



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Máster en Biología Molecular y Celular

Expresión recombinante de enzimas  
oxidorreductasas en *E. coli* y  
*Pichia pastoris*

Recombinant expression of oxidoreductases  
enzymes in *E. coli* y  
*Pichia pastoris*

Autor/es

Cristina Alierta Viñao

Director

Susana Velasco Lozano

Facultad de Ciencias  
2023



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
<b>1.1.    Métodos y estrategias usados en la regeneración de cofactores .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.    Ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR).....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.    Enzimas en electroquímica.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.    Sistemas de expresión heteróloga de proteínas en bacterias y levaduras.....</b>	<b>13</b>
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
3.1. MATERIALES .....	19
3.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS .....	19
<b>3.2.1.    Transformación en <i>E. coli</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2.    Purificación de plásmidos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3.    Expresión en <i>E. coli</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.4.    Purificación de enzimas producidas en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.5.    Cuantificación colorimétrica de proteínas .....</b>	<b>21</b>
3.3. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FNR .....	21
<b>3.3.1.    Mediciones de actividad enzimática .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2.    Cinéticas de Michaelis-Menten .....</b>	<b>22</b>
3.4. ESTABILIDAD DE LA FNR.....	22
<b>3.4.1.    Determinación de la temperatura de melting (Thermal shift assay) .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.2.    Estabilidad térmica .....</b>	<b>23</b>
3.5. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÉTICAS .....	23
<b>3.5.1.    Extracción del gen de interés del plásmido comercial agregando los sitios de restricción deseados mediante PCR.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.2.    Digestión del gen AsFNR y el plásmido pGAPZαA con las enzimas de restricción seleccionadas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.3.    Reacción de ligación entre el plásmido e inserto digeridos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.4.    Linealización y purificación de la construcción genética.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.4.    Transformación en <i>Pichia pastoris</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.5.    Expresión en <i>P. pastoris</i> .....</b>	<b>25</b>
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS EN <i>E. coli</i> .....	27
4.2. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÉTICAS .....	28

4.3.	CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.....	35
4.4.	ESTABILIDAD TÉRMICA .....	36
4.5.	MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES .....	39
5.	CONCLUSIONES .....	43
6.	CONCLUSIONS.....	44
7.	BIBLIOGRAFIA.....	45



## RESUMEN

En la naturaleza, la ferredoxina NADP-reductasa (FNR) es la principal flavoenzima capaz de regenerar NADPH recibiendo los electrones proporcionados por el fotosistema I y catalizando la reducción de dos electrones de  $\text{NADP}^+$  a NADPH. Esta capacidad catalítica ha sido aprovechada fuera de la célula en la llamada “e-leaf”. En estas condiciones, la FNR cataliza la interconversión reversible de NADPH en  $\text{NADP}^+$  cuando está confinada en la superficie de un electrodo. Además, este concepto bioelectrocatalítico se ha explotado como herramienta de regeneración de cofactores ensamblado con sistemas multienzimáticos que lo requieren. Entre las FNR reportadas, la de la cianobacteria *Anabaena* sp. (AsFNR) se ha expresado de forma recombinante en *E. coli* con rendimientos proteicos relativamente altos, lo que ha permitido estudiarla ampliamente y caracterizarla cinéticamente. A pesar de estas ventajas, AsFNR muestra una baja estabilidad (mantiene menos del 50% de su actividad después de una noche a 4 °C). Este inconveniente dificulta su aplicación como sistema robusto de regeneración de cofactores en biotransformaciones a gran escala. Varias estrategias se han centrado en aumentar la estabilidad de esta enzima principalmente mediante inmovilización y mutaciones racionales.

Hoy en día, el sistema de expresión de levadura *P. pastoris* es una de las herramientas más populares y estándar para la producción de proteínas recombinantes en biología molecular. En general, los beneficios de esta estrategia incluyen un plegamiento correcto y la secreción de proteínas recombinantes en el entorno externo de la célula de levadura. La glicosilación es una de las formas más comunes de modificación postraduccional de proteínas en este sistema de expresión en levaduras; que está estrechamente relacionado con el aumento de la estabilidad térmica de las enzimas resultantes. Basándonos en estos descubrimientos previos, en el presente trabajo presentamos por primera vez la expresión heteróloga de AsFNR en *P. pastoris* con el objetivo de aumentar la estabilidad operativa de esta enzima mediante el proceso natural de modificaciones postraduccionales. Para ello, hemos clonado un constructo de AsFNR marcado con cola de histidinas extraído del vector pET28a insertándolo en un vector pGAPZ $\alpha$ A. Tras la exitosa construcción del clon, optimizamos la expresión heteróloga de rAsFNR en *P. pastoris* en medio enriquecido para finalmente purificarla mediante cromatografía IMAC y caracterizarla cinéticamente. La rAsFNR obtenida exhibe la misma actividad específica, pero presenta mayor temperatura de fusión y mayor estabilidad operativa que la expresada en *E. coli*.

## ABSTRACT

In nature, ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) is the main flavoenzyme which regenerates NADPH by receiving the electrons dispensed from photosystem I and catalyzing the two-electron reduction of NADP<sup>+</sup> to NADPH. This catalytic capacity has been harnessed outside the cell in the so called electrochemical leaf. Under these conditions, FNR catalyzes the reversible interconversion of NADPH into NADP<sup>+</sup> when it is confined into an electrode surface. Moreover, this bioelectrocatalytic concept has been exploited as a cofactor regenerating tool when assembled with cofactor-dependent multi-enzyme systems. Among the reported FNRs, the one from the cyanobacterium *Anabaena* sp. (AsFNR) has been well recombinantly expressed in *E. coli* with relatively high protein yields, thus allowing been widely studied and kinetically characterized. Despite these advantages, AsFNR displays very poor stability (maintaining less than 50% of its initial activity after spending one night stored at 4 °C). This drawback hampers its application as a robust cofactor-regenerating system in large scale biotransformations. Several strategies have been focused on increasing the stability of this enzyme mainly by immobilization and rational mutations.

Nowadays, the yeast expression system *P. pastoris* is one of the most popular and standard tool for the production of recombinant proteins in molecular biology. Overall the benefits of this strategy include appropriate folding and secretion of recombinant proteins to the external environment of the yeast cell. Moreover, N-glycosylation is one of the most common forms of protein post-translational modification in this yeast expression system; which is closely related with the increase in thermal stability of the resulting enzymes. Based on these previous findings, herein we report for the first time the heterologous expression of AsFNR in *P. pastoris* aiming at increasing the operational stability of this enzyme through the natural post-translational modification process. We have cloned a his-tagged AsFNR construct extracted from a pET28a vector and inserted it into a pGAPZαA vector. After the successful clone construction, we optimized the heterologous expression of rAsFNR in *P. pastoris* in defined and enriched mediums. Once rAsFNR is secreted to the culture medium, we have purified it by IMAC chromatography and kinetically characterized. The obtained pure rAsFNR displays the same specific activity while exhibiting higher melting temperature and higher operational stability than the one expressed in *E. coli* expression system.

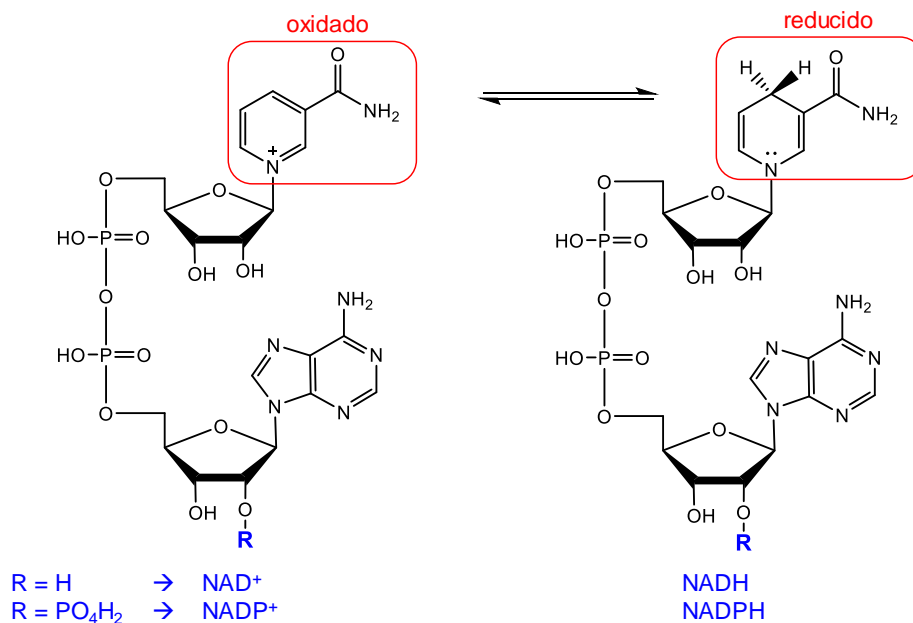
## 1. INTRODUCCIÓN

Los retos mundiales en materia de energía, recursos, medio ambiente y transformación química sostenible nos llevan a minimizar el uso de recursos naturales, materiales tóxicos, energía y la generación de residuos y contaminantes. La biocatálisis contribuye cada vez más a estos objetivos y ha sido ampliamente utilizada por su alta actividad, selectividad, especificidad y bajo consumo energético. Las enzimas son biocatalizadores eficientes, disponibles de forma natural, que presentan una gran especificidad y enantioselectividad. Desempeñan un papel fundamental en el sector farmacéutico, donde se emplean en la síntesis comercial de dos tercios de los productos quirales (1) utilizados en la síntesis de nuevos fármacos (2). Dentro de estas, las oxidorreductasas (enzimas redox) catalizan procesos de transferencia de electrones y son la segunda clase más grande de enzimas (lo que supone ~30% de todas las enzimas) (3). Además, estas enzimas tienen propiedades catalíticas que fomentan su uso en una amplia variedad de aplicaciones, como en la reducción de grupos carbonilo ácidos, dobles enlaces C=C, grupos nitro y enlaces múltiples C-N, y son muy útiles en la síntesis de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y combustibles (4). Las reducciones por oxidorreductasas resultan especialmente valiosas en la producción de compuestos farmacéuticos debido a su enantioselectividad única.

La mayoría de las oxidorreductasas (el 90% de ellas) emplean un cofactor redox como la nicotinamida adenina (NAD(P)H), o su homólogo oxidado, el NAD(P)<sup>+</sup> (**Figura 1**). Sin embargo, su elevado coste y las cantidades estequiométricas requeridas por estas enzimas hacen que el consumo de esta coenzima sea económicamente inviable en aplicación a larga escala. Por ello, se han dedicado enormes esfuerzos a la regeneración in situ de estos cofactores redox (5,6). Idealmente, un método de regeneración de cofactores redox debe cumplir eficientemente con un alto número de recambio total (TTN, definido como el número de moles de producto por mol de cofactor), alta selectividad, sostenibilidad, viabilidad económica y compatibilidad para integrarse en el sistema de biotransformación. Hasta la fecha, no existe un método de regeneración universal que pueda emplearse para cualquier tipo de reacción enzimática, y los más adecuados están limitados por las características y condiciones de la reacción. Las estrategias existentes de regeneración de cofactores redox tienen sus ventajas y sus inconvenientes y pueden englobarse en las siguientes categorías principales: enzimática, química, electroquímica y fotónica. Los principales problemas de aplicación de los métodos



enzimáticos son mejorar el desempeño catalítico enzimático, implementar rutas de regeneración eficientes y reciclar el cofactor. Por su parte, el desarrollo de catalizadores eficientes con una alta selectividad es la prioridad del método de regeneración química, mientras que para el método electroquímico la mejora del electrodo mediante modificación con nanomateriales o mediadores de electrones constituye el mayor desafío. Por otro lado, los métodos de regeneración fotoquímica se centran en el diseño y la explotación de fotosensibilizadores eficientes capaces de trabajar con luz visible (6,7).



**Figura 1.** Forma oxidada y reducida de los cofactores de nicotinamida.

Como proceso redox, la regeneración de NAD(P)H implica un suministro de electrones, para lo que tradicionalmente se han utilizado fuentes químicas, eléctricas o fotónicas. Los métodos químicos utilizan agentes reductores como donadores de electrones, mientras que los métodos electroquímicos requieren un suministro continuo de electricidad. Los métodos fotónicos emplean una fuente luminosa, pero requieren fotosensibilizadores caros con un TTN y una selectividad inferiores (6). Más recientemente, los métodos híbridos, como la combinación de enzimas con electrodos y fotosensibilizadores, han mejorado el rendimiento al combinar el elevado TTN y la selectividad de las enzimas con un suministro directo de electrones (8,9).

### 1.1. Métodos y estrategias usados en la regeneración de cofactores

La forma más sencilla para regenerar cofactores consiste en métodos directos, como la reducción química, fotoquímica o electroquímica directas. Desafortunadamente cada uno de estos tiene sus desventajas. Dado que el potencial energético del NAD(P)H es mayor que el de NAD(P)<sup>+</sup>, la regeneración de la forma reducida de la forma oxidada es termodinámicamente más difícil que la regeneración de la forma oxidada de la forma reducida (10).

La reducción química directa con ditionita es económica pero tiene varias desventajas como su baja TTN (<105), inestabilidad del reactivo, posible inactivación de enzimas por ditionita, y la posibilidad de reducción directa del sustrato por el reductor (11). *Taylor y Jones* (12) utilizaron derivados de la hidropiridina con el mismo fin en donde se consiguió un porcentaje de regeneración de NAD<sup>+</sup> 50 veces superior usando la oxidación de ciclohexanol catalizada por la alcohol deshidrogenasa (ADH) de hígado de caballo. En cuanto a la oxidación, se ha conseguido regenerar químicamente NAD<sup>+</sup> con flavin mononucleótido (FMN) y O<sub>2</sub> como último aceptor de electrones (12). La desventaja de esta reacción es que es muy lenta (0.27 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Otros agentes químicos utilizados para la regeneración de NAD<sup>+</sup> son el ferricianuro de potasio, el metosulfato de fenazina, las sales de piridinio y las flavinas (13). Todos estos tienen problemas de estabilidad y velocidades de reacción lentas, pero se pueden usar en una amplia gama de condiciones de funcionamiento, son baratos y son aplicables tanto para la regeneración de NAD<sup>+</sup> como para el NADP<sup>+</sup>.

Una forma de aumentar la velocidad de la regeneración de estos cofactores es mediante la fotoexcitación. En comparación con la oxidación química, este proceso consigue aumentar la velocidad de oxidación mediante electrones mediadores de transferencia (14), y se puede aplicar tanto para la regeneración de NAD<sup>+</sup> como NADP<sup>+</sup>.

Por otro lado, los métodos electroquímicos son baratos y no requieren sustratos específicos. Sin embargo, requieren altos sobrepotenciales para llevar a cabo las reacciones electroquímicas, presentan mala regioselectividad y la formación de reacciones secundarias, así como una baja TTN (<1000) (15). El problema de los sobrepotenciales elevados se puede solventar mediante el uso de mediadores orgánicos (como los derivados del viológeno, hierro tetrametilfenantrolino, ferrocenos, derivados del pirrol, complejos de rodio, azul de metileno, ferricianuro) (16). Estos mediadores

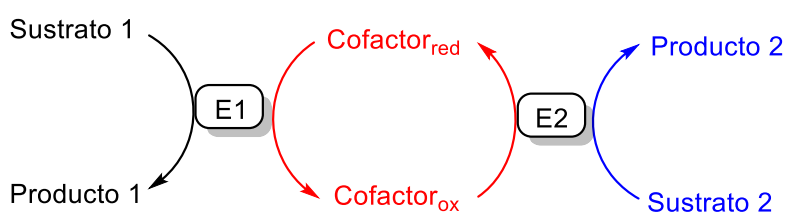
consiguen hacer más eficiente la transferencia electrónica desde el electrodo hacia el cofactor disminuyendo así el potencial requerido. Así mismo, la regeneración reductiva puede dar lugar a la formación de dímeros de NADH enzimáticamente inactivos (10,16,17). La formación de estos dímeros inactivos puede minimizarse mediante el uso de polímeros depositados en electrodos de cristal líquido (18). Dado que ninguna forma inactiva resulta a través de la regeneración directa de los cofactores oxidados de nicotinamida, este tipo de método se utiliza más ampliamente para la regeneración oxidativa.

Para la regeneración reductiva, se prefieren los métodos de regeneración enzimáticos. Sin embargo, debido al alto costo de las enzimas, se utilizan métodos combinados (electroquímicos y enzimáticos) que conducen a la regeneración de cofactores in situ que requieren solo cantidades catalíticas tanto de la enzima regeneradora como del cofactor. Esto convierte a los métodos electroenzimáticos en una buena opción para la regeneración de cofactores en biotransformaciones enzimáticas redox dependientes de NAD(P)H.

En este proceso, la transferencia de electrones (ET) más eficiente sería directamente entre la enzima regeneradora y el electrodo. Sin embargo, la ET directa desde el electrodo hacia el sitio activo de las enzimas es posible con proteínas redox que tienen el sitio catalítico expuesto como el citocromo c (19), la ferredoxina (20), la lacasa, y las peroxidasas.

En la regeneración enzimática se utilizan tres estrategias diferentes (21):

- a) Regeneración enzimática acoplada: en este método tanto la reacción principal como la regeneración del cofactor se llevan a cabo paralelamente con dos enzimas y dos sustratos diferentes (para la síntesis y para la regeneración, respectivamente) (**Figura 2**).

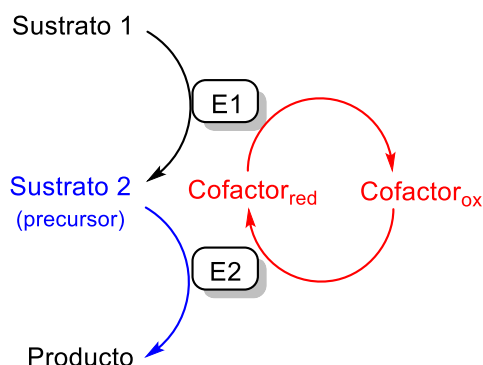


**Figura 1:** Método de regeneración enzimática acoplada para la regeneración del cofactor E1-enzima de síntesis, E2-enzima de regeneración.

Esta estrategia es conveniente siempre que ambas enzimas tengan especificidades suficientemente altas para sus respectivos sustratos y no se inhiban por presencia

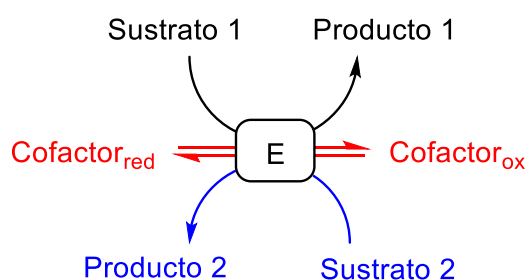
de ellos. Recientemente, a esta estrategia se le conoce como “Smart co-substrates”.

- b) Regeneración del cofactor acoplada al sustrato: en este método el sustrato para el producto deseado se forma in situ a partir de un precursor. Las enzimas para la reacción sintética (E1) y la regeneración (E2) requieren el mismo cofactor (una emplea la forma oxidada y la otra la reducida) (**Figura 3**). Este procedimiento es ventajoso en el caso de un precursor inestable.



**Figura 2:** Método de regeneración del cofactor acoplada al sustrato. E1-enzima de síntesis, E2-enzima de regeneración.

- c) Regeneración de sustrato acoplado o cosustrato: este método utiliza una sola enzima que funciona en direcciones opuestas con dos sustratos diferentes llevando a cabo tanto la reducción como la oxidación del cofactor dependiendo del sustrato que emplee. La coenzima puede permanecer en el mismo sitio activo y alternar entre dos estados de oxidación (**Figura 4**). En este caso, la eficiencia general del proceso se ve limitada por el hecho de que la actividad de la enzima se divide entre las dos reacciones, se requiere una gran cantidad de enzima, y es común que se produzca inhibición enzimática por el cosustrato.



**Figura 3.** Método de regeneración de sustrato acoplado.

Algunas de las enzimas más empleadas para la regeneración de cofactores derivados de nicotinamida se listan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Ejemplos de enzimas reportadas para la regeneración de cofactores derivados de nicotinamida.

Enzima	Sustrato	TN <sub>cof.</sub>	Aplicación	Ref.
ADH	ammonio	5 <sup>b</sup>	Conversión de alcoholes en aminas enantiopuras	(22)
Mioglobina	oxígeno	50000 <sup>a</sup>	Oxidaciones mediadas por deshidrogenasas	(23)
Glutación reductasa	2-hidroxietil disulfuro	500000 <sup>b</sup>	Biosíntesis de 6-fosfluconato (G-PG), Ribulosa 5-fosfato (Ru5P) y GMP	(24)
FDH	formiato	6300 <sup>a</sup>	Biosíntesis de fármacos quirales	(25)
Diaforasa	2,6-diclorofenolindofenol	174 <sup>b</sup>	Producción de D-ribulosa	(26)
NOX	oxígeno	33 <sup>a</sup>	Síntesis de L-tagatosa	(27)
GDH	almidón	120 <sup>a</sup>	Síntesis de ácido láctico	(28)
ADH	2-propanol	12855 <sup>b</sup>	Biocatálisis en flujo	(29)
FNR	Electrodo de ITO	436 <sup>b</sup>	Síntesis de L-glutamato	(60)

<sup>a</sup>NADH. <sup>b</sup>NADPH. ADH: Alcohol deshidrogenasa, FDH: formiato deshidrogenasa, NOX: NADH oxidasa, FNR: ferredoxina NADPH reductasa, GDH: Glucosa deshidrogenasa. Modificada de (21).

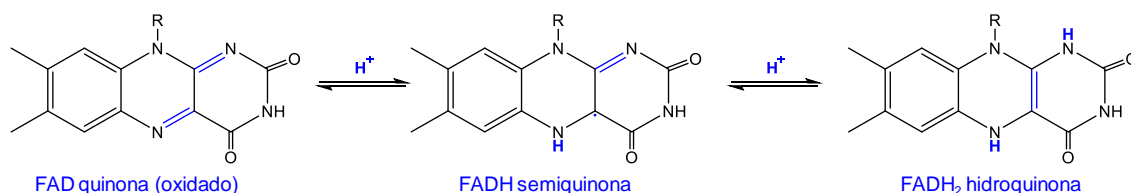
Existe también una categoría de métodos de regeneración de cofactores comúnmente conocidos como métodos biológicos (30). Estos métodos consisten en el uso de células enteras en lugar de enzimas aisladas, lo que permite el aprovechamiento de toda la maquinaria intracelular encargada de la regeneración de cofactores. Este enfoque evita la necesidad de purificación de la enzima, aumenta la estabilidad de las enzimas frente a factores de estrés externos (agitación, uso de solventes orgánicos) y lo más importante es que no requiere la adición exógena de cofactores (31). Sin embargo, el empleo de células enteras puede traer consigo la formación de productos de reacción secundarios derivados del metabolismo celular aumentando las etapas de purificación del producto final.

Una de las estrategias empleadas es el uso de células enteras de *E. coli* inmovilizadas que contienen una cadena respiratoria en su membrana interna y son capaces de oxidar NAD(P)H. Sin embargo, este sistema es poco estable y se requiere el uso de bacterias termofílicas para aumentar su estabilidad (32). Una técnica que se puede emplear para solventar esta problemática es la inmovilización de las células, sin embargo este método presenta una baja TTN en comparación con otros métodos de regeneración (33).

Inspirados en los sistemas de regeneración con células enteras, se ha descrito la inmovilización de cofactores en materiales microporosos en donde al mismo tiempo se inmovilizan tanto el cofactor como la enzima regeneradora. Estos métodos permiten la regeneración del cofactor in situ a muy bajas concentraciones de coenzima, además de que permite su reutilización en ciclos repetidos de biotransformaciones (34,35).

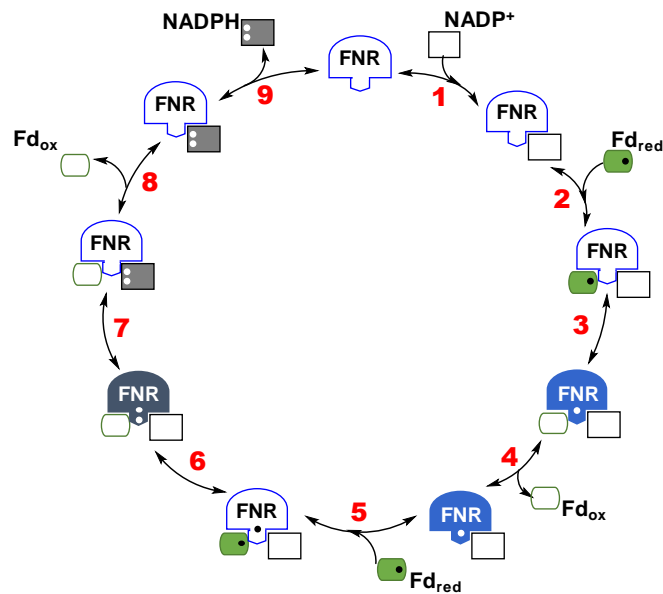
## 1.2. Ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR)

En la naturaleza, durante la fotosíntesis, la luz solar es empleada para regenerar NADPH y trifosfato de adenosina (ATP). En este proceso, la ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR (FNR, EC 1.18.1.2) es la flavoenzima principal encargada de regenerar el NADPH mediante la recepción de los electrones dispensados del fotosistema I, catalizando así la reducción del NADP<sup>+</sup> en NADPH mediante la transferencia de dos electrones y un hidruro(36). La función principal del fotosistema I (PSI) al final de la cadena lineal de transferencia de electrones fotosintéticos (PET) es reducir el NADP<sup>+</sup> a NADPH, utilizado principalmente como poder reductor en la asimilación de CO<sub>2</sub> (37). En plantas y cianobacterias, esto ocurre a través de la reducción de la ferredoxina (Fd) [2Fe–2S] de tipo vegetal soluble por el PSI (38), con la subsiguiente reducción de NADP<sup>+</sup> catalizada por la flavoenzima FNR, según la reacción  $2\text{Fd}_{\text{red}} + \text{NADP}^+ \rightarrow 2\text{Fd}_{\text{ox}} + \text{NADPH}$  (39,40).



**Figura 5.** Reducción del cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD).

En este proceso, el cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD) (**Figura 5**) de la FNR acepta dos electrones en dos pasos secuenciales de dos moléculas Fd reducida independientes, produciendo primero la semiquinona neutra y luego la forma totalmente aniónica reducida o hidroquinona de la enzima (FNR hq). La FNR hq transfiere entonces ambos electrones en un solo paso de transferencia de hidruro (HT) al NADP<sup>+</sup> (41–43). La reacción es un proceso reversible propuesto para seguir un proceso ordenado de dos sustratos dentro de un complejo ternario Fd:FNR:NADP<sup>+</sup>, con el nucleótido de piridina uniéndose primero a FNR (**Figura 6**) (41).

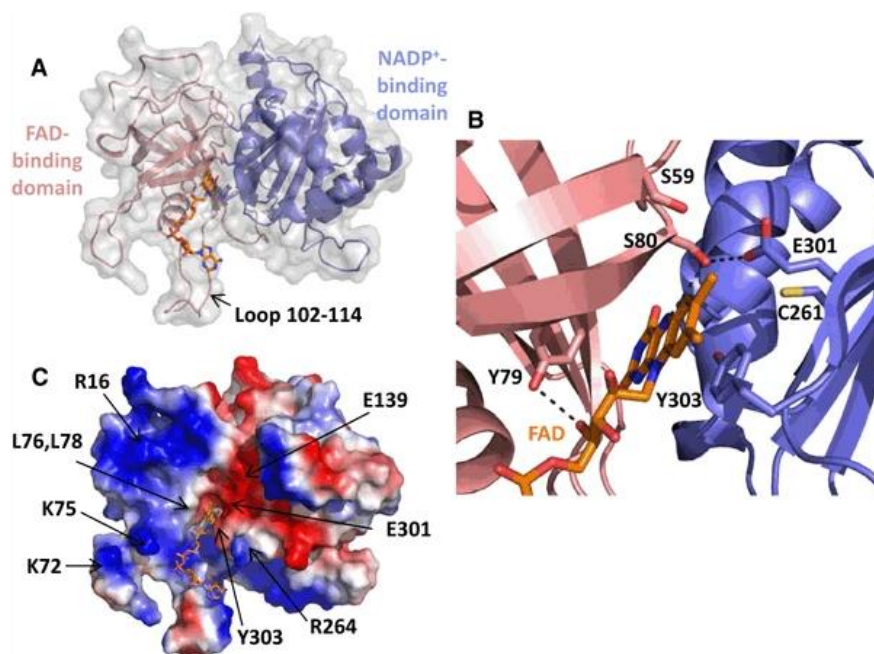


**Figura 6.** Mecanismo de transferencia electrónica de la FNR (44).

El análisis de la relación de los FNR plastídicos (~35–36 kDa) con otras enzimas que muestran actividad FNR indicó que comparten un origen evolutivo con los FNR bacterianos (también conocidos como FPR) (45–47). Los FNR plastídicos y bacterianos forman juntos la familia FNR de tipo vegetal, cuya estructura de dos dominios proporciona el andamiaje básico para una superfamilia extendida de flavoproteínas que llevan a cabo transferencia de electrones (ET) (48–53). El dominio de unión al FAD, se encuentra en el extremo N-terminal de las FNRs y está formado por seis cadenas  $\beta$  antiparalelas organizadas en dos láminas  $\beta$  perpendiculares, mientras que el dominio de unión a  $\text{NADP}^+$  se encuentra en el extremo C-terminal y consiste en un núcleo de cinco láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por siete hélices  $\alpha$  (**Figura 7**). El FAD se une fuera del barril  $\beta$  antiparalelo con su anillo de isoaloxazina entre dos tirosinas, una perteneciente al dominio de unión a FAD (Y79 en *Anabaena* FNR, AsFNR) y la otra al dominio de unión del  $\text{NADP}^+$  en el C-terminal donde se encuentra un residuo de tirosina (Y303 en AsFNR). Aunque la función fisiológica principal de los FNR plastídicos es la producción de poder reductor en forma de NADPH, estas enzimas pueden llevar a cabo el proceso reverso (oxidación de NADPH) y también catalizan la reducción de la  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  por NADPH para proporcionar poder reductor a varios procesos metabólicos (36).

La PET de Fd a  $\text{NADP}^+$  requiere la formación de al menos dos complejos transitorios binarios:  $\text{Fd:FNR}$  y  $\text{FNR:NADP}^+$ . Estos complejos organizan sus respectivos centros redox [ $2\text{Fe}-2\text{S}$ ], isoaloxazina y nicotinamida, cuando están presentes en los estados redox

adecuados, a la distancia y orientación adecuadas para la alta eficiencia exhibida en el proceso PET general ( $200 \text{ s}^{-1}$  TTN).



**Figura 7.** Representación molecular de la AsFNR y su interacción con el NADP<sup>+</sup> y el FAD. **A.** Representación de la superficie molecular y la estructura de la AsFNR (PDB 1QUE), dominios de unión del FAD y el NADP<sup>+</sup> en rosa pálido y en violeta metálico, respectivamente. **B.** Detalle del sitio activo de la AsFNR. **C.** Superficie molecular de la AsFRN con el potencial electrostático del ambiente de unión de sus ligandos (54).

### 1.3. Enzimas en electroquímica

La electroquímica de película de proteínas (PFE) se describe en varias revisiones (55–58). En ellas se describen los principios, numerosos ejemplos, así como las ventajas y aplicaciones, de unir una enzima directamente a la superficie del electrodo, evitando así la difusión lenta de proteínas que enmascara información útil. Las moléculas de proteína se adsorben espontáneamente en muchas superficies de electrodos, a menudo con la ayuda de contraiones polivalentes.

Una vez inmovilizada, la cobertura de una proteína puede ser lo suficientemente alta como para que el intercambio de electrones entre el electrodo y los sitios activos, impulsados por el voltaje cíclico, den lugar a señales visibles en forma de pico de tamaño finito y no distorsionadas por una cola difusiva.

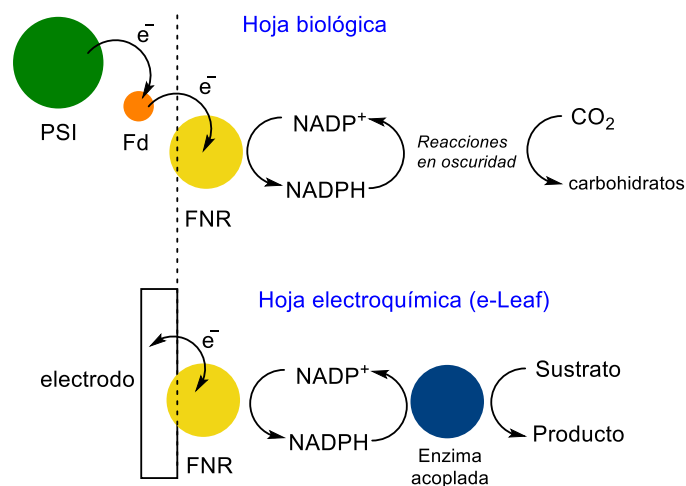
Sin embargo, el objetivo principal de PFE cuando se aplica a las enzimas es medir la actividad electrocatalítica que proviene de sitios activos que de otro modo serían



"indetectables". Dependiendo de la tasa de renovación y la cobertura de la enzima, las formas de onda catalíticas pueden estar limitadas por (i) el agotamiento del reactivo, (ii) la actividad inherente de la enzima, es decir, la frecuencia de recambio o (iii) transferencia de electrones interfacial (59). El transporte de reactivos a la superficie del electrodo (o productos lejos del electrodo) se puede controlar girando el electrodo a velocidades superiores a varios miles de rpm.

Ahora se ha establecido que muchas enzimas son electrocatalizadores reversibles cuando se unen a un electrodo (60). La electrocatálisis reversible se define aquí como una situación en la que solo se requiere un sobrepotencial mínimo para impulsar una reacción en cada dirección, y la velocidad a potenciales cercanos al valor reversible sigue aproximadamente la derivada, en última instancia, de la ecuación de Nernst. Por lo tanto, si una mezcla de formas oxidadas y reducidas de un reactivo está presente en solución, la corriente corta bruscamente el eje de potencial en el potencial esperado.

Dentro de este campo, también se ha explorado la alta capacidad que tiene la FNR para llevar a cabo la regeneración del NADPH, debida al proceso de transferencia directa de electrones (DET). Esta gran capacidad se ha exportado fuera de la célula fotosintética en lo que se conoce en electroquímica como "la hoja electroquímica" (e-Leaf) (**Figura 8**). Estos enfoques bioelectrocatalíticos aprovechan la capacidad de DET de la FNR para unir esta flavoenzima a la superficie de un electrodo y así recibir directamente los electrones inyectados (61). De este modo, la FNR se ha empleado para llevar a cabo la conversión reversible del  $\text{NADP}^+$  en NADPH cuando se encuentra unida electrostáticamente a electrodos de óxido de indio y estaño (ITO) (62). Bajo este escenario, la enzima es capaz de realizar la regeneración de esta coenzima cuando se acopla con otras oxidorreductasas para llevar a cabo biotransformaciones dependientes de dicho cofactor (61,63).



**Figura 8.** Esquema comparativo entre la hoja biológica y el concepto de hoja electroquímica (e-Leaf) (62).

A pesar de los exitosos reportes de la biocatálisis redox mediada por la FNR confinada electrostáticamente en la superficie de un electrodo, todavía quedan varios problemas por resolver, ya que esta enzima se inactiva rápidamente debido a su baja estabilidad operacional. Con el objetivo de aumentar su estabilidad, la FNR se ha inmovilizado en resinas microporosas (64).

#### 1.4. Sistemas de expresión heteróloga de proteínas en bacterias y levaduras

La expresión de una proteína recombinante en un hospedador apropiado tiene como objetivo la producción de una proteína altamente soluble en el citoplasma con un plegamiento y actividad apropiados. El plegamiento de proteínas es un proceso biofísico en el que los polipéptidos asumen una estructura tridimensional (3D) específica que les otorga determinadas funciones biológicas (65).

Por lo general, la producción de proteína recombinante tiene como objetivo la síntesis de altas cantidades de proteína, la alta densidad de células huésped y, lo que es más importante, la alta calidad del producto (66). La producción de proteínas a bajo costo es un objetivo importante en el desarrollo de procesos farmacoterapéuticos y bioindustriales (67). Por lo tanto, solo los procesos a gran escala pueden hacer frente a la creciente demanda y esos procesos requieren enfoques rentables (68). Hasta ahora, se han producido proteínas terapéuticas recombinantes como la insulina, la hormona del crecimiento humano y el factor VIII antihemofílico utilizando células huésped procariontas (p. ej., *Escherichia coli*) y eucariotas (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, células de

insectos, mamíferos, humanos y plantas) (69). Las células *de E. coli* fueron el primer huésped (y el más simple) en producir proteínas terapéuticas recombinantes en la década de 1980.

Cuando se induce a una célula a sintetizar una proteína determinada, es probable que surjan varios problemas, como el plegamiento, la proteólisis o la agregación incorrectos. El hecho de que una proteína no se pliegue en la estructura 3D correcta generalmente da como resultado la producción de proteínas inactivas, pero también puede provocar funcionalidades modificadas y/o tóxicas. Estos problemas pueden evitarse mediante la optimización de la producción y el plegamiento de proteínas recombinantes. Por otro lado, la expresión de proteínas recombinantes y las modificaciones postraduccionales son relevantes para abordar las funciones biológicas de los genes y realizar estudios bioquímicos, enzimáticos y de estructura de proteínas en 3D (70).

Una de las FNRs más estudiadas es la FNR de la cianobacteria *Anabaena* sp. (AsFNR). Esta enzima se ha conseguido expresar heterológamente en *E. coli* produciendo una cantidad relativamente alta de proteínas, que han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas cinéticamente (71). Las células de *E. coli* fueron transformadas con plásmidos que portaban el gen que codifica para la forma nativa de la AsFNR y demostraron ser competentes en la producción de la holoenzima (enzima completa formada por una proteína y un cofactor) de la flavoproteína en una forma completamente activa (72). Además de la AsFNR, se ha conseguido expresar heterológamente una gran variedad de FNRs de distintos orígenes empleando casi exclusivamente a la bacteria *E. coli* como hospedero (**Tabla 2**). Sin embargo, únicamente se encuentra un reporte de la expresión heteróloga en la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) correspondiente a la FNR de *Pseudomonas aeruginosa* (PaFNR) (73).

Entre los sistemas de expresión eucarióticos, la levadura tiene muchas ventajas, como medios de cultivo de costo relativamente bajo, crecimiento celular rápido, ausencia de endotoxinas, secreción extracelular de las proteínas sintetizadas y una diversidad de mecanismos de cambios postraduccionales que incluyen, por ejemplo, plegamiento y glicosilación (74). Además, las levaduras tienen el potencial de producir proteínas

recombinantes industrialmente debido a sus poderosos promotores que controlan la expresión génica.

**Tabla 2.** Ferredoxina NADP-reductasas producidas heterológamente

Tipo	Origen	Hospedero	Abreviatura	Ref.
Bacteriano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. pastoris</i>	PaFNR	(73)
	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>E. coli</i>	PpFNR	(75)
	<i>Bacillus subtilis</i>		BsFNR	(76)
	<i>Synechococcus</i> sp.		SsFNR	(77)
	<i>Anabaena</i> sp.		AsFNR	(78)
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>		XaFNR	(79)
	<i>Synechocystis</i> sp.		SsFNR	(80)
	<i>Sulfurisphaera tokodaii</i>		StFNR	(81)
	<i>Rhodobacter capsulatus</i>		RcFNR	(82)
	<i>Leptospira interrogans</i>		LiFNR	(83)
	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>		HtFNR	(84)
	<i>Chlorobaculum tepidum</i>		CtFNR	(85)
	<i>Alcanivorax borkumensis</i>		AbFNR	(86)
Algas	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>E. coli</i> .	CrFNR	(87)
Plantas	<i>Zea mays</i>	<i>E. coli</i>	ZmFNR	(88)
	<i>Spinacea oleracea</i>		SoFNR	(89)
	<i>Pisum sativum</i>		PsFNR	(90)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>		AtFNR	(91)
Protozoarios	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>E. coli</i>	TgFNR	(92)
	<i>Plasmodium falciparum</i>		PfFNR	(93)

Uno de los pasos finales en la biosíntesis de proteínas es la modificación postraducciona de las proteínas. Durante este extenso proceso, las proteínas sufren una serie de cambios químicamente reversibles o irreversibles después de la traducción. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas juegan un papel importante en la producción de varias proteínas funcionales a partir de un solo gen y en la estructura, función y regulación de muchas proteínas (94). Hay varios tipos de modificaciones, que incluyen fosforilación, glicosilación, acetilación, ubiquitilación, sumoilación, metilación, palmitoilación, miristoilación, prenilación, hidroxilación, anclaje GPI, ADP-ribosilación, citrulinación, S-nitrosilación, oxidación y sulfatación. La glicosilación es una de las formas más comunes y complejas de modificación de proteínas en células eucariotas. La glicosilación desempeña un papel importante en la actividad biológica, el plegamiento, la estabilidad y la solubilidad de las proteínas (95). El papel biológico de la glicosilación de proteínas se puede dividir en tres categorías, relacionadas con la estabilización de proteínas, la

modulación de las propiedades de las glicoproteínas y la identificación de proteínas de unión a glucanos (96). Tanto la O- como la N-glicosilación han sido reportadas en levaduras (97). Entre las diversas cepas de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado tradicionalmente como huésped para la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, se ha demostrado que *P. pastoris* presenta un sistema de expresión más exitoso (98).

La N-glicosilación es una de las formas más comunes de modificación postraduccional de proteínas en *P. pastoris*; aproximadamente 70 a 90% de los residuos de asparagina (Asn, N) que forman sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) están N-glicosilados. Además, la N-glicosilación a menudo juega un papel crucial en la secreción, la estabilidad y la actividad de las proteínas heterólogas (99).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La producción rentable de productos bioquímicos y biocombustibles de origen sostenible es un objetivo fundamental de la biotecnología actual. Las rutas redox biosintéticas son fundamentales en la síntesis química para establecer una bioeconomía circular. La regeneración sostenible y el reciclaje de cofactores redox es un requisito previo para la explotación industrial viable de muchas rutas biosintéticas redox descritas. Estos límites obstaculizan el empleo de biotransformaciones dependientes de cofactor en procesos de producción a gran escala.

En la naturaleza, la ferredoxina NADP-reductasa (FNR) es la principal flavoenzima capaz de regenerar NADPH recibiendo los electrones proporcionados por el fotosistema I y catalizando la reducción de dos electrones de  $\text{NADP}^+$  a NADPH. Entre las FNR reportadas, la de la cianobacteria *Anabaena* sp. (AsFNR) se ha expresado de forma recombinante en *E. coli* con rendimientos proteicos relativamente altos aunque se ha visto que esta enzima se inactiva rápidamente debido a su baja estabilidad operacional que dificulta su aplicación como sistema robusto de regeneración de cofactores en biotransformaciones a gran escala.

Entre las estrategias centradas en aumentar la estabilidad de esta enzima, el sistema de expresión de levadura *P. pastoris* es una de las herramientas más populares y estándar para la producción de proteínas recombinantes en biología molecular.

Por tanto, a la vista de los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la expresión heteróloga de la AsFNR (rAsFNR) en el sistema de expresión *Pichia pastoris* aumentará la estabilidad de la enzima. De este modo, el **objetivo principal** de este trabajo fue la construcción de un vector de expresión adecuado para *Pichia pastoris*, portador del gen que codifica para la AsFNR, para una vez expresada y purificada proceder a su caracterización térmica y cinética. Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Construcción del plásmido pGAPZ $\alpha$ A\_AsFNR a partir del plásmido pET28a\_AsFNR.
2. Expresión heteróloga de la AsFNR en los sistemas de expresión de *E. coli* y *P. pastoris*.
3. Caracterización cinética de la rAsFNR producida en ambos sistemas de expresión.

4. Caracterización de la estabilidad térmica de la rAsFNR producida en ambos sistemas de expresión.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

El gen pET28a que contiene a la ferredoxina NADP-reductasa de *Anabaena* sp. (AsFNR) con cola de histidinas y sitio de corte con trombina ambos en amino terminal (pET28a\_AsFNR) se sintetizó en GenScript (Estados Unidos). Las enzimas de restricción EcoRI, KpnI, BspHI y el colorante de tinción púrpura de ADN para cargar geles, fueron comprados en Werfen (Reino Unido). El medio de cultivo Luria-Bertani de autoinducción NZY (NZY), ADN polimerasa de alta fidelidad (NZYProof, MB14601), T4 ADN ligasa (MB00703), dNTPs (MB08603), DpnI (MB07801), marcador de pesos moleculares de ADN (NZYDNA ladder VII, MB17501) y el kit de purificación de ADN (NZYGelpure, MB01102) fueron adquiridos en Nzytech (Portugal). Las microperlas de agarosa entrecruzadas grado 6 (AG) (tamaño de partícula 50-150  $\mu\text{m}$  y diámetro de poro 300 nm) se adquirieron en Agarose Bead Technology (Madrid, Spain). Las resinas de agarosa activadas con cobalto (AG-Co<sup>2+</sup>) o níquel (AG-Ni<sup>2+</sup>) se prepararon siguiendo la metodología reportada (100). Los cofactores de nicotinamida NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> y NADPH se compraron en Gerbu Biotechnik (Wieblingen, Alemania). Los reactivos como 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), EDTA, imidazol, IPTG, cloruro de cobalto, tris base, sulfato de kanamicina y el colorante de proteínas SPYRO orange se adquirieron en Sigma-Aldrich-Merk (St. Louis, IL). La solución de acrilamida bis acrilamida, mercaptoetanol, tampón de ruptura Laemli-SDS, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate y el marcador de pesos moleculares fueron comprados en BioRAD. La zeocina, la agarosa y el medio YPD fueron comprados en Thermofisher. El plásmido pGAPZ $\alpha$ A fue donado por el profesor Juan Carlos Mateos Díaz de la Unidad de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), México. El kit de purificación de ADN plasmídico (miniprep) de marca Metabion comprado en Teknovas (España).

#### 3.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

La ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa de *Anabaena* sp. PCC 7119 (AsFNR) se sobreexpresó en células de *Escherichia coli* BL21.

##### 3.2.1. Transformación en *E. coli*

La transformación de plásmidos circulares o productos de PCR en *E. coli* se hizo en cepas BL21 o DH5 $\alpha$  dependiendo de si eran para expresión de la enzima o para la producción



de plásmido, respectivamente. Para ello, 1 o 5  $\mu\text{L}$  del plásmido circular o producto de PCR, respectivamente, se mezclaron con una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de células competentes de *E. coli* (BL21 o DH5 $\alpha$ , según el caso) y se incubaron 20 min a 4 °C. Después se les dio un choque térmico a 42 °C durante 1 min en un termobloque e inmediatamente después se adicionaron 750  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo LB estéril sin antibiótico. Para la recuperación de las células, estas fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C con agitación a 250 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron a 2500 rpm y se retiraron 650  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en los 150  $\mu\text{L}$  restantes de LB de los cuales 50  $\mu\text{L}$  se sembraron en placas Petri con LB-agar y el antibiótico correspondiente. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37 °C.

### **3.2.2. Purificación de plásmidos**

Para la purificación de los plásmidos, se inocularon 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente con una azada de una colonia transformada. Dicho cultivo se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se colectó el pellet celular por centrifugación a 4000 rpm por 2 min. Se retiró el sobrenadante y se siguió la metodología descrita por el fabricante del kit comercial de minipreps (Metabion). Una vez purificado el ADN se cuantificó su concentración midiendo la absorbancia de una muestra de 2  $\mu\text{L}$  a 260 y 280 nm en la placa Take3 de un espectrofotómetro Microplate Reader Epoch 2, BioTek con el software Gen5.

### **3.2.3. Expresión en *E. coli***

Un total de 1 mL de un cultivo de una noche de *E. coli* transformado con el plásmido pET28a-AsFNR, se inoculó en 50 mL de medio NZY que contenía kanamicina (concentración final de 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). El cultivo se incubó a 37 °C a 250 rpm durante 16 h y luego se recolectó el pellet celular por centrifugación a 1290 g durante 30 min a 4 °C.

### **3.2.4. Purificación de enzimas producidas en *E. coli***

Las enzimas expresadas de forma recombinante en *E. coli* se purificaron por cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC) de la siguiente manera: el sedimento del pellet celular resultante se resuspendió en una décima parte de su volumen original con solución tampón 25 mM Tris-HCl pH 8. Las células se rompieron por sonicación a una amplitud del 30% con ciclos alternos de 5 s encendido/5 s apagado durante 20 min a 4 °C (Sonopuls HD 4100, Bandelin). El lisado celular se centrifugó a 10528 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía la enzima se recogió y se pasó a través de una resina de agarosa activada con cobalto (AG-Co<sup>2+</sup>) equilibrada con

tampón de unión (Tris-HCl 25 mM pH 8). La columna se incubó durante 1 h a 4 °C para promover la unión de la enzima con cola de histidinas a la columna AG-Co<sup>2+</sup>. Posteriormente, la columna se lavó tres veces con tampón de unión antes de la elución de la proteína. Después del lavado la proteína se eluyó añadiendo 3 mL de tampón de elución (Tris-HCl 25 mM pH 8 suplementado con imidazol 300 mM) e incubando durante 1 h a 4 °C. La proteína eluída se filtró en gel usando columnas PD-10 (GE Healthcare) para eliminar el imidazol y cambiar el tampón enzimático a Tris-HCl 10 mM pH 8. Se realizaron ensayos SDS-PAGE y Bradford después de cada lote de producción para determinar la pureza, la concentración y la actividad específica de las enzimas.

### **3.2.5. Cuantificación colorimétrica de proteínas**

La concentración de proteína total se determinó por el método colorimétrico de Bradford (101). Este método se basa en el cambio de absorbancia de 465 nm a 595 nm cuando interaccionan el colorante hidrofóbico azul de Coomassie con el interior hidrofóbico de las proteínas. Para su realización se preparó una curva de calibrado empleando la albúmina de suero bovino (BSA) como patrón (0.06 a 1 mg·mL<sup>-1</sup>) y el reactivo Bradford comercial (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate). Para el ensayo, en una microplaca de 96 pocillos se colocaron 200 µL del reactivo de Bradford diluido (1:4 en agua) a los que se adicionaron 5 µL de muestra diluida adecuadamente (entre 0.4 y 1 mg·mL<sup>-1</sup>). Se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader Epoch 2, BioTek con el software Gen5.

## **3.3. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FNR**

### **3.3.1. Mediciones de actividad enzimática**

La actividad de la FNR se midió espectrofotométricamente en microplacas transparentes de 96 pocillos, empleando un Microplate Reader Epoch 2, BioTek con el software Gen5. Se utilizó un protocolo modificado para detectar la actividad diaforasa de la FNR (102). El ensayo sigue el decaimiento de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH y el decaimiento de la absorbancia a 600 nm debida a la reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). La mezcla de reacción contiene 0.15 mM DCPIP, 0.2 mM NADPH y 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA en 50 mM Tris-HCl pH 8.

Para el ensayo, en un pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 200 µL de la mezcla de reacción y para iniciar la reacción se añadieron 5 µL de solución o suspensión

enzimática (adecuadamente diluida) y se incubaron con agitación orbital constante a 30 °C. Se registró el decaimiento de la absorbancia a 600 nm debido a la reducción del DCPIP durante 5 minutos con lecturas cada 10 segundos. Una unidad de actividad diaforasa se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir 1  $\mu\text{mol}$  de DCPIP por minuto en las condiciones del ensayo.

Para calcular la actividad enzimática se empleó la siguiente fórmula (Eq. 1):

$$\text{Eq. 1} \quad \text{Actividad (U/mg)} = [(\Delta\text{Abs} \times V_{\text{tot}}) / (\epsilon_{\text{DCPIP}} \times (205/360) \times V_{\text{enz}})] / \text{mg}_{\text{enz}}$$

Donde,  $\Delta\text{Abs}$  es el delta de absorbancia a 600 nm en  $\text{OD} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $V_{\text{tot}}$  es el volumen total del ensayo en mL,  $\epsilon_{\text{DCPIP}}$  es el coeficiente de extinción molar del DCPIP a 600 nm ( $21.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (103)), 205/360 es la corrección de la longitud del paso óptico en el micropocillo en donde 360  $\mu\text{L}$  equivalen a una longitud de paso óptico de 1 cm,  $V_{\text{enz}}$  es el volumen de enzima en mL y  $\text{mg}_{\text{enz}}$  son los miligramos de enzima usados en el ensayo.

### 3.3.2. Cinéticas de Michaelis-Menten

Los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_{\text{max}}$ ) se determinaron a pH 7 y 25 °C para la FNR soluble siguiendo el método espectrofotométrico descrito anteriormente y utilizando concentraciones variables de NADPH (5000-50  $\mu\text{M}$ ). Se hicieron curvas de actividad específica contra concentración de NADPH para ajustar los resultados a la ecuación de Michaelis-Menten con el software Origin 2020b.

## 3.4. ESTABILIDAD DE LA FNR

### 3.4.1. Determinación de la temperatura de melting (Thermal shift assay)

Para este ensayo se utilizó el reactivo Spyro Orange 5000X en DMSO que tiene una  $\lambda_{\text{ex}}$  de 450 nm y una  $\lambda_{\text{em}}$  de 550 nm. Para el ensayo, en un micro tubo de 100  $\mu\text{L}$  de una placa de 96 microtubos se colocaron 40  $\mu\text{L}$  de solución de enzima en buffer Tris 50 mM pH 8 más 10  $\mu\text{L}$  de Spyro Orange 20X.

La placa se incubó en un termociclador para PCR en tiempo real (QuantaStudio 5, Thermofisher) empleando la siguiente rampa de temperatura: 2 min a 25 °C, rampa de 1 °C por minuto hasta llegar a 95 °C y ahí mantener 2 min. Para medir la fluorescencia, se excitó a 450 nm y se registró la fluorescencia a 550 nm. Para calcular la temperatura de melting ( $T_m$ ) los datos se ajustaron a la ecuación de Boltzmann (104).

### **3.4.2. Estabilidad térmica**

La estabilidad térmica de la enzima se llevó a cabo incubando la solución de rAsFNR producida en *P. pastoris* o en *E. coli* a diferentes temperaturas y midiendo su actividad residual después de la incubación. Para ello, la solución o suspensión enzimática (adecuadamente diluida) en buffer Tris 100 mM pH 8 se incubó con agitación orbital constante en un rango de temperaturas de 40 a 80 °C durante 30, 60 y 120 min. Para determinar la actividad una vez sacada la muestra de la incubación la muestra se dejó enfriar 10 minutos en hielo para después proceder con la medición de actividad a 30 °C siguiendo el método espectrofotométrico descrito anteriormente en el apartado 3.3.1.

### **3.5. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÉTICAS**

Las construcciones genéticas para la expresión heteróloga de AsFNR en *P. pastoris* partieron del gen pET28a\_AsFNR el cual contiene el gen de la enzima de interés que fue extraído y posteriormente insertado en el plásmido pGAPZαA empleando la metodología detallada a continuación.

#### **3.5.1. Extracción del gen de interés del plásmido comercial agregando los sitios de restricción deseados mediante PCR.**

Mediante PCR se llevó a cabo la amplificación de la secuencia del gen de interés (inserto de 964 pb) mediante la inserción de los sitios de restricción EcoRI (en amino terminal) y KpnI (en carboxilo terminal) en el plásmido pET28a\_AsFNR (GenScript) empleando 10 ng del plásmido (5.4 kb) y los cebadores correspondientes que añaden dichos sitios de restricción a la secuencia de ADN. Una vez comprobada la amplificación del gen de interés mediante un gel de electroforesis, se realizó la purificación de ADN utilizando el kit de purificación comercial siguiendo el protocolo de purificación de reacción de PCR recomendado por el fabricante (Nzytech). Posterior a la purificación se cuantificó la concentración de ADN obtenida mediante la medición de su absorbancia a 260 y 280 nm

#### **3.5.2. Digestión del gen AsFNR y el plásmido pGAPZαA con las enzimas de restricción seleccionadas.**

Una vez amplificado el gen de la AsFNR con los sitios de restricción EcoRI y KpnI, se llevó a cabo su digestión. Para ello se realizó una reacción de doble digestión empleando entre 1 y 2 µg de ADN por cada 50 µL de reacción de digestión y 10 U de cada enzima de restricción para digerir 1 µg de ADN durante 3 horas a 37 °C. Se realizó un control de digestión incubando 100 ng de plásmido pGAPZαA sin enzimas de restricción en 20 µL de medio de reacción para facilitar la identificación de la banda correspondiente al

plásmido con doble corte. El plásmido digerido se purificó a partir de un gel de electroforesis, en el que la banda correspondiente se extrajo del gel de agarosa con un bisturí y se purificó de acuerdo con las indicaciones del kit de purificación comercial (Nzytech). El inserto digerido se purificó utilizando el protocolo kit de purificación comercial (Nzytech).

### **3.5.3. Reacción de ligación entre el plásmido e inserto digeridos.**

Para la reacción de ligación se utilizaron los productos de la reacción de digestión puros. La relación molar entre el vector y el inserto en la reacción de ligación fue de 1:3. Para ello, 30 ng de inserto AsFNR y 30 ng de vector pGAPZ $\alpha$ A se mezclaron en una reacción de 20  $\mu$ L utilizando las condiciones indicadas por el proveedor de la ligasa a utilizar (Werfen) (incubación 17 horas a temperatura ambiente). Se agregó un control de ligación que consistió en lanzar una reacción que contiene el vector sin inserto. El producto de la ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (2.5 a 10  $\mu$ L) para producir suficiente cantidad de ADN para su posterior transformación en *P. pastoris*. Dado que el vector pGAPZ $\alpha$ A tiene resistencia a zeocina, las células transformadas se sembraron en cajas Petri con dicha resistencia. La zeocina es sensible a la luz por lo cual es importante siempre proteger el reactivo y las cajas que lo contienen con papel aluminio. La zeocina se agregó al medio (50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) a una temperatura máxima de 55 °C. Las cajas se incubaron una noche a 37 °C protegidas de la luz. Se realizó un control de transformación para validar la efectividad del antibiótico. Se seleccionaron algunas de las colonias crecidas para producir un preinóculo de 3 mL y hacer una purificación del plásmido de la construcción conseguida empleando el kit para miniprep disponible (Metabion). Se verificó la construcción genética mediante doble digestión con EcoRI y KpnI liberando el inserto de interés (964 pb) y el plásmido pGAPZ $\alpha$ A (3147 pb) cuyos pesos moleculares se contrastaron con un gel de electroforesis. Así mismo, la construcción conseguida se envió al servicio de secuenciación Sanger de la empresa Stabvida. Una vez conseguidas las construcciones del gen de interés en el vector pGAPz $\alpha$ A, la construcción genética se resguardó a -20 °C para ser utilizado posteriormente.

### **3.5.4. Linealización y purificación de la construcción genética**

*P. pastoris* integra el ADN externo de manera lineal combinándolo con su genoma por lo cual es necesario realizar un paso de linealización del plásmido antes de transformar. La linealización se realizó mediante una digestión con la enzima BspHI.

Se produjeron 15  $\mu\text{g}$  de plásmido (pGAPz $\alpha$ A con el inserto de interés) mediante minipreps tras lo cual se realizó una reacción de digestión con BspHI, utilizando 5 U por  $\mu\text{g}$  de ADN. Para 15  $\mu\text{g}$  de plásmido se utilizó un volumen de reacción de 500  $\mu\text{L}$  y se digirió durante 2 horas a 37 °C. Una vez comprobada la linealidad de la construcción genética de interés mediante un gel de electroforesis se purificó el ADN mediante precipitación agregando una décima parte del volumen de ADN lineal de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a 4 °C y dos veces el volumen de etanol a 4 °C (10:1:20, ADN lineal/acetato sodio/etanol.). Se agitó en vórtex y se dejó a -30 °C durante una noche. A continuación, se centrifugó a 4 °C a la máxima velocidad durante 15 min retirando el sobrenadante y agregando etanol al 70 % a 4 °C. Se centrifugó de nuevo a máxima velocidad durante 15 min y se retiró el sobrenadante para después resuspender en 15  $\mu\text{L}$  de agua extrapura. Posterior a la purificación se cuantificó la concentración de ADN obtenida mediante la medición de su absorbancia a 260 y 280 nm.

#### **3.5.4. Transformación en *Pichia pastoris***

Las células competentes de *P. pastoris* se electroporaron con al menos 5  $\mu\text{g}$  de ADN linealizado en hielo mediante pulsos con el programa Pic (1500 mV). Después del pulso se agregó 1 mL de medio YPD:Sorbitol 1 M (1:1) y se transfirieron las células con medio a tubos de 2 mL para incubar por 4 h a 30 °C y 200 rpm. Después de la incubación, se sembraron en placas de YPD con zeocina (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se incubaron a 30 °C con protección de la luz durante 72 horas.

#### **3.5.5. Expresión en *P. pastoris***

Tras la obtención de colonias resistentes a zeocina se realizó un cultivo pequeño (10 ml) para evaluar la producción de proteína. Para analizar la producción de proteína se centrifugó el cultivo para retirar la biomasa a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante para cargar un gel de proteínas. La cepa que más proteína produjo se cultivó de la cepa durante 16 horas en 10 mL de medio YPD con 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de zeocina que se alicuotaron con 20 % de glicerol para resguardar a -80 °C.

Después, a partir de estas células preservadas en glicerol se realizó un cultivo en medio YPD sólido con 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de zeocina que se incubó por 72 h a 30 °C. Del cultivo en medio sólido se seleccionó una colonia aislada con la cual se realizaron cultivos en tubos de agar inclinado con YPD y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de zeocina. Los tubos se incubaron durante 72 h a 30 °C.

Una vez transcurrido el tiempo se resuspendió la totalidad de la biomasa generada en el tubo de agar inclinado en 50 mL de medio YPD líquido con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de zeocina y se incubó durante una noche a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en un matraz de 250 mL de volumen con una agitación de 200 rpm. La producción de proteína se monitoreó cada 24 horas midiendo la actividad diaforasa en el cultivo líquido una vez removidas las células por centrifugación a 4000 rpm.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

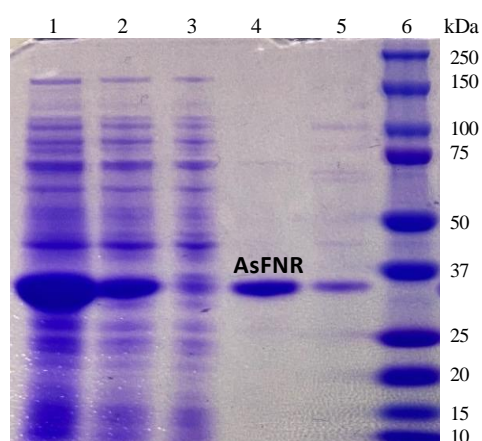
### 4.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS EN *E. coli*

El vector de expresión en *E. coli* utilizado en este trabajo (pET28a) presenta un promotor híbrido, mezcla del operador lac a donde se une el represor lacI y el promotor de la T7 RNA polimerasa que es potente y autoinducible, es decir, que se activa cuando se encuentra presente la T7 RNA polimerasa. En condiciones normales, lacI se expresa y se une al operador en ambos promotores (plásmido y genoma) por lo que no hay expresión de la T7 RNA polimerasa ni del gen clonado. La adición de un inductor como el isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) retira el lacI en ambos promotores de manera que en el genoma el promotor deja de reprimirse y se expresa T7 RNA polimerasa y en el plásmido, la T7 RNA polimerasa induce la expresión del promotor de T7 que ya no estará reprimido por lacI. Para expresar la AsFNR empleamos el medio LB de autoinducción NZY que es un medio para el cultivo de *E. coli* a altas densidades celulares mientras se obtienen altos niveles de expresión de proteínas recombinantes con sistemas de expresión bacterianos inducibles con IPTG. El método se basa en la presencia de componentes del medio que se metabolizan de manera diferencial para promover el crecimiento del cultivo a altas densidades celulares y, posteriormente, inducir la expresión de proteínas a partir de promotores basados en lac. Este medio contiene una mezcla de fuentes de carbono y energía, donde la glucosa es la fuente principal de *E. coli* y es utilizada por ésta durante las primeras etapas del crecimiento mientras que la lactosa y el glicerol sirven como fuentes de carbono y energía durante las últimas etapas de crecimiento y expresión proteínas recombinantes.

Una vez producida la enzima recombinante, llevamos a cabo su purificación mediante cromatografía de afinidad con metales (IMAC, del inglés “immobilized-metal affinity chromatography”). Esta es una técnica común utilizada para purificar proteínas recombinantes fusionadas con una etiqueta de afinidad peptídica corta, en este caso una cola de 6 histidinas (6xHis) fusionadas en el amino terminal de la proteína. Este tipo de cromatografía IMAC se basa en la interacción entre la etiqueta de afinidad (tag) con un ion de metal de transición ( $\text{Co}^{2+}$  en nuestro caso) quelado en el soporte en fase sólida de cobalto agarosa (AG- $\text{Co}^{2+}$ ). La adsorción de proteínas etiquetadas con IMAC se realiza a un pH ligeramente básico para garantizar que los grupos histidina imidazol no se protonen. Las condiciones de elución fueron suaves y se basaron en el intercambio de ligandos con imidazol.



En todas las etapas de purificación se colectaron muestras para posterior comprobación en gel SDS-PAGE de la presencia o ausencia de la proteína de interés en cada etapa (**Figura 9**). La ferredoxina NADP-reductasa de *Anabaena* sp. producida recombinantemente (rAsFNR) en *E. coli* presenta un alto nivel de sobreexpresión que se evidencia por la gran intensidad y tamaño de la banda de la calle 1 alrededor de los 37 kDa del gel de electroforesis (**Figura 9**). Sin embargo, en la etapa de lisis celular, se pierde una gran cantidad de proteína que se encuentra en forma de cuerpos de inclusión ya que se ve una disminución de la misma banda en la calle 2. A pesar de ello, la enzima consigue un alto grado de purificación después del paso por IMAC en donde todas las proteínas provenientes de *E. coli* se eliminan en el flow through (proteínas no retenidas en la columna AG-Co<sup>2+</sup>). Finalmente, en el eluato (donde se encuentra la enzima pura) se obtuvieron 4.28 mg de AsFNR a partir de 50 mL de medio de cultivo, con una actividad específica de  $12.5 \pm 0.08 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  (**Tabla 3**).

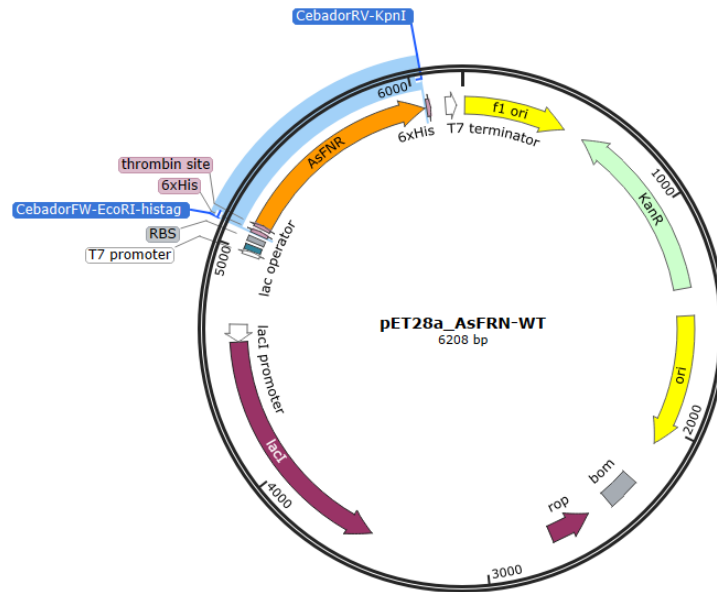


**Figura 9.** Visualización por SDS-PAGE de cada una de las etapas de purificación IMAC en la expresión de la proteína rAsFNR en *E. coli* inducida tras 17 horas a 37 °C en medio NZY Autoinducción. Calles: 1: Fracción total de proteína obtenida tras sonicación; 2: Fracción soluble de proteína; 3: Flow through; 4: Eluato; 5: Resina AG-Co<sup>2+</sup>; 6: Marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standard.

#### 4.2. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

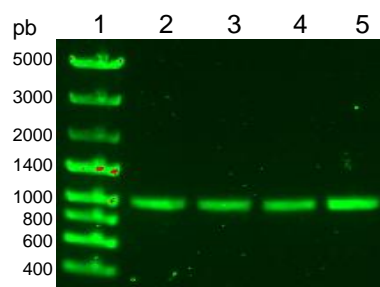
Con el objetivo de aumentar la estabilidad de la AsFNR, llevamos a cabo su expresión heteróloga en el sistema de expresión de *P. pastoris*. Para expresar la AsFNR en esta levadura se aisló el gen de la AsFNR (con cola de histidinas (6xHis) y sitio de unión a trombina (“thrombin site”) en amino terminal) a partir del plásmido pET28a\_AsFNR (regulador por el operador lac y el promotor T7) que contiene el gen de resistencia a

kanamicina como marcador de selección (**Figura 10**). Para ello, mediante PCR se amplificó el gen de interés (AsFNR, inserto) localizado en el plásmido pET28a\_AsFNR mediante la inserción de los sitios de restricción EcoRI y KpnI insertados mediante PCR.



**Figura 10.** Mapa del plásmido pET28a\_AsFNR que contiene el gen AsFNR secuencia nativa (WT) (flecha naranja) con 6xHis y Thrombin site (flechas rosas) en amino terminal, flanqueado por los sitios de restricción EcoRI y KpnI (recuadro azul).

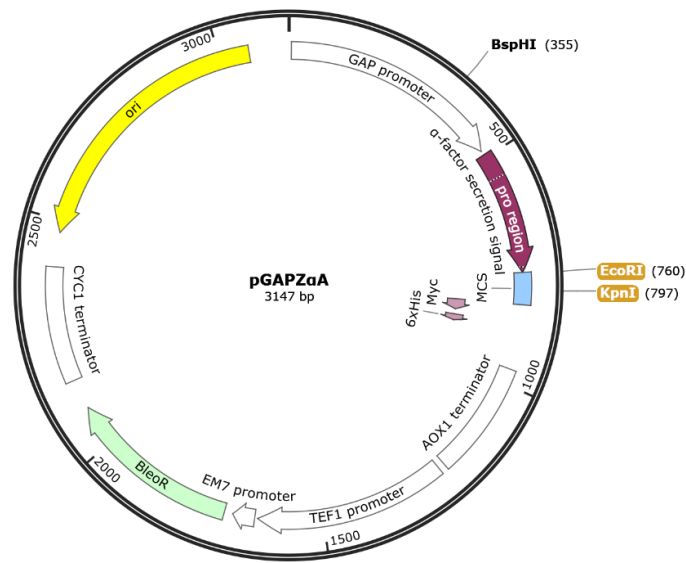
Los productos de la PCR fueron visualizados y confirmados en un gel de agarosa donde aparece una banda en torno a las 1000 pb correspondiente con el peso molecular del inserto amplificado (**Figura 11**).



**Figura 11.** Visualización de productos de PCR en gel de agarosa. Calles: 1: NZYDNA Ladder VIII; 2 a 5: AsFNR-WT

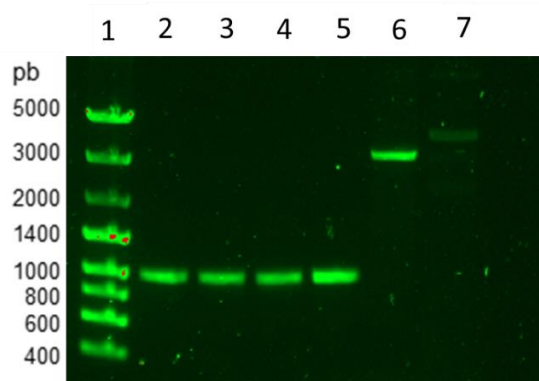
Por otro lado, el plásmido pGAPZ $\alpha$  contiene los elementos necesarios para la expresión heteróloga de proteínas en *P. pastoris* (bajo los promotores del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) y el factor de secreción  $\alpha$ ) así como los sitios de restricción EcoRI y KpnI que nos sirvieron para introducir los distintos genes a expresar

en el sitio de clonaje múltiple (MCS). Presenta, además, el gen de resistencia a zeocina como marcador de selección (**Figura 12**).



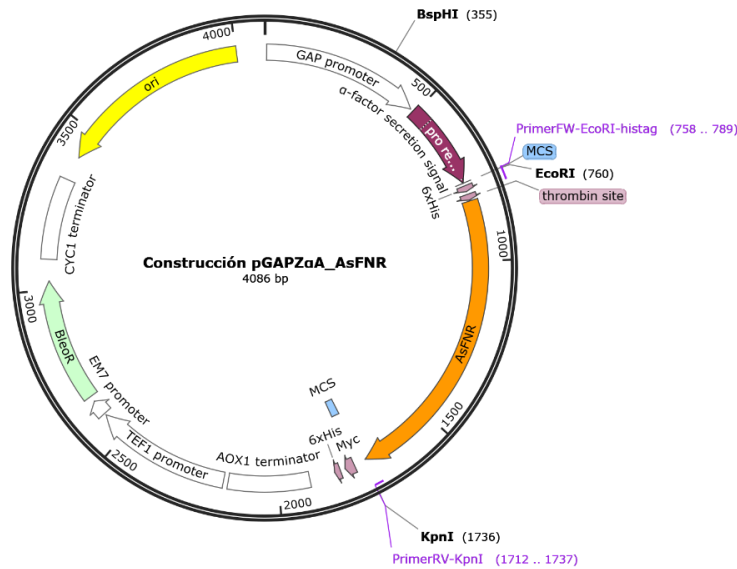
**Figura 12.** Mapa del plásmido pGAPZ $\alpha$ A que contiene el MCS delimitado por los sitios de restricción EcoRI y KpNI señalados en color naranja.

Una vez aislado el gen de interés se procedió a realizar la doble digestión de ambos, el plásmido pGAPZ $\alpha$ A y el inserto con las enzimas EcoRI y KpnI. La comprobación se hizo nuevamente en un gel de agarosa donde se observan una banda en torno a 3000 pb que corresponde al plásmido pGAPZ $\alpha$ A digerido y para el control tres bandas que corresponden con las 3 isoformas características del ADN circular (mellado, circular y lineal), así como las bandas de los insertos digeridos de peso molecular alrededor de las 1000 pb (**Figura 13**).



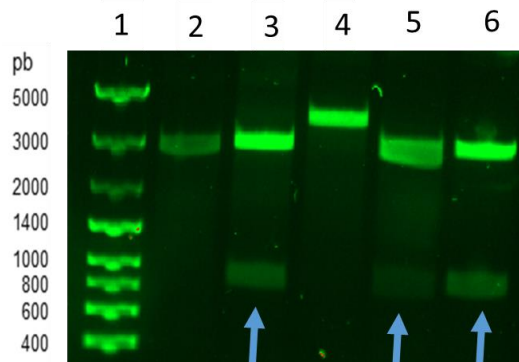
**Figura 13.** Visualización de los productos de doble digestión digeridos con EcoRI y KpnI en gel de agarosa. Calle 1: NZYDNA Ladder VIIIr; Calle 2, 3, 4,5: ASFNR digerida; Calle 6: pGAPZ $\alpha$ A digerido; Calle 7: pGAPZ $\alpha$ A sin digerir (control).

Tras la doble digestión, se llevó a cabo la reacción de ligación catalizada por la ligasa T4 para la obtención de la construcción genética compuesta por el plásmido pGAPZ $\alpha$ A y el gen de AsFNR (**Figura 14**).



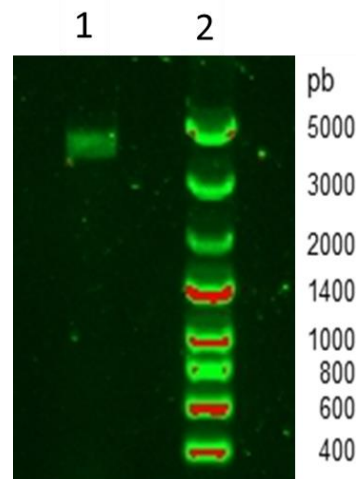
**Figura 14.** Mapa de la construcción genética del plásmido pGAPZ $\alpha$ A y el gen AsFNR (flecha naranja) con cola de histidinas y sitio de trombina en amino terminal (flechas rosas).

La construcción genética se verificó mediante doble digestión con EcoRI y KpnI en gel de agarosa donde se aprecian 2 bandas (inserto de 1000 pb y plásmido vacío de 3000 pb) (**Figura 15**) Para confirmar la ausencia de mutaciones no deseadas, el plásmido construido se envió a secuenciar.



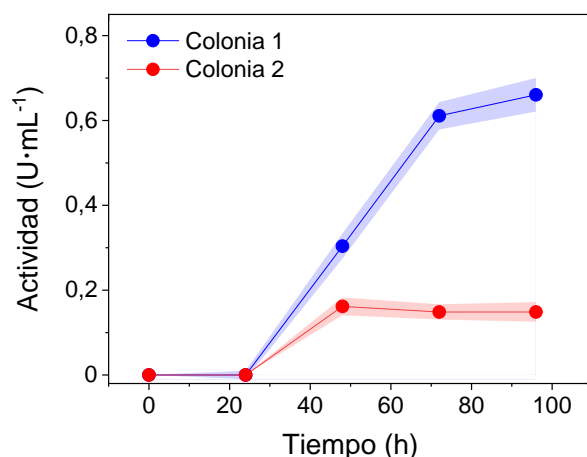
**Figura 15.** Visualización de los productos de doble digestión de las construcciones genéticas en gel de agarosa. Calles 1: NZYDNA Ladder VIII; 3,5 y 6: Construcción genética (pGAPZ $\alpha$ A\_AsFNR) digerida con EcoRI y KpnI. Las flechas azules se refieren a la liberación del inserto de interés que confirma la construcción genética.

La confirmación de las construcciones genéticas nos permitió seguir con la expresión heteróloga de la enzima en *P. pastoris* para lo cual se llevó a cabo su linearización mediante digestión con la enzima de restricción BspHI y posterior comprobación en gel de agarosa. En este caso, la linearización se dio por correcta con la aparición de una banda a 4086 bp (**Figura 16**).



**Figura 16.** Visualización del producto de linearización con BspHI. Calle 1: AsFNR WT linearizada; Calle 2: NZYDNA Ladder VIII.

Con la construcción genética lineal se llevó a cabo la transformación en células competentes de *P. pastoris* SMD (cepa deficiente en proteasas). Una vez transformadas se seleccionaron las colonias con mayor producción de proteína extracelular mediante pequeños cultivos (3 mL) de 72 h y su correspondiente análisis de proteína presente en el sobrenadante del cultivo. Las dos colonias con mayor producción de proteína se seleccionaron para llevar a cabo la producción de AsFNR en *P. pastoris* en un cultivo de 50 mL el cual alcanzó la mayor cantidad de actividad ( $0.66 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a las 96 horas con la colonia 1 (**Figura 17**).



**Figura 17.** Expresión de rAsFNR en *P. pastoris*. Actividad diaforasa conseguida durante el cultivo de dos colonias seleccionadas. La desviación estándar se presenta en el área sombreada.

Una vez alcanzada la máxima actividad diaforasa en el cultivo, se purificó la rAsFNR mediante cromatografía IMAC ya que la enzima cuenta con una cola de histidinas en amino terminal y se midió su actividad específica (**Tabla 3**). Desafortunadamente, a diferencia de la rAsFNR expresada en *E. coli*, la misma enzima expresada en *P. pastoris* presenta un muy bajo rendimiento de purificación por cromatografía IMAC con cobalto, ya que la enzima se une fuertemente a la resina AG-Co<sup>2+</sup>, por lo que únicamente se consigue eluir una muy baja cantidad de enzima incluso empleando imidazol 1 M. Por este motivo, la cantidad de proteína de rAsFNR en el medio de cultivo se determinó por análisis de imagen de un gel SDS-PAGE con los extractos crudos y una curva de calibración de BSA (**Figura 18**).

**Tabla 3.** Expresión heteróloga de AsFNR y sus variantes en diferentes sistemas de expresión.

Hospedero	Variante	Productividad (mg·mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	WT	0.086	12.5 ± 0.8
<i>P. pastoris</i>	WT	0.068	9.7 ± 1.6

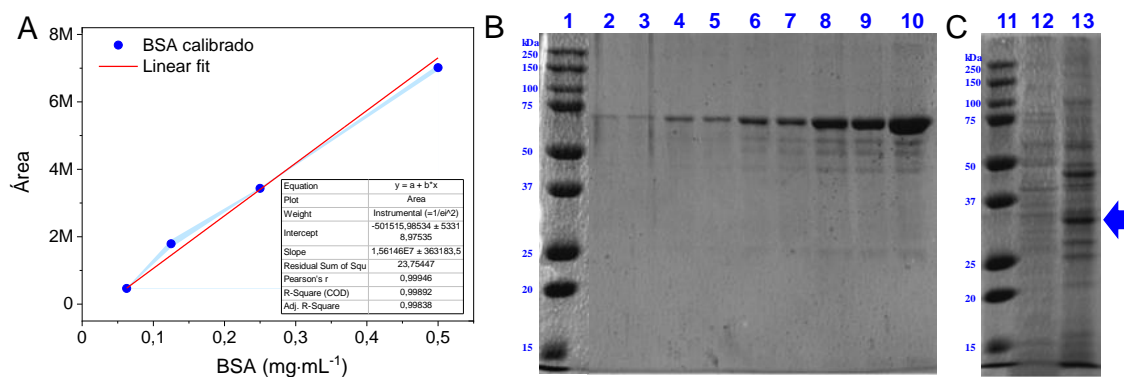
<sup>a</sup> Productividad = mg de AsFNR por mL de medio de cultivo. <sup>b</sup> Actividad diaforasa medida espectrofotométricamente con 0.15 mM DCPIP, 0.25 mM NADPH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 a 30 °C.

A pesar de que típicamente el sistema de expresión en *P. pastoris* suele producir mayor cantidad de proteína que el de *E. coli*, en este caso cabe destacar que las condiciones de cultivo de *P. pastoris* aún no están optimizadas, por lo que en estas condiciones se consiguió 1.26 menor productividad en el sistema de la levadura que en el de la bacteria.

Sin embargo, los rendimientos de obtención de enzima podrían mejorarse optimizando parámetros como la temperatura, tasa de crecimiento o tiempo de inducción que suelen mantenerse constantes entre experimentos para permitir la comparabilidad de los resultados.

En otros trabajos se ha evidenciado (105) que *P. pastoris* es apropiado para la expresión de múltiples proteínas, pues combina altos rendimientos de obtención de productos proteicos con la capacidad de los cultivos de alcanzar grandes densidades celulares. Asimismo, el sistema de expresión en *P. pastoris* reportado para la celobiosa deshidrogenasa (CDH) de *Phanerochaete chrysosporium* (106) permitió conseguir una producción máxima de  $33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de esta enzima tras 11 días de cultivo suplementado con suero bovino fetal. Por otro lado, en otro estudio se vio que la producción máxima de enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 (EntP) por *P. pastoris* X-33t 1 cultivada en BMMY ( $28.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue 3.7 veces superior y su actividad antimicrobiana 16 veces superior a la producción y actividad de EntP por *E. faecium* P13 (107).

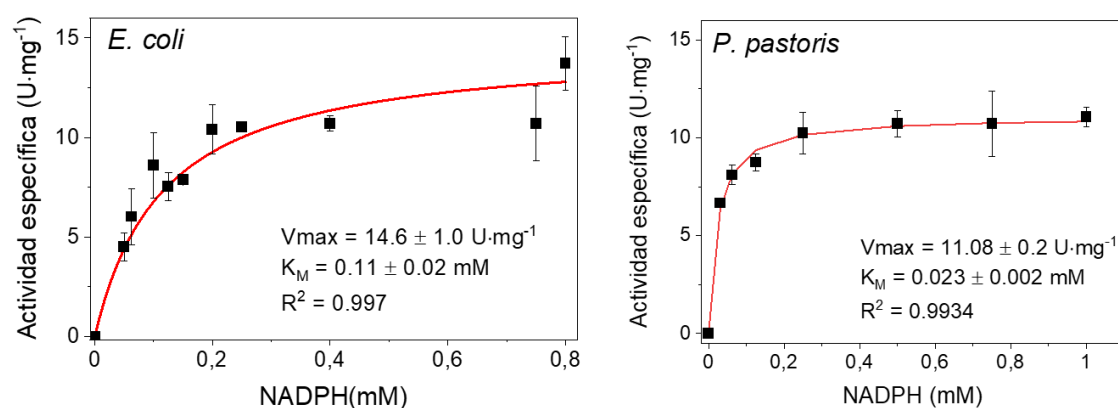
A diferencia de nuestros resultados, otros trabajos también muestran el efecto negativo que produce la deglicosilación de enzimas glicosiladas naturalmente por su organismo de origen. Por ejemplo, la lacasa Lcc9 de *Coprinopsis cinérea* mostró 2.63 veces menor actividad cuando la enzima fue deglicosilada. (108).



**Figura 18.** Análisis de imagen del gel SDS-PAGE. **A)** Curva de calibrado de BSA extraída a partir del gel mostrado en Fig. 18B. **B)** Curva de calibrado de BSA en SDS-PAGE gel, calle 1: marcador de pesos moleculares, calles 2 y 3: BSA  $0.063 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , calles 4 y 5: BSA  $0.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , calles 6 y 7: BSA  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , calles 8 y 9: BSA  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , calle 10: BSA  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . **C)** SDS-PAGE del cultivo de *P. pastoris*, calle 11: Marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standard, calle 12: Medio YPD concentrado 3X, calle 13: Extracto crudo de rAsFNR producido en *P. pastoris* concentrado 3X, la flecha azul indica la banca correspondiente a la rAsFNR.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Una vez producida la rAsFNR en los dos sistemas de expresión, se llevó a cabo su caracterización cinética (**Figura 19**). La enzima presenta 1.3 veces menor  $V_{max}$  cuando es producida en *E. coli*; sin embargo, la enzima producida en la levadura tiene 4.7 veces menor  $K_M$  que la producida en *E. coli* (**Tabla 4**). A pesar de esto, la rAsFNR expresada en la levadura presenta 3.6 veces mayor eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que la producida en la bacteria.



**Figura 19.** Cinéticas de Michaelis-Menten de AsFNR producida en diferentes hospederos. En todos los casos la actividad se midió a diferentes concentraciones de NADPH en 0.15 mM DCPIP, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 a 30 °C.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten de la AsFNR y sus variantes en diferentes sistemas de expresión.

Hospedero	$V_{max}$ ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
<i>E. coli</i>	$14.6 \pm 1.0$	$0.11 \pm 0.02$	$8.8 \pm 0.6$	80
<i>P. pastoris</i>	$11.1 \pm 0.3$	$0.023 \pm 0.002$	$6.6 \pm 0.2$	289

<sup>a</sup> La actividad diaforasa fue medida espectrofotométricamente a diferentes concentraciones de NADPH en 0.15 mM DCPIP, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 a 30 °C.

Numerosos estudios evidencian cambios en los parámetros cinéticos de enzimas expresadas en distintos sistemas. Por ejemplo, en el estudio de la caracterización cinética de la lacasa Lcc9 de *Coprinopsis cinerera* (108) expresada en esta levadura, se vio que la deglicosilación aparentemente no cambió el valor de  $K_M$  de rLcc9 (forma glicosilada). En comparación, el número de recambio ( $k_{cat}$ ) de drLcc9 (forma deglicosilada) disminuyó



6.34 veces en comparación con el de rLcc9. Como resultado, la eficiencia catalítica de la lacasa deglicosilada fue aproximadamente una cuarta parte de la de la lacasa glicosilada. También es cierto, que otras investigaciones han mostrado valores cinéticos prácticamente idénticos a los de la enzima nativa (108,109). En concreto, los parámetros cinéticos de la lacasa de *P. sanguineus* (111) obtenida en este sistema de expresión eucariótico ensayada con distintos sustratos (guayacol, siringaldazina, o -dianisidina y ABTS) fueron similares a los informados para otras lacasas. Para todos los sustratos probados, no se observaron cambios significativos en la relación  $k_{cat}/K_M$  entre las formas glicosilada y deglicosilada, ya que las diferencias en  $K_M$  fueron acompañadas por cambios en la  $k_{cat}$ .

#### 4.4. ESTABILIDAD TÉRMICA

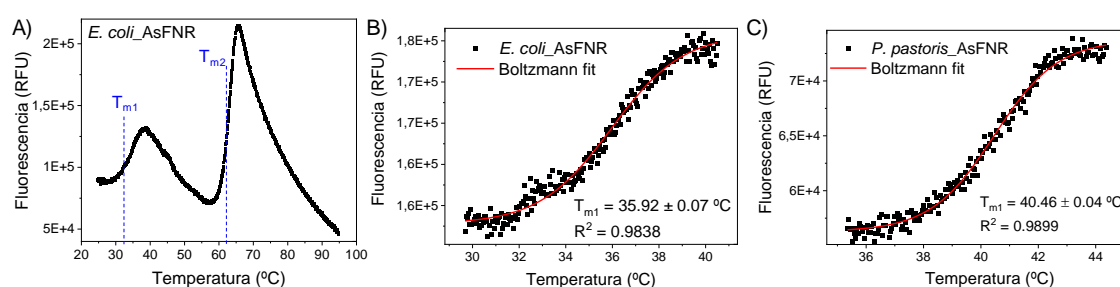
Posteriormente evaluamos la estabilidad térmica de la rAsFNR producida en ambos sistemas de expresión. Para ello medimos su temperatura de fusión o  $T_m$  (por siglas en inglés melting temperature) mediante un ensayo de fluorescencia. Dicha técnica se basa en la medición de la fluorescencia de un colorante (en este caso el SPYRO orange) que en medio acuoso no emite fluorescencia, y conforme la proteína se desdobla por aumento de la temperatura, las zonas hidrofóbicas se exponen al medio acuoso consiguiendo que el colorante se una a la proteína y así emitiendo mayor fluorescencia que en medio acuoso (104). Una vez que se obtienen las curvas de desnaturalización (fluorescencia vs temperatura) se calcula la  $T_m$  mediante su ajuste a la ecuación de Boltzmann (Eq. 2) o bien mediante la gráfica de la segunda derivada de la fluorescencia en función de la temperatura.

$$y = A_{\text{bottom}} + (A_{\text{top}} - A_{\text{bottom}}) / [1 + \exp^{(T_m - x/dx)}] \quad \text{Eq. 2}$$

Donde,  $y$  es la fluorescencia en unidades arbitrarias (RFU),  $x$  es la temperatura,  $A_{\text{bottom}}$  es la fluorescencia de referencia a baja temperatura,  $A_{\text{top}}$  es la fluorescencia máxima en la parte superior del conjunto de datos truncado y  $T_m$  es la temperatura de fusión.

Para poder llevar a cabo este ensayo, fue necesario obtener al menos 50  $\mu\text{L}$  de un extracto puro de rAsFNR expresada en *P. pastoris*. Para ello usamos la cromatografía IMAC, que a pesar de que la gran mayoría de la enzima se queda fuertemente unida a la resina metálica, fue posible obtener un extracto puro. Para ello, incubamos 50 volúmenes de extracto crudo con 1 volumen de  $\text{AG-Co}^{2+}$  (5 veces la proporción usual) y después de

eluir con 0.5 M de imidazol, se consiguió eluir una concentración de alrededor de 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rAsFNR. Dicho extracto enzimático se concentró 10 veces ( $\approx 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mediante unidades de ultrafiltración tangencial (10 kDa, Millipore) para conseguir una concentración de proteína suficiente para poder llevar a cabo el ensayo de  $T_m$ . Sin embargo, dada la baja concentración de proteína, no fue posible visualizar las etapas de la purificación mediante SDS-PAGE. A pesar de la baja concentración de rAsFNR eluida, el extracto purificado y concentrado 10 veces presentó la misma actividad específica que la que se determinó en la **Tabla 3**.



**Figura 20.** Desnaturalización térmica de AsFNR recombinante. A) Perfil de fluorescencia durante el ensayo de desnaturalización. B y C) Cálculo de  $T_m$  mediante ajuste con ecuación de Boltzmann.

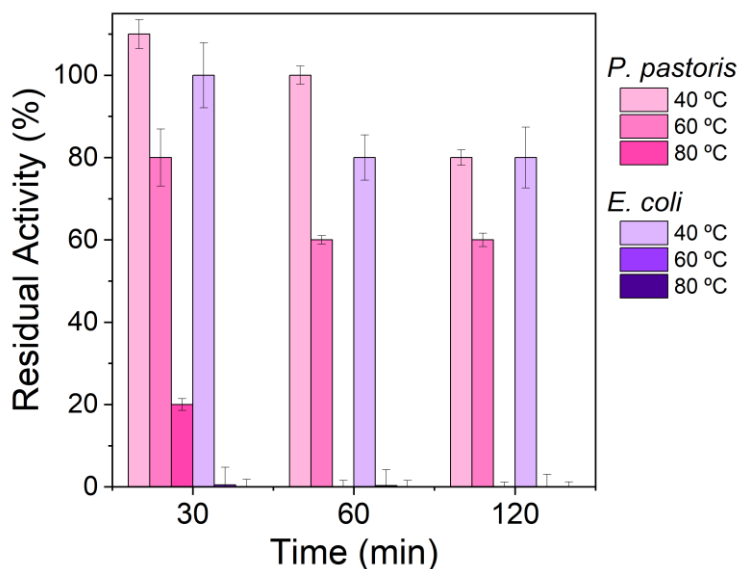
El perfil de inactivación térmica de la rAsFNR producida en ambos sistemas de expresión presenta dos temperaturas de fusión ( $T_{m1}$  y  $T_{m2}$ , **Figura 20A**). Dicho perfil nos informa que el proceso de inactivación térmica que sufre esta enzima se lleva a cabo en dos etapas. La primera de ellas ocurre alrededor de los 35-40  $^\circ\text{C}$  en donde una parte de la proteína se despliega, mientras que el segundo fenómeno de desplegamiento total ocurre alrededor de los 62  $^\circ\text{C}$  en donde se alcanza a desnaturalizar toda la estructura terciaria de la enzima. Sin embargo, a pesar de que ambas rAsFNR se desnaturalizan totalmente a la misma temperatura ( $T_{m2} = 62 \text{ }^\circ\text{C}$ , **Tabla 5**), la rAsFNR producida en *P. pastoris* presenta una  $T_{m1}$  que es 4.7  $^\circ\text{C}$  más alta que la  $T_{m1}$  de la misma enzima producida en *E. coli* (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Estabilidad térmica de la AsFNR y sus variantes en diferentes sistemas de expresión.

Sistema de expresión	$T_{m1}$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_{m2}$ ( $^\circ\text{C}$ )
<i>E. coli</i>	35.9	62.3
<i>P. pastoris</i>	40.5	62.4

El cambio en la  $T_{m1}$  concuerda con la mayor estabilidad térmica observada al incubar ambas enzimas a 40, 60 y 80  $^\circ\text{C}$ . En todas las condiciones de temperatura ensayadas, la

rAsFNR producida en la levadura es capaz de mantener mayor actividad residual que la producida en la bacteria (**Figura 21**). De este modo, el sistema de expresión en *P. pastoris* permite la producción de una rAsFNR estable a 60 °C durante 2 h (< 60% actividad residual), condiciones en las que la misma enzima está totalmente inactivada cuando se expresa en *E. coli*.



**Figura 21.** Estabilidad térmica de AsFNR producida en diferentes sistemas de expresión.

El incremento de la estabilidad térmica de otras enzimas producidas en *P. pastoris* también se ha reportado para la lacasa de *Coprinopsis cinerea* cuya actividad es 2.63 veces mayor cuando la enzima está glicosilada en comparación con la misma enzima deglicosilada (108). *Garg et al.* también vieron que los patrones de glicosilación efectuados por *P.pastoris* aumentaban la estabilidad térmica y la tolerancia a la sal de la lacasa de *Cyathus bulleri* (112), resultados que también concordaron con los llevados a cabo por *Vite-Vallejo et al.* (111) en los cuales la forma deglicosilada de la lacasa de *P.sanguineus* resultó ser menos estable a temperaturas por debajo de los 50 °C y su actividad se vio reducida por debajo de los 20 °C.

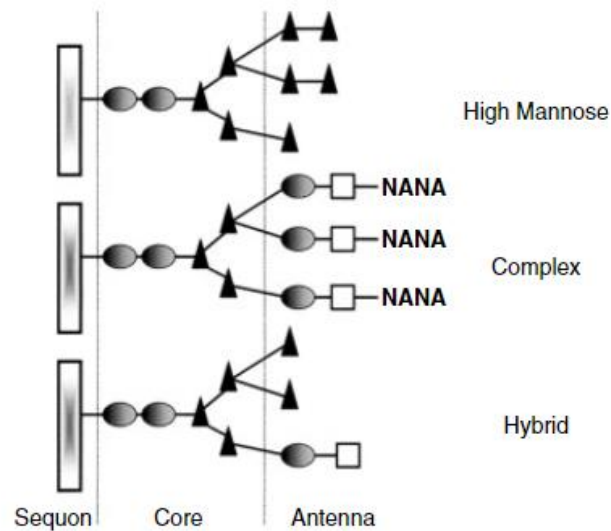
Además, este hecho también se ha observado en otras enzimas como RNAasa A pancreática bovina expresada en *P. pastoris* donde también contribuyó a aumentar la  $T_m$  con respecto a la forma deglicosilada (113).

#### 4.5. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes realizadas por *P. pastoris* y una de las más complejas. Se cree que, dado que muchas proteínas nativas de mamíferos están glicosiladas, es necesario disponer de los patrones de glicosilación correctos en las proteínas recombinantes para garantizar su actividad biológica. Además, los productos génicos glicosilados suelen tener longitudes mucho más cortas de cadenas glicosiladas que los expresados en *S. cerevisiae*, lo que convierte a *P. pastoris* en un hospedador mucho más atractivo para la expresión de proteínas recombinantes. *P. pastoris*, al igual que otras levaduras y hongos, añade O-oligosacáridos a los grupos hidroxilo serina y treonina de las proteínas secretadas. Estos se componen de residuos de manosa solamente, mientras que los eucariotas superiores, como los mamíferos, tienen una composición de azúcar más variada en estos oligosacáridos. Es posible que *P. pastoris* glicosile proteínas heterólogas, incluso cuando esas proteínas normalmente no son glicosiladas por el huésped nativo; e incluso cuando la proteína está glicosilada en el huésped nativo, *P. pastoris* no puede glicosilar en los mismos residuos de serina y treonina (114). La adición de O-glicanos por *P. pastoris* ha sido estudiada en un dominio catalítico de la enzima glucoamilasa de *Aspergillus awamori* (115). El peso molecular de la proteína secretada fue 20 kDa más pesado que la proteína nativa. Alrededor de 10 kDa de este peso podría atribuirse a N-glicosilación, lo que significa que el resto podría atribuirse a O-glucósidos añadidos que probablemente constan de 20 a 30 residuos de manosa. En la producción de antitrombina III humana recombinante a partir de *P. pastoris* se vio que la O- glicosilación ocurrió cerca del sitio reactivo y dio como resultado la proteína recombinante teniendo la mitad de la actividad inhibitoria contra la trombina en comparación con la nativa (116).

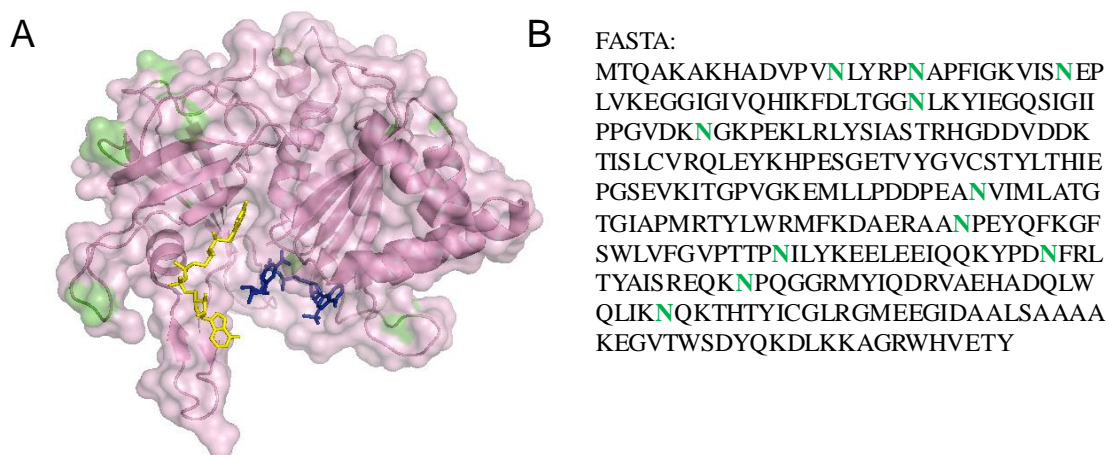
La glicosilación ligada a eucariotas comienza en el lado citoplasmático del retículo endoplásmico (ER) con la generación de un intermedio de heptasacárido ramificado. Esto se transloca a través del ER, iniciando la segunda fase del proceso de síntesis (117). Hay tres clases de N-glicanos añadidos que se sintetizan mediante la adición de Glc3Man9GlcNAc2 (high manosse), una mezcla de varios azúcares diferentes (complejo) o una combinación de ambos (híbrido) (**Figura 22**) (118). Reacciones de adición y reducción a medida que la estructura del carbohidrato pasa a través del ER y del aparato de Golgi da como resultado estructura final del glicano, que incorporará una de las tres clases N-glicosilaciones descritas anteriormente. Sin embargo, en hongos y levaduras,

como *Pichia*, el oligosacárido externo de la cadena de proteínas secretadas está mayormente inalterada y consiste en Man<sub>8-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (119). A pesar de las diferencias observadas en la cantidad y complejidad de la N-glicosilación, hay evidencia de una secuencia de reconocimiento consenso única para el inicio de la glicosilación, la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr, que se ha considerado necesaria para la incorporación de N-glicanos aunque se ha visto que no siempre es suficientemente eficiente (120).



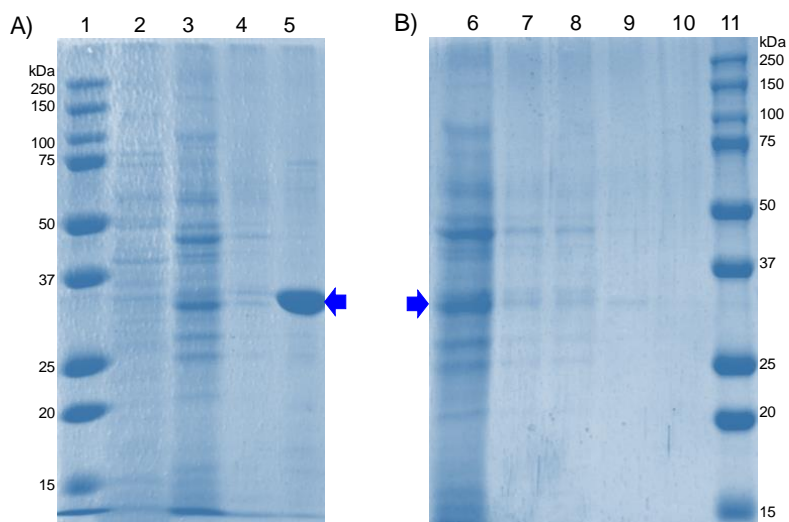
**Figura 22.** Patrón de glicosilación de proteína. Las cadenas de oligosacáridos consisten en una secuencia (sequon), que está unida al núcleo por un residuo de Asn. El núcleo está unido a la antena, que puede ser rica en manosa (high mannose), compleja (complex) o híbrida (hybrid). GlcNAc, ●; manosa, ▲; galactosa, □.(121)

Llevamos a cabo el estudio de los potenciales sitios de N-glicosilación de la AsFNR mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de dicha enzima. Dicho análisis mostró que dentro de su secuencia de aminoácidos no existen potenciales sitios de N-glicosilación de acuerdo a la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (**Figura 23**).



**Figura 23.** A) Estructura de la AsFNR (PDB 1GJR), en verde se resaltan las asparaginas (N). En amarillo el FAD y en azul el NADP<sup>+</sup>. B) Secuencia de aminoácidos de la AsFNR, en verde las asparaginas.

A pesar de que la AsFNR no presenta sitios potenciales de N-glicosilación y debido al aumento de su estabilidad térmica, intentamos llevar a cabo el análisis de masas de la proteína purificada mediante espectrofotometría de masas. Sin embargo, los resultados de dicho análisis fueron negativos ya que no fue posible conseguir una muestra de la enzima suficientemente concentrada para su análisis por esta técnica. Por este motivo, decidimos llevar a cabo el análisis mediante SDS-PAGE (**Figura 18C**). La rAsFNR obtenida después de 92 h de cultivo, puede apreciarse en la banda en torno a los 36 kDa. Esta banda también corresponde a la misma banda observada de la elución de la enzima de la resina de AG-Co<sup>2+</sup> que se incubó con buffer de lisis (mercaptoetanol y SDS) demostrando que la enzima se queda fuertemente retenida en esta columna (**Figura 24A**). Posteriormente evaluamos la purificación de esta enzima cambiando el cobalto quelado en la resina AG-Co<sup>2+</sup> por níquel (AG-Ni<sup>2+</sup>) para ver si la enzima presenta menor afinidad (**Figura 24B**). Mediante esta técnica no se observó diferencia significativa de pesos moleculares entre la rAsFNR producida en *P. pastoris* y en *E. coli*, por lo que creemos que las posibles modificaciones postraduccionales que pueda tener la rAsFNR producida en la levadura no son de tipo glicosilaciones, ya que estas suelen tener un peso de alrededor de 3 kDa (122).



**Figura 24.** Visualización por SDS-PAGE de la proteína rAsFNR en *P. pastoris*. **A)** Calles: 1 Marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standard; 2: Medio YPD 3X; 3: Extracto crudo de rAsFNR producido en *P. pastoris* 3X; 4: Resina AG-Co<sup>2+</sup> después de incubación con extracto crudo de rAsFNR producida en *P. pastoris*; 5: Fracción purificada de rAsFNR producida en *E. coli*. **B)** Purificación de rAsFNR producida en *P. pastoris* mediante IMAC con AG-Ni<sup>2+</sup>, calles 6: Extracto crudo 3X; 7: Extracto crudo 1X ; 8: Flow through; 9: eluato; 10: Resina AG-Ni<sup>2+</sup>; 11: Marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standard.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo hemos conseguido clonar con éxito la ferredoxina NADP-reductasa de *Anabaena* sp. en el plásmido pGAPZ $\alpha$ A para su expresión heteróloga en *Pichia pastoris*. Cabe mencionar que, hasta la fecha, es la primera vez que esta enzima se expresa en este sistema de expresión. Además, La rAsFNR fue expresada exitosamente en los sistemas de expresión heteróloga de *E. coli* y *P. pastoris*, en donde presentó 1.3 veces menor actividad específica, pero 3.6 veces mayor eficiencia catalítica cuando fue expresada en la levadura. Por otro lado, la enzima producida en *P. pastoris*, mostró mayor estabilidad térmica que la producida en la bacteria, manteniendo 60% de su actividad inicial después de ser incubada 2 horas a 60 °C, mientras que la expresada en *E. coli* fue totalmente inactivada en las mismas condiciones. Con este trabajo, hemos conseguido demostrar nuevamente que la termoestabilización es una de las ventajas que presenta el sistema de expresión heteróloga de *P. pastoris*. Sin embargo, para poder avanzar en la caracterización es necesario optimizar las condiciones de cultivo y la purificación de la enzima producida en *P. pastoris* ya que su purificación mediante IMAC con cobalto resulta muy ineficiente debido a que interacciona muy fuertemente con la columna metálica y los rendimientos de elución son muy bajos. Como perspectivas de este trabajo, está prevista la purificación de la rAsFNR expresada en *P. pastoris* mediante otras técnicas cromatográficas para poder determinar la masa exacta de la enzima mediante la técnica de espectrometría de masas que permitirá detectar pequeñas diferencias de peso molecular. A este respecto, se propone el cambio del metal cobalto de la resina IMAC por níquel en donde se probó que la proteína interacciona con menos fuerza y es más fácil eluirla cuantitativamente. Finalmente, este trabajo expande las posibilidades de aplicación de la AsFNR como sistema termoestable para la regeneración enzimática de cofactores de nicotinamida para aplicaciones en biocatálisis.



## 6. CONCLUSIONS

In this work we have successfully cloned ferredoxin NADP- reductase from *Anabaena* sp. into the plasmid pGAPZ $\alpha$ A for heterologous expression in *Pichia pastoris*. It is worth mentioning that, to date, this is the first time that this enzyme has been expressed in this expression system. In addition, rAsFNR was successfully expressed in *E. coli* and *P. pastoris* heterologous expression systems, where it presented 1.3 times lower specific activity but 3.6 times higher catalytic efficiency when expressed in the yeast. The enzyme produced in *P. pastoris* showed greater thermal stability than that produced in bacteria, maintaining 60% of its initial activity after being incubated for 2 hours at 60 °C, while that expressed in *E. coli* was totally inactivated under the same conditions. With this work, we have demonstrated once again that thermostabilization is one of the advantages of the *P. pastoris* heterologous expression system. However, it is necessary to optimize the production and purification conditions of the enzyme produced in *P. pastoris* since its purification by IMAC using cobalt is very inefficient because it interacts very strongly with the metal and the elution yields are very low. As perspectives of this work, the purification of rAsFNR expressed in *P. pastoris* by other chromatographic techniques is planned in order to determine the exact mass of the enzyme by mass spectrometry technique that will allow the detection of small differences in molecular weight. In this regard, it is proposed to change the cobalt metal of the IMAC resin to nickel where it was proved that the protein interacts less strongly and is easier to elute quantitatively. Finally, this work expands the application possibilities of AsFNR as a thermostable system for enzymatic regeneration of nicotinamide cofactors for biocatalysis applications.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ciriminna R, Pagliaro M. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. *Org Process Res Dev.* 2013; 17(12):1479–84.
2. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature.* 2012; 485(7397):185–94.
3. Zhou S, Wang L. Unraveling the structural and chemical features of biological short hydrogen bonds. *Chem Sci.* 2019; 10(33):7734–45.
4. Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Serrano A, Linde D, Lund H, et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv.* 2017;35(6):815–31.
5. Wang X, Saba T, Yiu HHP, Howe RF, Anderson JA, Shi J. Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem.* 2017;2(5):621–54.
6. Wu H, Tian C, Song X, Liu C, Yang D, Jiang Z. Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chemistry.* 2013;15(7):1773–89.
7. Immanuel S, Sivasubramanian R, Gul R, Dar MA. Recent Progress and Perspectives on Electrochemical Regeneration of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Chem Asian J.* 2020;15(24):4256–70.
8. Chen H, Simoska O, Lim K, Grattieri M, Yuan M, Dong F, et al. Fundamentals, Applications, and Future Directions of Bioelectrocatalysis. *Chem Rev.* 2020;120(23):12903–93.
9. Maciá-Agulló JA, Corma A, Garcia H. Photobiocatalysis: the power of combining photocatalysis and enzymes. *Chemistry.* 2015; 21(31):10940-10959.
10. Nakamura, K.; Aizawa M; M. *Electroenzymology. Coenzyme Regeneration.* Springer-Verlag. 1988; 24(1):70.
11. Jones JB, Sneddon DW, Higgins W, Lewis AJ. Preparative-scale reductions of cyclic ketones and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. *J Chem Soc Chem Commun.* 1972;(15):856–7.
12. Jones, J. B., & Taylor, K. E. Nicotinamide coenzyme regeneration. Flavin mononucleotide (riboflavin phosphate) as an efficient, economical, and enzyme-compatible recycling agent. *Can. J. Chem.* 1976; 54(19):2969-2973.
13. Chenault HK, Whitesides GM. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol.* 1987;14(2):147–97.
14. Chambers RP, Cohen W, Baricos WH. Physical immobilization of enzymes by hollow-fiber membranes. *Methods Enzymol.* 1976;44(C):291–317.
15. Aliverti, A.; Faber, R.; Finnerty, C. M.; Ferioli, C.; Pandini, V.; Negri, A.; Karplus, P. A.; Zanetti, G., Biochemical and Crystallographic Characterization of Ferredoxin–NADP<sup>+</sup> Reductase from Nonphotosynthetic Tissues. *Biochem.* 2001, 40 (48), 14501-14508.

16. Steckhan, Eberhard, Eberhard Steckhan, and R. D. Little. *Electrochemistry VI Electroorganic Synthesis: Bond Formation at Anode and Cathode*. Springer Berlin Heidelberg, 1997; pp 150-152.
17. Leonida M. Redox Enzymes Used in Chiral Syntheses Coupled to Coenzyme Regeneration. *Curr Med Chem*. 2001;8(4):345–69.
18. Aizawa M, Coughlin RW, Charles M. Electrochemical characterization of immobilized NAD<sup>+</sup>. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1976;440(1):233–40.
19. Armstrong FA, Hill HAO, Walton NJ. Direct electrochemistry of redox proteins. *Acc Chem Res*. 1988;21(11):407–13.
20. Haladjian J, Bianco P, Asso L, Guerlesquin F, Bruschi M. Direct electrochemical reduction of spinach and *Desulfovibrio desulfuricans* Norway ferredoxins. *Electrochim Acta*. 1986;31(12):1513–7.
21. Sharma VK, Hutchison JM, Allgeier AM. Redox Biocatalysis: Quantitative Comparisons of Nicotinamide Cofactor Regeneration Methods. *ChemSusChem*. 2022; 15(22):e202200888.
22. Mutti FG, Knaus T, Scrutton NS, Breuer M, Turner NJ. Conversion of alcohols to enantiopure amines through dual-enzyme hydrogen-borrowing cascades. *Science*. 2015;349(6255):1525–9.
23. Jia HY, Zong MH, Zheng GW, Li N. Myoglobin-Catalyzed Efficient in Situ Regeneration of NAD(P)<sup>+</sup> and Their Synthetic Biomimetic for Dehydrogenase-Mediated Oxidations. *ACS Catal*. 2019;9(3):2196–202.
24. Angelastro A, Dawson WM, Luk LYP, Allemann RK. A Versatile Disulfide-Driven Recycling System for NADP<sup>+</sup> with High Cofactor Turnover Number. *ACS Catal*. 2017;7(2):1025–9.
25. Jiang W, Fang B. Construction of a tunable multi-enzyme-coordinate expression system for biosynthesis of chiral drug intermediates. *Sci Rep*. 2016; 6(1), 30462.
26. Singh R, Singh RK, Kim SY, Sigdel S, Park JH, Choi JH, et al. D-Ribulose production by a ribitol dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes* coupled with an NADH regeneration system. *Biochem Eng J*. 2016; 109:189–96.
27. Hartley CJ, Williams CC, Scoble JA, Churches QI, North A, French NG, et al. Engineered enzymes that retain and regenerate their cofactors enable continuous-flow biocatalysis. *Nat Catal*. 2019; 2(11):1006–15.
28. Han L, Liang B, Song J. Rational design of engineered microbial cell surface multi-enzyme co-display system for sustainable NADH regeneration from low-cost biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018; 45(2):111–21.
29. Baumer B, Classen T, Pohl M, Pietruszka J. Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP(H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis. *Adv Synth Catal*. 2020; 362(14):2894–901.
30. Chenault HK, Whitesides GM. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol*. 1987; 14(2):147–97.

31. Kara S, Schrittwieser JH, Hollmann F, Ansorge-Schumacher MB. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(4):1517–29.
32. Burstein C, Ounissi H, Legoy MD, Gellf G, Thomas D. Recycling of NAD<sup>+</sup> using coimmobilized alcohol dehydrogenase and *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 1981; 6(4):329–38.
33. Estival F, Burstein C. Immobilized thermophilic bacteria as a source of respiratory chain for the recycling of NAD<sup>+</sup>. *Enzyme Microb Technol.* 1985; 7(1):29–33.
34. Velasco-Lozano S, López-Gallego F. Wiring step-wise reactions with immobilized multi-enzyme systems. *Biocatal Biotransformation.* 2018; 36(3):184–94.
35. Velasco-Lozano S, Benítez-Mateos AI, López-Gallego F. Co-immobilized Phosphorylated Cofactors and Enzymes as Self-Sufficient Heterogeneous Biocatalysts for Chemical Processes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017; 56(3):771–5.
36. Hanke G, Mulo P. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell Environ.* 2013; 36(6):1071–84.
37. Vishniac W, Ochoa S. Photochemical reduction of pyridine nucleotides by spinach grana and coupled carbon dioxide fixation. *Nature.* 1951;167(4254):768–9.
38. Sétif, Pierre. Electron transfer from the bound iron–sulfur clusters to ferredoxin/flavodoxin: kinetic and structural properties of ferredoxin/flavodoxin reduction by photosystem I. In *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006; p. 439-454.
39. Arnon DI. Photosynthetic electron transport: emergence of a concept, 1949–59. *Photosynth Res.* 1991; 29(3): 117-131
40. Arnon DI, Chain RK. Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(12): 4961–4965.
41. Batie CJ, Kamin H. Electron transfer by ferredoxin:NADP + reductase. Rapid-reaction evidence for participation of a ternary complex. *J Biol Chem.* 1984; 259(19):11976-11985.
42. Carrillo N, Ceccarelli EA. Open questions in ferredoxin-NADP + reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem.* 2003;270(9):1900-1915.
43. Medina M, Gómez-Moreno C. Interaction of ferredoxin-NADP + reductase with its substrates: optimal interaction for efficient electron transfer. *Photosynth Res.* 2004; 79 (2): 113-131.
44. Carrillo N, Ceccarelli EA. Open questions in ferredoxin-NADP + reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem.* 2003;270 (9): 1900-1915.
45. Aliverti A, Pandini V, Pennati A, Rosa M, Zanetti G. Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP + reductases. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 474(2):283-291.
46. Arakaki AK, Ceccarelli EA, Carrillo N. Plant-type ferredoxin-NADP + reductases: a basal structural framework and a multiplicity of functions. *FASEB J.* 1997;11 (2):133-140.

47. Ceccarelli EA, Arakaki AK, Cortez N, Carrillo N. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1698 (2): 155-165.
48. Deng Z, Aliverti A, Zanetti G, Arakaki AK, Ottado J, Orellano EG, et al. A productive NADP + binding mode of ferredoxin-NADP + reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nat Struct Biol*. 1999;6(9):847-853.
49. Dorowski A, Hofmann A, Steegborn C, Boicu M, Huber R. Crystal structure of paprika ferredoxin-NADP + reductase. Implications for the electron transfer pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9253-9263.
50. Karplus PA, Daniels MJ, Herriott JR. Atomic structure of ferredoxin-NADP + reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* (1979). 1991;251(4989):60-66.
51. Kurisu G, Kusunoki M, Katoh E, Yamazaki T, Teshima K, Onda Y, et al. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP (+) reductase. *Nat Struct Biol*. 2001;8(2):117-121.
52. Muraki N, Seo D, Shiba T, Sakurai T, Kurisu G. Asymmetric dimeric structure of ferredoxin-NAD(P) + oxidoreductase from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*: implications for binding ferredoxin and NADP+. *J Mol Biol*. 2010;401(3):403-414.
53. Serre L, Vellieux FM, Medina M, Gómez-Moreno C, Fontecilla-Camps JC, Frey M. X-ray structure of the ferredoxin:NADP + reductase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 at 1.8Å resolution, and crystallographic studies of NADP + binding at 2.25Å resolution. *J Mol Biol*. 1996;263(1), 20–39.
54. Mulo P, Medina M. Interaction and electron transfer between ferredoxin–NADP+ oxidoreductase and its partners: structural, functional, and physiological implications. *Photosynthesis Research* 2017;134(3):265–80.
55. Armstrong FA, Evans RM, Hexter S V, Murphy BJ, Roessler MM, Wulff P. Guiding Principles of Hydrogenase Catalysis Instigated and Clarified by Protein Film Electrochemistry. *Acc Chem Res*. 2016;49(5):884–92.
56. del Barrio M, Fourmond V. Redox (In)activations of Metalloenzymes: A Protein Film Voltammetry Approach. *ChemElectroChem*. 2019;6(19):4949–62.
57. Evans RM, Siritanaratkul B, Megarity CF, Pandey K, Esterle TF, Badiani S, et al. The value of enzymes in solar fuels research – efficient electrocatalysts through evolution. *Chem Soc Rev*. 2019;48(7):2039–52.
58. Fourmond V, Léger C. Protein Electrochemistry: Questions and Answers. In: Jeuken LJC, editor. *Biophotoelectrochemistry: From Bioelectrochemistry to Biophotovoltaics*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 1–41.
59. Léger C, Jones AK, Albracht SPJ, Armstrong FA. Effect of a Dispersion of Interfacial Electron Transfer Rates on Steady State Catalytic Electron Transport in [NiFe]-hydrogenase and Other Enzymes. *J Phys Chem B*. 2002;106(50):13058–63.

60. Armstrong FA, Hirst J. Reversibility and efficiency in electrocatalytic energy conversion and lessons from enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(34):14049–54.
61. Megarity CF, Siritanaratkul B, Heath RS, Wan L, Morello G, FitzPatrick SR, et al. Electrocatalytic Volleyball: Rapid Nanoconfined Nicotinamide Cycling for Organic Synthesis in Electrode Pores. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2019;58(15):4948–52.
62. Siritanaratkul B, Megarity CF, Roberts TG, Samuels TOM, Winkler M, Warner JH, et al. Transfer of photosynthetic NADP + /NADPH recycling activity to a porous metal oxide for highly specific, electrochemically-driven organic synthesis. *Chem. Sci. J*. 2017; 8(6),4579-4586.
63. Castañeda-Losada L, Adam D, Paczia N, Buesen D, Steffler F, Sieber V, et al. Bioelectrocatalytic Cofactor Regeneration Coupled to CO<sub>2</sub> Fixation in a Redox-Active Hydrogel for Stereoselective C–C Bond Formation. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021;60(38):21056–61.
64. Bes MT, Gomez-Moreno C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Selective oxidation: stabilisation by multipoint attachment of ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *J Mol Catal A Chem*. 1995; 98(3):161–9.
65. Bandehagh A, Noparvar PM, Uliiaie ED. Principles of Protein Folding. *Journal of Academia and Industrial Research*. 2013;2(4), 216–220.
66. Shokri A, Sandén AM, Larsson G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;60(6):654–64.
67. Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotechnol*. 2006;17(4):367–72.
68. Gupta, V.; Sengupta, M.; Prakash, J.; Tripathy, B. C., Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. In *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, Gupta, V.; Sengupta, M.; Prakash, J.; Tripathy, B. C., Eds. Springer Singapore: Singapore, 2017; pp 77-101.
69. Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories* 2021;20(1):1–20.
70. Shih CJ, Lai MC. Analysis of the AAA+ chaperone clpB gene and stress-response expression in the halophilic methanogenic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Microbiology*. 2007, 153 (8), 2572-2583.
71. Aliverti A, Corrado ME, Zanetti G. Involvement of lysine-88 of spinach ferredoxin-NADP + reductase in the interaction with ferredoxin. *FEBS Letters* 1994; 343 (3), 247-250.
72. Aliverti A, Jansen T, Zanetti G, Ronchi S, Herrmann RG, Curti B. Expression in *Escherichia coli* of ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase from spinach: Bacterial synthesis of the holoflavoprotein and of an active enzyme form lacking the first 28 amino acid residues of the sequence. *Eur J Biochem*. 1990;191(3):551–5.

73. Wang A, Rodríguez JC, Han H, Schönbrunn E, Rivera M. X-ray crystallographic and solution state nuclear magnetic resonance spectroscopic investigations of NADP<sup>+</sup> binding to ferredoxin NADP reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 2008 Aug 5;47(31):8080–93.
74. Karbalaee M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*. 2020;235(9):5867–81.
75. Yeom J, Jeon CO, Madsen EL, Park W. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Pseudomonas putida* functions as a ferric reductase. *J Bacteriol*. 2009;191(5):1472–9.
76. Seo D, Asano T, Komori H, Sakurai T. Role of the C-terminal extension stacked on the re-face of the isoalloxazine ring moiety of the flavin adenine dinucleotide prosthetic group in ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase from *Bacillus subtilis*. *Plant Physiol Biochem*. 2014; 81:143–8.
77. Nakajima M, Sakamoto T, Wada K. The complete purification and characterization of three forms of ferredoxin-NADP (+) oxidoreductase from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Plant Cell Physiol*. 2002;43(5):484–93.
78. Goñi G, Serrano A, Frago S, Hervás M, Peregrina JR, De La Rosa MA, et al. Flavodoxin-mediated electron transfer from photosystem I to ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in *Anabaena*: role of flavodoxin hydrophobic residues in protein-protein interactions. *Biochemistry*. 2008;47(4):1207–17.
79. Tondo ML, Musumeci MA, Delprato ML, Ceccarelli EA, Orellano EG. Structural-functional characterization and physiological significance of ferredoxin-NADP reductase from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *PLoS One*. 2011,6(11), e27124.
80. Sato J, Takeda K, Nishiyama R, Watanabe T, Abo M, Yoshimura E, et al. *Synechocystis* ferredoxin-NADP (+) oxidoreductase is capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction in the absence or presence of free flavin. *Biomaterials*. 2011;24(2):311–21.
81. Yan Z, Nam YW, Fushinobu S, Wakagi T. *Sulfolobus tokodaii* ST2133 is characterized as a thioredoxin reductase-like ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *Extremophiles*. 2014;18(1):99–110.
82. Bortolotti A, Pérez-Dorado I, Goñi G, Medina M, Hermoso JA, Carrillo N, et al. Coenzyme binding and hydride transfer in *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin/flavodoxin NADP(H) oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(2):199–210.
83. Nascimento AS, Catalano-Dupuy DL, Bernardes A, Neto MDO, Santos MAM, Ceccarelli EA, et al. Crystal structures of *Leptospira interrogans* FAD-containing ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and its complex with NADP<sup>+</sup>. *BMC Structural Biology*. 2007;7(1),69.
84. Ikeda T, Nakamura M, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. Ferredoxin-NADP reductase from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297(1):124–30.

85. Seo D, Kitashima M, Sakurai T, Inoue K. Kinetics of NADP<sup>+</sup>/NADPH reduction-oxidation catalyzed by the ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth Res.* 2016;130(1–3):479–89.
86. Teimoori A, Ahmadian S, Madadkar-Sobhani A. Biochemical characterization of two recombinant ferredoxin reductases from *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Biotechnol Appl Biochem.* 2012;59(6):457–64.
87. Mosebach L, Heilmann C, Mutoh R, Gäbelein P, Steinbeck J, Happe T, et al. Association of Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase with the photosynthetic apparatus modulates electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res.* 2017;134(3):291–306.
88. Kimata-Arigo Y, Sakakibara Y, Ikegami T, Hase T. Electron transfer of site-specifically cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *Biochemistry.* 2010;49(46):10013–23.
89. Aliverti A, Jansen T, Zanetti G, Ronchi S, Herrmann RG, Curti B. Expression in *Escherichia coli* of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase from spinach. Bacterial synthesis of the holoflavoprotein and of an active enzyme form lacking the first 28 amino acid residues of the sequence. *Eur J Biochem.* 1990;191(3):551–5.
90. Musumeci MA, Botti H, Buschiazzo A, Ceccarelli EA. Swapping FAD binding motifs between plastidic and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochemistry.* 2011;50(12):2111–22.
91. Koskela MM, Dahlström KM, Goñi G, Lehtimäki N, Nurmi M, Velazquez-Campoy A, et al. *Arabidopsis* FNRL protein is an NADPH-dependent chloroplast oxidoreductase resembling bacterial ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductases. *Physiol Plant.* 2018;162(2):177–90.
92. Singh K, Bhakuni V. *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: Role of ionic interactions in stabilization of native conformation and structural cooperativity. *Proteins.* 2008;71(4):1879–88.
93. Milani M, Balconi E, Aliverti A, Mastrangelo E, Seeber F, Bolognesi M, et al. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Plasmodium falciparum* undergoes NADP<sup>+</sup>-dependent dimerization and inactivation: functional and crystallographic analysis. *J Mol Biol.* 2007;367(2):501–13.
94. Hermann J, Schurgers L, Jankowski V. Identification and characterization of post-translational modifications: Clinical implications. *Mol Aspects Med.* 2022; 86:1010-66.
95. Jayaprakash NG, Surolia A. Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochemical Journal.* 2017;474(14):2333–47.
96. Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure.* 1999; 7:155–60.
97. Han M, Wang W, Wang X, Liu X, Cao H, Tao Y, et al. Enhanced Expression of Recombinant Elastase in *Pichia pastoris* through the Substitution of Thr for Ser in Asn-Xaa-Ser Sequons. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;175(1):428–35.



98. Baratti J, Couderc R. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. Chem. Biol. Technol. Agric.2014;44(10):2279–89.
99. Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. Bioorg Med Chem. 2009;17(7):2645–53.
100. Mateo C, Bolivar JM, Godoy CA, Rocha-Martin J, Pessela BC, Curiel JA, et al. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. Biomacromolecules. 2010;11(11):3112–7.
101. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1–2):248–54.
102. Vorphal MA, Bruna C, Wandersleben T, Dagnino-Leone J, Lobos-González F, Uribe E, et al. Molecular and functional characterization of ferredoxin NADP (H) oxidoreductase from *Gracilaria chilensis* and its complex with ferredoxin. Biol Res. 2017;50(1):39.
103. McD. Armstrong J. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. Biochim Biophys Acta. 1964;86(1):194–7.
104. Huynh K, Partch CL. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. Curr Protoc Protein Sci. 2015; 79:28.9.1-28.9.14.
105. Hausjell J, Schendl D, Weissensteiner J, Molitor C, Halbwirth H, Spadiut O. Recombinant production of a hard-to-express membrane-bound cytochrome P450 in different yeasts-Comparison of physiology and productivity. Yeast. 2020;37(2):217–26.
106. Yoshida M, Ohira T, Igarashi K, Nagasawa H, Aida K, Hallberg BM, et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biosci Biotechnol Biochem. 2001;65(9):2050–7.
107. Gutiérrez J, Criado R, Martín M, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):3004–8.
108. Xu G, Wu Y, Zhang Y, Fang W, Xiao Y, Fang Z. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*. J Biosci Bioeng. 2019;128(5):518–24.
109. Kawai R, Yoshida M, Tani T, Igarashi K, Ohira T, Nagasawa H, et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* beta-glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(1):1–7.
110. Chatani E, Tanimizu N, Ueno H, Hayashi R. Expression of soluble bovine pancreatic ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Biosci Biotechnol Biochem. 2000;64(11):2437–44.
111. Vite-Vallejo O, Palomares LA, Dantán-González E, Ayala-Castro HG, Martínez-Anaya C, Valderrama B, et al. The role of N-glycosylation on the enzymatic

- activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme Microb Technol.* 2009;45(3):233–9.
112. Garg N, Bieler N, Kenzom T, Chhabra M, Ansorge-Schumacher M, Mishra S. Cloning, sequence analysis, expression of *Cyathus bulleri* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant laccase. *BMC Biotechnol.* 2012;12(1):75.
  113. Chatani E, Tanimizu N, Ueno H, Hayashi R. Expression of Soluble Bovine Pancreatic Ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its Purification and Characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;64(11):2437–44.
  114. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45–66.
  115. Heimo H, Palmu K, Suominen I. Expression in *Pichia pastoris* and Purification of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Catalytic Domain. *Protein Expr Purif.* 1997;10(1):70–9.
  116. Mochizuki S, Hamato N, Hirose M, Miyano K, Ohtani W, Kameyama S, et al. Expression and Characterization of Recombinant Human Antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2001;23(1):55–65.
  117. Helenius J, Aebi M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(3):171–8.
  118. Fountoulakis M, Gentz R. Effect of Glycosylation on Properties of Soluble Interferon Gamma Receptors Produced in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. *Bio/Technology.* 1992;10(10):1143–7.
  119. Montesino R, García R, Quintero O, Cremata JA. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 1998;14(2):197–207.
  120. Charlwood J, Bryant D, Skehel JM, Camilleri P. Analysis of N-linked oligosaccharides: progress towards the characterisation of glycoprotein-linked carbohydrates. *Biomol Eng.* 2001;18(5):229–40.
  121. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22(4):249–70.
  122. Monk, S. A.; Williams, J. M.; Hope, A. G.; Barnes, N. M., Identification and importance of N-glycosylation of the human 5-hydroxytryptamine 3A receptor subunit. *Biochemical Pharmacology.* 2004, 68 (9), 1787-1796.