (m/z 375, Fig. S1A, bottom). In tridecanedioic acid (Fig. S1B), the fragment at [M - CH₃]⁺ shifts from m/z 373 (Fig. S1B, top) to m/z 377 and m/z 375 after incorporation of two or one ¹⁸O atoms, respectively (Fig. S1B, bottom). Also, the fragments at m/z 117 and m/z 257 become mono ¹⁸O-labeled (m/z 119 and m/z 259, respectively) and bi ¹⁸O-labeled (m/z 121 and m/z 261, respectively).

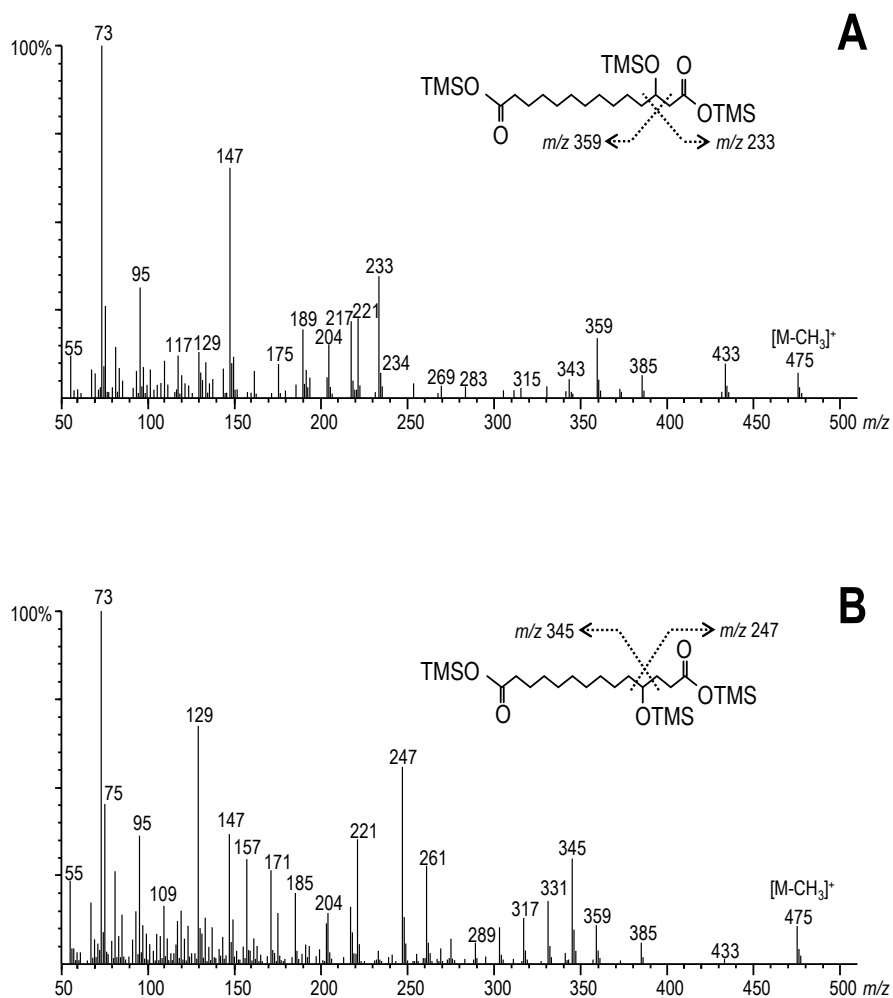


Figure S2. Mass spectra of β -hydroxytetradecanedioic (A) and γ -hydroxytetradecanedioic (B) acids from *Mro*UPO reactions with tetradecanedioic acid, as trimethylsilyl (TMS) derivatives, formulae and main fragmentations.

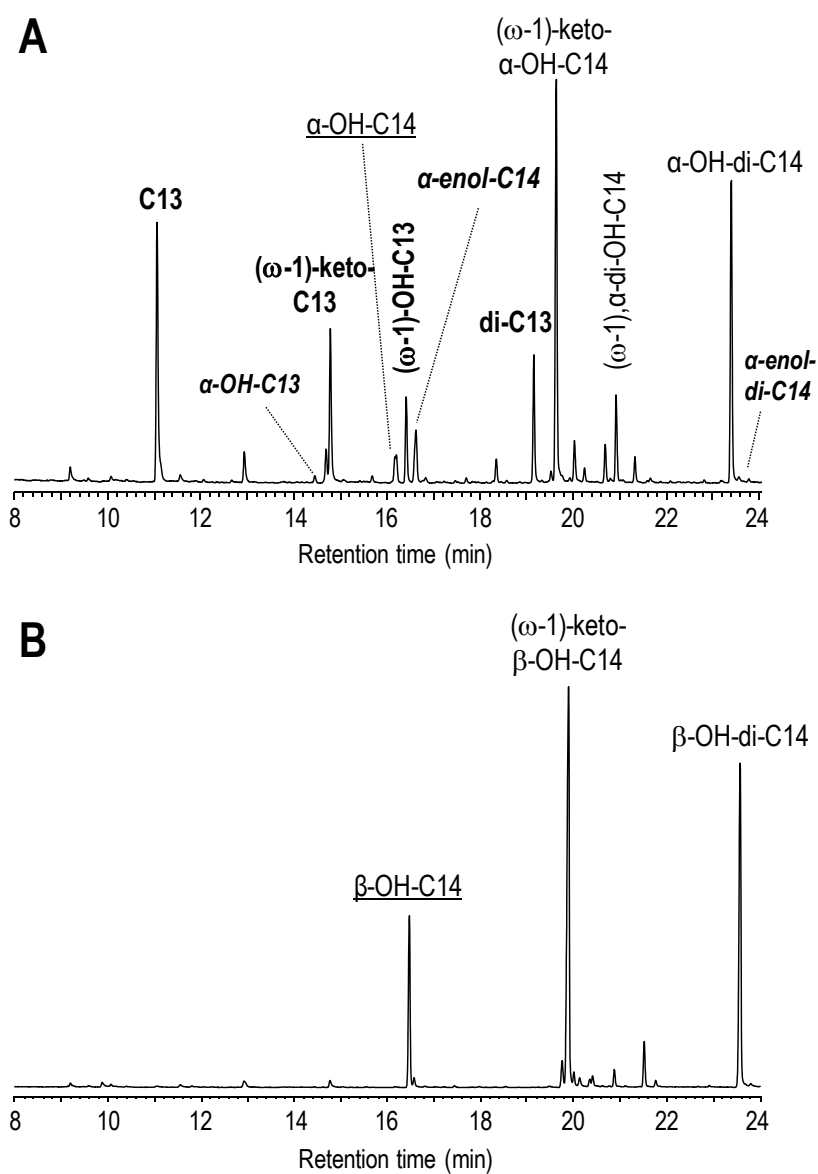


Figure S3. GC-MS analysis of *MroUPO* reactions with α -hydroxytetradecanoic (A) and β -hydroxytetradecanoic (B) acids showing the remaining substrates (underlined), two α -enol forms (italics), the chain-shortened (bold) mono- (C13) and dicarboxylic (di-C13) acids and their α - and (ω -1)-oxygenated derivatives (italics) (being characteristic of the α -hydroxytetradecanoic acid reaction, A), together with products from ω - and (ω -1)-oxygenation of the substrates (the only products in B, and also present in A). 0.25 μ M *MroUPO*, 0.1 mM acid substrate and 2.5 mM peroxide were used in 2 h reactions. See mass spectra of the two α -enol forms in Figure S5.

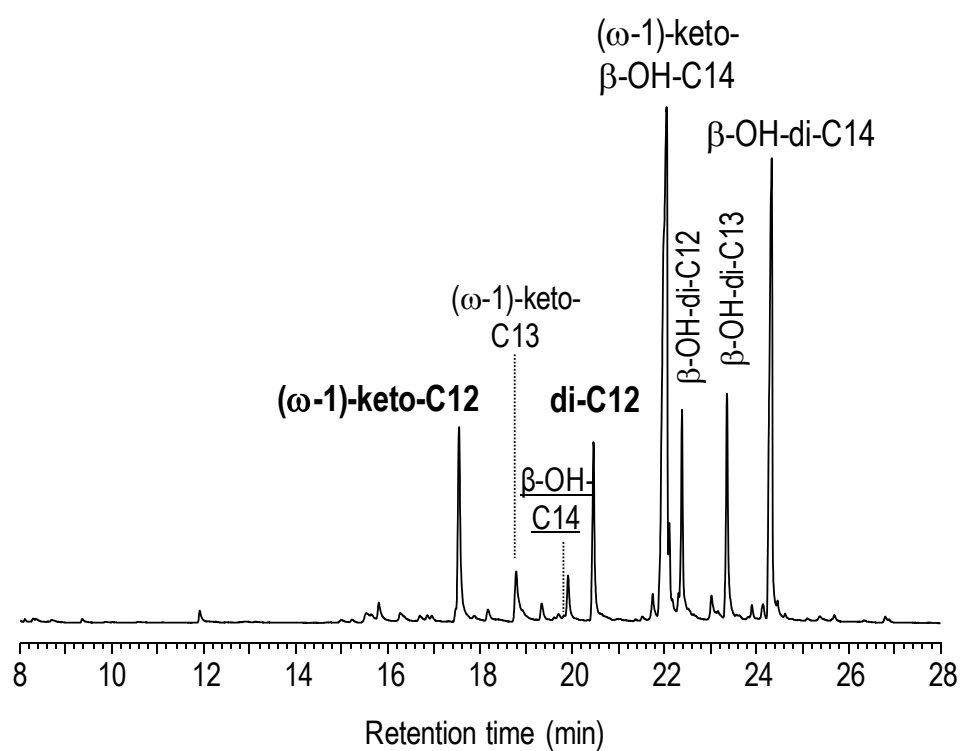


Figure S4. GC-MS analysis of β -hydroxytetradecanoic acid (0.1 mM) treatment forcing the reaction conditions using more enzyme (2 μ M), more peroxide (30 mM) and more reaction time (5 h) than in Figure S3B. Decanedioic and ω -1-ketododecanoic acids, from two-carbon shortening of the main products found in Figure S3B, are indicated in bold.

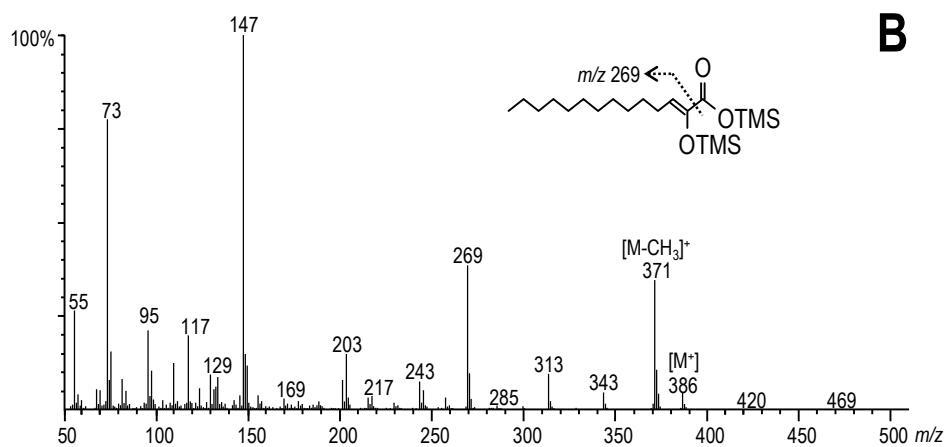
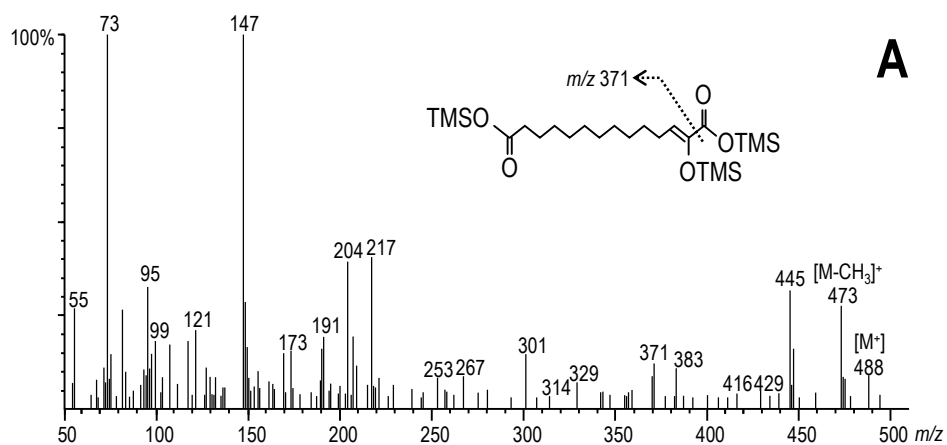


Figure S5. Mass spectra of α -hydroxytetradec-2-enedioic (A) and α -hydroxytetradec-2-enoic (B) acids from *MroUPO* reactions with tetradecanedioic acid, as trimethylsilyl (TMS) derivatives, formulae and main fragmentations.

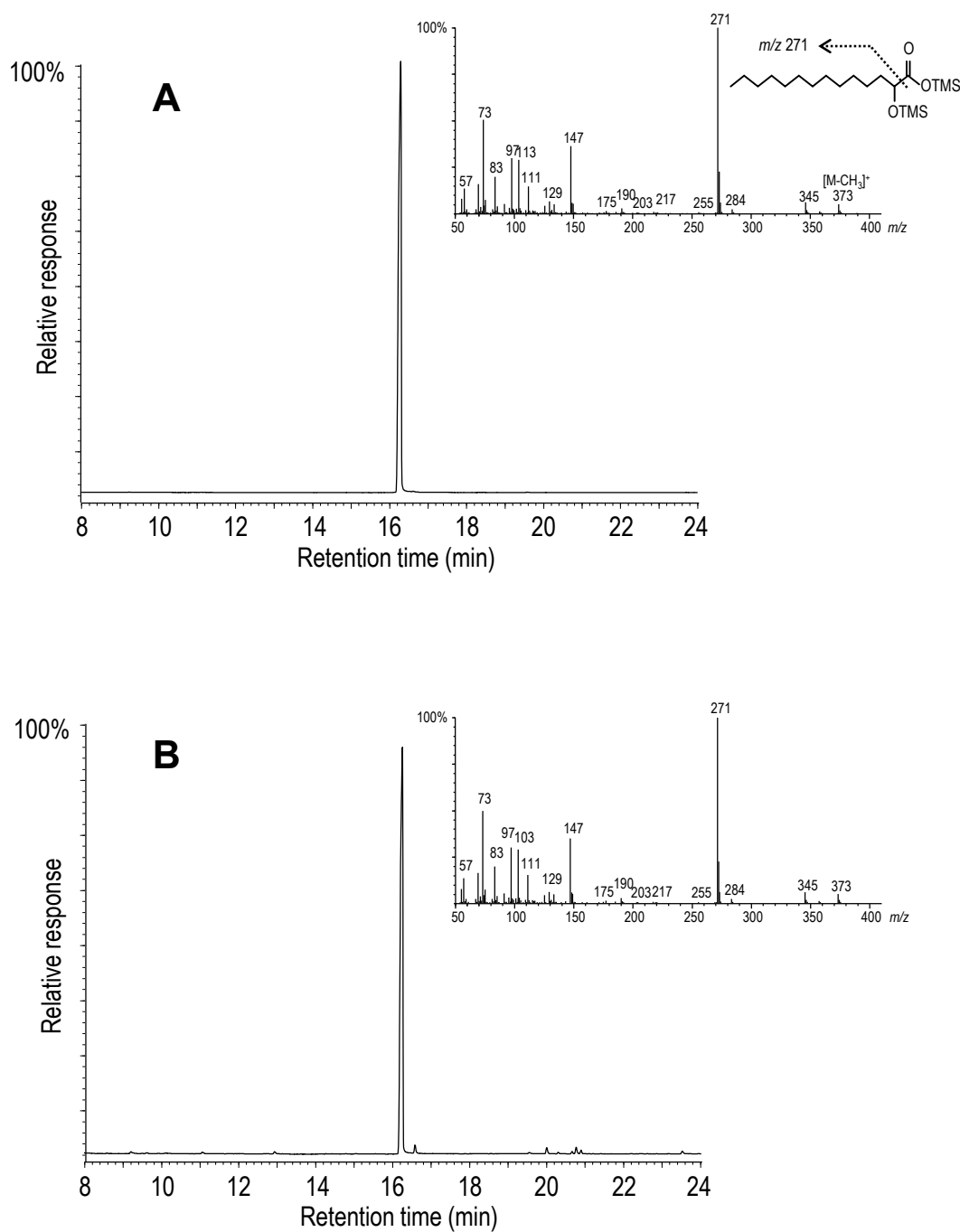


Figure S6. GC-MS analysis of α -hydroxytetradecanoic (0.1 mM) standard compound (A) and control experiment of α -hydroxytetradecanoic (0.1 mM) under the same conditions of the enzymatic reaction of Figure S3A (but without enzyme) in the presence of 2.5 mM H_2O_2 (B) showing in both cases the peak of α -hydroxytetradecanoic acid demonstrating that this compound is not oxidized by the H_2O_2 under the conditions used. Insets are the mass spectra of both peaks (formula and fragmentation included).

3. Supplemental references

- (1) Gröbe, G.; Ullrich, M.; Pecyna, M.; Kapturska, D.; Friedrich, S.; Hofrichter, M.; Scheibner, K. High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula* . *AMB Express* 2011, *1*, 31-42.
- (2) Ullrich, R.; Nuske, J.; Scheibner, K.; Spantzel, J.; Hofrichter, M. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, *70*, 4575-4581.

6.1 Publicación 3:

C. Aranda[‡], A. Olmedo[‡], J. Kiebist, K. Scheibner, J. C. del Río, A. T. Martínez, A. Gutiérrez (2018) Selective epoxidation of fatty acids and fatty acid methyl esters by fungal peroxygenases. *ChemCatChem*, DOI: 10.1002/cctc.201800849. ([‡]co-primeros autores)

Selective Epoxidation of Fatty Acids and Fatty Acid Methyl Esters by Fungal Peroxygenases

Carmen Aranda^{1‡}, Andrés Olmedo^{1‡}, Jan Kiebitz², Katrin Scheibner², José C. del Río¹, Angel T. Martínez³, and Ana Gutiérrez*¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Reina Mercedes 10, 41012 Seville (Spain)

² JenaBios GmbH Orlaweg 2, 00743 Jena (Germany)

³ Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid (Spain)

* Corresponding author

‡ These authors contributed equally to this work

Keywords: epoxidation • fatty acids • fatty acid methyl esters fungal peroxygenases • oxidoreductases

*Abstract: Recently discovered fungal unspecific peroxygenases from *Marasmius rotula* and *Chaetomium globosum* catalyze the epoxidation of unsaturated fatty acids (FA) and FA methyl esters (FAME), unlike the well-known peroxygenases from *Agrocybe aegerita* and *Coprinopsis cinerea*. Reactions of a series of unsaturated FA and FAME with *cis*-configuration revealed high (up to 100%) substrate conversion and selectivity towards epoxidation, although some significant differences were observed between enzymes and substrates with the best results being obtained with the *C. globosum* enzyme. This and the *M. rotula* peroxygenase appear as promising biocatalysts for the environmentally-friendly production of reactive FA epoxides given their self-sufficient monooxygenase activity and the high conversion rate and epoxidation selectivity.*

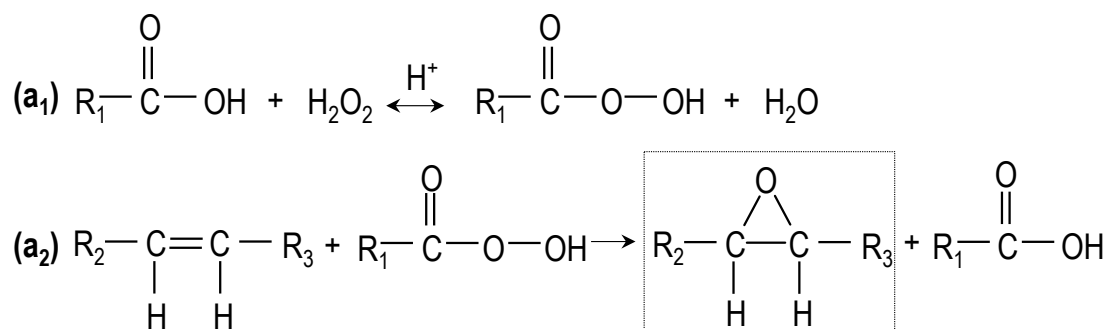
Oils and fats are among the most important renewable feedstock of the chemical industry, whose possibilities are still far from being fully exploited.^[1] By simple industrial operations, fatty acids (FA) are available from vegetable oils in such purity that they may be used for further chemical transformations. Their conversion to FA methyl esters (FAME) is a well-known application of fats and oils, largely investigated for biodiesel production. Moreover, unsaturated FA and FAME can be further epoxidized, and used in industrial syntheses of chemicals and intermediates.

The industrial-scale epoxidation of unsaturated FA compounds is generally carried out by the Prileshajev^[2] reaction via percarboxylic acids (Scheme 1a₂). However, this method, which often includes strong mineral acids as catalysts for the "in situ" generation of peracids (Scheme 1a₁), suffers from several drawbacks such as the relatively low selectivity for epoxides due to oxirane ring opening in the acidic medium, the corrosive nature of acids, and the unstable character of peracids.^[3] Many studies have been aimed at searching an alternative, such as the chemo-enzymatic synthesis with lipases catalyzing the carboxylic acid reaction with hydrogen peroxide.^[4;5] However, the latter reaction maintains most drawbacks of peracid-based epoxidation. Therefore, direct enzymatic processes emerge as an alternative solution for more selective and environmentally friendly epoxidation of unsaturated lipids. Several enzymes are known to catalyze epoxidation directly, such as cytochrome P450 monooxygenases (P450), diiron-center oxygenases, and plant peroxygenases.^[5;6] However, they present some drawbacks, such as their intracellular nature, and the requirement for costly cosubstrates in the two former cases.

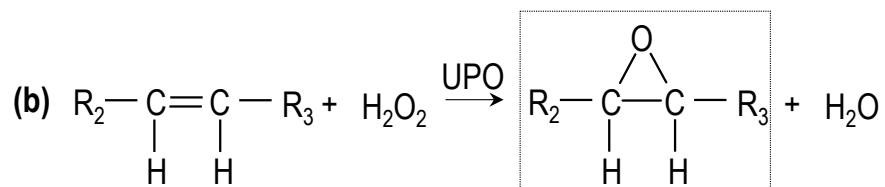
Here, we show a promising enzymatic technology to epoxidize unsaturated FA (Scheme 1b) under mild and environmentally-friendly conditions, as potential alternative to the above chemical and enzymatic epoxidations. This includes the use of two recently discovered unspecific peroxygenases (UPO, EC 1.11.2.1), from the fungi *Marasmius rotula* (*MroUPO*)^[7] and *Chaetomium globosum* (*CglUPO*).^[8] These and related fungal peroxygenases represent a new class of enzymes that eludes some

of the limitations of other monooxygenases since they are secreted proteins, therefore far more stable, and only require H_2O_2 for activation.

Conventional chemical route



This work: new enzymatic route



Scheme 1. Chemical and enzymatic routes for the epoxidation of fatty acids.

Peroxygenases are structurally related to the P450s, as they also contain the heme prosthetic group coordinated by a cysteine ligand, but they do not depend on the reductive activation of molecular oxygen and catalyze the transfer of an oxygen atom from peroxide to substrates.^[9] Initially, these UPO were shown to catalyze oxygenation reactions on aromatic compounds,^[10] and their action on aliphatic compounds was demonstrated later.^[11] After the first UPO discovered in *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*),^[12] similar enzymes were found in other basidiomycetes, such as *M. rotula*, and there are indications for their widespread occurrence in the fungal kingdom.^[13] Over one-hundred peroxygenase-type genes have been identified in the analysis of 24 basidiomycete genomes,^[14] including *Coprinopsis cinerea*.^[15] One UPO from the latter fungus is produced as a recombinant protein (*rCciUPO*) by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) (Figure S1A).^[16] Interestingly, the recently described *MroUPO* presents differences with the best studied fungal peroxygenases, such as the ability

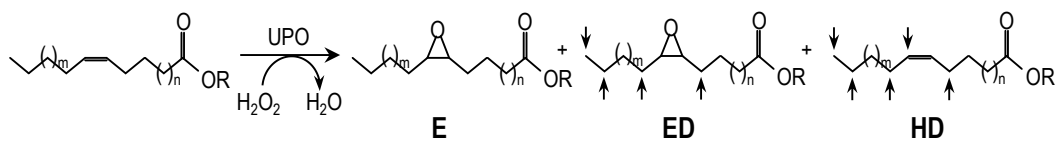
of oxidizing bulkier substrates,^[9;17] the terminal hydroxylation of *n*-alkanes^[18] and the chain-shortening of carboxylic acids.^[19] On the other hand, *Cg/UPO* is the fourth wild-type described UPO, and the first isolated from an ascomycete.^[8]

The reactions of purified *MroUPO* and *Cg/UPO* (Figure S1B,C) with a series of *cis*-monounsaturated FA (from C14:1 to C22:1), showed that both enzymes are capable of oxygenating these substrates, *Cg/UPO* being more active since it achieved maximal substrate conversion with lower enzyme doses (Table 1). Interestingly, both peroxygenases generated the epoxidized derivatives as main products (Figures 1A-B), unlike the other well-known *AaeUPO* (not shown) and *rCciUPO* that were not able to epoxidize the double bond and instead, produced the hydroxyderivatives at the subterminal positions (Figure 1C). Therefore, whereas *AaeUPO* and *rCciUPO* shows similar regioselectivity towards saturated and unsaturated FA, *MroUPO* and *Cg/UPO* behave differently, hydroxylating at the terminal and/or subterminal positions the saturated FA and oxygenating the double bonds of unsaturated ones. The hydroxylation of FA at the subterminal positions by *AaeUPO* and *rCciUPO* was previously described.^[11;16] However, the epoxidation of a fatty acid by a fungal peroxygenase is revealed here for the first time. Moreover, whereas *Cg/UPO* was highly selective with all unsaturated FA, over 90% epoxidation except with erucic (C22:1) acid, epoxidation by *MroUPO* depended on FA chain length, showing the highest value with myristoleic (C14:1) acid.

Besides epoxides, minor amounts of other products were found with *Cg/UPO* and especially with *MroUPO*, such as oxygenated derivatives of epoxidized FA (ED) and hydroxylated derivatives of FA (HD) mainly at terminal or subterminal positions of the carbon chain, and at the allylic positions (Table 1, Figure 1B). The higher efficiency and selectivity of *Cg/UPO* than *MroUPO* for epoxidation of most FA is shown in reactions with oleic (C18:1) acid (Figures S5-S6). Curiously, erucic acid, an abundant fatty acid in rapeseed and mustard oils, was transformed and epoxidized at a larger extent by *MroUPO*. The high selectivity of these UPOs epoxidizing oleic and palmitoleic (C16:1) acids (up to 100%) differs from

that of P450 (BM3) where hydroxylation (> 97% and 65%, respectively) predominated over epoxidation (< 3% and 35%).^[6]

Table 1. Monounsaturated FA (R=H) and FAME (R=CH₃) reactions with *Cg/UPO* and *MroUPO* doses yielding maximal conversion into epoxides, together with other oxygenated (hydroxyl, keto and carboxyl) derivatives at different positions (arrows)



Substrate	Enzyme dose	H ₂ O ₂ (mM)	Products (%)			Tot (μM)
			E	ED	HD	
<u>R=H</u>						
14:1 <i>cis</i> -Δ9 (n=5, m=1)	<i>Cg/UPO</i> 60 nM	5	99	-	1	98
	<i>MroUPO</i> 200 nM	5	86	8	6	99
16:1 <i>cis</i> -Δ9 (n=5, m=3)	<i>Cg/UPO</i> 60 nM	5	91	4	5	99
	<i>MroUPO</i> 200 nM	2.5	65	17	18	99
18:1 <i>cis</i> -Δ9 (n=5, m=5)	<i>Cg/UPO</i> 60 nM	2.5	91	2	7	99
	<i>MroUPO</i> 200 nM	5	38	61	1	96
20:1 <i>cis</i> -Δ11 (n=7, m=5)	<i>Cg/UPO</i> 60 nM	5	95	4	1	94
	<i>MroUPO</i> 400 nM ^a	2.5	62	7	31	99
22:1 <i>cis</i> -Δ13 (n=9, m=5)	<i>Cg/UPO</i> 250 nM	2.5	50	12	39	77*
	<i>MroUPO</i> 400 nM ^c	5	67	10	23	91
<u>R=CH₃</u>						
14:1 <i>cis</i> -Δ9	<i>Cg/UPO</i> 60 nM	2.5	100	-	-	94
	<i>MroUPO</i> 200 nM	2.5	68	13	19	100
18:1 <i>cis</i> -Δ9	<i>Cg/UPO</i> 1 μM ^b	5	98	-	2	75*
	<i>MroUPO</i> 200 nM ^c	2.5	73	7	21	93

Substrates (100 μM), enzyme doses, and estimated total products (μM), relative abundance (% of total products) of epoxide (E), epoxide derivatives (ED), hydroxylated derivatives (HD) are shown. Reactions were performed in 20% acetone, 30 min at 30°C except for reactions ^{a,b and c} that were performed in 40% acetone at 40°C, for 30 min, 60 min and 120 min, respectively. *Higher enzyme concentration (up to 500 nM) did not improve conversion. See Figure S2 for GC-MS of authentic standards and Figures S3A,S4 for mass spectra of E and ED.

In addition to monounsaturated FA, some polyunsaturated FA (linoleic and α- and γ-linolenic acids) abundant in vegetable oils were tested as substrates. Although both UPOs transformed almost completely linoleic acid at the highest enzyme doses (Table 2), *Cg/UPO* was more selective producing the diepoxide (both syn and anti-enantiomers) in very high yield (92% of total products) (Figure 2A). *MroUPO*, besides the epoxides also generated hydroxylated derivatives of the monoepoxides and oxygenated derivatives at allylic positions (mainly at ω-7) (Figure 2B). When lower

doses of enzymes were used, a predominance of monoepoxides over diepoxides was observed (Table 2).

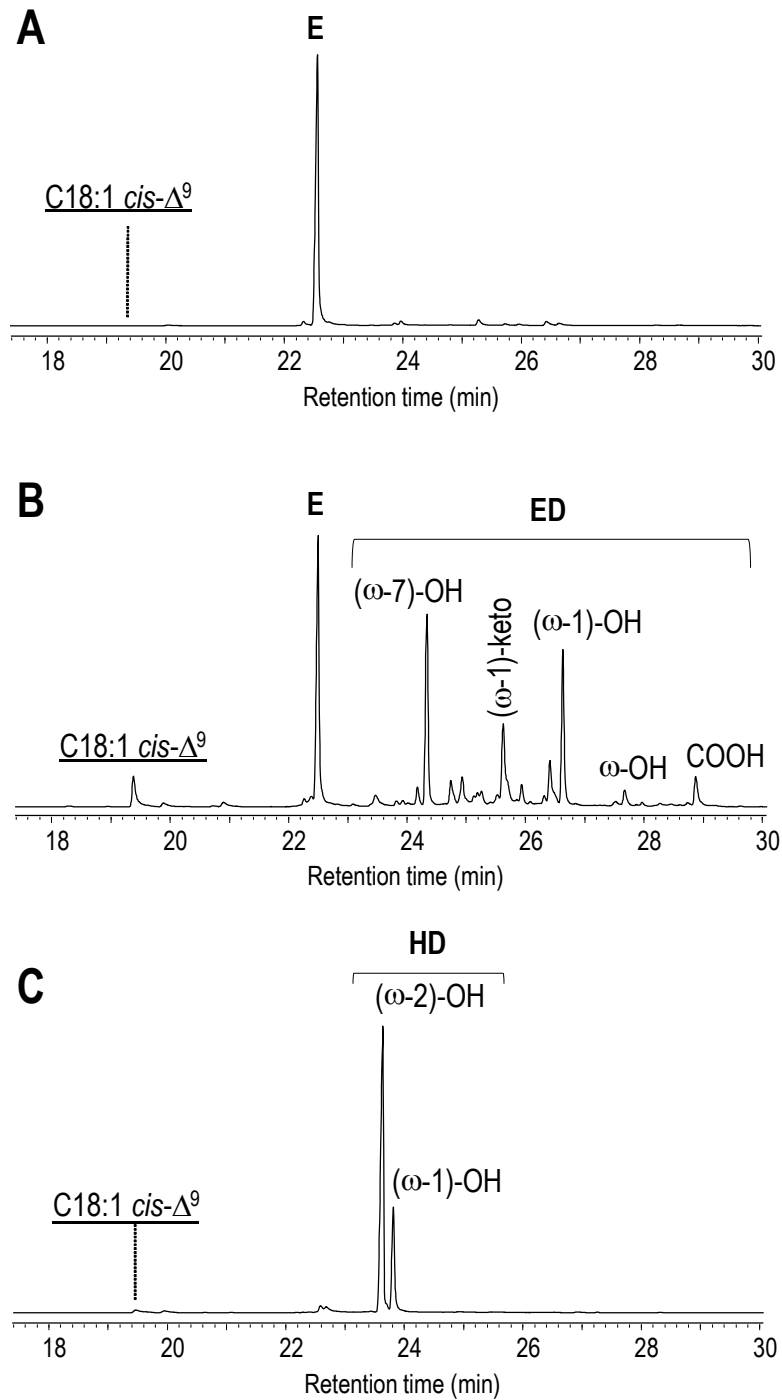


Figure 1. GC-MS of reactions of oleic acid (underlined) at 30 min with 60 nM *Cg*/UPO (A), 200 nM *Mro*UPO (B), and 100 nM *rCci*UPO (C), showing the epoxide (E), epoxide derivatives (ED) and the hydroxylated derivatives (HD) of oleic acid.

Table 2. Oxidation of linoleic acid and its methyl ester by *CglUPO* and *MroUPO*

Enzyme dose	H ₂ O ₂ (mM)	Products (%)					Total (μM)	
		12-E	9-E	di-E	ED	HD		
R=H								
<i>CglUPO</i>	30 nM	2.5	39	57	2	-	2	76
	125 nM	5	-	-	92	8	-	98
<i>MroUPO</i>	100 nM	2.5	37	25	10	25	3	75
	400 nM	2.5	-	-	39	59	2	95
R=CH₃								
<i>CglUPO</i>	250 nM	5	13	59	28	-	-	80
	1 μM	5	-	-	100	-	-	100
<i>MroUPO</i>	200 nM	2.5	39	40	4	8	9	95
	1 μM	5	-	-	49	51*	-	98

Substrate (100 μM), enzyme doses, H₂O₂ conc., amount of estimated total products (μM) and relative abundance (% of total products) of 12-epoxide (12-E), 9-epoxide (9-E), di-epoxide (di-E), epoxide derivatives (ED) and hydroxylated derivatives (HD) are shown. Arrows indicate the main chain positions oxidized by the enzymes in epoxidized derivatives (ED) and hydroxylated derivatives (HD). Reactions conditions: 20% acetone at 30°C, 30 min (R=H), 40% acetone at 40°C, 60 min (*CglUPO*) and 120 min (*MroUPO*) (R=CH₃). * Mono- and di-epoxide derivative. See Figure S7 for GC-MS of authentic standards and Figures S3B, S8 for mass spectra of E and ED.

Linolenic acids (α- and γ-) were also transformed by *MroUPO* and *CglUPO* (Figure S9). Both, monoepoxides (located in two different double bonds) and diepoxides were generated from α-linolenic acid under the conditions tested. However, only one epoxide was observed in the γ-linolenic acid reactions.

To compare the efficiency of *MroUPO* and *CglUPO* oxidizing unsaturated FA, apparent kinetic constants were determined for oleic acid oxidation (Table 3) in spite of the difficulties for GC-MS estimation of initial reaction rates. Regarding the turnover rate, *CglUPO* presented three-fold higher k_{cat} values than *MroUPO*. In addition, the K_m value was four-fold higher for *MroUPO*, which represented less affinity by this enzyme compared to *CglUPO*. As a result, one order of magnitude higher catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was observed with *CglUPO*. In agreement with these results,

Cg/UPO presented total turnover numbers (TTN) up to 8000 in oleic acid reactions when the substrate concentration was increased to 1 mM while this number was half for *MroUPO* with 50 nm enzyme being used in both cases.

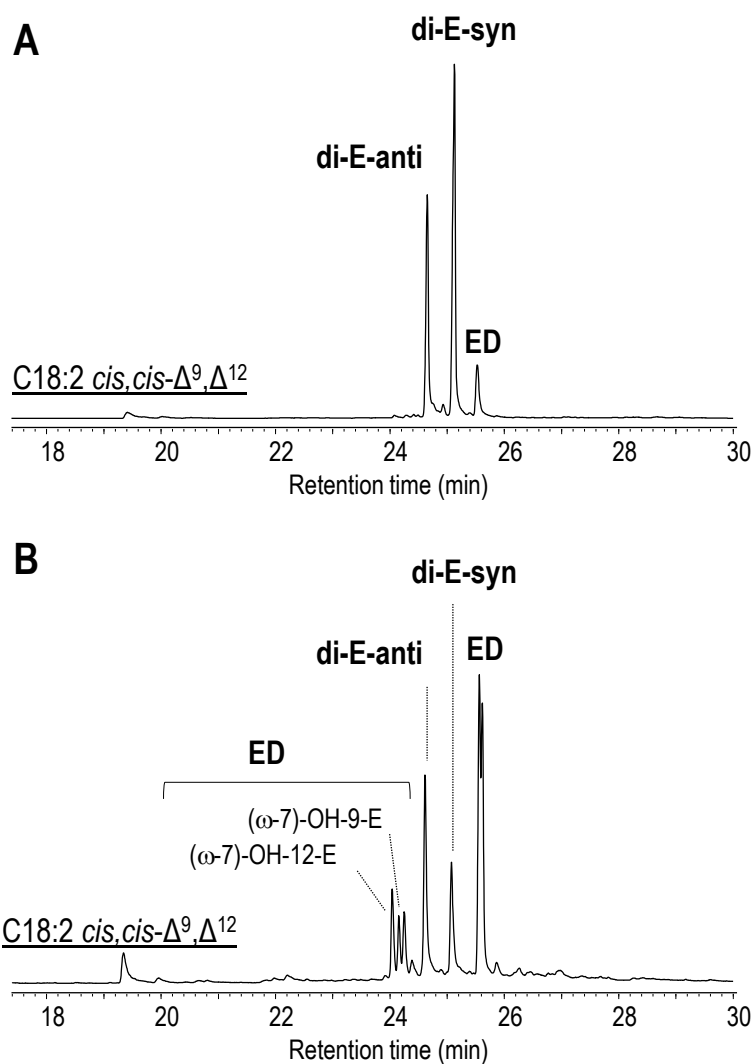


Figure 2. GC-MS of reactions of linoleic acid (underlined) at 30 min with 125 nM *Cg/UPO* (A) and 400 nM *MroUPO* (B), showing the diepoxides (di-E), epoxide derivatives (ED) and the hydroxylated derivatives of linoleic acid (see mass spectrum of the diepoxide in Figure S3B).

This is a promising value accompanied by a significantly higher product amount (of about 0.5 mM) considering the limited solubility and other difficulties for fatty acid epoxidation. Likewise, the turnover frequency (TOF) was double for *Cg/UPO* (2.2 s^{-1}) than for *MroUPO* (1.1 s^{-1}). Solubility limitations prevented calculation of accurate kinetic constants for linoleic acid oxidation, since saturation could not be estimated especially for *MroUPO* (Figure S10), but higher activity than found for oleic acid was observed at high linoleic acid concentration.

FAME, usually obtained from vegetable oils by transesterification with methanol, were also tested as substrates of *MroUPO* and *Cg/UPO*. Namely, the methyl esters of two monounsaturated (myristoleic and oleic acids) and one diunsaturated FA (linoleic acid) were selected. Both peroxygenases were able to transform and epoxidize the monounsaturated FAME (Figures 3A,C). *Cg/UPO* showed similar selectivity towards the esters than with the free FA, but differences in the case of oleic acid were observed with *MroUPO* (Table 1). Regarding the methyl ester of linoleic acid, *Cg/UPO* showed a strict selectivity towards epoxidation (generating the diepoxide) while *MroUPO* was less selective towards diepoxide formation (Table 2, Figures 3B,D). In contrast, P450 BM3, which hydroxylate/epoxidize free fatty acids, was reported as unable to hydroxylate FAME^[20]. This seems related to the fact that the free carboxyl group is required to fix the substrate at the entrance of P450 active site^[6]. Finally, it is interesting that different patterns of oxygenation were observed with the *cis* isomers of the substrates (compared to the *trans* isomers).

Table 3. Estimated kinetic parameters for oleic acid oxidation by *Cg/UPO* and *MroUPO*. Data represent mean values of three replicates with standard errors

	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{m}} (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$
<i>Cg/UPO</i>	8.1 ± 0.9	10.7 ± 4.0	$7.6 \pm 3.0 \times 10^5$
<i>MroUPO</i>	2.6 ± 0.2	38.9 ± 6.1	$6.7 \pm 1.1 \times 10^4$

While *MroUPO* converted predominantly myristelaidic, palmitelaidic and elaidic acids (or their methyl esters) into the hydroxyderivatives at the allylic positions, *Cg/UPO* generated mainly the epoxides, with the only exception of elaidic acid (data not shown).

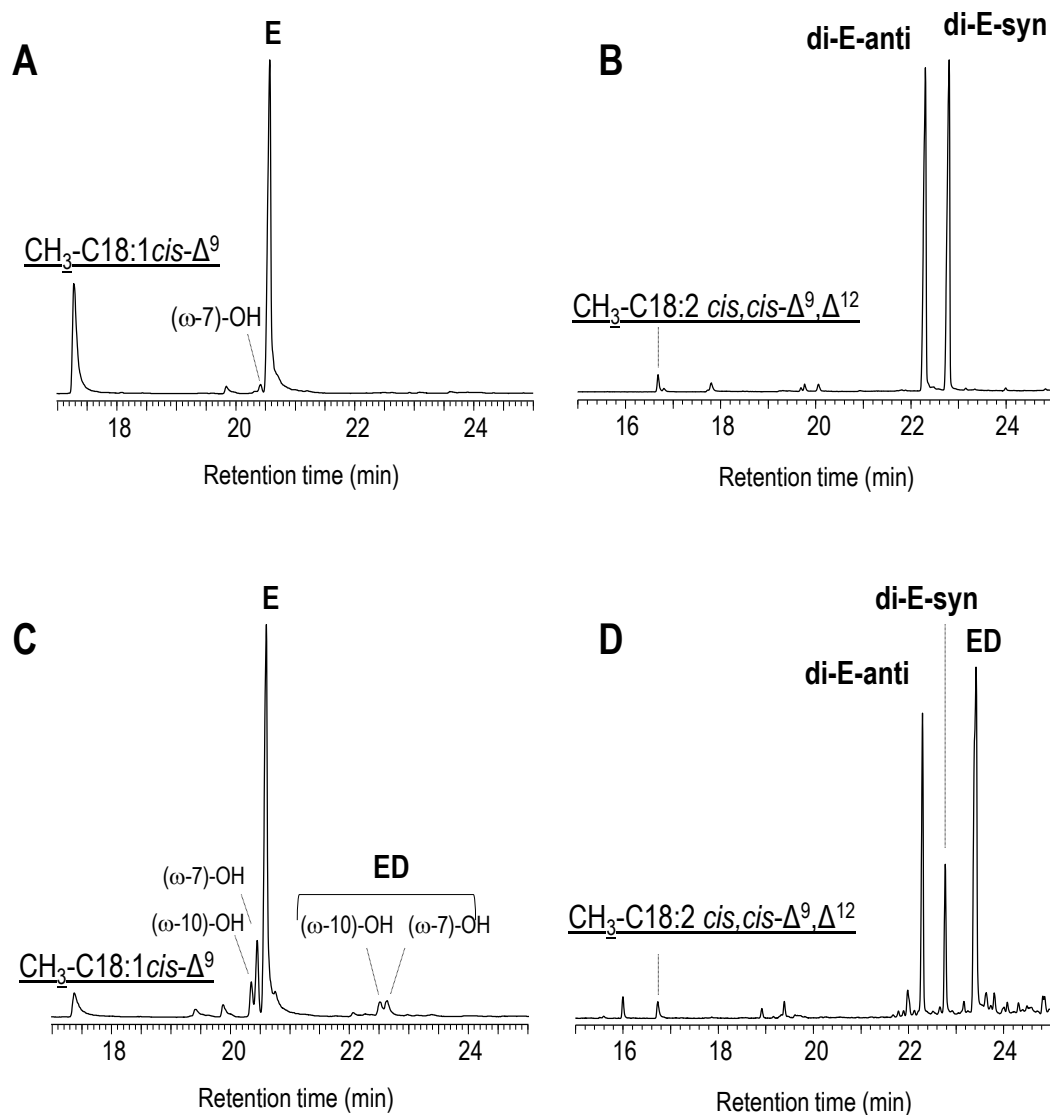


Figure 3. GC-MS of reactions of methyl oleate (*left*, underlined) with 1 μM *Cg/UPO* at 60 min (A) and 200 nM *MroUPO* at 120 min and (C), showing the epoxide (E), epoxide derivatives (ED); and the hydroxylated derivatives, and methyl linoleate (*right*, underlined) with 1 μM *Cg/UPO* at 60 min (B) and 1 μM *MroUPO* at 120 min (D), showing the diepoxides (di-E), epoxide derivatives (ED) and the hydroxylated derivatives of methyl linoleate.

The selective epoxidation of FA and FAME, a reaction of great interest for the chemical industry,^[21] must be added to the repertoire of UPOs, as dream biocatalysts for oxyfunctionalization chemistry.^[9;22;23] The structural determinants driving to selective epoxidations in *Mro*UPO and *Cgl*UPO (compared to *Aae*UPO and *Cci*UPO) are difficult to be identified with the information available on these new heme-thiolate enzymes (note that only one UPO crystal structure has been published to date). However, in related P450, epoxidation vs hydroxylation rates have been related to the balance between the iron hydroperoxo and oxenoid forms after the oxidative activation of the enzyme, with an active site threonine being involved in the transition as the proton donor.^[24;25] Interestingly, a threonine residue is present at the active sites of both *Aae*UPO and *Cci*UPO, and absent from those of *Mro*UPO and *Cgl*UPO, as shown by Aranda et al.^[26] but its relevance in the FA hydroxylation/epoxidation balance is still to be experimentally investigated. This and other structural-functional studies with UPOs will help to understand the reaction mechanisms of these versatile enzymes, and to obtain ad-hoc variants for biotechnological application.

Acknowledgements

This work was funded by the BIORENYMERY (AGL2014-53730-R) project of the Spanish MINECO (co-financed by FEDER) and by the CSIC 201740E071 project. H. Lund (Novozymes) is acknowledged for r*Cci*UPO.

References

- [1] U. Biermann, U. Bornscheuer, M. A. R. Meier, J. O. Metzger, H. J. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 3854-3871.
- [2] N. Prileschajew, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1909, 42, 4811-4815.
- [3] S. M. Danov, O. A. Kazantsev, A. L. Esipovich, A. S. Belousov, A. E. Rogozhin, E. A. Kanakov, *Catal. Sci. Technol.* 2017, 7, 3659-3675.
- [4] F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron* 1992, 48, 4587-4592.
- [5] C. Tiran, J. Lecomte, E. Dubreucq, P. Villeneuve, *OCL* 2008, 15, 179-183.
- [6] R. T. Ruettinger, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 5728-5734.
- [7] G. Gröbe, M. Ullrich, M. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, *AMB Express* 2011, 1, 31-42.
- [8] J. Kiebist, K. U. Schmidtke, J. Zimmermann, H. Kellner, N. Jehmlich, R. Ullrich, D. Zänder, M. Hofrichter, K. Scheibner, *ChemBioChem* 2017, 18, 563-569.
- [9] M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna, R. Ullrich, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 851, 341-368.
- [10] M. Hofrichter, R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 871-897.
- [11] A. Gutiérrez, E. D. Babot, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, J. C. del Río, *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 514, 33-43.
- [12] R. Ullrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 4575-4581.
- [13] M. J. Pecyna, R. Ullrich, B. Bittner, A. Clemens, K. Scheibner, R. Schubert, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 84, 885-897.

- [14] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martínez, R. Otilar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav et al., *Science* 2012, 336, 1715-1719.
- [15] J. E. Stajich, S. K. Wilke, D. Ahren, C. H. Au, B. W. Birren, M. Borodovsky, C. Burns, B. Canbäck, L. A. Casselton, C. K. Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 11889-11894.
- [16] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 2332.
- [17] E. D. Babot, J. C. del Río, M. Cañellas, F. Sancho, F. Lucas, V. Guallar, L. Kalum, H. Lund, G. Gröbe, K. Scheibner, R. Ullrich, M. Hofrichter, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 4130-4142.
- [18] A. Olmedo, C. Aranda, J. C. del Río, J. Kiebish, K. Scheibner, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 12248-12251.
- [19] A. Olmedo, J. C. del Río, J. Kiebish, K. Scheibner, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Chem. -Eur. J.* 2017, 23, 16985-16989.
- [20] Y. Miura, A. J. Fulco, *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 1975, 388, 305-317.
- [21] A. Corma, S. Iborra, A. Velty, *Chem. Rev.* 2007, 107, 2411-2502.
- [22] Y. Wang, D. Lan, R. Durrani, F. Hollmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 37, 1-9.
- [23] S. Bormann, A. G. Baraibar, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *Catal. Sci. Technol.* 2015, 5, 2038-2052.
- [24] A. D. N. Vaz, D. F. McGinnity, M. J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3555-3560.
- [25] E. G. Hrycay, S. M. Bandiera, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 851, 1-61.
- [26] C. Aranda, R. Ullrich, J. Kiebish, K. Scheibner, J. C. del Río, M. Hofrichter, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Catal. Sci. Technol.* 2018, 8, 2394-2401.

Supporting Information

Selective Epoxidation of Fatty Acids and Fatty Acid Methyl Esters by Fungal Peroxygenases

Carmen Aranda[‡], Andrés Olmedo[‡], Jan Kiebist, Katrin Scheibner, José C. del Río, Angel T. Martínez, and Ana Gutiérrez*

Table of contents

1. Supplemental materials and methods
 - 1.1. Enzymes
 - 1.2. Model substrates
 - 1.3. Enzymatic reactions
 - 1.4. Enzyme kinetics
 - 1.4. GC-MS analyses
2. Supplemental figures
3. Supplemental references
4. Complete reference cited in the main text

1. Supplemental materials and methods

1.1. Enzymes

*Mro*UPO is a wild enzyme isolated from cultures of *M. rotula* DSM 25031, a fungus deposited at the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). It was purified by fast protein liquid chromatography (FPLC) to apparent homogeneity, confirmed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions, and showed a molecular mass of 32 kDa and isoelectric point of pH 5.0-5.3. The UV-visible spectrum of the enzyme showed a characteristic maximum at 418 nm (Soret band of heme-thiolate proteins).^[1]

Cg/UPO (36 kDa) is a wild enzyme isolated from cultures of *C. globosum* DSM 62110, from the German Collection of Microorganisms and Cell cultures. It was purified by ammonium sulfate precipitation and successive FPLC on Q-Sepharose FF, Superdex75, and Mono Q columns using an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare).^[2]

*rCci*UPO (used with comparative purpose) was provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). This recombinant enzyme corresponds to the protein model 7249 from the sequenced *C. cinerea* genome available at the JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Copci1>), expressed in *Aspergillus oryzae* (patent WO/2008/119780), and purified using a combination of S-Sepharose and SP-Sepharose ion-exchange chromatography. The recombinant peroxygenase preparation is an electrophoretically homogeneous glycoprotein with a molecular mass around 44 kDa, a typical UV-vis spectrum, and the ability to oxygenate different aromatic compounds with a specific activity of approximately 100 U·mg⁻¹ (measured as described below). SDS PAGE of different UPO preparations are shown in Fig. S1.

One UPO activity unit is defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmol of veratryl alcohol to veratraldehyde (ϵ_{310} 9300 M⁻¹·cm⁻¹) in 1 min at 24 °C, pH 7, after addition of 2.5 mM H₂O₂. Enzyme concentration was estimated

from the characteristic spectrum of peroxidase complex with carbon monoxide^[3].

1.2. Model substrates

A series of unsaturated lipids (*cis* isomers) from Sigma-Aldrich was used including: i) fatty acids such as myristoleic (*cis*-9-tetradecenoic), palmitoleic (*cis*-9-hexadecenoic), oleic (*cis*-9-octadecenoic), linoleic (*cis,cis*-9,12-octadecadienoic), α - (*cis, cis, cis*-9,12,15), and γ -(*cis, cis, cis*-6, 9,12) linolenic (octadecatrienoic) acids, gondoic (*cis*-11-eicosenoic) and erucic (*cis*-13-docosenoic) acids; and vi) fatty acid esters such as methyl myristoleate, methyl oleate and methyl linoleate. The *trans* isomers such as myristelaidic (*trans*-9-tetradecenoic), palmitelaidic (*trans*-9-hexadecenoic) and elaidic (*trans*-9-octadecenoic) acids were also obtained from Sigma-Aldrich. The following standards of epoxides were also used, rac *cis*-9,10-epoxyoctadecanoic acid and (\pm) 9(10)-EpOME (9,10-*cis*-epoxide of linoleic acid) from Santa Cruz Biotechnology; (\pm) 12(13)-EpOME (12,13-*cis*-epoxide of linoleic acid) from Cayman; and 9,10-12,13-diepoxyoctadecanoic acid from Larodan.

1.3. Enzymatic reactions

Reactions of the model compounds at 0.1 mM concentration were performed with: i) *Mro*UPO (50-400 nM) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5) at 30 °C or 40 °C and 30-120 min reaction time, in the presence of 0.5-5 mM H₂O₂ and ii) *Cgl*/UPO (30-1000 nM) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) at 30 °C or 40 °C and 30-60 min reaction time, in the presence of 0.5-5 mM H₂O₂. In all cases the H₂O₂ was added in pulses. Prior to use, the substrates were dissolved in acetone and added to the buffer to give a final acetone concentration of 20% (v/v) although concentrations of 40% were also tested with some compounds. In control experiments, substrates were treated under the same conditions (including 2.5-5 mM H₂O₂) but without enzyme. Products were recovered by liquid-liquid extraction with methyl *tert*-butyl ether and dried under N₂.

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Supelco) was used to prepare trimethylsilyl (TMS) derivatives that were analyzed by GC-MS.

1.4. Enzyme kinetics

To study the kinetics of fatty acids (oleic and linoleic acid) oxidation, reactions in 1 mL vials with 50 nM of enzyme (*Mro*UPO and *Cg*/UPO) were carried out. Substrate concentration was varied between 6.25 μ M and 400 μ M and 20% (v/v) of acetone was used as cosolvent. The reactions were initiated with 0.5 mM H₂O₂ and stopped after 1 min (*Cg*/UPO) or 5 min (*Mro*UPO) with 100 μ L of 100 mM sodium azide solution by vigorous shaking. Time course of the reactions were previously followed to ensure the estimation of kinetic parameters while the reaction rate was still in linear range. All reactions were carried out in triplicate. Products quantification was performed by GC-MS (as described below) using external standard curves and response factors of authentic standards. Kinetic parameters (k_{cat} , K_m) were obtained by fitting the data to the Michaelis-Menten equation using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). For TTN (total turnover number) determination, substrate concentration was increased to 1 mM and 5 mM using methyl- β -cyclodextrin (from Sigma-Aldrich) in a final reaction concentration of 5 mM or 20% (v/v) of acetone using 50 nM of both enzymes. The highest product concentration was attained using acetone in the case of *Cg*/UPO (1 mM substrate, 400 μ M products) and methyl- β -cyclodextrin in the case of *Mro*UPO (1mM substrate, 200 μ M products).

1.5. GC-MS analyses

The analyses were performed with a Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra, using a fused-silica DB-5HT capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter, 0.1 μ m film thickness) from J&W Scientific. The oven was heated from 120 °C (1 min) to 300 °C (15 min) at 5 °C·min⁻¹. The injection was performed at 300 °C and the transfer line was kept at 300 °C. Compounds were identified by mass fragmentography, and comparing

6. Publicaciones

their mass spectra with those of the Wiley and NIST libraries and standards. Quantification was obtained from total-ion peak area, using molar response factors of the same or similar compounds.

2. Supplemental figures

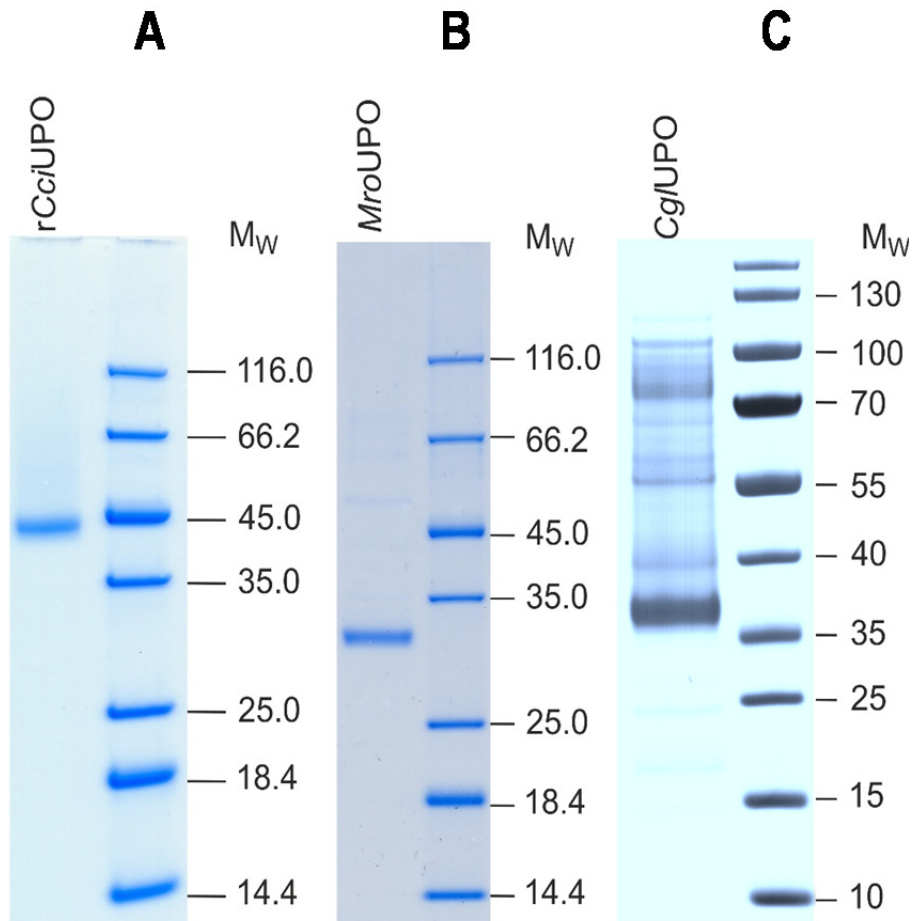


Figure S1. SDS PAGE of different UPO preparations: *rCciUPO* (A), *MroUPO* (B) and *Cg/UPO* (C). 10-12% Bis-Tris was used, and the proteins were visualized with a colloidal Blue staining (Invitrogen). Conditions (50 mM dithiothreitol) resulted in monomeric *MroUPO*. Low molecular weight standards (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) were included.

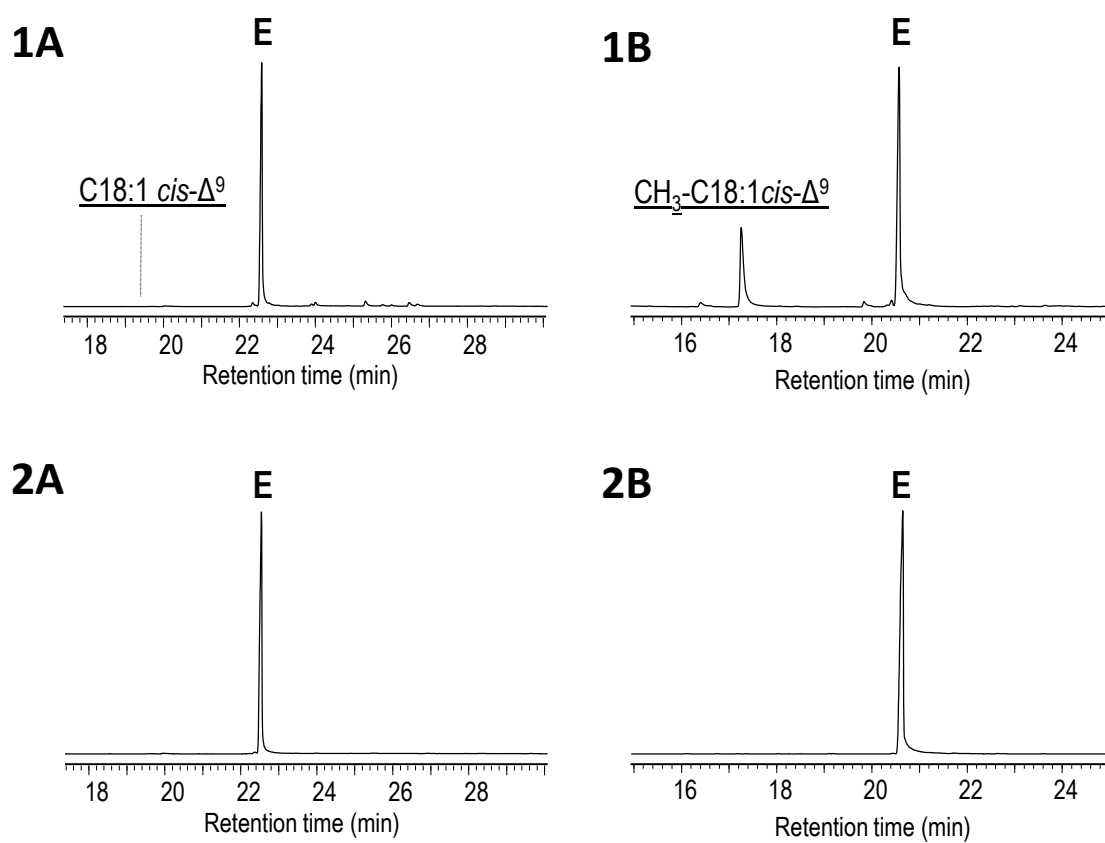


Figure S2. GC-MS chromatograms of *cis*-9,10-epoxystearic acid (E) from oleic acid (underlined) reaction with *Cg*/UPO (1A) and *cis*-9,10-epoxystearic acid standard (2A); and of *cis*-9,10-epoxystearic acid methyl ester (E) from oleic acid methyl ester (underlined) reaction with *Cg*/UPO (1B) and *cis*-9,10-epoxystearic acid methyl ester standard (2B).

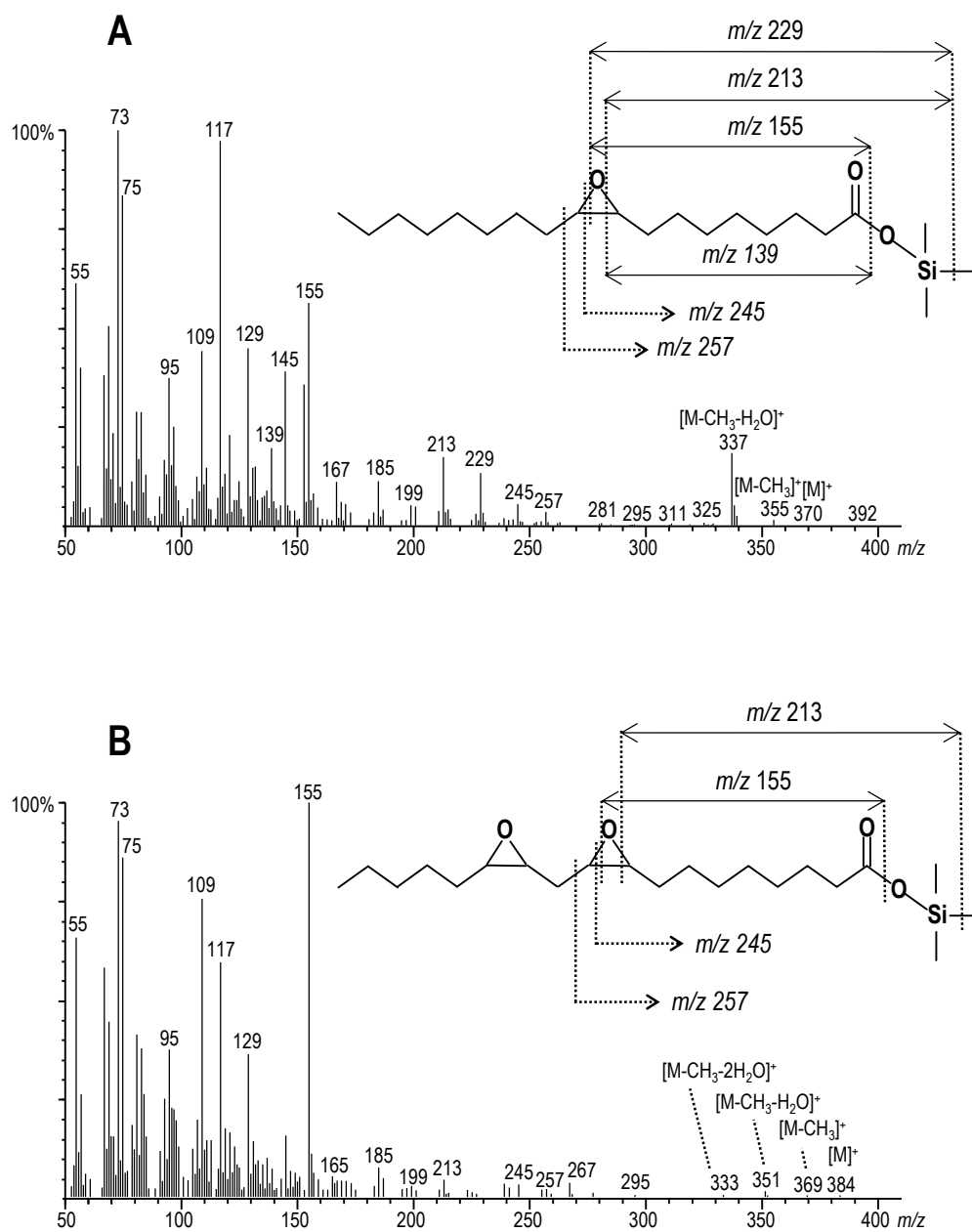


Figure S3. Mass spectra and formula/fragmentation of oleic acid epoxide (A) and linoleic acid diepoxide (B) (as trimethylsilyl derivatives) from *Cg*/UPO and *Mro*UPO reactions with oleic acid and linoleic acid, respectively.

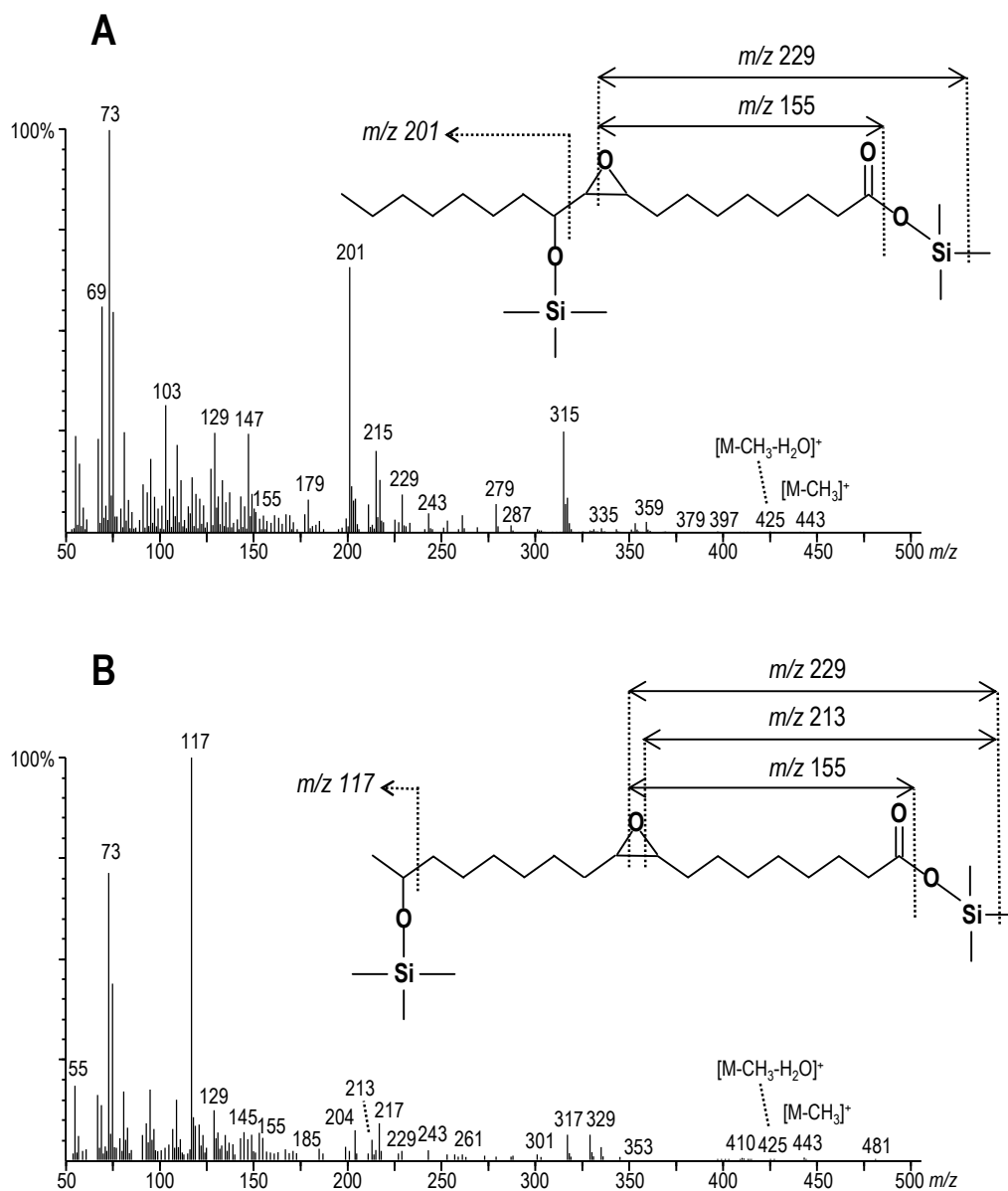


Figure S4. Mass spectra and formula/fragmentation of compounds tentatively assigned as hydroxylated derivative at (ω -7) position (A) and at (ω -1) position (B) of oleic acid epoxide (as trimethylsilyl derivatives) from *Mro*UPO reactions with oleic acid (Fig. 1B).

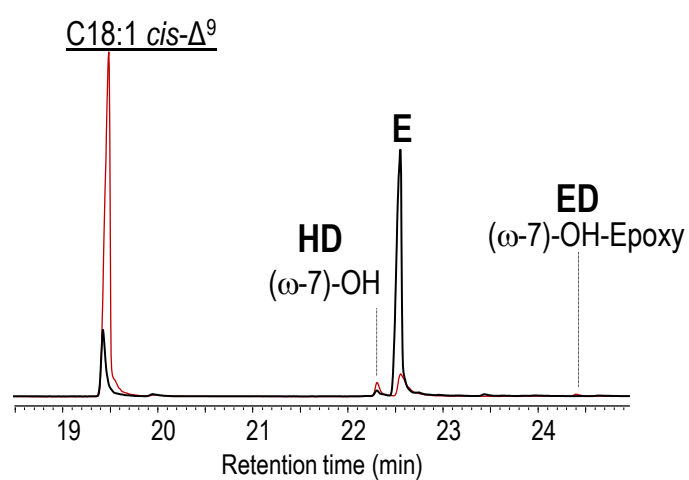


Figure S5. GC-MS of conversion of oleic acid (underlined) by the same dose (50 nM) of *Cg*/UPO (black) and *Mro*UPO (red), within 5 min, and 0.5 mM H₂O₂, showing the epoxide (E), epoxide derivatives (ED) and the hydroxylated derivatives (HD) of oleic acid at allylic positions (see mass spectra of the epoxide in Figures S3).

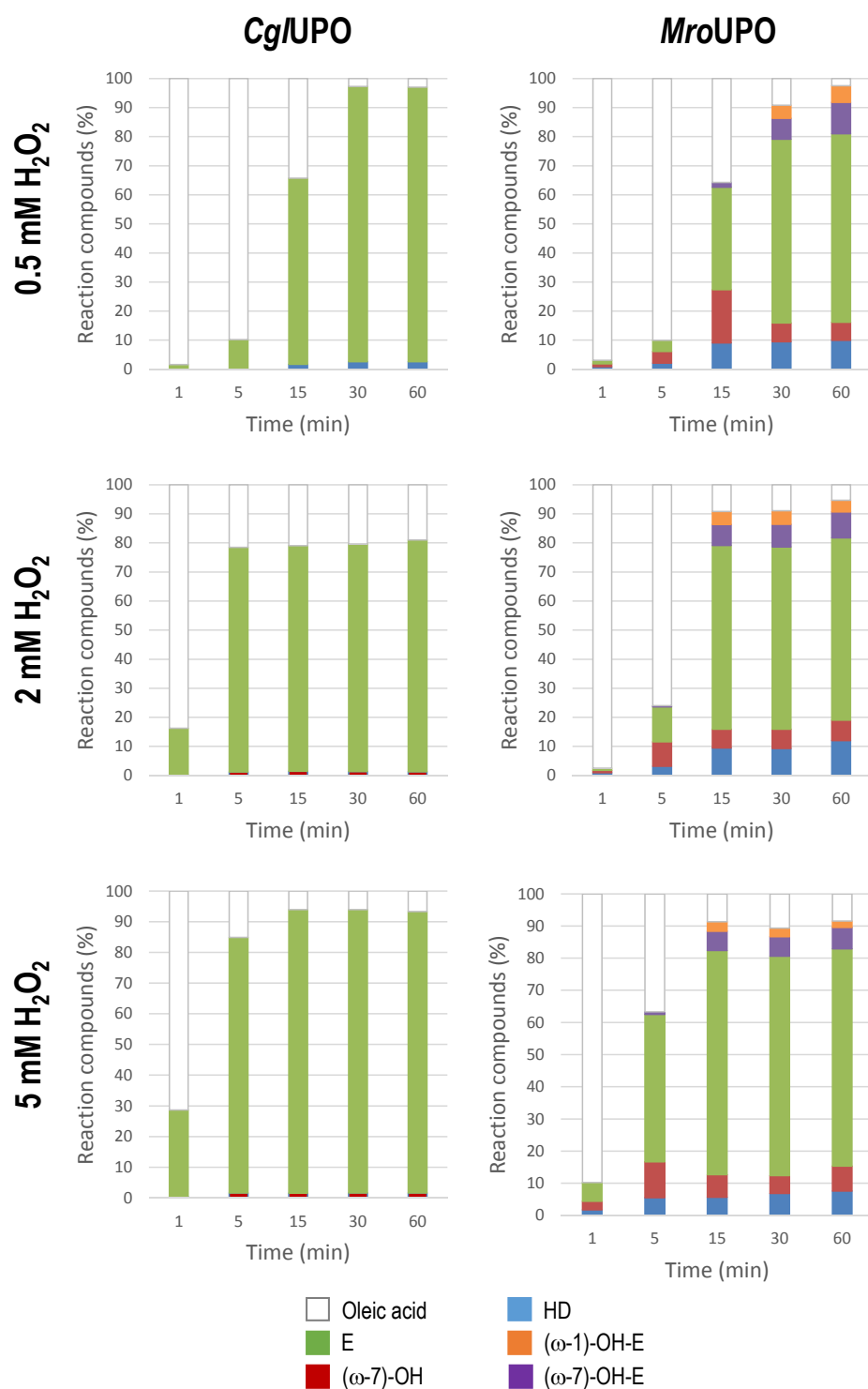


Figure S6. Molar percentage of compounds from reactions of oleic acid with 50 nM *Cg/UPO* and 100 nM *MroUPO*, under different final H₂O₂ concentrations and reaction times, showing the remaining substrate, epoxide (E), hydroxylated derivatives of the epoxide at (ω -1) and (ω -7) positions and the hydroxylated derivatives (HD) of oleic acid at subterminal positions.

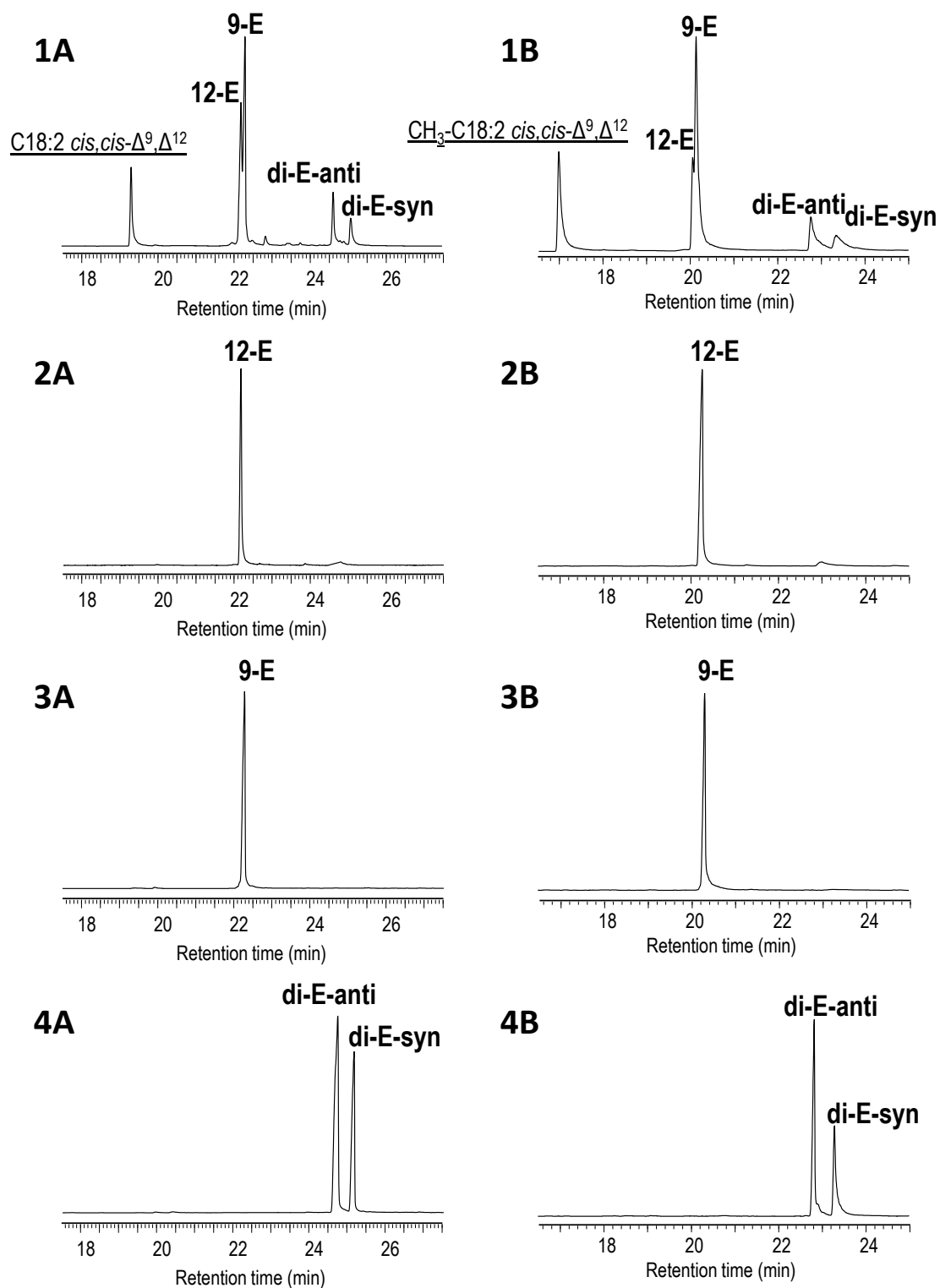


Figure S7. GC-MS chromatograms of 12,13-*cis*-epoxide of linoleic acid (12-E); 9,10-*cis*-epoxide of linoleic acid (9-E) and 9,10-12,13-diepoxyoctadecanoic acid (di-E-anti and di-E-syn) from linoleic acid (underlined) reaction with *Cg/UPO* (1A) and of authentic standards *cis*-12,13-epoxystearic acid (2A); *cis*-9,10-epoxystearic acid (3A); and 9,10-12,13-diepoxyoctadecanoic acid (4A) as well as their corresponding methyl esters (1B-4B).

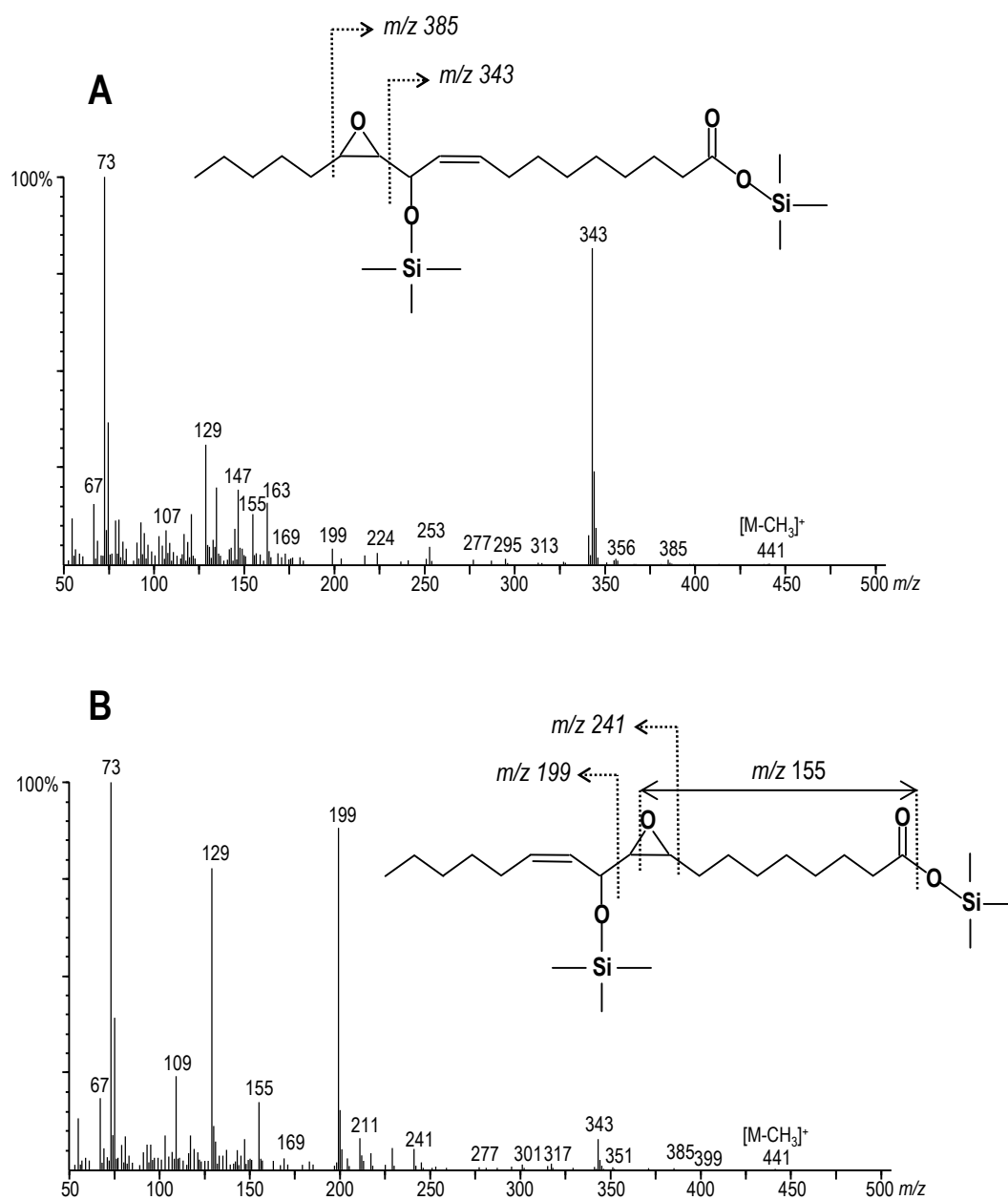


Figure S8. Mass spectra and formula/fragmentation of compounds tentatively assigned as hydroxylated derivatives at (ω -7) position of linoleic acid 12-epoxide (A) and 9-epoxide (B) (as trimethylsilyl derivatives) from *Mro*UPO reactions with linoleic acid (Fig. 2B).

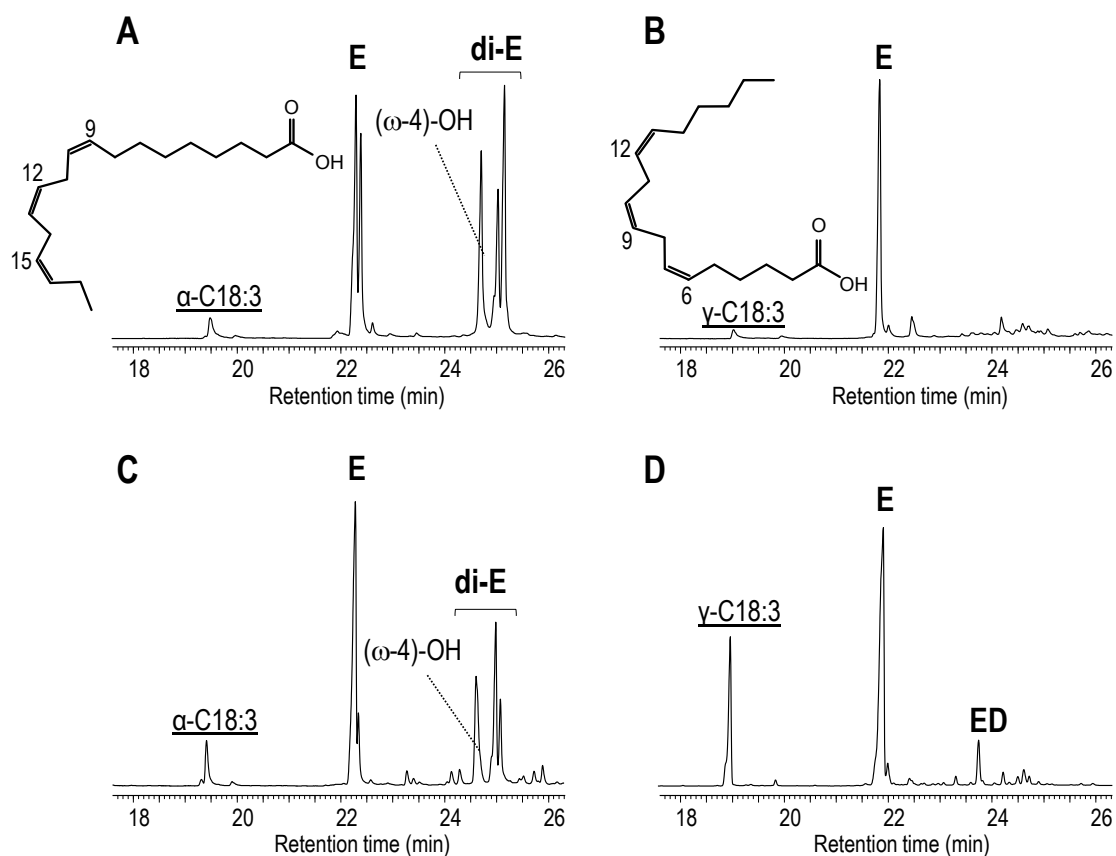


Figure S9. GC-MS of reactions of α -linolenic acid (*left*) at 30 min with 125 nM *Cg/UPO* (A) and 100 nM *MroUPO* (C), and γ -linolenic acid (*right*) at 30 min with 60 nM *Cg/UPO* (B) and 60 nM *MroUPO* (D), showing the remaining substrates (underlined), monoepoxides (E), diepoxides (di-E) and hydroxylated derivatives.

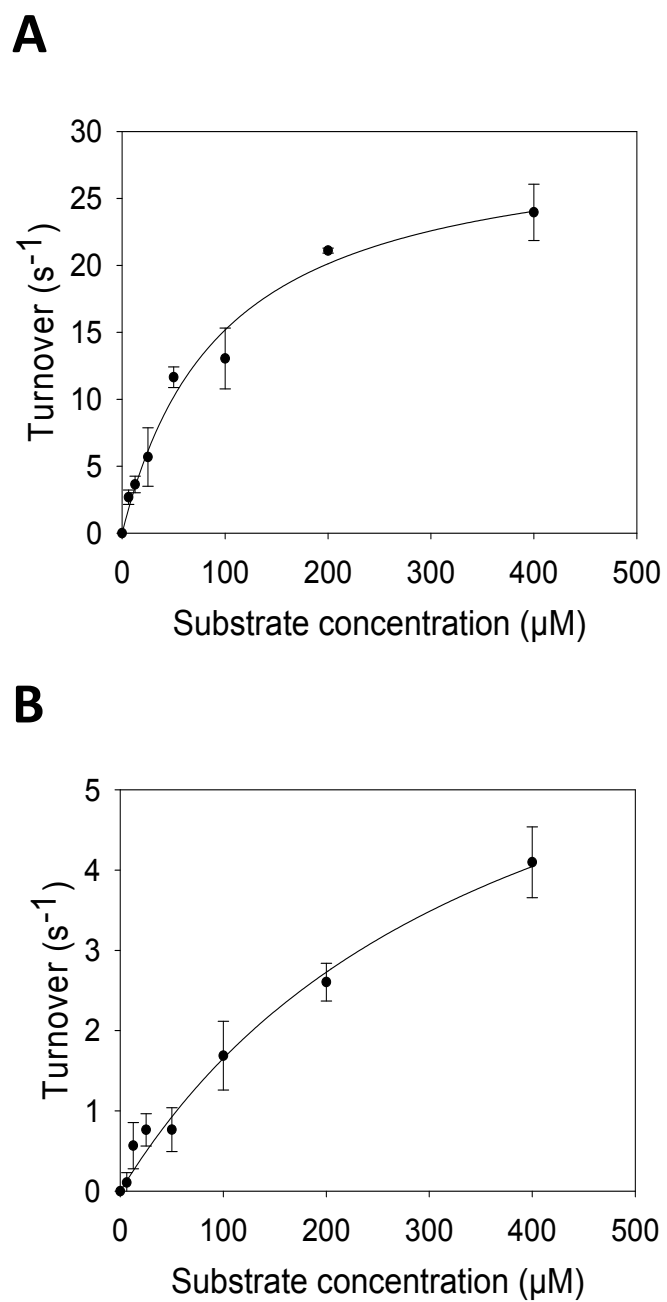


Figure S10. Kinetic studies for the enzymatic oxidation of linoleic acid by *Cg/UPO* (A) and *MroUPO* (B).

3. Supplemental references

- [1] G. Gröbe, M. Ullrich, M. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, *AMB Express* 2011, 1, 31-42.
- [2] J. Kiebist, K. U. Schmidtke, J. Zimmermann, H. Kellner, N. Jehmlich, R. Ullrich, D. Zänder, M. Hofrichter, K. Scheibner, *ChemBioChem* 2017, 18, 563-569.
- [3] C. R. Otey, *Methods Mol. Biol.* 2003, 230, 137-139.

4. Complete reference cited in the main text

- [14] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martínez, R. Otilar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav, A. Aerts, I. Benoit, A. Boyd, A. Carlson, A. Copeland, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. Ferreira, K. Findley, B. Foster, J. Gaskell, D. Glotzer, P. Górecki, J. Heitman, C. Hesse, C. Hori, K. Igarashi, J. A. Jurgens, N. Kallen, P. Kersten, A. Kohler, U. Kües, T. K. A. Kumar, A. Kuo, K. LaButti, L. F. Larrondo, E. Lindquist, A. Ling, V. Lombard, S. Lucas, T. Lundell, R. Martin, D. J. McLaughlin, I. Morgenstern, E. Morin, C. Murat, M. Nolan, R. A. Ohm, A. Patyshakuliyeva, A. Rokas, F. J. Ruiz-Dueñas, G. Sabat, A. Salamov, M. Samejima, J. Schmutz, J. C. Slot, F. St.John, J. Stenlid, H. Sun, S. Sun, K. Syed, A. Tsang, A. Wiebenga, D. Young, A. Pisabarro, D. C. Eastwood, F. Martin, D. Cullen, I. V. Grigoriev, D. S. Hibbett, *Science* 2012, 336, 1715-1719.

6.2 Patente:

Gutiérrez Suárez A., Olmedo Mena-Bernal A., del Río Andrade J.C., Martínez Ferrer A.T. (2017) Process for shortening the hydrocarbon chain of a carboxylic acid by a peroxygenase. EP17382211



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

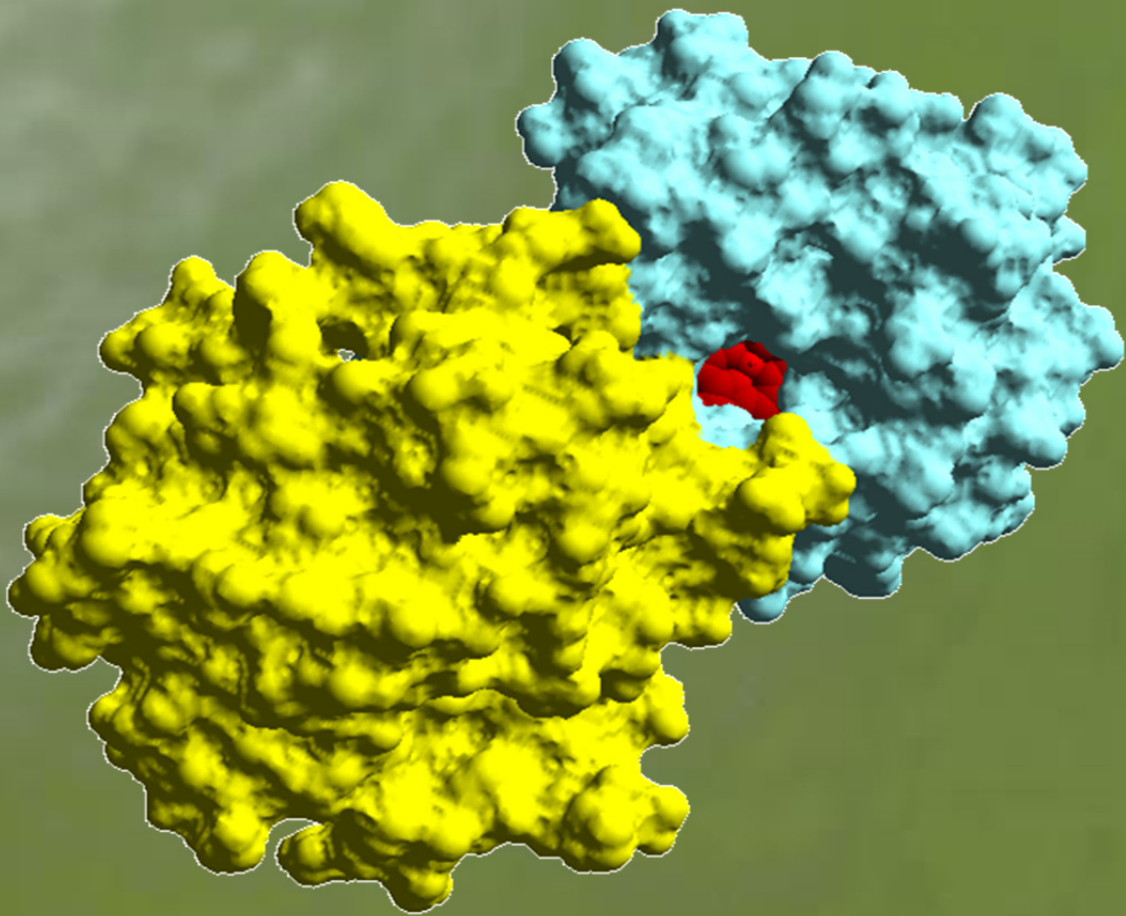
Submission number	300231075	
Application number	EP17382211.5	
File No. to be used for priority declarations	EP17382211	
Date of receipt	20 April 2017	
Your reference	EP1641.1298	
Applicant	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Country	ES	
Title	PROCESS FOR SHORTENING THE HYDROCARBON CHAIN OF A CARBOXYLIC ACID BY A PEROXYGENASE	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfDescripción - EP1641.1298.pdf (18 p.) SPECEPO-3.pdfresumen - EP1641.1298.pdf (1 p.) SEQLTXT.txt\Untitled_ST25.txt f1002-1.pdf (2 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdfclaims - EP1641.1298.pdf (3 p.) SPECEPO-4.pdfdrawings - EP1641.1298.pdf (5 p.) OTHER-1.pdf\Untitled_ST25_Bloc de notas.pdf (2 p.)
Submitted by	C=ES,O=PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL,2.5.4.97=#0C0F56415445532D423834393231373039,CN=50534279J ANGEL PONS (R: B84921709),SN=PONS ARIÑO,givenName=ANGEL,serialNumber=IDCES-50534279J,description=Ref:AEAT/AEAT0297/PUESTO 1/40639/05102016093524	

6. Publicaciones

Method of submission	Online
Date and time receipt generated	20 April 2017, 16:48:16 (CEST)
Official Digest of Submission	DC:79:E0:A8:94:8E:C1:5E:57:23:E8:FB:EC:2E:92:DB:C7:4C:92:03

/Madrid, Oficina Receptora/

7. Conclusiones



7. CONCLUSIONES

En la presente Tesis se ha llevado a cabo el estudio de la oxifuncionalización enzimática de diferentes compuestos alifáticos catalizada por la peroxigenasa de *Marasmius rotula* (*MroUPO*) en presencia de H_2O_2 como co-sustrato único. Con fines comparativos, se estudiaron también las reacciones de algunos sustratos con las peroxigenasas de *Chaetomium globosum* (*CglUPO*), *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*) así como con la peroxigenasa recombinante de *Coprinopsis cinerea* (*rCciUPO*). Finalmente, se ha estudiado en detalle los mecanismos de la oxigenación selectiva de los diferentes sustratos por estas enzimas utilizando $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$. Las principales conclusiones obtenidas se citan a continuación:

1. Se ha demostrado que la enzima *MroUPO* es capaz de hidroxilar la posición terminal de los alcanos, además de las posiciones subterminales, a diferencia de otras peroxigenasas previamente estudiadas (*AaeUPO*, *rCciUPO*) que únicamente hidroxilan los alcanos en posición subterminal.
2. La hidroxilación terminal de alcanos da lugar a ácidos dicarboxílicos, tras sucesivas hidroxilaciones.
3. La peroxigenasa de *M. rotula* es la única peroxigenasa fúngica de las estudiadas hasta ahora capaz de catalizar el acortamiento sucesivo de la cadena de ácidos dicarboxílicos saturados, originando un nuevo ácido dicarboxílico con una cadena hidrocarbonada de un átomo de carbono menos.
4. El acortamiento de la cadena se inicia con una hidroxilación en el carbono α (adyacente al grupo carboxílico), seguida de otra hidroxilación en este mismo carbono, dando lugar a un α -cetoácido que, en presencia del H_2O_2 utilizado en la reacción, se descarboxila originando un nuevo ácido de un átomo de carbono menos.
5. La reacción de acortamiento de la cadena también se produce en algunos ácidos grasos monocarboxílicos saturados, particularmente

7. Conclusiones

en aquéllos con una longitud de cadena inferior a catorce átomos de carbono.

6. La peroxigenasa de *M. rotula*, así como la de *C. globosum*, catalizan la epoxidación de ácidos grasos insaturados (así como de sus ésteres de metilo) a diferencia de las enzimas previamente estudiadas (*AaeUPO*, *rCciUPO*) que únicamente hidroxilan dichos ácidos grasos en posición subterminal y no los epoxidan. La peroxigenasa de *C. globosum* mostró una mayor selectividad en la epoxidación de ácidos grasos insaturados que la de *M. rotula*.
7. El análisis de los espectros de masas de los productos de reacción obtenidos en las reacciones enzimáticas de *MroUPO* y diversos sustratos utilizando $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, reveló que estas enzimas introducen el átomo de oxígeno en el sustrato a partir del H_2O_2 (y no del O_2) demostrando de este modo su actividad peroxigenasa.

Podemos concluir, por tanto, que el uso de *MroUPO* puede representar una alternativa tanto a la síntesis química como a las reacciones catalizadas por citocromos P450, para la oxifuncionalización selectiva de compuestos de interés industrial, ya que utilizando únicamente H_2O_2 como co-sustrato, esta UPO cataliza reacciones de gran interés hasta ahora desconocidas para estas novedosas enzimas, como son la oxigenación terminal de alcanos, el acortamiento de la cadena de ácidos grasos saturados y la epoxidación de ácidos grasos insaturados.

