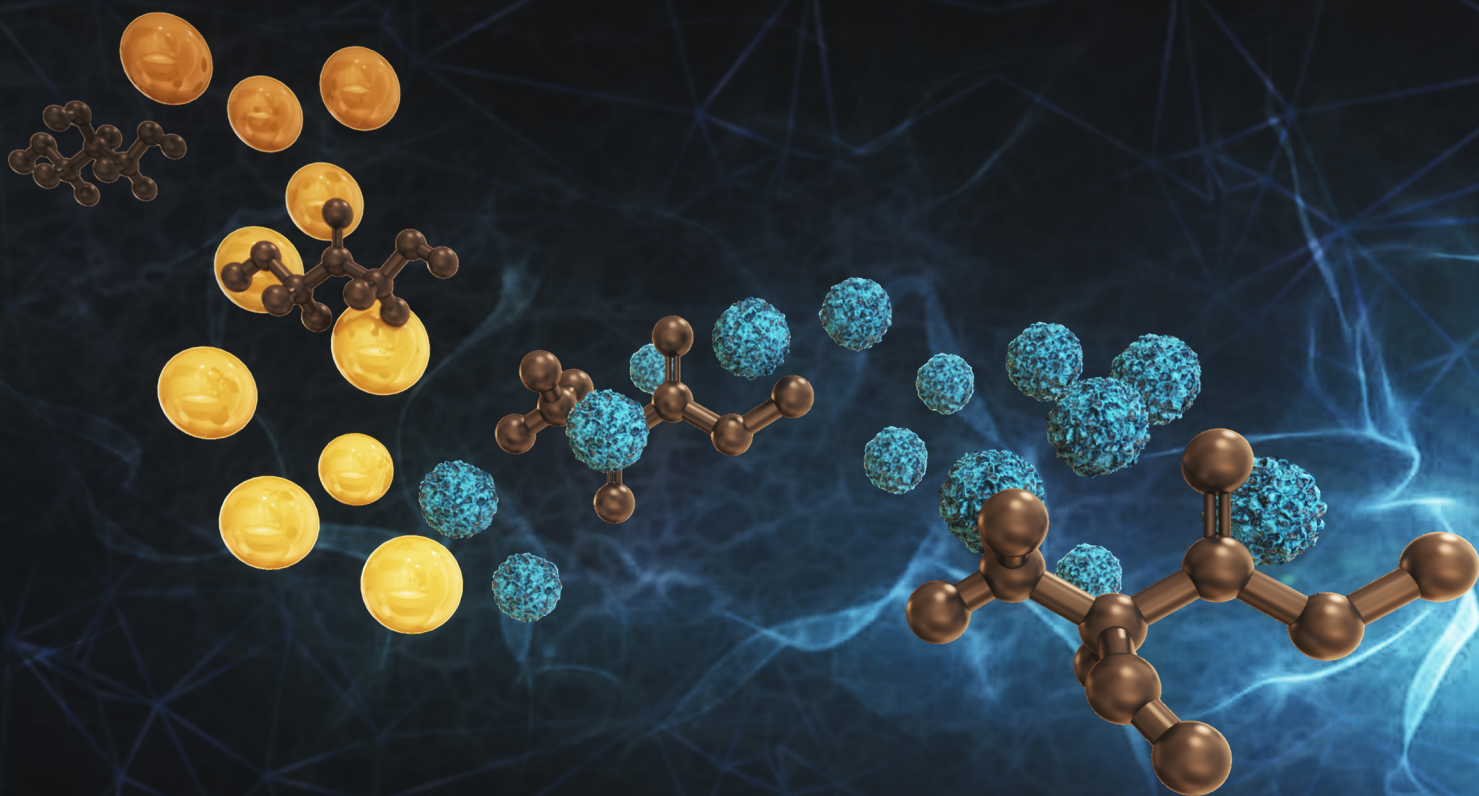


Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética



MSc. Erienne Jackson

Dirección de Tesis: Dra. Lorena Betancor y Prof. Dr. José Manuel Guisán
Dirección académica: Prof. Dr. Francisco Batista

Realizada en el marco del programa de Doctorado en Química, Facultad de
Química, Universidad de la República y PEDECIBA Química
12/2015-06/2019

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

Resumen

El glicerol es un subproducto inevitable de la producción de biodiésel. Una gran cantidad de este producto es generado durante la transesterificación de grasas y aceites con alcohol. El exceso de oferta y la limitada demanda de este producto afectan directamente los costos de producción del biodiésel. Sin embargo, el glicerol puede ser convertido a productos de más alto valor agregado mediante procesos puramente químicos o mediante biotransformaciones. Los bioprocesos verdes, tales como las reacciones biocatalíticas, son capaces de modificar selectivamente sustratos polifuncionales debido a su alta eficiencia catalítica, selectividad inherente y fácil o nulo procesamiento *downstream*. Además, las biotransformaciones se realizan bajo condiciones suaves con menores requerimientos energéticos, ofreciendo tecnologías medioambientalmente limpias. Las nuevas tendencias en bioconversiones marcan el acoplamiento de procesos biocatalíticos enzimáticos a procesos fermentativos como una solución de gran potencial en la biosíntesis secuencial de productos biotecnológicos. En esta tesis se propuso una ruta biosintética mixta novedosa para la síntesis de ácido L-láctico a partir de glicerol crudo, subproducto de la industria del biodiésel. Nuestro enfoque incluyó el uso de biocatalizadores inmovilizados microbiológicos y enzimáticos mediante estrategias que aportaron estabilidad y la posibilidad de reutilización en aras de conversiones más verdes y económicas.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi tutora Lorena Betancor por aceptarme para realizar esta tesis de doctorado bajo su dirección. Por su apoyo y confianza en mi trabajo, su tiempo y energía dedicada al desarrollo de esta tesis y en el avance de mi carrera profesional.

A mi cotutor José M. Guisan, por los valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo.

A mi tutor académico, Francisco Batista por su disponibilidad y apoyo a lo largo de este proceso y en la selección de los cursos que fueron indispensables para mi formación.

A Carlos Sanguinetti, por permitirme ser parte del equipo de Biotec.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, en particular a Magdalena Ripoll y Sebastián Rodríguez.

A Jorge Trelles por abrirme las puertas de su laboratorio y ayudarnos con el avance de la tesis.

A ANII por la financiación de la beca de posgrado nacional. A ANII, Pedeciba Química y Universidad ORT por la financiación de la estancia de investigación en el Laboratorio de Biotecnología Sustentable de la Universidad de Quilmes, Argentina.

A mi familia y amigos que me acompañan y apoyan siempre.

A Rodrigo, por su apoyo incondicional y su paciencia.

Índice

Índice.....	1
Abreviaturas.....	3
Introducción general.....	4
Biocatálisis y biotransformaciones.....	5
El glicerol crudo producto de la industria de biocombustibles.....	6
El ácido L-láctico.....	7
Hipótesis de trabajo.....	8
Objetivos.....	11
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Capítulo 1 Glicerol como sustrato en biotransformaciones.....	13
Introducción.....	14
Transformación de glicerol.....	14
Bioconversiones de glicerol mediante bacterias del género <i>Gluconobacter</i>	17
Inmovilización de células.....	21
Objetivos específicos.....	24
Materiales y Metodología.....	25
Materiales.....	25
Metodología.....	25
Resultados y discusión.....	31
Biotransformación de glicerol puro a DHA y GA con células en reposo de <i>Gluconobacter</i>	31
Biotransformación de glicerol crudo a DHA y GA con células en reposo de <i>Gluconobacter</i>	38
Conversión a GA y DHA con microorganismos inmovilizados.....	44
Capítulo 2 Preparación de biocatalizadores enzimáticos.....	49
Introducción.....	50
Biocatalizadores enzimáticos inmovilizados.....	50
Biocatalizadores enzimáticos estudiados.....	59
Objetivos específicos.....	62
Materiales y metodología.....	63

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson	
Materiales	63
Metodología	63
Resultados y discusión	74
Expresión y purificación de la enzima dihidroxiácido dehidratasa (DHAD)	74
Preparación del catalizador enzimático inmovilizado de TA.....	83
Preparación del biocatalizador bi-enzimático: LDH:FDH	91
Capítulo 3 Acoplamiento de biocatalizadores para la obtención de ácido L-láctico	97
Introducción	98
Cascadas biocatalíticas.....	98
Bioconversión de glicerol crudo.....	103
Ácido L-láctico	103
Objetivos específicos.....	105
Materiales y metodología	106
Materiales	106
Metodología	106
Conversión de DHA en piruvato con TA soluble e inmovilizada	106
Conversión de DHA en L-láctico con TA, LDH y FDH solubles	106
Conversión de glicerol crudo en L-láctico con G. oxydans, TA, LDH y FDH inmovilizados	106
Análisis por HPLC, NMR y GC-MS	107
Resultados y discusión	108
Conversión de DHA con biocatalizadores enzimáticos en solución.....	108
Conversión de glicerol crudo a ácido L-láctico mediante el acoplamiento de biocatalizadores inmovilizados	112
Conclusiones generales.....	118
Referencias bibliográficas	123
Anexo	138
Curva estándar de BSA con método del ácido bicinconínico.....	138
Análisis de estándares de glicerol, DHA, GA y piruvato por HPLC obtenidos mediante separación en columna Aminex® HPX-87C 300 x 7.8 mm.	138
Análisis de estándares de piruvato y ácido L-láctico por HPLC obtenidos mediante separación en columna Ultra RP C18 250 X 4,6 mm.	140
Producción	141

Abreviaturas

%I Porcentaje de inmovilización

%R Porcentaje de rendimiento

BCA Ácido bicinconínico

BSA Seroalbúmina Bovina

DHA Dihidroxiacetona

DHAD Dihidroxiácido dehidratasa

DTT Ditiotreitól

E. coli Escherichia coli

EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético

FDH Formiato deshidrogenasa

GA Ácido glicérico

HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

His Histidina

L-LDH L-lactato deshidrogenasa

MgCl₂ Cloruro de magnesio

NaCl Cloruro de sodio

NAD⁺ Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

NADH Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)

PEI Polietilenimina

PLP Piridoxal fosfato

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TA Transaminasa

TMOS Tetrametil ortosilicato

UI Unidades internacionales de enzima

Introducción general

Biocatálisis y biotransformaciones

La biocatálisis y las biotransformaciones comprenden el uso de microorganismos o enzimas para acelerar conversiones químicas. En las últimas décadas los aportes de la ciencia en este campo han aumentado notoriamente la disponibilidad de aplicaciones biocatalíticas [1]. Se han reportado una serie de microorganismos y enzimas capaces de llevar a cabo conversiones con elevada enantio, quimio y regioselectividad en una amplia gama de condiciones de reacción [2,3]. Dicha selectividad es extremadamente deseable en las industrias química y farmacéutica, ya que ofrece ventajas tales como minimizar las reacciones secundarias, no requiere pasos de protección y desprotección y, por lo tanto, permite la síntesis en menos etapas. En este contexto, los biocatalizadores tienen muchas características atractivas para las áreas de la química verde y el desarrollo sostenible ya que proporcionan una tecnología más amigable con el medio ambiente, generalmente trabajando en condiciones acuosas a temperatura ambiente y presión atmosférica e incluso disminuyendo la generación de desechos.

Las bioconversiones utilizando células, ya sea de fuentes naturales o genéticamente modificadas tienen la ventaja de ser, en general, de bajo costo. Los catalizadores involucrados se encuentran estabilizados en el interior celular y no requieren del agregado exógeno de cofactores ya que cuentan con la maquinaria para sintetizarlo y además regenerarlo [4]. Se pueden ver facilitadas además las reacciones en cadena ya que permiten la co-expresión de múltiples enzimas que pueden actuar de manera concertada en un espacio confinado. Sin embargo, esto puede también resultar en una carga metabólica demasiado alta para la célula lo que disminuye la eficiencia de la conversión.

La biocatálisis enzimática, por otro lado, implica el uso de proteínas catalíticas muy selectivas lo que reduce la formación de subproductos por reacciones colaterales [5].

Las herramientas modernas de ingeniería, producción y descubrimiento de proteínas así como los avances en biología molecular y estructural, facilitan el desarrollo de catalizadores y su diseño a medida para integrarlos en procesos industriales [3,6].

Su uso industrial se ha incrementado en las últimas décadas, principalmente en el área farmacéutica, alimenticia, cosmética, desarrollo de biocombustibles, entre otros [7,8]

Sin embargo, las condiciones de operación de las enzimas pueden ser acotadas. En particular, enzimas aisladas de fuentes naturales a menudo son muy eficientes en sus condiciones nativas (de pH y temperatura) pero pueden ser inestables en condiciones no naturales como las requeridas en bioprocesos industriales (pH y temperatura extremos, baja actividad del agua, sustratos no naturales, entre otros) [8,9].

Continuamente los nuevos desarrollos en el área de la genómica, ingeniería y tecnología de proteínas, ofrecen la posibilidad de modificar y crear nuevas enzimas capaces de llevar a cabo una creciente variedad de reacciones [10,11].

Las ventajas y desventajas del uso de células y enzimas libres en bioconversiones serán discutidas en mayor profundidad en el capítulo 3.

El glicerol crudo producto de la industria de biocombustibles

El biodiesel constituye una alternativa a los combustibles fósiles tradicionales ya que logra una *performance* similar que los combustibles convencionales y menores emisiones de monóxido de carbono, óxidos de azufre y material particulado fino con respecto al diésel derivado del petróleo [12]. Su condición de biodegradable y su baja toxicidad para los humanos, sumado a una mayor durabilidad de los motores que lo utilizan, lo convierten en una opción altamente deseable para lograr un desarrollo sostenible [13]. Se pronostica que la producción mundial de biodiesel alcanzará casi 39 mil millones de litros para 2024; el volumen de producción proyectado de biodiesel es estable y está impulsado principalmente por políticas relacionadas a su uso [14]. En particular, Uruguay cuenta con una ley de promoción de los biocombustibles que establece el corte obligatorio de nafta y diésel con combustibles renovables. En Uruguay, Alur SA ha montado dos plantas de biodiesel con capacidad de producción de hasta 80000 toneladas por año. Respecto del biodiésel, la compañía lleva adelante un programa de siembras con agricultores, que contempla unas 15.000 ha de colza, 10.000 de girasol y 15.000 de soja. La apuesta país por los combustibles alternativos se ha evidenciado además por un incremento constante en las inversiones desde el año 2009.

El glicerol crudo es un subproducto de bajo valor que se obtiene inevitablemente de la producción de biodiésel. Una gran cantidad de este producto es generado durante la transesterificación de grasas y aceites con alcohol. Su composición es significativamente diferente de la del glicerol puro. El glicerol crudo usualmente contiene varias impurezas, como agua, metanol, jabón, ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos [15]. Alur genera más de 2.000 toneladas de glicerol crudo por año, constituido principalmente por glicerol (aprox. 50-65%), agua y ácidos grasos. La empresa está desarrollando fuertemente la exportación de glicerina cruda a Alemania. Sin embargo, el valor de mercado del glicerol de purzas menores a 90% es significativamente bajo dado sus limitadas aplicaciones directas. El glicerol crudo se utiliza principalmente en la alimentación animal directa, con fines no químicos o en biotecnología, principalmente en crecimiento y conversiones microbianas [16,17].

Las grandes cantidades de glicerol crudo producidas cada año han impactado al mercado del glicerol, lo que resulta en precios bajos del mismo tanto puro como crudo. La producción mundial de glicerol se estima que alcanzará 4,200,000 toneladas en 2020 mientras que el mercado existente para sus aplicaciones se estima en 1,000,000 toneladas al año [18]. Se han dedicado esfuerzos a encontrar aplicaciones para convertir el glicerol crudo en productos de alto valor, como biocombustibles, productos químicos, polímeros y alimentos para animales, para mejorar la viabilidad económica de la industria del biodiesel y superar los desafíos ambientales asociados con la eliminación del glicerol crudo. Esto se ha logrado a través de vías biológicas o químicas [19], las mismas son discutidas en mayor profundidad en el capítulo 1 de esta tesis.

El ácido L-láctico

El ácido láctico, así como sus derivados (sales y ésteres) son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, textil, agrícola, alimenticia y química [20].

Uruguay importa alrededor de 362 mil kilogramos netos anuales de ácido láctico proveniente de Brasil, Holanda, China, Alemania, Bélgica, Argentina y México. Actualmente el kilogramo de ácido láctico de calidad para la industria farmacéutica llega a alcanzar los 65 dólares. Un análisis de los requerimientos de ác. láctico del país, indicó

importaciones del producto por valor de USD 500.000 en el último año (www.pencatransaction.com). En el mismo período, no hubo exportaciones del producto desde Uruguay. Entre los países de origen de las importaciones uruguayas se encuentran Argentina y Brasil que, a pesar de ser productores de este producto, importan 4,7 y 6,7 millones de USD anuales respectivamente. Estos datos indican una demanda nacional y regional insatisfecha y generan una oportunidad para la comercialización del producto.

La síntesis de ácido láctico a nivel industrial se realiza principalmente mediante transformaciones microbianas y síntesis química [21]. Estos procesos no siempre son eficientes en términos de enantioselectividad o rendimiento, además de ser poco amigables con el medio ambiente ya que muchas veces generan residuos tóxicos y tienen altos requerimientos energéticos. La síntesis química da lugar a mezclas racémicas de ácido D/L-láctico mientras que los productos enantioméricamente puros, mucho más costosos, pueden obtenerse mediante transformación microbiana. Actualmente, aproximadamente el 90% de ácido láctico es producido por esta estrategia. En este caso se requieren etapas de purificación que encarecen el proceso, las mismas incluyen etapas de hidrólisis, esterificación, y la destilación. Generalmente se forman subproductos tales como el etanol y el ácido acético [22]. Por lo tanto, ambos procesos a pesar de que suelen ser eficientes, producen una alta cantidad de desechos inutilizables y productos secundarios, requieren largos tiempos de reacción y en general requieren de un proceso de purificación del isómero deseado [21].

Es por esta razón que continúa siendo pertinente la búsqueda de estrategias verdes y eficientes para la síntesis de L-láctico.

Hipótesis de trabajo

Basándonos en los antecedentes previamente mencionados, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo: Es posible desarrollar una cascada de biocatalizadores inmovilizados para producir ácido L-láctico a partir de glicerol crudo.

Para demostrar esta hipótesis se planteó la siguiente cascada (Figura).

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

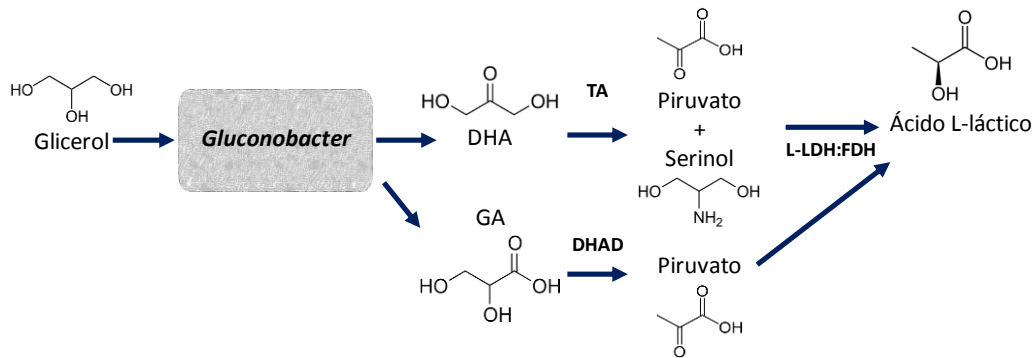


Figura: Esquema de la cascada biocatalítica planteada. DHA, dihidroxiacetona, GA, ácido glicérico, TA, transaminasa, DHAD, dihidroxiácido deshidratasa, L-LDH, L lactato deshidrogenasa, FDH, formiato deshidrogenasa.

El primer paso de la cascada implica la conversión de glicerol crudo a dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA). En este contexto, el género *Gluconobacter* comprende algunos de los microorganismos más utilizados en aplicaciones biotecnológicas y ya se han reportado cepas capaces de convertir GA y DHA a partir de glicerol crudo [23,24].

La inmovilización de especies de *Gluconobacter* se presenta en la literatura casi exclusivamente restringida a su uso en biosensores. La aplicación de este microorganismo inmovilizado en reacciones de bioconversión es escasa [25–27]. La novedad de nuestro enfoque incluirá el uso de cepas mutantes de *Gluconobacter* inmovilizadas, que podría mejorar la estabilidad de los biocatalizadores. Evaluaremos el atrapamiento en geles ya que esta estrategia es ampliamente utilizada en la inmovilización de células, proporcionando factibilidad en el escalado del proceso y reusabilidad del biocatalizador con alta estabilidad operacional. Los estudios planteados en este trabajo de inmovilización resultarán de interés no solo para la conversión de glicerol a GA y DHA sino también para otras transformaciones catalizadas por este microorganismo.

Luego de este primer paso, se propone una secuencia enzimática de dos pasos libres de células para la síntesis de ácido L-láctico. Se propone la utilización de todos los biocatalizadores enzimáticos en forma inmovilizada.

Una vez obtenido el GA de la conversión con *Gluconobacter*, utilizaremos una dihidroxiácido deshidratasa (DHAD) recombinante de *E. coli* para transformar el GA en ácido pirúvico y una transaminasa (TA) recombinante de *E. coli* para transformar DHA y L-alá en serinol y ácido pirúvico.

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

El último paso de la cascada implica el acoplamiento a un sistema enzimático co-inmovilizado de L-lactato deshidrogenasa (LDH) y formiato deshidrogenasa (FDH) que producirá ácido L-láctico a partir del piruvato sintetizado con CO_2 y H_2O como subproductos.

Objetivos

Objetivo general

Tal como se ha comentado en la introducción, el glicerol crudo es un subproducto de la industria de biocombustibles cuya oferta excede ampliamente su demanda, lo que afecta directamente su valor de mercado. Con el aumento progresivo de la producción de biodiesel a nivel mundial, nuevas estrategias que utilicen el glicerol crudo para la generación de moléculas de mayor valor agregado podrían mejorar la ecuación económica de la industria de biocombustibles.

En este trabajo se utilizarán biocatalizadores celulares y enzimáticos acoplados para la síntesis de ácido L-láctico utilizando glicerol crudo en el proceso.

Los biocatalizadores implicados en este sistema presentan diversidad en su complejidad estructural y propiedades catalíticas. Sin embargo, su naturaleza inherentemente lábil, justifica los esfuerzos por estabilizarlos.

El objetivo general de este trabajo es el acoplamiento de preparaciones inmovilizadas activas y estables de células y enzimas capaces de catalizar *in vitro* la conversión en cascada de glicerol crudo en ácido L-láctico.

Objetivos específicos

- Estudiar la transformación biológica del glicerol tanto puro como crudo en ácido glicérico (GA) y dihidroxiacetona (DHA) utilizando células en reposo de *Gluconobacter frateurii* NBRC13465 y *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 en suspensión e inmovilizadas.
- Inmovilizar las enzimas dihidroxiácido dehidratasa (DHAD) y transaminasa (TA) para la estudiar la conversión de GA y DHA a piruvato.
- Acoplar el sistema de *Gluconobacter* con TA o DHAD para la síntesis de piruvato.
- Inmovilizar el sistema acoplado lactato deshidrogenasa (LDH) y formiato deshidrogenasa (FDH) para la conversión de piruvato a ácido L-láctico.
- Acoplar el sistema de *Gluconobacter* con TA, DHAD, LDH y FDH inmovilizados para la conversión de glicerol crudo y generación de ácido L láctico.

Capítulo 1

Glicerol como sustrato en biotransformaciones

Introducción

Transformación de glicerol

El glicerol crudo es un compuesto de bajo valor que se obtiene principalmente como subproducto en la producción de biodiesel. El mismo contiene una serie de impurezas, como agua, metanol, jabón, ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos, entre otros. Con aproximadamente 1 kg de glicerol crudo generado por cada 10 kg de biodiesel producido, las grandes cantidades producidas cada año han impactado su valor de mercado obteniéndose una muy baja ganancia al comercializarlo para aplicaciones de su uso directo como el pienso animal o combustible en hornos industriales [15,28]. En este contexto, se han dedicado esfuerzos para encontrar aplicaciones para convertir el glicerol crudo en productos de mayor valor, como el glicerol de alta pureza, biocombustibles, productos químicos, polímeros y alimentos para animales, para mejorar la viabilidad económica de la industria del biodiesel y reducir los impactos ambientales asociados al descarte del mismo. Según reportes recientes, el valor de mercado del kilogramo del glicerol crudo (hasta 80%) y puro rondan los 0,24 y 0,9 USD respectivamente [29]. El glicerol puro se puede convertir en varios productos de valor agregado, actualmente existen varios reportes referentes a esta temática. Sin embargo, esta ruta puede no ser económicamente viable para los productores de biodiesel pequeños o medianos debido al alto costo de los procesos de refinación. El traslado de glicerol crudo a una refinería de glicerol se hace viable cuando un grupo de plantas de biodiesel están ubicadas dentro de un área limitada. Por lo tanto, la conversión directa de glicerol crudo a productos de alto valor agregado resulta en procesos más rentables en comparación al uso de una materia prima refinada (Figura 1) [14].

La transformación directa del glicerol a productos de mayor valor agregado ha sido abarcada tanto por estrategias químicas como biológicas para la producción de una amplia variedad de moléculas, tales como el butanol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, ácido cítrico, dihidroxiacetona, lípidos, poli hidroxialcanoatos, acroleína, monoglicéridos, poliglicerol, polioles, aceites biológicos, entre otros (Figura 2) [19,30–32]. Estos productos químicos y polímeros tienen aplicaciones extensas como

biocombustibles, aditivos para combustibles, detergentes, materiales poliméricos y otros usos.

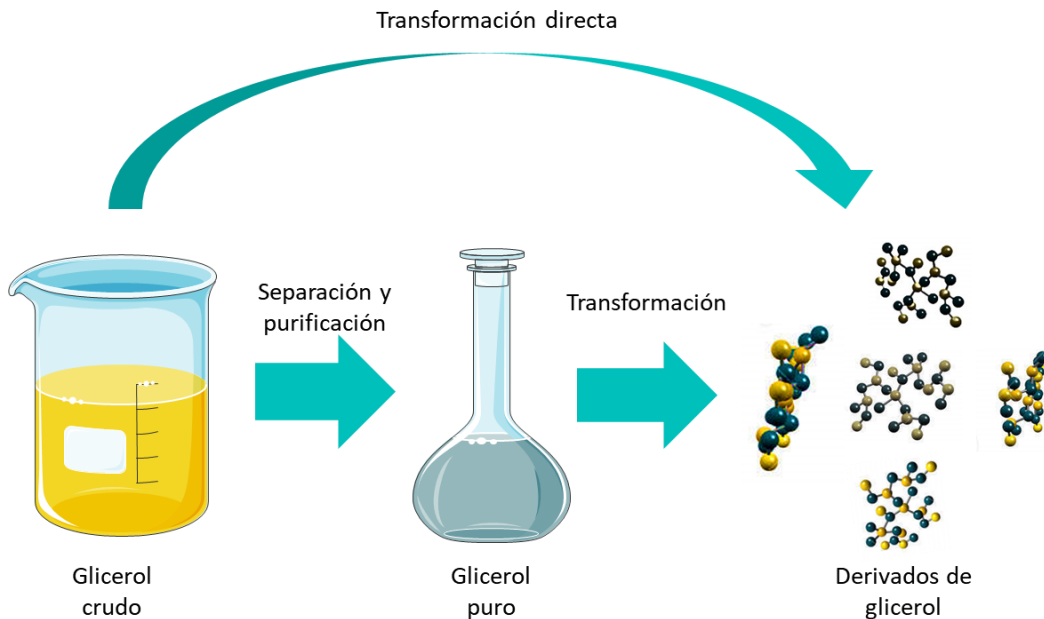


Figura 1: Transformación de glicerol crudo y puro. Figura tomada y modificada de Kong y cols. 2016 [14].

La transformación directa de glicerol crudo a través de rutas químicas a una serie de compuestos ha sido reportada, algunos de los cuales incluso se encuentran disponibles a nivel comercial [14,33]. Este tipo de procesos implican condiciones extremas de reacción y la utilización de catalizadores químicos por lo que generalmente tienen un alto impacto ambiental. Entre los productos obtenidos por conversiones químicas, la triacetina, un aceite transparente de grado alimenticio, se obtiene a partir de glicerol crudo y ácido acético sin el empleo de un catalizador [34]. Otro producto obtenido a través de una conversión química convencional es el (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4il) metil acetato, utilizado como aditivo que aporta viscosidad al biodiesel [15].

La acroleína, otro producto de transformación del glicerol, puede utilizarse como bloque de construcción para la producción de detergentes, polímeros de ésteres de ácido acrílico y polímeros superabsorbentes [15]. Otra alternativa de revalorización del glicerol crudo de la industria del biodiesel es la producción de gas hidrógeno, proceso que se está estudiando actualmente en Uruguay por Veiga y colaboradores [35,36]. Esta reacción requiere catalizadores, temperaturas que oscilan entre los 450 °C y 650 °C

dependiendo del proceso y da como resultado una mezcla gaseosa rica cuyos mayores componentes son H₂, CO₂ y CO.

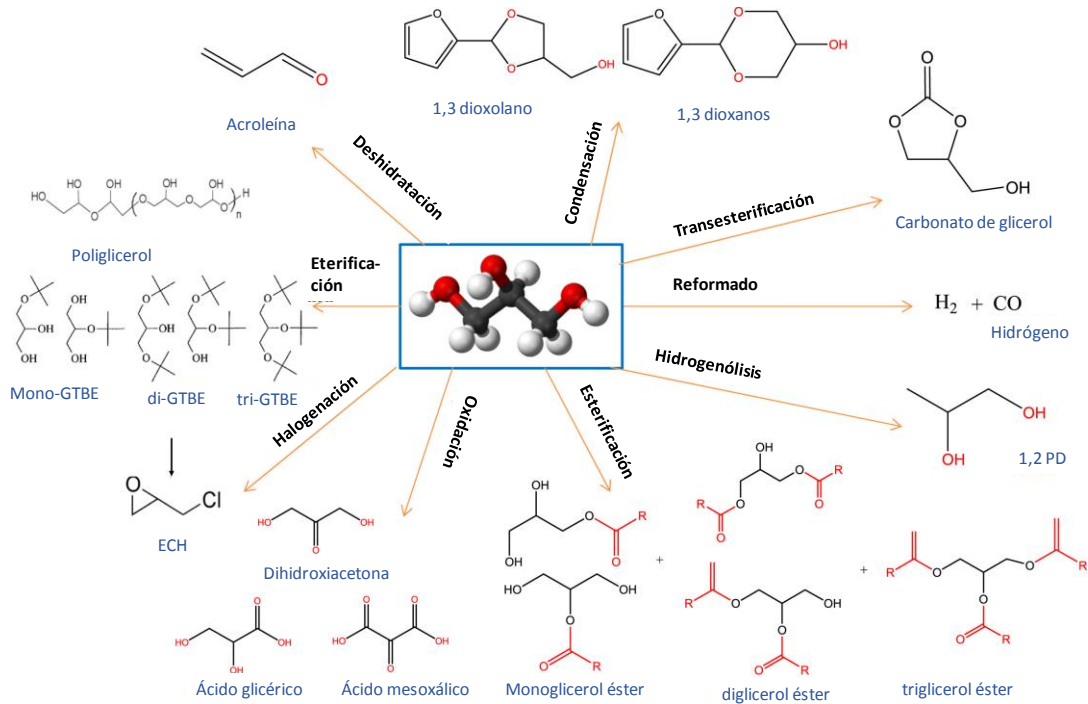


Figura 2: Posibles derivados de glicerol a través de diferentes vías. Tomado y modificado de [14].

Existen numerosos ejemplos en la literatura sobre la conversión microbológica del glicerol. En general los trabajos reportados se basan en la conversión biológica mientras las bacterias crecen en medio de cultivo [37–39].

Entre estos procesos se encuentra el 1,3 propanodiol que es obtenido utilizando como catalizadores especies anaerobias de la familia *Enterobacteriaceae*. Este compuesto sirve como monómero para la producción de polímeros fotoestables y es utilizado en las industrias química, alimenticia y farmacéutica [40]. Otro compuesto obtenido a partir del glicerol crudo es el ácido cítrico, utilizando como catalizador la bacteria *Yarrowia lipolytica* [15]. Este ácido es de importancia en las industrias química, farmacéutica, alimenticia y agropecuaria [40]. También es posible la producción de hidrógeno por parte de *Rhodospseudomonas palustris*, a través de reacciones de conversión fotofermentativa del glicerol crudo [15]. La producción de bioplásticos, como los polihidroxicanoatos (PHAs) por parte de especies como *Cupriavidus necator*, *Zobellella denitrificans* y *Pseudomonas oleovorans* es otro ejemplo de la gran variedad de productos que se pueden obtener a partir de la bioconversión del glicerol crudo [15,40].

En este contexto, al trabajar con microorganismos en crecimiento, pueden generarse metabolitos no deseados o productos de reacciones secundarias que contaminen el sistema. Por lo tanto, resulta de interés minimizar este tipo de reacciones. El uso de células en reposo, es decir, células suspendidas en medio de reacción sin medio de crecimiento, puede proporcionar varias ventajas operativas al disminuir significativamente la complejidad del sistema facilitando la purificación posterior del producto químico objetivo y, por lo tanto, disminuyendo las demandas económicas de la biotransformación [41,42]. Las células en reposo (también conocidas como *resting cells*) no se encuentran en crecimiento, pero están metabólicamente activas. Por esta razón tienen un gran potencial en biotransformaciones ya que no necesitan gastar su energía en la producción de biomasa [43].

Como se ha mencionado, en los últimos años se han reportado una serie de microorganismos capaces de metabolizar el glicerol de manera tanto aerobia como anaerobia, entre ellos pueden destacarse *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Candida*, *Aspergillus* y *Gluconobacter*. Estas cepas han sido estudiadas en el proceso de conversión de glicerol a través de reacciones con células en crecimiento o en reposo, tanto libres como inmovilizadas.

Esta sección del trabajo se centra en la conversión biológica del glicerol puro y crudo por bacterias del género *Gluconobacter* como primera etapa en la transformación hacia ácido L-láctico.

Bioconversiones de glicerol mediante bacterias del género *Gluconobacter*

El género *Gluconobacter* pertenece a la familia *Acetobacteraceae*. La misma se puede encontrar en la naturaleza en flores, tierra de jardín, miel de abeja, frutas, sidra, cerveza, vino y vinagre de vino [44]. Las especies del género *Gluconobacter* han mostrado no tener efectos patogénicos ni para el hombre ni para otros animales [45]. Este género está constituido por bacterias del ácido acético con forma de bastones, Gram negativas que no forman endosporas. Son aerobias obligatorias, teniendo un metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno como aceptor final de electrones. Su

temperatura óptima de crecimiento está entre los 25 °C y 30 °C y su pH óptimo de crecimiento es de 5,5.

Al igual que múltiples especies de bacterias del ácido acético, las bacterias del género *Gluconobacter* son capaces de la oxidación incompleta de carbohidratos y alcoholes a aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos.

Este género es de gran importancia en la industria para la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol, ácido D-glucónico, ácido 5 - ceto - y 2 - cetoglucónico a partir de D-glucosa; y dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA) a partir de glicerol [45].

En este trabajo nos enfocaremos en dos productos generados por la vía oxidativa del metabolismo del glicerol en especies de *Gluconobacter* : GA y DHA (Figura 3) [40,46].

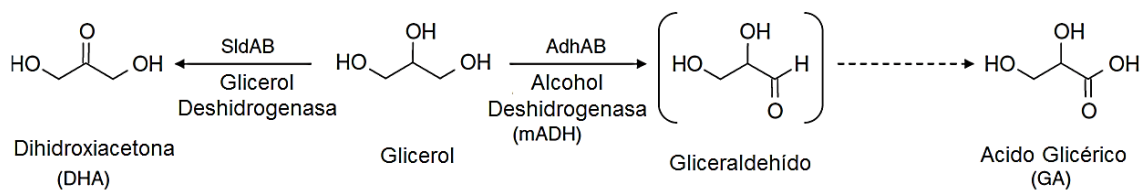


Figura 3: Vías para la formación de GA y DHA a partir de glicerol por *Gluconobacter* spp. La flecha discontinua indica una reacción enzimática no identificada en la formación de GA. AdhAB, alcohol deshidrogenasa asociada a la membrana, denominada mADH; SldAB, glicerol deshidrogenasa asociada a la membrana, denominada SLDH o GLDH. Adaptado de Sato y colaboradores [47].

Se encuentra reportada la oxidación de glicerol por estrategias químicas, esta es una reacción relativamente compleja, que está muy afectada por la selectividad del catalizador [14]. A su vez, la DHA y el GA pueden obtenerse a través de la ruta de oxidación catalítica en presencia de catalizadores metálicos, como paladio, platino, oro y catalizadores de paladio soportado por bismuto, sin embargo las productividades obtenidas no superan las alcanzadas en la oxidación biológica de este compuesto [14].

Bioconversión de glicerol a DHA

La DHA (1,3-dihidroxi-2-propanona, $C_3H_6O_3$) es una cetotriosa que se produce a través de la oxidación del grupo OH secundario del glicerol [40]. Este proceso de oxidación microbiana requiere largas horas de operación, independientemente de su alta conversión y selectividad [14]. Su peso molecular es de 90,08 g/mol y su punto de fusión

se encuentra entre los 75 °C y 80 °C. Es un polvo blanco, higroscópico con sabor dulce y aroma característico. La misma no posee centros quirales ni muestra actividad óptica [48]. Es un producto químico comercializable con mayor valor al del glicerol crudo y actualmente se produce a nivel mundial a través de procesos biotecnológicos (Global and Chinese 1, 3 Dihydroxyacetone Market, 2018. Estudio realizado por Zion Market research).

La DHA se usa ampliamente como un precursor para la síntesis de químicos finos como 1,2-propilenglicol, ácido láctico, metotrexato, tensioactivos, entre otros, en la industria química [40]. En la industria farmacéutica, como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades de la piel como la leucoderma y la porfiria variegata [48] y en la industria cosmética, como un ingrediente activo en productos de bronceado sin sol. Además, en la industria alimenticia se utiliza en la elaboración de vinos y en suplementos nutricionales [15,26,49].

Debido a la estricta regulación de los productos cosméticos y alimenticios es que actualmente no se produce DHA comercialmente a través de la oxidación catalítica química [50,51]. La creciente demanda de DHA en los últimos años ha promovido un flujo de investigaciones y estudios sobre el desarrollo de su producción. Esto sumado a los altos precios sostenidos de DHA, abren la ruta para el desarrollo de procesos de producción nuevos o mejorados.

Los métodos de bioconversión de glicerol a DHA actualmente consisten en la oxidación parcial de glicerol mediante cepas seleccionadas de bacterias de ácido acético como *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter melanogenus*, y *Acetobacter xylinum*. Estas cepas se caracterizan por presentar una alta actividad de glicerol deshidrogenasa (GDH), enzima que cataliza esa reacción (Figura 3) [48].

En *Gluconobacter*, el sitio activo de la enzima GDH está orientado hacia el periplasma. Por lo tanto, la oxidación del glicerol tiene lugar en el espacio periplásmico sin necesidad de entrar en el citoplasma. Esto facilita la liberación y la acumulación de DHA en el medio. A su vez, la alta concentración tanto de glicerol como de DHA pueden inhibir el crecimiento celular y la bioconversión a DHA, lo que conduce a un bajo rendimiento y productividad de la misma [52].

Bioconversión de glicerol a GA

El ácido glicérico (ácido 2,3-dihidroxiopropiónico, $C_3H_6O_4$) se encuentra naturalmente como un componente fitoquímico quiral en una gran variedad de plantas, tales como maní, alcachofa, manzana y uva [40]. El GA también está presente en el cuerpo humano como un metabolito, formado como un producto de la ruptura de la fructosa. A su vez, sus derivados fosfato son intermediarios importantes en la vía glicolítica. Con excepción de pocas propiedades como su peso molecular de 106,08 g/mol, su pKa de 3,5, y su completa miscibilidad en agua, los datos sobre las propiedades fisiológicas y químicas de GA son escasos [46].

Existen varias patentes que implican la aplicación de GA como materia prima para productos químicos, farmacéuticos y cosméticos. En particular, se ha reportado que este compuesto y sus derivados presentan actividad biológica, estimulando la actividad colessterolítica en perros y acelerando la eliminación de etanol y la oxidación del acetaldehído en ratas y como monómero con otros ácidos hidrocarboxílicos, resulta en polímeros que pueden ser aplicables como sistemas de *delivery* drogas [23,46]. Aunque el mercado industrial requiere menos de este producto en comparación con la DHA, el GA es tradicionalmente obtenido por estrategias de oxidación química y su producción biocatalítica ha surgido recientemente. La bibliografía aún se encuentra acumulando mejoras en los procesos que proporcionen ventajas económicas de la biotecnología sobre el proceso de producción química.

Químicamente el GA se sintetiza por oxidación selectiva del grupo alcohólico primario del glicerol por catalizadores heterogéneos de paladio (Pd), platino (Pt) y oro (Au) soportados sobre carbono [14,40]. La quimioselectividad de los catalizadores es importante en el sentido de que la oxidación del grupo alcohol primario produce GA, mientras que la oxidación del grupo alcohol secundario forma la DHA. La mejor quimioselectividad se logra en condiciones básicas y en presencia de catalizadores de Au o Pd. La síntesis química no es la ruta preferida para la producción de GA, ya que el proceso no es favorable al medio ambiente, produciéndose altas concentraciones de ácidos minerales como subproductos [40].

La biosíntesis de GA se produce por oxidación aeróbica del glicerol por bacterias pertenecientes a la familia del ácido acético. Estos son *Gluconobacter*, *Acetobacter* y

Gluconacetobacter [40]. El GA fue originalmente conocido como un subproducto de la producción de DHA a partir de glicerol por *G. oxydans*, pero poco trabajo se ha centrado en la producción biotecnológica de GA como un compuesto objetivo [46].

La bioquímica de la producción de GA no ha sido estudiada en detalle aún. Sin embargo, está reportado que uno de los primeros pasos de la conversión de glicerol a gliceraldehído, para su posterior transformación a GA, está catalizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (mADH) (Figura 3) [47]. Sato y colaboradores han observado que una delección en el gen *adhA* (que codifica para la enzima mADH) en una cepa *G. oxydans* resulta en una pérdida total en la producción de GA por parte de esta bacteria, indicando que es una enzima clave en la vía de síntesis de GA [47]. Existen algunas diferencias entre la síntesis química y biológica del GA. La síntesis química de GA siempre produce una mezcla racémica de D y L- GA, mientras que la síntesis biológica preferentemente produce la forma D en exceso enantiomérico sobre la forma L [40]. Un estudio reciente ha demostrado que *Gluconobacter frateurii* es la cepa con mayor potencial para la producción de D-GA [53,54]. También se han obtenidos buenos rendimientos utilizando *Gluconobacter sp* 3259 [46].

Inmovilización de células

La inmovilización es una herramienta ampliamente reportada que se puede aplicar tanto para enzimas como para células.

La inmovilización de células puede definirse como el confinamiento de la célula en una zona definida, manteniendo su actividad catalítica e, idealmente, la viabilidad celular [42,55]. En esta situación, el paso limitante de la conversión estará determinado por la transferencia de masa de sustratos y/o productos, ya que la acumulación de los mismos puede causar inhibición [42,56].

En un escenario ideal, al inmovilizar células se apunta a que el biocatalizador pueda separarse fácilmente de la reacción, se pueda reutilizar, reduciendo los costos operativos, o se pueda facilitar el uso de reactores de flujo continuo [41,56].

Además, pueden presentarse otras ventajas como el aumento de productividad, aumento en la estabilidad celular, protección de células lábiles frente al medio de

reacción y en caso de trabajar con células en condiciones de no crecimiento (en reposo), se produce un menor número de reacciones secundarias [56].

Las desventajas que pueden asociarse a la inmovilización de células son los costos adicionales, las limitaciones de difusión que pueden causar una disminución en la cinética de la reacción, la disminución de la viabilidad celular durante inmovilización y el desgaste de la matriz de inmovilización durante su uso en biorreactores [42,57].

Estrategias y matrices de inmovilización

Actualmente se encuentran reportadas una gran variedad de estrategias y matrices para la inmovilización de células. La selección de una matriz de inmovilización a ser utilizada a mayor escala se realiza teniendo presente tanto el costo de la matriz, así como su estabilidad de almacenamiento y el protocolo de descarte luego de su uso [42].

En este contexto, existen numerosos soportes tanto orgánicos como inorgánicos para la inmovilización de células, ejemplos de los mismos son los hidrogeles iónicos, las espumas de poliuretano, las matrices sol-gel, los geles sintéticos y los termogeles de agar y agarosa [41,42].

A su vez, las metodologías de inmovilización en estos soportes incluyen la adsorción o la unión covalente en superficies sólidas, el entrecruzamiento entre células y polímeros, y el atrapamiento en una matriz porosa. Otras variaciones de inmovilización se han desarrollado combinando estos métodos originales [58].

La Inmovilización de células por adsorción se basa en interacciones electrostáticas (fuerzas de van der Waals) o enlaces físico-químicos entre el soporte y la célula. Al no existir una barrera entre las células y el medio de conversión, las células pueden liberarse y re adsorberse generando un equilibrio entre células libres e inmovilizadas. Esto puede evitarse mediante el uso de técnicas de entrecruzamiento post-inmovilización o generando las condiciones propicias para que se genere un *biofilm* de células sobre el soporte donde las mismas quedan atrapadas dentro de la matriz de polímeros extracelulares que secretan [59].

La unión covalente, se basa en la formación de enlace covalentes entre el soporte activado y las células. En este caso la desorción de material celular puede darse por muerte celular debido a las condiciones de la reacción.

La Inmovilización de células por atrapamiento o encapsulación implica recubrir o atrapar células dentro de un material polimérico para producir perlas que son permeables a los solutos de la reacción [60,61].

Dentro de los tipos de matrices ya mencionadas, el atrapamiento de células se encuentra reportado principalmente en hidrogeles iónicos como el alginato de calcio, polímeros sintéticos como poliacrilamida, alcohol polivinílico y poliuretano y termogeles como agar, agarosa o celulosa.

En este trabajo se utilizó agar como matriz de inmovilización para *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter frateurii* en perlas de agar.

La agarosa, que es el componente principal del agar (junto con la agarpectina), es un polisacárido no ramificado compuesto de L-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa (con un porcentaje muy bajo de grupos sulfónicos), que se obtiene de la pared celular de algunas algas *Rhodophyceae*, principalmente del género *Gelidium* y *Gracilaria* [62]. El mismo es líquido a temperaturas mayores a 85 °C y que se gelifica cuando la temperatura disminuye por debajo de su punto de fusión (generalmente entre 32 °C y 43 °C). Sus mayores ventajas son su bajo costo y disponibilidad, aunque su uso está restringido por su temperatura de su fusión. [56,63]. Este tipo de compuestos provenientes de fuentes naturales tienen además una clara ventaja sobre los polímeros sintéticos que es la baja toxicidad de los componentes utilizados para la inmovilización de células vivas. Además, no presentan un riesgo biológico para su descarte. El agar ha sido utilizado durante décadas como componente de cultivos sólidos para microorganismos, por lo que su compatibilidad con los mismo ya se encuentra ampliamente demostrada.

Objetivos específicos

- Estudiar la transformación biológica del glicerol puro y crudo en GA y DHA utilizando células en reposo de *Gluconobacter frateurii* NBRC13465 y *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819.
- Inmovilizar cepas de *Gluconobacter frateurii* NBRC13465 y *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 en agar.
- Estudiar la conversión de glicerol a GA y DHA con células inmovilizadas.

Materiales y Metodología

Materiales

Las cepas liofilizadas de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 y *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 (en adelante *G. frateurii*, *G. oxydans*, respectivamente) fueron obtenidas del National Institute of Technology and Evaluation (NITE) (Tokio, Japón). El sorbitol y la D-Glucosa fueron obtenidos de Amresco (Ohio, EEUU). La peptona y el agar fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). El $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ fue obtenido de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El extracto de levadura fue de BD Biosciences (California, EEUU). El KH_2PO_4 fue obtenido de Emsure (Massachusetts, EEUU). El K_2HPO_4 fue obtenido de Dorwil (Buenos Aires, Argentina). El glicerol puro utilizado en las reacciones de conversión fue obtenido de Carlo Erba (Barcelona, España). El glicerol crudo producto del proceso de *splitting*, en adelante referido como glicerol crudo (Agua < 12%, cenizas < 7%, glicerol 70-80%, materia grasa < 1%, metanol < 5%, cloruros < 3%) fue donado por Alcoholes del Uruguay (ALUR). Los estándares para el HPLC fueron de grado analítico. La sal de ácido D-Glicérico fue obtenida de Sigma Aldrich (Misuri, EEUU) y la dihidroxiacetona fue obtenida de Merck (Darmstadt, Alemania). La columna Rezex RHM – Monosaccharide H+ (8%) y la precolumna con cartuchos Carbo-H 4 x 3.0 mm fueron obtenidas de Phenomenex (California, EEUU). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Métodología

Generación del stock de cepas de estudio

Se suspendieron bajo esterilidad las cepas de *Gluconobacter* liofilizadas en 500 μ L de medio líquido de recuperación según las indicaciones de NITE (sorbitol 50 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L, pH 6 ajustado con HCl). 500 μ L de la suspensión bacteriana fueron traspasados a un recipiente estéril conteniendo 3 mL de medio líquido de recuperación. Se plaquearon 250 μ L en medio sólido de recuperación (sorbitol 50 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L, agar 15 g/L, pH 6 ajustado con HCl), este

procedimiento se realizó por duplicado. Las placas se colocaron en estufa a 30 °C por 48 horas. Se realizó un cultivo líquido en medio de recuperación a partir de una única colonia y se creció 24 h a 30 °C. Se tomaron alícuotas de cada cepa y se almacenaron con 30 % de glicerol estéril a -80 °C.

Estudio de crecimiento bacteriano

Se prepararon precultivos a partir de colonias aisladas de *G. frateurii* y *G. oxydans*. Se inocularon 3 mL de medio con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y se incubaron durante 16 horas a 30° C y 210 rpm. Posteriormente, se inocularon matraces de 1 L con 250 mL de medio glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH₂PO₄ 0,9 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, pH 6) con 250 µL de precultivo de *G. frateurii* (DO600nm = 3) o 2,5 mL de *G. oxydans* (OD600nm = 0,6). Los mismos se incubaron durante 76 horas a 30 °C y 210 rpm. Se tomaron muestras periódicamente para medir DO600nm.

Las mediciones de peso seco se llevaron a cabo siguiendo una adaptación del protocolo establecido por Black y Nair [64]. Para esto, se inocularon matraces de 1 L que contenían 250 mL de medio de glicerol con precultivos de cada cepa y se incubaron a 30 °C y 210 rpm hasta alcanzar DO600nm = 3. Se prepararon diluciones a partir de los cultivos concentrados usando tampón de fosfato 30 mM (NaH₂PO₄ 4,14 g/L, K₂HPO₄ 5,23 g/L, pH 7,0) con un volumen final de 50 mL en tubos previamente pesados. Se obtuvieron suspensiones bacterianas con DO600nm de 0,4, 0,6, 1, 1,5, 2,5 y 3 por duplicado. Cada suspensión bacteriana se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante se descartó. Los precipitados celulares se lavaron con 5 mL de agua destilada y se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 5000 rpm. El agua de lavado se desechó luego y el precipitado celular se secó durante 48 horas en estufa a 60 °C. Los tubos que contenían los precipitados celulares secos se pesaron en la misma balanza analítica hasta que obtener un peso constante. Con estos datos se construyó la relación lineal de DO600nm en función de peso seco (g/L). Todas las mediciones de DO600nm se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro BioSpec-mini (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Preparación de inóculos para la bioconversión de glicerol

Se prepararon precultivos de 3 mL de medio con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,5) a partir de colonias aisladas de *G. frateurii* y *G. oxydans* y se incubaron durante 16 horas a 30° C y 210 rpm. Posteriormente, matraces de 1 L con 250 mL de medio suplementado con glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6) se inocularon con 250 μL de pre-cultivo de *G. frateurii* ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 3$) o con 2,5 mL de *G. oxydans* ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$) y se incubaron a 30 ° C y 210 rpm hasta llegar a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ en ambos casos. Se centrifugó por 15 minutos a 5000 rpm el volumen necesario para tener 2 o 20 mg de peso seco de células. El precipitado celular se lavó con tampón fosfato 30 mM para remover el medio de cultivo y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante.

Estudio de bioconversiones en diferentes etapas de crecimiento

Para llevar a cabo reacciones en 4 estadíos de crecimiento diferentes, se crecieron las células como se describe previamente y se colectan cuando los cultivos llegaron a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4, 1,0, 2,5 y 3,0 para exponencial temprana, exponencial media, exponencial tardía y fase estacionaria, respectivamente. Las conversiones se llevaron a cabo por duplicado a 30° C y 210 rpm durante 20 horas en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro (glicerol 50 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L) inoculados con 2 mg del precipitado celular obtenido previamente. Las muestras fueron analizadas por HPLC para la detección de GA, DHA y glicerol.

Efecto del pH inicial en la conversión

Se estudió la conversión de glicerol puro a diferentes pH iniciales de reacción (3,0, 4,0, 6,0, 7,0 y 8,0). Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 160 rpm por 50 h por duplicado, partiendo de 50 g/L de glicerol puro. Cada reacción fue iniciada con el agregado de 2 mg de peso seco de células provenientes de un cultivo con $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1 obtenido como se describe previamente. Las muestras se analizaron por HPLC.

Estudio de la cinética de conversión de glicerol

Se llevaron a cabo conversiones de glicerol puro a pH 8,0 para *G. frateurii* y pH 6,0 para *G. oxydans* inoculado con un precipitado celular correspondiente a 2 mg de peso seco previamente obtenidos. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm, por duplicado. Se tomaron muestras a las 3, 6, 20, 26, 30, 50, 100 y 125 horas de reacción. Las muestras se analizaron por HPLC. En paralelo, el pH del medio de reacción se midió a partir del sobrenadante de las muestras obtenidas.

Conversión de glicerol crudo por cepas de *Gluconobacter*

Se llevaron a cabo conversiones de glicerol crudo, 25 g/L a pH 8,0 para *G. frateurii* y 50 g/L pH 6,0 para *G. oxydans* inoculado con un precipitado celular correspondiente a 20 mg. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm, por duplicado. Se tomaron muestras a las 45 h de reacción. Las muestras se analizaron por HPLC.

Conversión en diferentes medios de reacción

Se llevaron a cabo conversiones de 50 g/L de glicerol crudo con 20 mg de peso seco de *G. oxydans* a pH 6,0 en 3 condiciones, con glicerol crudo y sulfato de magnesio (glicerol 50 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L), con glicerol crudo y sales de fosfato (glicerol 50 g/L, KH₂PO₄ 0,9 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L) y sólo glicerol crudo (glicerol 50 g/L en agua destilada). Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm, por duplicado. Se tomaron muestras a las 20 horas de reacción y se analizaron por HPLC.

Reducción de volumen de agua utilizada en la reacción

Se llevaron a cabo conversiones con 20 mg de *G. oxydans* por duplicado a 30 °C y 210 rpm durante 20 horas en matraces de 250 mL con un volumen de 30, 15 y 5 mL manteniendo la cantidad total de glicerol crudo en el medio de reacción. Las muestras fueron analizadas por HPLC.

Viabilidad de células almacenadas para la conversión

Se colectaron el equivalente a 20 mg de peso seco de células como se describe previamente y se almacenó a -20 °C y -80 °C. Se tomaron las células a las 24 horas, 7 días

y 20 días y se llevó a cabo la conversión de 50 g/L de glicerol crudo como se describe previamente. Las muestras se analizaron por HPLC.

Inmovilización de células en agar

Para realizar la inmovilización de las células en agar se siguió el protocolo reportado por Trelles y Rivero [41]. La biomasa necesaria para la inmovilización se preparó como se describe previamente. Se preparó una solución de agar al 3% y se resuspendió el precipitado celular en 3 mL de la misma. Se prepararon perlas de agar por goteo en aceite de girasol frío. Las mismas se lavaron con hexano y luego con agua destilada. Con esta estrategia se prepararon perlas de agar de 2 diámetros diferentes (3 y 1.5 mm).

Conversión a GA y DHA con microorganismos inmovilizados

Las conversiones de glicerol crudo por inmovilizados de *Gluconobacter* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción conteniendo 50 g/L de glicerol crudo en agua, inoculado con las perlas de agar obtenidas previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 20 horas, por duplicado. Al finalizar el ensayo se tomaron muestras para analizar por HPLC.

Reusos del biocatalizador

Se estudió el reuso de *G. oxydans* libres e inmovilizadas en agar de ambos diámetros. La reacción para cada uso se llevó a cabo como se describe anteriormente por 24 h y se lavó con buffer fosfato 30 mM entre cada uso. En el caso de las células libres se colectaron por centrifugación previo al lavado y en el caso de los inmovilizados se colectaron por colado.

Análisis por HPLC

Cada muestra tomada para su análisis por HPLC se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos para eliminar el sedimento bacteriano. El sobrenadante se disolvió 5 veces en agua mQ y se filtró con un filtro de 0,22 µm previamente tratado con polivinilpirrolidona (PVP). La producción de GA y DHA durante las reacciones de conversión se analizó utilizando un HPLC Shimadzu Nexera X2 (Kyoto, Japón), con un detector de arreglo de diodos. El método utilizado fue según [65]. Se usó una columna Aminex® HPX-87C 300 x

7.8 mm Bio-Rad (California, EE. UU.) con una precolumna de cartucho Carbo-H de 4 x 3.0 mm Phenomenex (California, EE. UU.). La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 5 mM. La detección se llevó a cabo a 70 °C a 210 nm para GA, tiempo de retención 13,6 min, 271 nm para DHA, tiempo de retención 16,7 min y 190 nm para glicerol, tiempo de retención 14,7 min, con un flujo de 0,6 mL/min durante 21 minutos. Cada inyección fue de 20 µl. Se construyeron curvas de calibración para GA, DHA y glicerol (Cromatogramas y curvas de calibración en anexo). Las muestras se analizaron utilizando el software LabSolutions de Shimadzu.

Análisis por RMN

Los análisis por RMN fueron realizados por el Dr. Gonzalo Hernández de Vis Magnética *Scientific solutions*.

Las muestras se prepararon disolviendo 50 µl de cada muestra en 540 µL de D₂O, y se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm. Los datos se adquirieron en un Bruker Avance Neo operando a una frecuencia ¹H de 400,13 MHz, utilizando una ventana espectral de 6,25 KHz, un ancho de pulso de 90 ° de 14us, un tiempo de adquisición de 3 segundos y una relajación de 2 segundos. Se adquirieron 16 registros para cada muestra. Los datos crudos se procesaron con el software TopSpin 4.0.2 usando una ventana exponencial de 0,3Hz y 65536 puntos.

Resultados y discusión

En esta sección se propuso el uso de células en reposo (*resting cells*) inmovilizadas de *G. frateurii* y *G. oxydans* para la transformación de glicerol crudo en dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA). Las cepas seleccionadas han sido utilizadas previamente en la transformación de glicerol en condiciones de crecimiento [54]. Se seleccionó el uso de células en reposo ya que proporcionan una serie de ventajas operativas como el aumento en la facilidad de la purificación de los productos [43]. Además, como se mencionó previamente, cuando se trabaja con microorganismos en crecimiento se producen reacciones secundarias y, por lo tanto, los metabolitos de crecimiento no deseados o productos de reacciones cruzadas pueden contaminar el sistema.

Se exploraron las condiciones de reacción para las conversiones de glicerol puro a GA y DHA utilizando células libres en reposo, para luego reproducir la mejor estrategia con glicerol crudo y consiguientemente con células inmovilizadas.

Biotransformación de glicerol puro a DHA y GA con células en reposo de *Gluconobacter*

Existen numerosos estudios de conversión de glicerol a GA y DHA en las que se evalúa el efecto de diferentes condiciones de reacción sobre la producción de dichas moléculas. Tales estudios se han llevado a cabo principalmente en condiciones en las células se encuentran en crecimiento [26,40]. Las condiciones estudiadas para la conversión de glicerol puro fueron las diferentes etapas de crecimiento bacteriano, pH, concentración inicial de glicerol y cantidad de biomasa de partida. Con el fin de evitar cualquier efecto de los contaminantes del glicerol crudo en las cepas de *Gluconobacter*, las condiciones de transformación se estudiaron primero utilizando glicerol puro.

Conversiones a GA y DHA con células en reposo a diferentes etapas de crecimiento

El metabolismo bacteriano cambia a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento. Al ser metabolitos primarios involucrados en la glucólisis, es esperable el aumento de la

producción de DHA y GA durante la fase exponencial de crecimiento [67]. Sin embargo, se ha reportado que *Gluconobacter* en la fase estacionaria puede producir el doble de DHA que en la fase exponencial [40]. Por lo tanto, la etapa en la cual las células se colectan para ser usadas en reposo para una bioconversión podría afectar la velocidad de transformación del sustrato.

Por esta razón, se llevaron a cabo las conversiones de glicerol con células en reposo colectadas a diferentes estadios de crecimiento para determinar en qué etapa del crecimiento microbiano se sintetiza una mayor cantidad de GA y DHA. Esto permitió determinar la etapa en la que las células en reposo debían ser colectadas para las reacciones de conversión futuras.

Estudios preliminares mostraron que la ausencia de glicerol en los medios de crecimiento de las células no condujo a la conversión de glicerol por las células en reposo, posiblemente debido a la necesidad del sustrato para activar la maquinaria metabólica necesaria para su conversión. Por lo tanto, para el diseño de este ensayo fue necesario estudiar la curva de crecimiento bacteriano de ambas cepas crecidas en medio suplementado con glicerol a 30 °C (Figura 4 A y B). La temperatura fue seleccionada en base a reportes previos de conversiones con especies del género *Gluconobacter* [54,64]. Se estudió además la correlación entre la DO 600_{nm} obtenida de la medida con espectrofotómetro y el peso seco (Figura 4 C y D). Esta correlación permitió determinar el volumen de inóculo necesario para las reacciones de conversión de glicerol, ya que asocia las medidas de DO 600_{nm} con la concentración en g/L de células. La correlación de DO 600_{nm} y peso seco fue muy similar para ambas bacterias en estudio. Se logró obtener una correlación lineal en ambos casos, lo que permitió determinar y estandarizar el volumen de inóculo utilizado en las reacciones de conversión.

Una vez que se contaba con la curva de crecimiento celular, se seleccionaron cuatro fases de crecimiento bacteriano: fase exponencial temprana (DO 600_{nm} = 0,3), fase exponencial media (DO 600_{nm} = 1), fase exponencial tardía (DO 600_{nm} = 2,5) y fase estacionaria (DO 600_{nm} = 3). Se procedió entonces a realizar la conversión de glicerol por *G. frateurii* y *G. oxydans* en cada uno de los cuatro estadios en donde se colectó la

cantidad necesaria para obtener 2mg de precipitado celular (peso seco) según la relación de peso seco y DO 600_{nm} previamente definida.

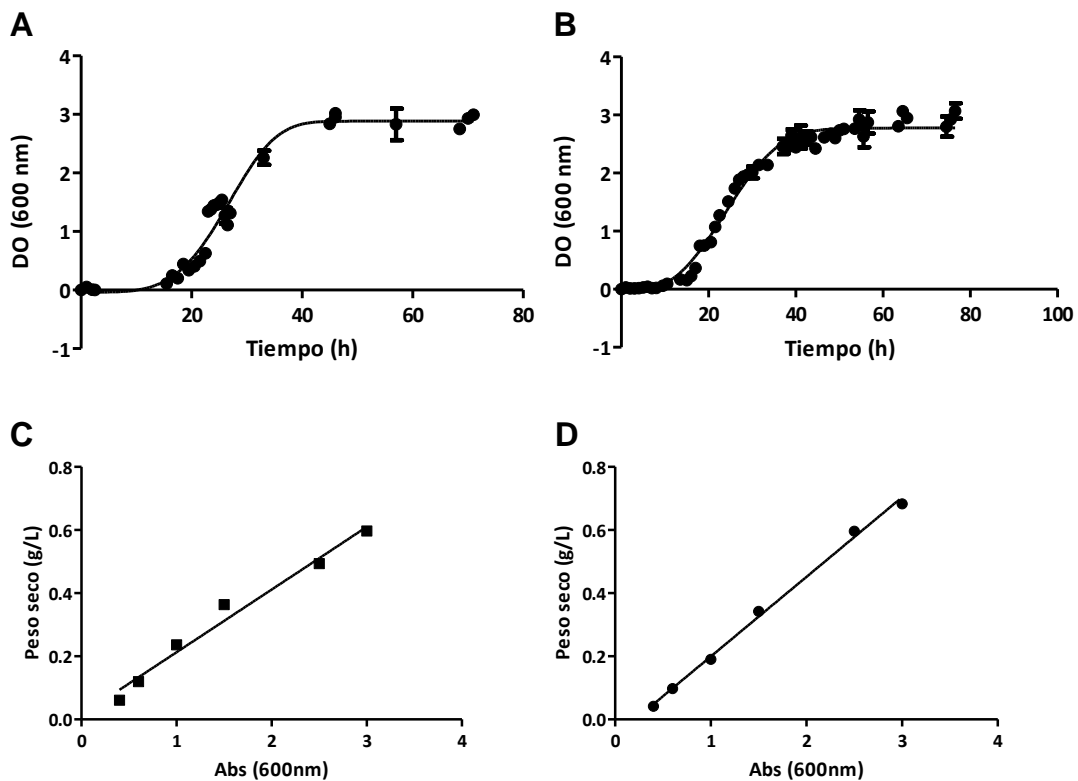


Figura 4: Estudio del crecimiento de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) en medio de cultivo suplementado con glicerol, 30 °C en agitación y la relación entre DO 600_{nm} con el peso seco de la biomasa obtenida para *G. frateurii* (C) y *G. oxydans* (D), R² en ambos casos ≥ 0,99.

La conversión se complementó además con sales de fosfato de potasio y magnesio (KH₂PO₄, K₂HPO₄ y MgSO₄), ya que como se describió previamente para *G. frateurii*, estas sales tuvieron un impacto significativo en la cantidad de DHA formada en las conversiones [68]. Después de un período de 20 h, los resultados mostraron que se obtuvieron mayores conversiones de glicerol cuando las células en reposo de ambas cepas se recolectaron durante la fase exponencial media (Figura 5).

Bajo estas condiciones, la conversión por *G. frateurii* fue de 1,7 ± 0,1 % a GA y de 18,3 ± 0,9 % a DHA, resultando en una conversión total de 20,0 ± 0.1 % de glicerol, y *G. oxydans* mostró una conversión de 36,8 ± 3,9 % de DHA sin producción de GA (Figura 5).

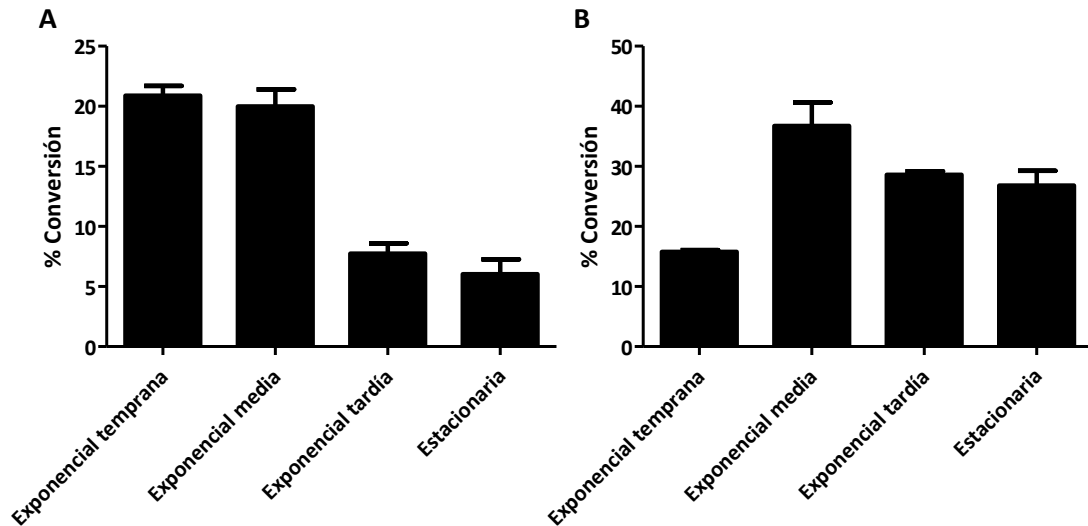


Figura 5: Conversión de glicerol por 2mg de peso seco de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) en cada uno de los cuatro estadios de crecimiento seleccionados (Fase exponencial temprana, DO $600_{nm}=0,3$, fase exponencial media, DO $600_{nm}=1$, fase exponencial tardía, DO $600_{nm}=2,5$ y fase estacionaria, DO $600_{nm}=3$).

La cinética de reacción en estas condiciones mostró una conversión de $52,2 \pm 2,7$ % de glicerol para *G. frateurii* alcanzada después de 50 h ($47,35 \pm 0,7$ % para DHA y $4,1 \pm 0,1$ % para GA) y 100% de conversión en 100 horas ($52,9 \pm 0,7$ % para DHA y $55,8 \pm 1,2$ % para GA). En el caso de *G. oxydans*, se logró una conversión de $46,6 \pm 14,9$ % a DHA y no se observó conversión a GA, alcanzando un máximo de conversión a las 120 h de reacción de $57,1 \pm 14,9$ % a DHA y de un $4,1 \pm 2,3$ % a GA. La producción de GA fue detectable solamente a partir de las 50 horas de reacción.

La baja conversión de glicerol mostrada por *G. oxydans* (en comparación con *G. frateurii*) podría atribuirse a la inhibición por DHA, ya que se ha reportado que altas concentraciones de este producto inhiben la vía de fosfato de pentosa, así como la enzima glicerol deshidrogenasa, causando daño celular [40]. Estos resultados confirman que *G. oxydans* genera más DHA que *G. frateurii* a las 20 horas de reacción y que *G. frateurii* produce ambos compuestos y en comparación con *G. oxydans*, produce más GA. Ambos resultados obtenidos con células en reposo concuerdan con lo reportado en bibliografía con células en crecimiento [40,53].

Se seleccionó entonces la fase exponencial media para la recolección de células en ambas cepas para los consiguientes estudios de biotransformación del glicerol.

Efecto del pH inicial en la biotransformación de glicerol puro

Una vez seleccionada la fase de crecimiento en la que se colectarían las células para la conversión, se llevó a cabo el estudio del impacto del pH inicial del medio de reacción usando células en reposo de *G. frateurii* y *G. oxydans* (colectadas en la fase exponencial media). El pH es un parámetro importante a tener en cuenta en las biotransformaciones ya que afecta directamente la actividad de las enzimas y en consecuencia, el crecimiento y metabolismo microbiano [69]. Las variaciones en el pH inicial demostraron tener un impacto en la producción de DHA y GA por *G. frateurii* (Figura 6 A). La producción de DHA y GA aumentó con un pH inicial más alto, alcanzando un máximo de casi 50 % de conversión a 50 h a pH 8,0. Se encuentra reportado que el pH óptimo para la alcohol deshidrogenasa de membrana de *Gluconobacter*, involucrada en la conversión a ácido glicérico, es cercano a 6,0 [70], esta diferencia podría estar dada por una rápida bajada el pH en la conversión producida por el metabolismo celular y la generación y liberación de GA al medio. Para esto se estudió la cinética de la conversión de GA y DHA por esta cepa acompañada del seguimiento del pH de la misma.

Por otro lado, para *G. oxydans*, se observó una mayor conversión de DHA $56,7 \pm 3,9 \%$ después de 50 h de reacción sin una producción significativa de GA a un pH inicial de 6,0 (Figura 6 B) lo que coincide con reportes previos de conversión con esta cepa [25].

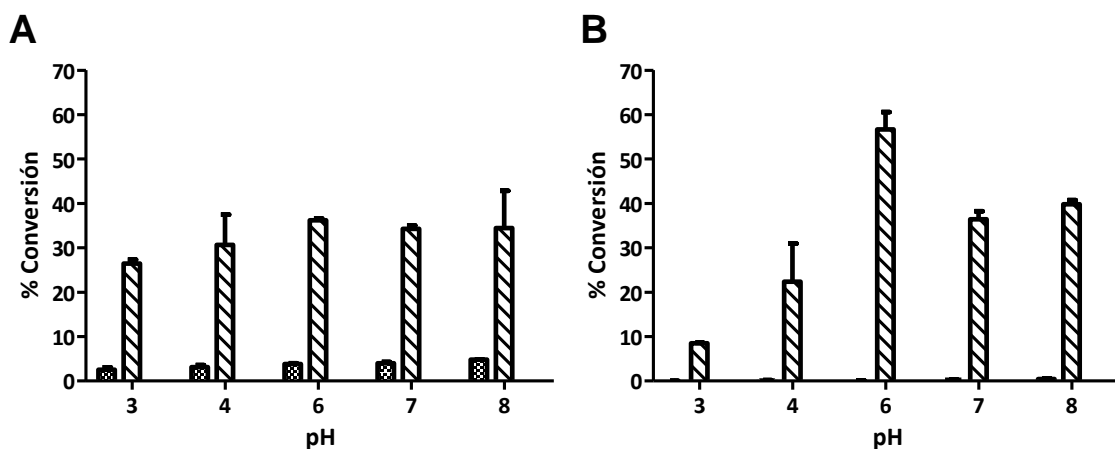


Figura 6: Conversión de glicerol por *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) a diferentes pH iniciales.

Condiciones: 2mg de peso seco, 30 °C, 50 h . (▨) DHA y (▩) GA.

Se seleccionaron los pH que resultaron en las conversiones máximas para ambas cepas para estudiar la cinética de conversión y la variación del pH durante la misma. La cinética de la reacción de *G. frateurii*, mostró que a las 3 horas ya se observa producción tanto de DHA como de GA, la producción de este último se vio reflejada en la baja del pH de la solución de reacción. A lo largo del experimento se observó un aumento en el porcentaje de conversión de GA y DHA alcanzando a las 50 horas un $4,1 \pm 1,8 \%$ y $47,3 \pm 0,7 \%$ respectivamente. La producción se vio acompañada de una baja del pH de la solución de reacción, alcanzando un final de pH 3,0 (Figura 7 A), esto concuerda con la generación de GA en la reacción y una acidificación más moderada para el medio *G. oxydans* como se esperaba por la formación de GA en el primer caso. Dado que no se detectó producción de GA para *G. oxydans*, esta baja más moderada en el pH podría estar asociada con la producción de otros ácidos relacionados con el metabolismo bacteriano (Figura 7 B).

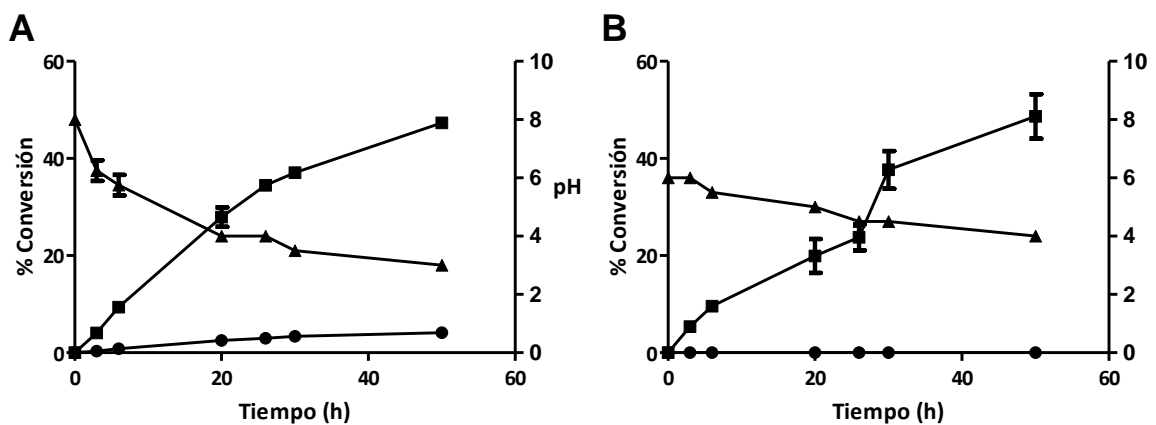


Figura 7: Cinética de conversión de glicerol por *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) a diferentes pH iniciales. Condiciones: 2mg de peso seco, 30 °C (■) DHA, (●) GA, (▲) pH.

En general, los resultados obtenidos para las conversiones de glicerol puro en las condiciones estudiadas se correlacionan con los de Khanna y cols., 2012 y Sato y cols., 2015 [40,53] que utilizaron células en crecimiento para la transformación de glicerol puro. Por lo tanto, bajo las condiciones estudiadas, el comportamiento bacteriano en la transformación no cambió en ausencia de nutrientes y aditivos. Esto representa una

importante ventaja operacional y es un avance en el conocimiento sobre esta bioconversión.

Se seleccionaron entonces pH de 8,0 y 6,0 para llevar a cabo las conversiones con *G. frateurii* y *G. oxydans* respectivamente.

Efecto del aumento de la biomasa utilizada en la conversión

En un intento de aumentar la cantidad de producto obtenido en un menor tiempo, se testeó un aumento de diez veces en el inóculo de células en las bioconversiones y se observó un impacto significativo en la conversión de glicerol para ambas cepas de *Gluconobacter* (Tabla 1).

Tabla 1: Conversiones de glicerol con diferente cantidad de inóculo celular

Peso seco (mg)	<i>G. frateurii</i>		<i>G. oxydans</i>
	DHA (% conversión)	GA (% conversión)	DHA (% conversión)
2	44,7 ± 4,1	4,1 ± 0,2	56,7 ± 3,9
20	90,1 ± 0,2	10,4 ± 0,2	98,4 ± 9,8

Después de 50 h bajo las condiciones previamente establecidas, la producción por células en reposo de *G. frateurii* aumentó dos veces y media para GA y al doble para DHA. Para *G. oxydans*, el aumento en la producción de DHA fue al doble lo que implicó una conversión total del glicerol a DHA en 50 h. El estudio de la cinética de la conversión a tiempos menores a 50 h sería valioso para conocer con mayor detalle el impacto del aumento de la biomasa del inóculo.

Estudio de la conversión a diferentes concentraciones de glicerol puro de partida

Se ha reportado que la concentración inicial de glicerol en los medios de reacción puede afectar la producción de DHA y GA que podría deberse a la inhibición enzimática por exceso de sustrato o inclusive por un aumento en la viscosidad del medio que dificulta la difusión de sustratos hacia la célula [54,64,71]. Para probar un posible efecto de este parámetro en la conversión utilizando células en reposo, se evaluaron una serie de concentraciones iniciales de glicerol puro de partida. Para *G. frateurii*, se observó un cambio en la proporción de productos asociados con el aumento de las concentraciones

iniciales de glicerol. La concentración de sustratos o productos afectan la tasa de conversión de las enzimas implicadas en la biotransformación (Figura 8).

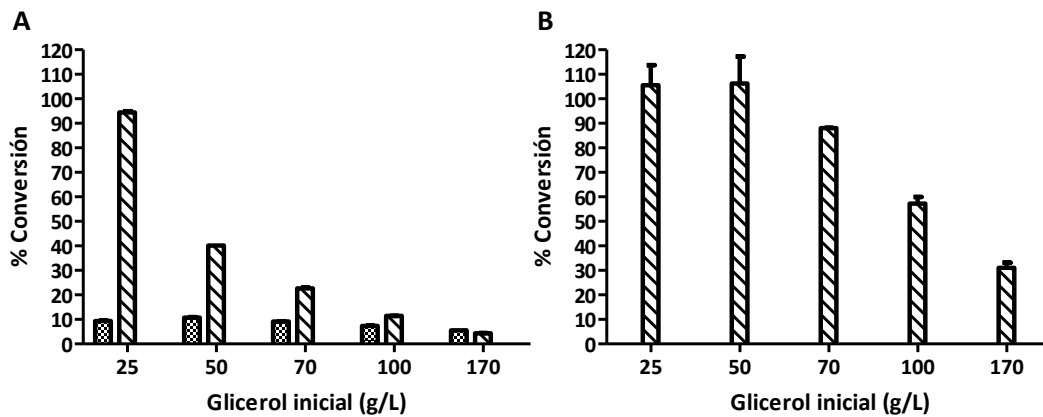


Figura 8: Conversión de glicerol por *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) a diferentes concentraciones de glicerol puro de partida. Condiciones: 20 mg de peso seco, 30 °C, 45 h. (▨) DHA y (■) GA.

El aumento en la concentración inicial de glicerol causó una reducción en el porcentaje de conversión para ambas cepas. Por lo tanto, para experimentos posteriores, se seleccionó la cantidad máxima de glicerol que era completamente convertida en 45 h de reacción, es decir 25 g / L para *G. frateurii* y 50 g / L para *G. oxydans* (Figura 8 A y B).

Biotransformación de glicerol crudo a DHA y GA con células en reposo de *Gluconobacter*

Se estudió la conversión de glicerol crudo en las condiciones previamente seleccionadas como las mejores para la conversión de glicerol puro (Figura 9).

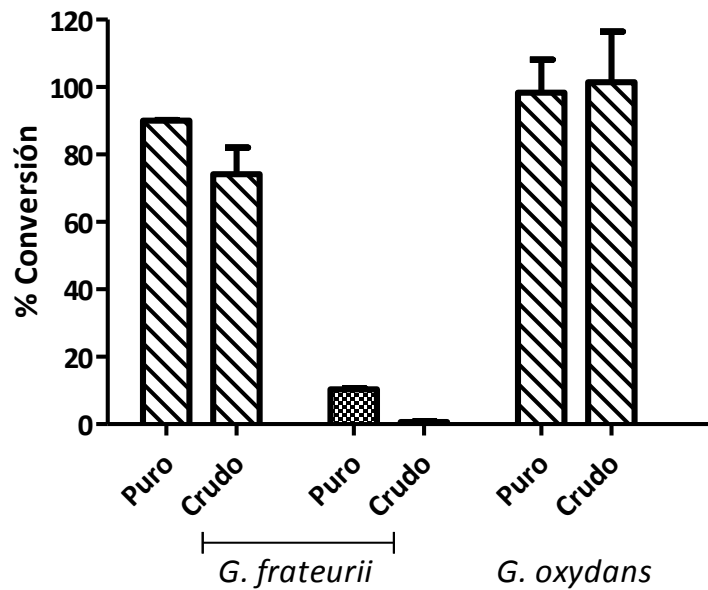


Figura 9: Conversión de glicerol puro y crudo por 20mg de peso seco de *G. frateurii* y *G. oxydans*. (▨) DHA y (▩) GA. Condiciones: 20 mg de peso seco, 30 °C, 45 h.

Se encontró una menor conversión a DHA y GA para *G. frateurii* utilizando glicerol crudo en comparación con glicerol puro después de 45 h de reacción, $0,67 \pm 0,1$ % a GA y de $74,1 \pm 7,9$ % a DHA. La baja productividad de GA podría estar asociada a la presencia de metanol en el glicerol crudo que tiene un efecto inhibitor sobre la enzima mADH, responsable de la producción de GA en *Gluconobacter*. Sato y cols. informaron una disminución en la productividad de GA en presencia de metanol por la misma cepa de *G. frateurii* utilizada en este estudio, que puede mejorarse mediante la eliminación de metanol del medio de reacción [23,47]. Para *G. oxydans*, la conversión después de 45 h fue similar para ambos tipos de glicerol (Figura 9). Esto indica que, a diferencia de *G. frateurii*, *G. oxydans* mantuvo su capacidad para convertir el glicerol independientemente de la presencia de los contaminantes del glicerol crudo.

Las muestras de las biotransformaciones se analizaron mediante espectroscopia de ^1H RMN para confirmar e identificar los componentes principales en la reacción al inicio y a las 24 h. El análisis del espectro ^1H -1D del medio al inicio de reacción mostró glicerol y metanol como componentes principales, junto con cantidades menores de ácidos grasos. Este resultado confirmó los componentes habituales en glicerol crudo obtenidos como un subproducto de la industria del biodiesel.

El análisis del espectro $^1\text{H-NMR}$ de las muestras de reacción a las 24 h de las muestras de conversiones con *G. oxydans* permitió la identificación de señales correspondientes a DHA (71,5 %), glicerol (18,8 %), acetato (2,6 %) y metanol (7,1 %) y una señal adicional de GA en las reacciones con *G. frateurii* (DHA 71,0 %, glicerol 13,0 %, MeOH 5,4 %, acetato 2,1 %, ácido glicérico 8,4 %) (Figura 10 A y B).

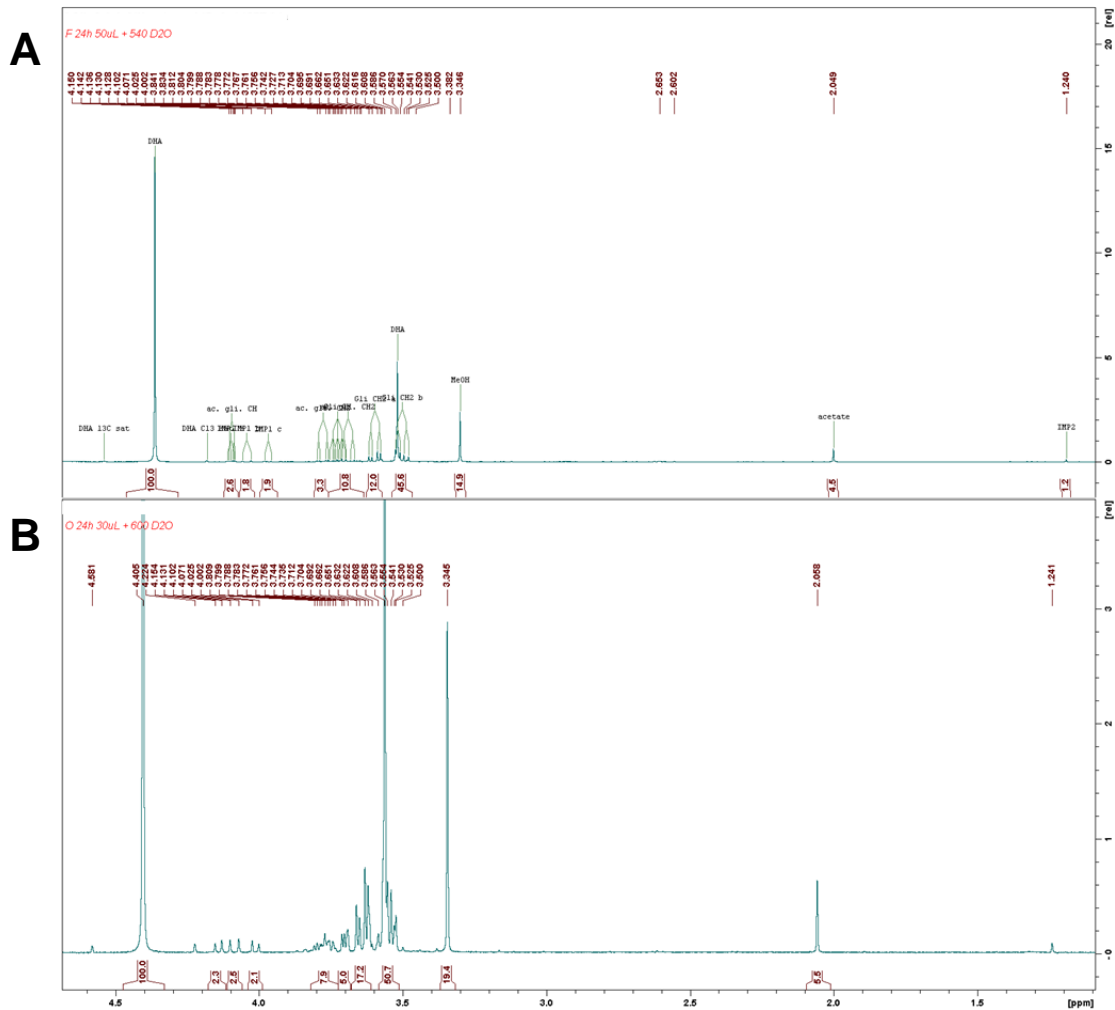


Figura 10: Análisis por $^1\text{HNMR}$ de la conversión a 24 h por *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B). Asignaciones: DHA, 4,405 (s, 1H); 3.563 (s, 4H), Glicerol: 3,763 (tt, 4,4, 9,9Hz, 1H); 3,642 (dd, 4,4, 11,7Hz, 2H); 3,547 (dd, 6,5, 11,7Hz, 2H), GA: 4,139 (dd, 3,1, 5,7Hz, 1H); 3,823 (dd, 3,2, 11,9Hz, 1H); 3,734 (dd, 5,5, 11,7Hz, 1H), metanol: 3,35 (s, 3H), acetato: 2,05 (s, 3H).

Los resultados de la espectroscopia confirmaron los obtenidos por HPLC donde no se observó GA para las biotransformaciones de *G. oxydans*. También confirmaron la ausencia de cualquier otro producto de conversión o metabolito en concentraciones significativas, destacando los beneficios de usar células en reposo para producir

compuestos libres de contaminantes en los medios de comunicación en las biotransformaciones.

Intensificación del proceso de conversión glicerol crudo

Este trabajo es el primer informe de la transformación de glicerol puro y crudo por *G. frateurii* en condiciones de ausencia de medio de cultivo utilizando células en reposo. Los resultados para la producción de GA mostrados aquí alcanzaron niveles de productividad cercanos a 20 veces más bajos que otros reportados en la literatura [71,72]. Sin embargo, la ventaja de realizar esta conversión en un medio simple, que solamente cuenta con sales es sustancial considerando la facilidad con la que se podría aislar el producto de interés. Por otro lado, la DHA se produjo a niveles similares a los reportados [73,74].

Dados los resultados prometedores obtenidos para la transformación del glicerol crudo en DHA utilizando células de *G. oxydans* en reposo, se ahondó en el estudio de intensificación del proceso mediante estrategias para aumentar la formación de producto mejorando o manteniendo los costos del proceso.

Para esto, se llevaron a cabo una serie de transformaciones en las que se simplificó la composición de los medios de reacción (Figura 11).

En estos estudios se encontró que ni el KH_2PO_4 ni el K_2HPO_4 , ni el MgSO_4 probaron ser necesarios para la conversión, ya que incluso cuando se ofreció glicerol crudo en agua a las células, la cantidad de producto obtenida después de 20 h no varió con respecto a lo obtenido previamente bajo las mismas condiciones de pH y temperatura.

Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre una transformación con células en reposo de glicerol crudo a DHA realizada exclusivamente en agua.

Con el fin de ampliar la perspectiva de implementación de esta bioconversión a gran escala, se estudió la conversión utilizando una cantidad reducida de agua sin variar la cantidad total de glicerol crudo en la reacción (1,5 g totales de glicerol en la conversión) (Figura 12).

Los resultados de este trabajo demuestran que una disminución del 50% en el volumen de reacción total resulta en una conversión más lenta, sin embargo, alcanza en 45 h los mismos niveles de conversión obtenidos a las 20 h con el doble de volumen de agua.

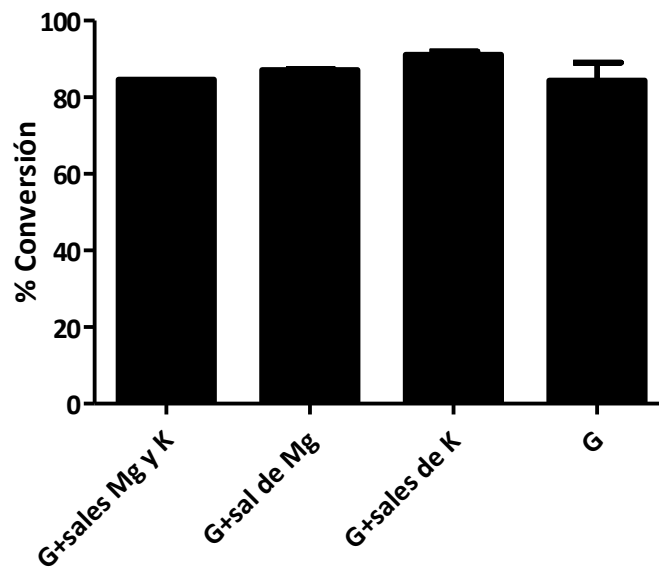


Figura 11: Conversión de glicerol por 20mg de peso seco de *G. oxydans* en diferentes condiciones: “G+sales Mg y K”, glicerol crudo en agua con sales de potasio y magnesio, “G+sales de Mg”, glicerol crudo en agua con sales magnesio, “G+ sales de K”, glicerol crudo en agua con sales de potasio, “G”, glicerol crudo en agua destilada.

Consideramos estos resultados de suma importancia a la luz de una posible aplicación industrial de esta transformación ya que el costo del proceso puede verse significativamente reducido no solo por la reducción del gasto de agua sino también por la reducción del gasto energético asociado a la manipulación de volúmenes mayores. A menores volúmenes (5 y 1,8 mL) los niveles de productividad se vieron significativamente reducidos lo cual coincide con los resultados obtenidos a concentraciones altas de glicerol de partida.

Los resultados obtenidos para la intensificación del proceso de bioconversión de glicerol en crudo utilizando *G. oxydans* se resumen de manera progresiva en la figura 13, donde además se testeó la reducción de la temperatura de la conversión, lo que a nivel industrial podría llevar a una reducción de costos significativa. En estas condiciones se alcanzó una productividad de 2,07 g/L.h (similar al 1.91 g/L.h obtenido para glicerol puro previamente descrito).

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Hu y cols. [75] en el que *G. oxydans* ZJB09113 transformó glicerol puro con una productividad de 2,16 g / L.h para DHA, similar a la alcanzada en este trabajo, en un sistema de lote alimentado en un reactor de tipo *airlift*. Este trabajo, sin embargo, utilizó 15 veces más cantidad de

biocatalizador en el sistema de 2 L (10 g/L en Hu y cols en comparación con 0,67 g/L en el trabajo presentado en esta tesis).

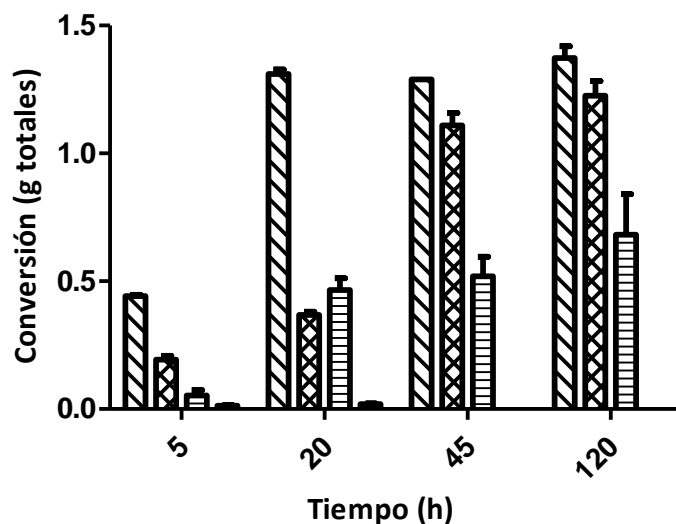


Figura 12: Conversión por 20mg de peso seco de *G. oxydans* de 1,5 g de glicerol crudo en 30 (▨), 15 (▩), 5 (▧) y 1,8 (▦) mL de agua.

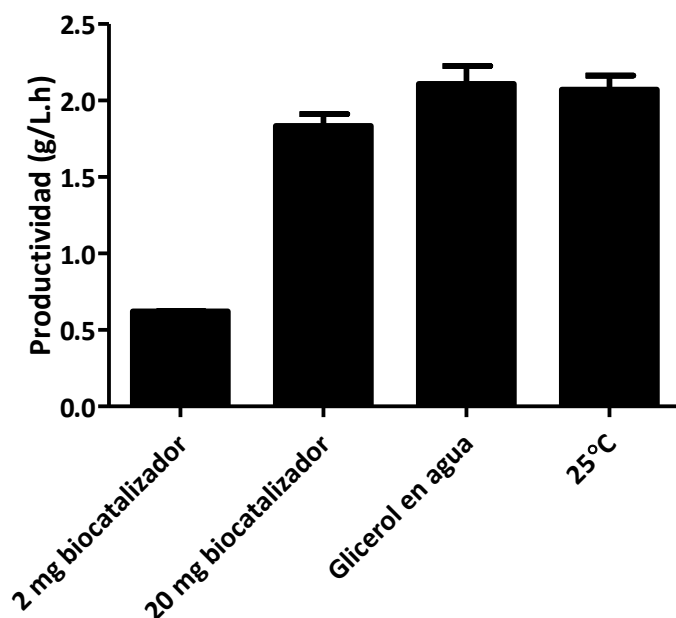


Figura 13: Evolución de las condiciones testeadas para la conversión de glicerol por *G. oxydans*.

Por otro lado, las conversiones más altas a DHA fueron reportadas por Zhou y cols en 2016, alcanzando productividades de 9,41 g/L.h de DHA con *G. oxydans* NL71 utilizando

como sustrato glicerol puro y en condiciones de crecimiento que, como ya se mencionó anteriormente, dificultan la recuperación del producto [76]. Estudios futuros en diferentes configuraciones de reactores, utilizando las condiciones estudiadas, podrían mejorar los rendimientos como en Habe y cols. o Sato y cols [47,54].

Finalmente, se estudió la posibilidad de almacenar las células colectadas en fase exponencial media para su posterior uso en la bioconversión de glicerol crudo (Figura 14).

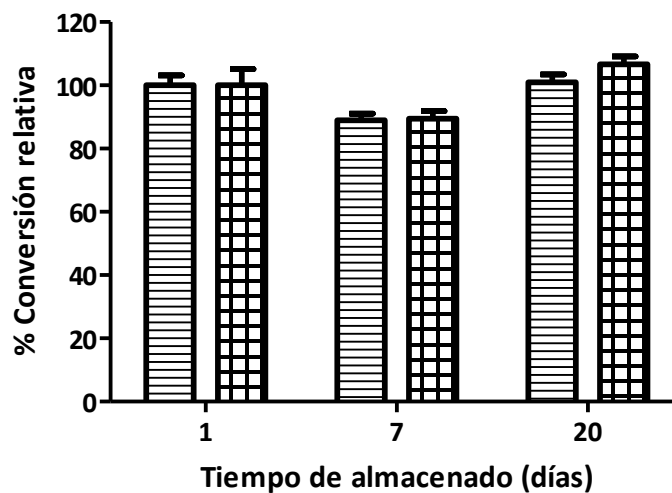


Figura 14: Conversión relativa de glicerol crudo por *G. oxydans* almacenada 1, 7 y 20 días a -20 °C (▨) y -80 °C (▩).

Se observó que las células mantuvieron su capacidad de conversión luego de almacenadas hasta 20 días a -20 °C y -80 °C sin el agregado de aditivos para su conservación.

Conversión a GA y DHA con microorganismos inmovilizados

Dentro de la gran variedad de estrategias de inmovilización presentadas previamente, las más utilizadas para la inmovilización de células son las técnicas de atrapamiento. En este tipo de técnicas, los microorganismos se encuentran confinados en el interior de una red que idealmente evita la liberación de células en el medio circundante.

Dentro de las ventajas del uso de células inmovilizadas en bioconversiones, previamente discutidas, se destaca la facilidad de separación del biocatalizador de la mezcla de

reacción ya que, en la última década, se han realizado una gran cantidad de esfuerzos en la conversión microbiana glicerol donde se enfatiza que el procesamiento *downstream* de la biotransformación contribuyen con aproximadamente el 70% del costo de producción. Por lo que la simplificación del mismo es fundamental para reducir el costo de producción[77–80].

La selección de la mejor estrategia para inmovilizar células se determina de manera experimental, para esto se deben tomar en cuenta algunas variables como la estabilidad del organismo durante la inmovilización, la resistencia mecánica del soporte, la estabilidad operativa o reuso, entre otros [41].

Dentro de las principales matrices utilizadas para estrategias de atrapamiento, se encuentran los termogeles, entre ellos el agar [81–83] que fue la matriz seleccionada en este trabajo para el atrapamiento de *Gluconobacter*. La inmovilización de ambas cepas se llevó a cabo en agar como se describe en la sección de metodología.

Una vez estudiadas las condiciones de conversión de glicerol crudo con células en reposo en suspensión, se llevó a cabo la conversión de glicerol crudo con células en reposo de *G. oxydans* y *G. frateurii* inmovilizadas en perlas de agar bajo las mismas condiciones (Figura 15).

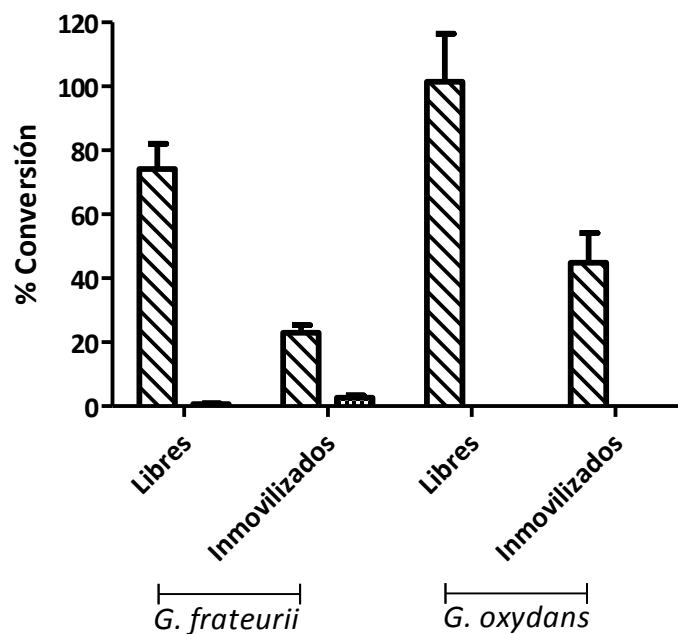


Figura 15: Conversión de glicerol crudo en 45 h por *G. frateurii* y *G. oxydans* libres e inmovilizados en perlas de agar. (▨) DHA y (▩) GA.

En la figura 15, se observa una conversión a DHA y GA menor en ambas cepas en comparación con la conversión con células libres después de 45 h de reacción. Para *G. frateurii* se obtuvo $22,9 \pm 2,2$ % de conversión a DHA y solamente $2,7 \pm 0,7$ % a GA, alcanzando un máximo de $51,1 \pm 3,4$ % de DHA y $4,0 \pm 0,6$ % de GA en 13 días de reacción. Para *G. oxydans*, la conversión después de 45 h disminuyó aunque en menor medida a $44,8 \pm 9,2$ %, alcanzando un máximo de $84,3 \pm 0,8$ % de DHA en 6 días, nuevamente no se detectó GA bajo estas condiciones (Figura 15). Estos resultados indican que, ambas cepas mantuvieron su capacidad de conversión luego del proceso de inmovilización, aunque con una disminución de las productividades. Se encuentra reportado que la transferencia de masa juega un rol importante en bioconversiones con organismos inmovilizados, lo que podría explicar la disminución en la productividad del proceso [41,56,84].

Se ha estudiado que a mayor diámetro de perlas, el tiempo de operación de las células puede verse comprometido además por la acumulación de metabolitos en el microambiente que tengan una difusión al exterior más lenta.

En vista de los resultados obtenidos para ambas cepas, se seleccionó *G. oxydans* por tener una mejor tasa de conversión para testear si la disminución del diámetro de la esfera de agar tendría un impacto en la conversión del glicerol como se ha reportado para otros microorganismos [60,61].

Se llevó a cabo entonces, la inmovilización de *G. oxydans* en perlas de agar de menor diámetro (1,5 mm) en donde se observó que la conversión a DHA era efectivamente 1,4 veces más rápida en las primeras 50 h (Figura 16).

Además de la mejora en la difusión de sustratos y productos, varios autores han reportado que las perlas de tamaño más pequeño permiten una difusión eficiente de oxígeno. Teniendo en cuenta que *G. oxydans* es un organismo aerobio estricto, la difusión de oxígeno al interior de las perlas podría ser un paso crucial en el mantenimiento de la viabilidad celular y afectar positivamente la conversión como se observó para *G. oxydans* [56,60,61,84]. La productividad con las perlas de agar de menor diámetro aumentó, aunque no lo suficiente para alcanzar la productividad obtenida con las células libres por lo que se llevó a cabo el estudio de estabilidad operacional de las

mismas para testear la capacidad de las células inmovilizadas de convertir DHA a lo largo de varios reusos del biocatalizador en la conversión de glicerol crudo en agua.

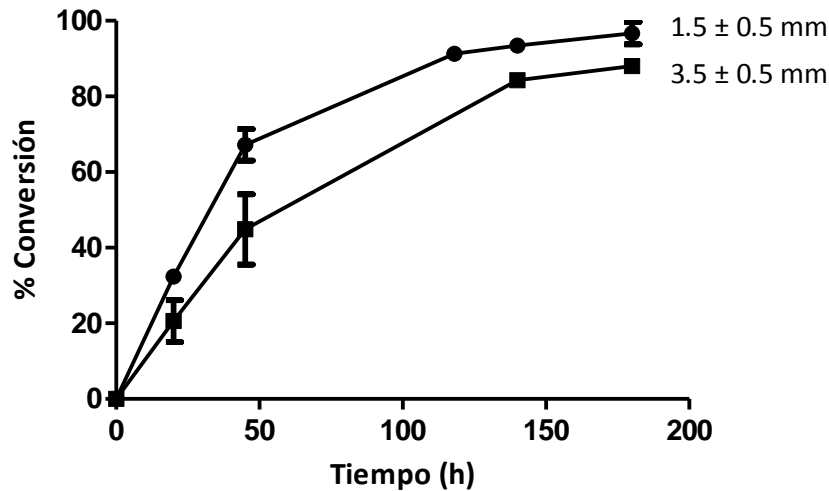


Figura 16: Cinética de conversión de glicerol crudo a DHA con *G. oxydans* inmovilizado en agar de $3,5 \pm 0.5$ mm (■) y $1,5 \pm 0.5$ mm (●) de diámetro.

En la figura 17 se observa dicho estudio donde se determinó que las células libres pierden casi completamente su capacidad de conversión luego de tan solo un ciclo de uso lo que se reflejó en una productividad de $2,3 \pm 0,2$ g/L.h por cada lote de células. Por otro lado, las células inmovilizadas retuvieron su capacidad de conversión hasta 8 ciclos, lo que se reflejó en una productividad acumulada de $10,0 \pm 0,1$ g/L.h. Estos resultados apoyan el uso de las células inmovilizadas en agar en la conversión de glicerol crudo a DHA por parte de *G. oxydans* ya que se alcanzó una mayor cantidad de producto con un mismo lote de células además de facilitar la separación del biocatalizador de la reacción sin la necesidad del uso de equipamiento especializado, lo que en conjunto podría disminuir el costo del proceso.

Los reportes de conversión de glicerol con *Gluconobacter* inmovilizadas han aumentado en los últimos 5 años. En la tabla 2 se resumen las productividades de los reportes más recientes en el área, donde se observa que las productividades obtenidas en este trabajo superan las reportadas hasta el momento para *G. oxydans* inmovilizados en otras matrices.

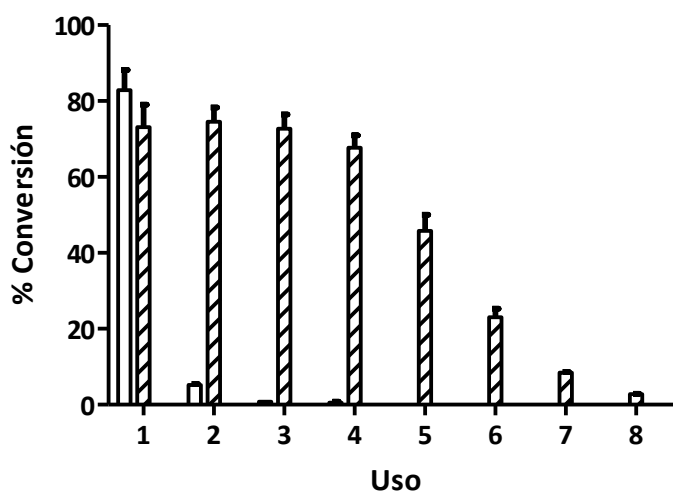


Figura 17: Conversión de glicerol crudo en en 45 h por *G. oxydans* libres (□), inmovilizados en agar de 1,5 mm (▨).

Tabla 2: Conversión de glicerol a DHA con *G. oxydans* inmovilizado

<i>G. oxydans</i>	Estrategia de inmovilización	Productividad (g/L.h)	Observaciones	Referencias
MTCC 904	PU-GA*	0,5	Conversión en medio de cultivo	[85]
ZJB09113	Cerámica porosa	2,6	Conversión con agregado de urea	[86]
MTCC 904	PU**	0,3	Conversión en medio de cultivo	[87]
MTCC 904	PU**	0,2	Conversión con agregado de extracto de levadura	[26]
MTCC 904	PU-GA*	0,3	Conversión en medio de cultivo	[88]
NBRC 14819	Agar	1,9-10,0	Conversión en agua	Este trabajo

*PU-GA, espuma de poliuretano entrecruzada con glutaraldehído

**PU, espuma de poliuretano.

Es de destacar que ésta es la única conversión reportada hasta el momento realizada con células en reposo inmovilizadas en agar solamente en glicerol y agua, sin el agregado de medio de cultivo ni aditivos para la conversión.

Capítulo 2

Preparación de biocatalizadores enzimáticos

Introducción

Biocatalizadores enzimáticos inmovilizados

La biocatálisis enzimática encuentra aplicaciones en diversas áreas de la industria. Sin embargo, aún no ha sido completamente explotada y el desarrollo de estrategias para adaptar a las enzimas a usos industriales es un área de estudio creciente [7,89,90]. En este contexto, la inmovilización de enzimas es una estrategia comúnmente utilizada para evitar algunas de las limitaciones previamente mencionadas en este trabajo. Esta estrategia, acompañada de herramientas modernas de ingeniería, producción y descubrimiento de proteínas, así como los avances en biología molecular y estructural, facilitan el desarrollo de catalizadores y su diseño a medida para integrarlos en procesos industriales [91].

La inmovilización de enzimas es actualmente una estrategia de investigación y desarrollo muy exitosa aplicada para mejorar el rendimiento de las enzimas. Se entiende por inmovilización, el proceso en el cual una enzima soluble es confinada en el espacio para generar un catalizador insoluble, reutilizable, idealmente con mayor estabilidad frente a condiciones ambientales adversas, tales como solventes no acuosos, altas temperaturas y pH extremos (Figura 18) [7].

Dado que las enzimas son solubles en agua, su recuperación de una solución acuosa suele ser un desafío. Por lo tanto, se pueden lograr reducciones sustanciales en la contribución de los costos del uso de enzimas en un proceso industrial mediante su inmovilización, disminuyendo a su vez la huella ambiental del proceso [92,93].

La inmovilización puede contribuir a una mejor estabilidad y tolerancia a los solventes orgánicos y otros ambientes hostiles, al disminuir la desnaturalización de enzimas por desplegamiento de la estructura tridimensional de proteínas bajo estas condiciones.

Las etapas comúnmente involucradas en el proceso de inmovilización de enzimas incluyen: seleccionar el material del soporte, con una química de superficie adecuada que definirá la química de unión enzima-soporte; evaluar las condiciones experimentales durante el proceso, con el fin de optimizar el rendimiento operativo (es decir, alto porcentaje de inmovilización y actividad expresada en el soporte) y

finalmente caracterizar el comportamiento del biocatalizador en las condiciones operativas [7,92].

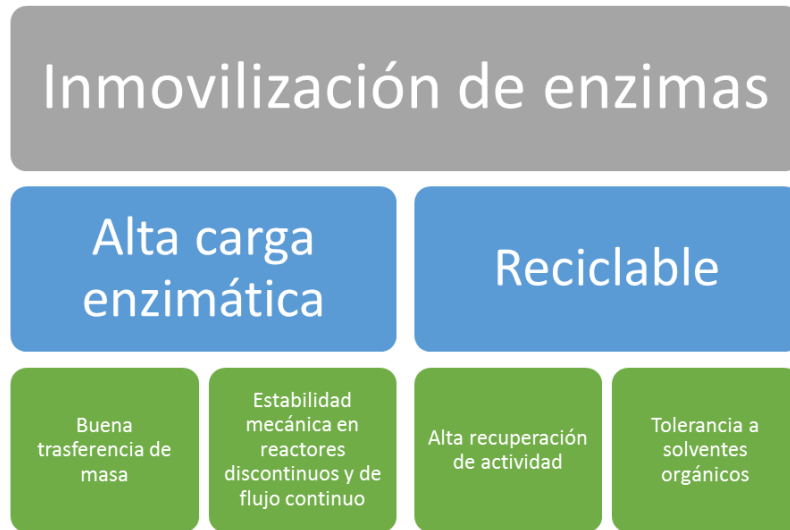


Figura 18: Características ideales deseadas en un biocatalizador enzimático inmovilizado [94].

La estabilización otorgada por la inmovilización del catalizador puede también mejorar algunas propiedades enzimáticas, fijando conformaciones proteicas que mejoren la especificidad de sustrato y reduzcan el efecto de inhibidores [95,96].

La inmovilización de biocatalizadores puede presentar también tiene algunas desventajas. Durante la inmovilización, las enzimas pueden perder su actividad y cambiar algunas características tales como pH o temperatura óptima de trabajo y/o la constante afinidad de Michaelis [95,97].

Sin embargo, hoy en día existen numerosas estrategias para lograr una inmovilización exitosa que minimice los impactos negativos en las propiedades de las enzimas y mejore aquellas propiedades deseables para su uso aplicado [7,98]. A pesar de esto, actualmente no se cuenta con una estrategia estandarizada única por lo que estos procesos deben ser optimizados para cada enzima y cada soporte [7].

Actualmente se encuentran reportados una amplia variedad de materiales que pueden ser utilizados como soportes para la inmovilización de enzimas y a su vez una gran variedad de químicas de unión. Numerosos biopolímeros y una variedad de materiales de diversos orígenes (orgánicos, inorgánicos e híbridos) se han empleado como soportes para la inmovilización de diferentes enzimas: dentro de la amplia variedad de materiales, los polisacáridos modificados, como la agarosa [99,100], el quitosano

[101,102] y la celulosa [103], son muy utilizados debido a su alta disponibilidad y la posibilidad de modificación química de su superficie.

Por otro lado, en la última década se han presentado alternativas de naturaleza inorgánica como la sílica [104,105] y el dióxido de titanio [106], las mismas presentan como principal ventaja una alta estabilidad mecánica.

Estrategias para la inmovilización de enzimas

Existen en la bibliografía una amplia diversidad de estrategias de inmovilización de biocatalizadores enzimáticos (Figura 19). Estas pueden involucrar el uso de soportes en donde las enzimas son unidas a través de diferentes tipos de interacciones o meramente por atrapamiento físico. Las estrategias de interacción enzima-soporte pueden ser covalentes, iónicas, hidrofóbicas, por afinidad o incluso mixtas. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas que deben ser consideradas de cara a la aplicación y al biocatalizador implicado [8].

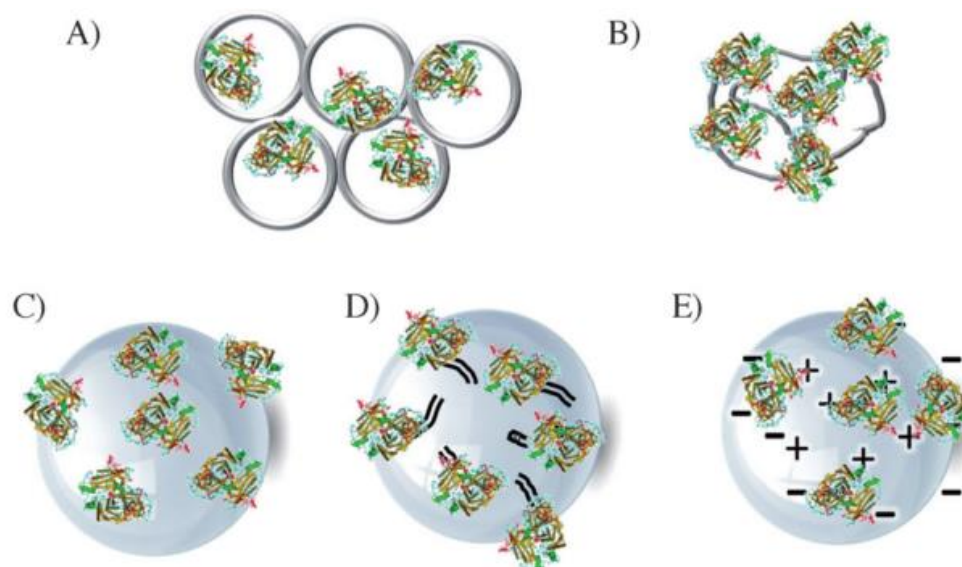


Figura 19: Esquema de estrategias de inmovilización de proteínas. A) atrapamiento, B) agregados enzimáticos entrecruzados, C) adsorción física, D) unión covalente al soporte y E) interacciones electrostáticas. Tomado de Betancor y cols. 2013 [107].

Por otro lado, la inmovilización no necesariamente involucra el uso de soportes. Tal es el caso de los agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAS) en donde aglomerados de enzimas o incluso cristales enzimáticos (CLECS) se entrecruzan con agentes químicos que insolubilizan el biocatalizador [8,108]. Este enfoque proporciona ventajas distintas

como la actividad enzimática concentrada, estabilidad elevada y el bajo costo de producción debido a la eliminación del agregado de un soporte.

Cada caso debe ser estudiado acorde a las características de las enzimas involucradas ya que como se mencionó previamente, no existe actualmente un método universal de inmovilización que permita asegurar de antemano la retención de actividad luego de la unión al soporte o la mejora de las propiedades deseadas.

En este trabajo se propuso el acoplamiento de biocatalizadores celulares y enzimáticos inmovilizados. Los biocatalizadores enzimáticos fueron inmovilizados en una serie de soportes con el objetivo de obtener preparaciones muy estables y activas, que facilitaran la separación del catalizador del producto final y posibilitara además su reuso. A su vez para el caso de las deshidrogenasas utilizadas la co-inmovilización se propuso como estrategia para llevar el reciclado del cofactor utilizado de manera más eficiente.

A continuación, se describen las estrategias de inmovilización de biocatalizadores enzimáticos utilizadas en este trabajo.

Inmovilización de enzimas por adsorción iónica

Este tipo de estrategias de inmovilización reversible suelen implicar protocolos sencillos para la inmovilización de enzimas y ofrecen la posibilidad de reutilizar los soportes después de la inactivación de las mismas, lo que lleva a una reducción del descarte generado y el costo global del proceso [109]. El principal inconveniente de estos protocolos es que las enzimas pueden liberarse del soporte durante la reacción si cambia el valor del pH o aumenta la fuerza iónica [96,110].

El soporte agarosa monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE) contienen grupos amino primarios los cuales son aptos para la inmovilización de enzimas cuya superficie contiene grupos carboxilo como en residuos de aspártico y glutámico los cuales son muy frecuentes en la superficie de enzimas (Figura 20) [111].

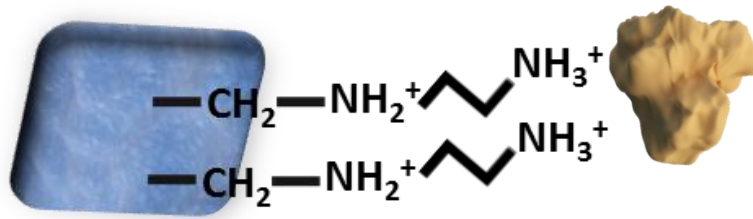


Figura 20: Unión de proteínas a soporte MANAE.

Inmovilización de enzimas por unión covalente

Los biocatalizadores pueden ser covalentemente unidos a un soporte insoluble. Esta estrategia es particularmente útil para evitar la pérdida de la enzima al medio de reacción dada la estabilidad del enlace enzima-soporte [108]. Preferentemente, la unión covalente debe afectar a grupos funcionales de la enzima que no intervengan en el proceso catalítico o promuevan su desestabilización. En este sentido se han reportado el uso de soportes activados con aldehídos [112,113], epiclorhidrina [114], entre otros. En particular, los soportes glioxil, activados con aldehídos, unen a las enzimas a través de Lys superficiales que son abundantes en la mayoría de las proteínas y en general no participan en la catálisis. Esta estrategia idealmente requiere temperaturas moderadas (20-25°C) y pH alcalinos (10-11) para tener la máxima reactividad de las enzimas y del soporte ya que los grupos aminos de las Lys superficiales poseen un pKa en el entorno de 10,6 [115]. La reacción entre aldehídos del soporte y aminos de la enzima produce enlaces reversibles del tipo Bases de Schiff. Una reducción posterior con borohidruro de sodio transforma las bases de Schiff en enlaces covalentes muy estables y los aldehídos libres en grupos hidroxilo inertes [116] (Figura 21). Ya que generalmente se encuentran varios residuos de lisinas presentes en la superficie proteica, puede verse facilitada una unión multipuntual entre la enzima y el soporte. Un gran número de brazos espaciadores cortos entre enzima y soporte permiten fijar posiciones relativas de los grupos implicados en la inmovilización aumentando la rigidificación de la proteína [117]. La rigidificación de la enzima en general aumenta la estabilidad de la misma aunque en algunos casos la actividad enzimática puede ser afectada negativamente [118]. Estos

soportes además presentan una estabilidad de almacenamiento muy buena dada la estabilidad de sus grupos funcionales [119].

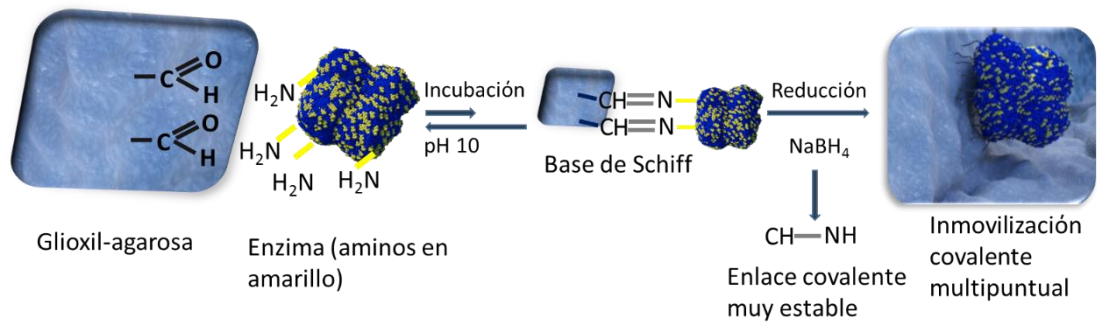


Figura 21: Inmovilización de proteínas en agarosa-glioxil.

Otra estrategia que implica la unión a aldehídos es mediante la unión a soportes funcionalizados con glutaraldehído. En el caso de la inmovilización en soportes glutaraldehído se utilizan los grupos amino terminal de los biocatalizadores para la unión al soporte ya que son los más reactivos a pH neutros [120]. Esta estrategia idealmente requiere temperaturas moderadas (20-25°C) y pH neutros, estas condiciones suaves pueden ser menos perjudiciales para la actividad enzimática. La actividad y estabilidad de proteínas inmovilizadas en este tipo de soportes depende del protocolo utilizado ya que puede estar unido a un brazo espaciador corto (monómero de glutaraldehído) o largo (dímero) [121], esta estrategia presenta algunas ventajas frente a la inmovilización con glioxil-agarosa como la sencillez de la funcionalización del soporte con glutaraldehído y el uso de pH neutro.

Inmovilización de enzimas por afinidad a iones metálicos y unión a soportes heterofuncionales

En los últimos años ha ganado mucho terreno la estrategia de inmovilización de enzimas mediante formación de enlaces de afinidad entre una etiqueta presente en la proteína y el soporte [122–124]. Esto puede lograrse mediante una cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (IMAC). La IMAC es una tecnología que separa y purifica proteínas mediante la interacción entre aminoácidos específicos (histidina) en la superficie de la proteína e iones metálicos inmovilizados en la matriz (Figura 22 A).

Esta estrategia presenta una serie de ventajas como la protección de la actividad y conformación de la enzima durante el proceso de inmovilización, la purificación y la inmovilización de la enzima se da en un solo paso y la posibilidad de reutilizar y recargar los soportes con enzima nueva.

Sin embargo, esta estrategia presenta algunos desafíos. Por un lado, puede darse la unión al soporte de proteínas no deseadas, disminuyendo la carga del soporte con la enzima deseada. Por otro lado, se debe asegurar la unión fuerte de los iones metálicos al soporte para evitar la liberación de los mismos bajo las condiciones de trabajo que causaría la contaminación del medio de reacción.

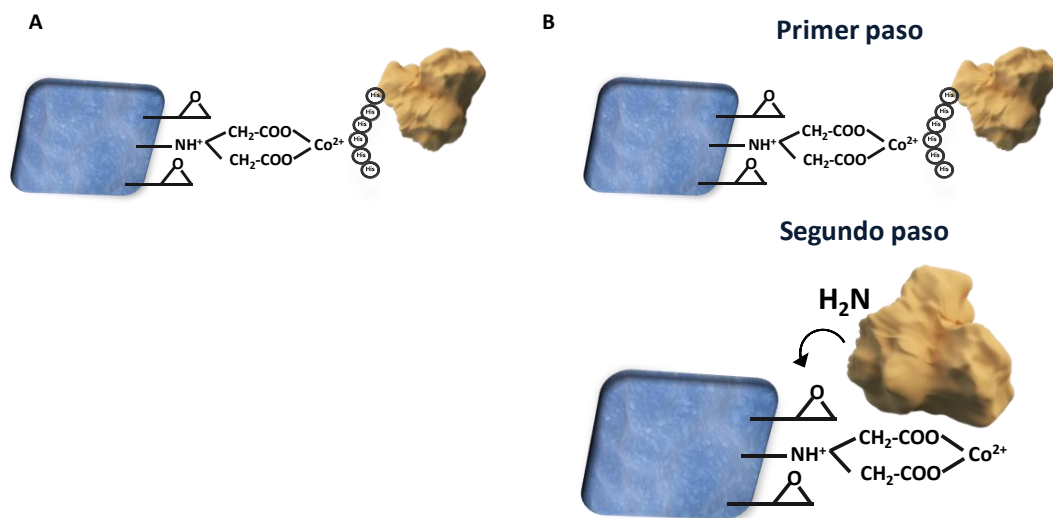


Figura 22: A) Purificación e inmovilización de enzimas en un paso. B) Inmovilización en soportes IDA/epóxido.

Una estrategia de inmovilización que mejora la selectividad del soporte y ha demostrado aumentar la estabilización de varias enzimas es el uso de soportes que unen enzimas por distintos grupos funcionales de su superficie. Esto se logra sintetizando soportes con múltiples grupos reactivos, los llamados soportes heterofuncionales [125].

Dentro de la amplia variedad de soportes heterofuncionales en este trabajo se testeó el uso de un soporte de quelatos metálicos/epóxido [126]. Estos soportes combinan las propiedades de los soportes epóxido para la inmovilización y estabilización de enzimas con la unión de proteínas descrita previamente en la IMAC (Figura 22 B).

Debido a la baja reactividad de los grupos epóxido, la inmovilización de proteínas en estos soportes sigue un mecanismo de dos pasos: primero la enzima se absorbe por afinidad al soporte mediante la interacción entre iones metálicos a las colas de histidina

de las proteínas y segundo, se da la unión covalente por la interacción de residuos aminoacídicos de la superficie proteica con los grupos epóxido [126].

Los grupos epóxido pueden reaccionar con diferentes grupos nucleofílicos ampliamente encontrados en la superficie de proteínas como aminos primarios, tioles e hidroxilos para formar enlaces covalentes fuertes (enlaces amino secundarios, tioéter y éter) con una modificación química mínima de la proteína [127,128].

Inmovilización de enzimas por atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento involucra la confinación física de la proteína dentro de la estructura del soporte. Esta estrategia puede proteger a la enzima de su ambiente operativo, aunque la transferencia de masa de sustratos y productos podría ser limitada comparada con enzimas no atrapadas. El atrapamiento en estructuras nanométricas puede mejorar los problemas de reparto de reactivos dentro y fuera del inmovilizado ya que se confina el biocatalizador en soportes nanoparticulados preparados con materiales semi permeables tales como polímeros (por ej. polietilenimina) o materiales inorgánicos (Por ejemplo: SiO₂) [108].

En este sentido la encapsulación de biomoléculas dentro de nanopartículas de sílica biomimética, inspirada en la naturaleza, ha sido investigada para un gran número de enzimas [129,130]. La deposición de sílica con esta metodología resulta de las interacciones específicas entre biomoléculas aminadas y derivados de ácido silícico. La precipitación de sílica es guiada por poliaminas de cadena larga y la presencia de aniones fosfato que sirven como crosslinkers iónicos, induciendo la formación de microgotas enriquecidas en poliamina-fosfato que se solidifican con la adición de ácido silícico [105]. En la naturaleza, grupos amino en proteínas denominadas silafinas actúan como catalizadores ácido-base que facilitan la formación de enlaces siloxano. Los grupos amino desprotonados aceptan un protón de una molécula de ácido silícico que da como resultado la formación de un grupo silanolato reactivo. Durante el ataque nucleofílico de este grupo en una segunda molécula de ácido silícico, los grupos amino protonados facilitan la liberación de agua de la molécula atacada por protonación (Figura23). El avance de la condensación entre los monómeros de ácido silícico y las partículas de sílice coloidal finalmente da como resultado la precipitación de sílica [131].

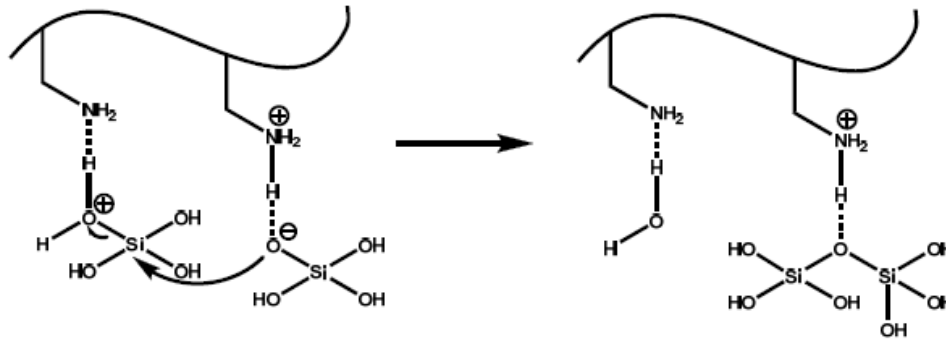


Figura 23: Mecanismo propuesto para la reacción de poli-condensación de ácido silícico facilitado por grupos de poliamina presentes en péptidos de silafina. Tomado de Lechner y Becker, 2015 [131].

La sencillez del protocolo de síntesis y las condiciones suaves de precipitación de la sílica (pH cercano a neutralidad y temperatura ambiente), hacen de esta estrategia una alternativa ventajosa para la inmovilización de enzimas.

Acoplamiento para regeneración de cofactores

La biocatálisis con cascadas enzimáticas ha adquirido una importancia creciente en la industria biotecnológica ya que permite la síntesis de moléculas complejas en varios pasos químicos con alta selectividad y una especificidad [132].

En particular, muchas bioconversiones requieren el uso de cofactores por lo que se ha prestado especial atención en el desarrollo de procesos de regeneración, ya que son costosos y habitualmente se requieren en elevadas concentraciones. En las cascadas redox, la regeneración *in situ* de los cofactores se ha realizado mediante el uso de una variedad de técnicas (química, fotoquímica y enzimática) [133]. Dentro de estas estrategias, el reciclado de cofactores redox mediado por enzimas es industrialmente preferido debido a su alta selectividad y eficiencia [134]. Para esto se han estudiado el desarrollo y optimización de cascadas bi-enzimáticas acopladas de deshidrogenasas que resultan en la reducción de la cantidad de cofactor requerido y mejora de las limitaciones termodinámicas asociadas al proceso [135,136]. La co-inmovilización de las deshidrogenasas que participan en la cascada redox no solo permite la fácil separación y reutilización del biocatalizador bi-enzimático sino que permite que el cofactor se recicle *in situ* dentro de la misma partícula porosa, cerca de la deshidrogenasa principal

[93]. En este escenario, la concentración efectiva del cofactor dentro de los poros del soporte sería mayor; por lo tanto, mayores cantidades de cofactor (en su estado de oxidación correcto) se encuentra disponible para ser utilizado por la deshidrogenasa principal en la catálisis, optimizando la tasa de recambio de la misma.

Sin embargo, la co-inmovilización de dos o más enzimas en el mismo soporte no es trivial ya que una estrategia de inmovilización podría ser óptima para una enzima, pero no para las demás. Por lo tanto, el protocolo debe ser cuidadosamente diseñado para preservar la actividad e idealmente, para aumentar la estabilidad de todas las enzimas que intervienen en la cascada.

Biocatalizadores enzimáticos estudiados

Es este trabajo se planteó una cascada enzimática de dos pasos para la conversión de DHA y GA a ácido L-láctico (Figura 24). Para esto se utilizó una dihidroxiácido dehidratasa (DHAD) recombinante expresada en *E. coli* para transformar el GA en ácido pirúvico y una transaminasa (TA) recombinante expresada en *E. coli* para transformar DHA y L-alá en serinol y ácido pirúvico. La conversión de piruvato a ác. L-láctico se llevó a cabo por un sistema enzimático co-inmovilizado de L-lactato deshidrogenasa (LDH) y formiato deshidrogenasa (FDH).

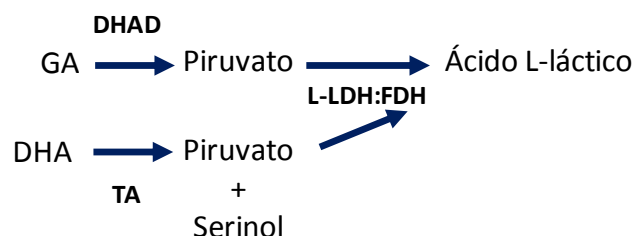


Figura 24: Esquema de la cascada enzimática planteada. DHA, dihidroxiacetona, GA, ácido glicérico, TA, transaminasa, DHAD, dihidroxiácido dehidratasa, L-LDH, L lactato deshidrogenasa, FDH, formiato deshidrogenasa.

A continuación, se describen brevemente las principales características de los biocatalizadores enzimáticos estudiados en este trabajo.

Dihidroxiácido dehidratasa de *Sulfolobus solfataricus*

En este trabajo se utilizó la enzima recombinante dihidroxiácido dehidratasa (DHAD, EC 4.2.1.9) de *Sulfolobus solfataricus*. Esta enzima pertenece a la familia de las liasas, las

cuales clivan enlaces carbono-oxígeno. La misma posee un *cluster* de hierro-azufre [4Fe-4S] y ha sido utilizada para la generación de piruvato (y agua) a partir de ácido glicérico *in vitro* sin la necesidad del agregado de cofactores [137,138].

Transaminasa de *Pseudomonas fluorescens*

En este trabajo se utilizó la enzima recombinante transaminasa (TA, EC 2.6.1.x) de *Pseudomonas fluorescens*. Este tipo de enzimas catalizan la transferencia de un grupo amino de un donante a una cetona o aldehído. Las transaminasas han demostrado ser biocatalizadores altamente versátiles para la síntesis de aminas quirales y α -aminoácidos [139]. Las mismas requieren del derivado de vitamina B6 piridoxal-5 'fosfato (PLP) como cofactor. La reacción de las TA se divide en dos pasos: una desaminación oxidativa de un donante de amina y una aminación reductiva de un aceptor de amina [140]. A su vez, las TA pueden clasificarse como α -transaminasas (α -TA) o ω -transaminasas (ω -TA) en función de la posición del grupo amina que se transfiere en relación con el grupo carboxilo del sustrato. Las α -TA requieren la presencia de un grupo carboxílico en la posición α por lo que solo permiten la formación de α -aminoácidos. Las ω -TAMs representan todas las demás TA (es decir, donde no están involucrados un α -aminoácido o α -cetoácido) [141]. En este trabajo se utilizó una ω -TA, las mismas en principio, pueden aceptar cualquier cetona o amina y, por lo tanto, se consideran de gran interés para la industria farmacéutica [142].

L-lactato deshidrogenasa y formiato deshidrogenasa

Las deshidrogenasas son enzimas que catalizan dos tipos de reacciones, la oxidación de un grupo alcohol a un grupo carbonilo y la reacción inversa de reducción de un carbonilo a un alcohol. Estas enzimas intervienen en importantes rutas de síntesis de gran demanda en la química moderna, en química fina y farmacéutica, relacionadas con la síntesis altamente eficiente de enantiómeros puros como alfa hidroxácidos a partir de sustratos pro quirales [143]. Una característica de estas enzimas es que requieren de un cofactor redox. El uso de enzimas aisladas hace necesario el agregado de este cofactor como sustrato. En este estudio se trabaja con la enzima L-lactato deshidrogenasa de conejo (E.C. 1.1.1.27), la misma requiere de NADH para su funcionamiento. Dicho

cofactor representa un alto costo para su uso en reacciones *in vitro* a gran escala [144] por lo que se presenta la necesidad del diseño de un sistema de regeneración *in situ* del mismo, de tal forma que siempre se encuentre disponible en el medio de reacción. La inclusión de un sistema de regeneración de cofactor tiene sentido desde un punto de vista termodinámico, cinético y de costos ya que es necesario que el diseño y desarrollo de este sistema sea eficiente y económico [133] y resulta inviable la adición del cofactor como sustrato al reactor. Se han desarrollado diferentes sistemas de regeneración para superar esta dificultad, como la regeneración electroquímica, química y fotoquímica [145]. Sin embargo, el uso de enzimas adicionales ha atraído mucha atención en los últimos años debido a varias ventajas: las condiciones suaves de reacción, catálisis efectiva, alta selectividad, y la facilidad de monitoreo de reacción [133]. Los cofactores de nicotinamida, NAD(P)(H), son los cofactores oxidoreductasa más utilizados. En particular el NADH puede ser regenerado usando formiato deshidrogenasas (FDH, EC 1.1.99.33), glucosa deshidrogenasas (EC 1.1.1.47 [146,147], o alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.1) [148].

En este trabajo se seleccionó la enzima FDH de *Candida boidinii* para llevar a cabo la regeneración del NADH utilizado por la LDH. El estudio de acoplamiento de FDH a deshidrogenasas para regeneración de NADH ya ha sido ampliamente estudiado [149]. La misma cataliza la oxidación del ácido fórmico con la reducción concomitante del cofactor NAD(P)H. Cuenta con la ventaja de que el ácido fórmico es un sustrato de bajo costo, estable e inocuo para las enzimas. El subproducto (dióxido de carbono) es también inocuo y puede ser fácilmente eliminado de la reacción sin contaminar los productos. En este estudio se partió de LDH y FDH de origen comercial.

Objetivos específicos

- Construir un plásmido de expresión de la enzima DHAD de *Sulfolobus solfataricus*
- Expresar y purificar la enzima DHAD
- Inmovilizar DHAD en diferentes soportes
- Expresar y purificar la enzima TA de *Pseudomonas fluorescens*
- Inmovilizar TA en diferentes soportes
- Co-inmovilizar LDH y FDH en agarosa-glioxil
- Caracterizar biocatalizadores enzimáticos inmovilizados

Materiales y metodología

Materiales

La Taq ADN polimerasa, la Platinum Taq ADN polimerasa, la ADN T4 ligasa, las enzimas de restricción, el kit de clonado en Champion™ pET SUMO Expression System y el DNA ladder fueron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). El plásmido peTduet fue donado por el Prof. López-Gallego. El kit de extracción de ADN plasmídico y el kit DNA Clean and concentrator fueron de Zymo Research (Irvine, CA, Estados Unidos), la L-Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo tipo II, la formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*, la polietilenimina (Mw 1300), los marcadores de peso molecular de preteínas, el piruvato, la sefarosa 6BCL fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). El anticuerpo anti-His tag monoclonal de ratón 1 mg/mL fue de EBI (Vancouver, Canada). El anticuerpo secundario de conejo anti IgG de ratón con fosfatasa alcalina fue de antibodies-online.com (Limerick, PA, Estados Unidos). El tetrametil ortosilicato y la trehalosa fueron de MERCK (Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos). El dodecil sulfato de sodio fue de AppliChem (Darmstadt, Alemania). El fosfato de sodio, el acetato de sodio y potasio, el bicarbonato de sodio y el HEPES fueron de Biopack (Buenos Aires, Argentina). Las columnas de gel filtración PD10 fueron de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). Las columnas utilizadas en el HPLC fueron de Phenomenex (Torrance, CA, Estados Unidos). Los demás reactivos fueron grado analítico.

Metodología

Construcción del vector de expresión conteniendo el gen de la DHAD

El gen de la enzima DHAD de *Sulfolobus solfataricus* (GenBank: AE006641.1, 1677 nucleótidos) fue sintetizado por la empresa Shinegene, el mismo fue adquirido en el vector PUC57 liofilizado.

Secuencia:(5'-->3')

```
ATGCCAGCAAATTAATAGTCCCTCGAGATATCATGGCATATATAATGC
TCCACACAGAGCGTTTCTAAGATCTGTAGGTTTAACGGATGAAGAGATAG
GTAAACCATTGGTTGCCATAGCCACAGCATGGAGTGAGGCAGGCCCTTGT
```

AACTCCACACATTAGCTTTAGCAAGAGTAGCTAAGGAGGGGACAAAGGA
AGCCGGTTTATCCCCATTAGCATTCCCAACCATGGTAGTTAACGATAACA
TTGGAATGGGATCTGAAGGAATGAGGTATAGTTTAGTTAGCAGGGATTTA
ATAGCAGATATGGTAGAGGCGCAATTTAATGCTCACGCGTTTGATGGACT
AGTGGGCATAGGAGGGTGTGATAAGACAACGCCTGGTATACTAATGGCAA
TGGCTAGGTAAACGTTCCCTCAATTTACATTTATGGCGGATCAGCAGAG
CCAGGGTACTTTATGGGTAAAAGACTAACAATAGAGGATGTACATGAGGC
AATAGGCGCATATTTAGCGAAGAGAATAACAGAAAATGAGCTATACGAAA
TAGAGAAAAGGGCACATCCGACATTGGGAACTTGCTCTGGATTATTTACA
GCCAATACTATGGGCTCAATGTGCGAGGCATTAGGAATGGCATTGCCAGG
TAGTGCATCACCAACCGCTACCTCATCTAGGAGAGTAATGTATGTGAAGG
AAACTGGAAAAGCTTTAGGTAGTTTAAATTGAAAACGGAATAAAGTCAAGG
GAAATATTAACTTTTGAGGCCTTTGAGAACGCAATAACAACGCTAATGGC
TATGGGTGGTTCAACAAACGCGGTATTACACCTATTGGCAATAGCCTATG
AAGCAGGAGTGAAATTAACCTTAGATGATTTCAATAGGATATCTAAAAGA
ACACCATATATTGCAAGTATGAAACCTGGTGGAGATTACGTGATGGCTGA
TTTGGACGAAGTTGGAGGTGTCCAGTAGTCTTAAAGAAGCTACTAGACG
CTGGTCTACTTCATGGTGACGTTTTAACAGTTACTGGAAAGACTATGAAG
CAAAACCTTGAGCAATACAAGTATCCTAATGTACCTCACAGTCATATAGT
TAGGGATGTTAAGAATCCGATTAAGCCTAGAGGAGGAATAGTTATATTGA
AGGGATCGTTAGCCCCAGAAGGTGCCGTAATTAAGGTAGCCGCAACTAAC
GTTGTTAAATTTGAAGGAAAGGCTAAGGTGTATAATTCCGAGGACGACGC
TTTTAAGGGAGTTCAAAGTGGCGAAGTTAGTGAGGGTGAAGTTGTAATTA
TAAGATATGAAGGACCTAAGGGAGCTCCAGGTATGCCAGAAATGCTGAGA
GTTACAGCGGCAATCATGGGTGCGGGTTTGAATAACGTTGCCTTAGTTAC
TGATGGTAGATTTTCCGGAGCCACTAGGGGACCTATGGTAGGCCATGTAG
CTCCAGAGGCAATGGTAGGTGGTCTATCGCAATAGTTGAAGATGGAGAT
ACTATAGTGATTGATGTTGAGAGCGAAAGACTTGACTTGAAGCTATCCGA
GGAGGAGATAAAGAATAGACTGAAAAGATGGTCTCCTCCATCTCCAAGAT
ACAAGTCTGGTCTATTGGCTAAATACGCCTCCTTGGTCTCCAGGCGTCA
ATGGGGGCTGTGACTAGACCAGCTTAA

Se reconstituyó el plásmido PUC57-DHAD según las instrucciones del fabricante resuspendiendo en 20 µL de agua libre de DNAsa. Se llevó a cabo una PCR (ver sección “Reacción en cadena de la polimerasa”) y la purificación de los amplicones se realizó mediante el kit DNA Clean and concentrator siguiendo las indicaciones del fabricante. El clonado en el vector petDuet y pBAD se realizó por corte con enzimas de restricción y posterior ligación. Para esto se se cortó peTDuet y el inserto obtenido por PCR con

BamHI y Sall. Estos se realizaron reacciones de 20 μ L conteniendo agua libre de nucleasas, tampón Tango™, ADN molde (1 μ g), BamHI (5UI), Sall (5UI), a 37°C por 2 h. La ligación se realizó en relaciones 1:3, 3:1, 1:7, 1:5 de vector:inserto en reacciones de 20 μ L conteniendo Tampón de ligasa T4, vector e inserto en cantidades necesarias para las relaciones previamente mencionadas, ligasa T4 0,1 UI, agua, a 24 °C por 16 h. El producto de ligación se utilizó para transformar células DH5 α y BL21 codón plus. La presencia del fragmento se corroboró por análisis en gel de agarosa de una minipreparación de ADN plasmídico y por PCR.

El clonado en peTSUMO se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante por PCR utilizando Platinum *Taq* DNA polimerasa.

Preparación de células competentes

Se crecieron 5mL de cultivo de *E. coli* BL21-CodónPlus (DE3)-RP y DH5 α durante 16 horas en medio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% cloruro de sodio). Se inocularon 50 mL de LB con 1mL del precultivo y se crecieron a 37 °C en agitación a 250 rpm hasta observar una DO600= 0,3 ~ 0,6. Se centrifugaron las células a 4000 x g, durante 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 50 mL de buffer A a 4°C (buffer A: 50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, pH 6,2). Se incubaron en hielo 60 minutos y se centrifugaron a 4000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. El precipitado celular de células se resuspendió en 50 mL de buffer B a 4°C (buffer B: 50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, 20% glicerol, pH 6,2). Para BL21 se suplementó el medio con cloranfenicol (30 μ g/mL) en cada etapa.

Transformación de *E. coli*

Para todos los casos se colocaron las células competentes preparadas en hielo. A 50 μ L de células se le agregaron 0,5 μ L de plásmido. La suspensión se dejó en hielo durante 30 minutos. La transformación se llevó a cabo por choque térmico a 42 °C por 45 segundos y hielo durante 5 minutos. Las células transformadas se suspendieron en 1 mL de medio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L NaCl, 20 mM glucosa, pH 7,0) y se incubaron a 37 °C por una hora. El cultivo se sembró en LB agar suplementado con el correspondiente antibiótico y se incubaron 16 horas a 37 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción de PCR fue realizada en un volumen de 25 µl conteniendo agua, tampón de la enzima taq polimerasa conteniendo MgCl₂, 0,1 µM de dNTPs, 0,4 µM de cebador sentido, 0,4 µM de cebador antisentido, 2,5 UI de Taq ADN Polimerasa y 1,0 µl de ADN molde.

Los cebadores utilizados se presentan en la tabla 3.

El ciclado fue de:

- 95°C por 3 minutos
- 35 ciclos de: 95 °C por 30 segundos, temperatura de hibridización* por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto.
- 72 °C por 10 minutos.

Para *colony* PCR se agregó un paso inicial 95 °C 5 min.

*Las temperaturas utilizadas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa.

Cebador	Secuencia	Temperatura de hibridización (°C)	Referencia
Cebador sentido para peTDuet	GGATCCGATGCCAGCAAATTAATAGTCCCT (BamHI)	63	[37]
Cebador antisentido para peTDuet	GTCGACTTAAGCTGGTCTAGTCACAGCCC (Sall)		
Cebador sentido para peTSUMO	ATGTCACCAGCAAATTAATAGTCCCT	60	Este trabajo
Cebador antisentido para peTSUMO	TTAAGCTGGTCTAGTCACAGCCC		
Cebador sentido para pBAD	ATAT GGTACCAA TGCCAGCAAATTAATAGTCCCT (KpnI)	60	Este trabajo
Cebador antisentido para pBAD	ATAT GAATTCT TAAAGCTGGTCTAGTCACAGCCC (EcoRI)		

El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Expresión y purificación de proteínas

Para la expresión de TA y DHAD, se tomaron colonias aisladas de *E. coli* BL21 Codón plus conteniendo el plásmido deseado en cada caso y se crecieron en 5 mL de medio LB con el correspondiente antibiótico. Los cultivos fueron incubados 16 horas a 37 °C con agitación a 220 rpm. Se tomaron 5 mL de cada cultivo y se inocularon 250 mL del LB suplementado con antibiótico. Se incubaron a 37 °C con agitación a 220 rpm hasta observar que la DO_{600} alcanzara valores de absorbancia de entre 0,6 y 1,0. La inducción de la expresión proteica se llevó a cabo mediante el agregado de IPTG 1 mM para TA y 0.5-2 mM para DHAD e incubando 16 h a 16 °C en agitación para TA y 16 h a 37 °C para DHAD a 190 rpm. La expresión de DHAD se llevó a cabo según el protocolo reportado por [137].

Se colectaron las células mediante centrifugación a 4000 x g a 4 °C durante 15 min. Se resuspendieron en 25 mL de tampón de lisis (para TA: HEPES 25 mM, 1 mM piridoxal fosfato PLP, pH 8,0; para DHAD: Tris-HCl 20 mM conteniendo 0,5 M de NaCl, 5 mM de imidazol y 10% de glicerol) y se lisaron con ultrasonido en hielo durante 3 minutos en intervalos de 10 segundos cada 30 segundos. El detrito celular y proteínas insolubles fueron removidos por centrifugación a 17000 x g 4 °C durante 30 min.

Los clarificados celulares se aplicaron a una columna de afinidad por quelatos metálicos conteniendo 2 g de agarosa-IDA previamente lavada con 10 mL de agua destilada, cargada con 10 mL de una solución 100 mM de $CoSO_4$ para TA y $NiSO_4$ para DHAD y equilibrada con 15 mL el tampón de lisis correspondiente. Las proteínas adsorbidas fueron lavadas con 10 mL de tampón de lisis y con 5 mL de tampón de lavado (Tampón de lisis conteniendo 20 mM de imidazol) y finalmente eluidas con tampón de elución (tampón de lisis conteniendo 250 mM de imidazol). En el caso de la purificación de TA, se agregó 1 mM de cofactor PLP en cada paso y el imidazol se removió por gel filtración. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Las muestras de proteínas fueron preparadas con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, pH 6,8) y calentadas 5 minutos a 100°C.

Los geles fueron corridos en tampón de corrida Tris-glicina (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a 120 V durante 90 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler prestained protein ladder 26616 de ThermoScientific.

Los geles fueron teñidos durante 16 horas a temperatura ambiente con solución de coomassie (2,5 g/L *Coomassie Brilliant Blue* en MeOH:H₂O:ácido acético 4,5:4,5:1) y se decoloraron con solución decolorante (MeOH:H₂O:ácido acético 4,5:4,5:1) agua destilada. Fueron documentados utilizando un E-Gel[®] Imager (Life Technologies).

Western blot con anticuerpos anti hisitidinas

Se llevó a cabo la transferencia semiseca a membrana de nitrocelulosa en un *iBlot Blotting System* (ThermoFisher Scientific). La membrana se bloqueó 16 h en 1% leche en PBS-tween 0,1% a 4 °C. Se lavó 3 veces con PBS-tween 0,1% y se incubó 1 h con una dilución de anticuerpo primario anti His (1/2000) a 24 °C. Se lavó 2 veces con PBS-tween 0,1% y se incubó 1 h con una dilución de anticuerpo secundario (1/5000) a 24 °C. El revelado de las bandas se realizó con el sustrato BCIP/NBT. Se detuvo la reacción mediante el agregado de una solución de ácido acético 10%.

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) [150]. Para el mismo se agregaron 25 µL de muestra a 200 µL de solución de BCA (50:1 de Solución de ácido bicinonínico: solución de sulfato de cobre (II)), se incubó 30 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia a 562 nm. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración realizada en las mismas condiciones con seroalbúmina bovina (Curva en Anexo).

Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras de ADN fueron preparadas mediante el agregado de tampón de carga (Glicerol 60%, Tris-HCl pH 7,6 10 mM, azul de bromofenol 0,03% y xileno cianol 0,03%).

Las electroforesis fueron llevadas a cabo en tampón TAE (20 mM Tris base, 10 mM de ácido acético y 0,5 mM de EDTA) a 100 V durante 25 minutos. Se utilizó el ADN *ladder* SM0331 de ThermoScientific. Los geles fueron documentados utilizando un E-Gel® Imager (Life Technologies) con luz UV.

Ensayos de actividad

Actividad dihidroxiácido dehidratasa (DHAD)

La actividad se midió en un ensayo de 1 mL conteniendo 5-20 mM ácido glicérico en 100mM de HEPES pH 7,4 y 1 mg/mL de DHAD. La reacción se incubó 50°C por 12 h. La concentración de piruvato y ácido glicérico se determinó por HPLC como se describe en el capítulo 1. La detección de piruvato se realizó a 190 nm, tiempo de retención 9,1 min, cromatograma y curva de calibración en anexo.

Actividad transaminasa (TA)

La actividad se midió en un ensayo de 0,2 mL conteniendo 2 mM de DL- α -metilbenzilamina, 2 mM de piruvato, 0,1 mM de PLP en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de 10 μ L de una solución de TA y se midió durante 10 min a 245 nm ($\epsilon_M = 12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

L-Lactato deshidrogenasa (L-LDH)

La actividad se midió en un ensayo de 2,5mL conteniendo 0,8mM de piruvato, 0,2 mM de NADH en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante el agregado de una solución 0,015 mg/mL de L-LDH y se midió durante 120 segundos a 340nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Formiato deshidrogenasa (FDH)

La actividad se midió en un ensayo de 2mL conteniendo 100 mM de ácido fórmico y 5 mM de NAD⁺ en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se inició la reacción mediante

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

el agregado de una solución dializada de 0,26 UI/mL de FDH y se midió durante 120 segundos a 340 nm ($\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

En todos los casos las unidades de enzima (UI) se definieron como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato en un minuto en las condiciones del ensayo.

Síntesis de soportes para la inmovilización de proteínas

Síntesis de agarosa-glioxil

El soporte agarosa-glioxil se preparó según Guisán y cols [116]. La activación de agarosa se realizó sobre 10,5 g de agarosa 6BCL en 3 mL de agua destilada a los que se les agregó 0,34 g de NaOH en 5 mL de agua destilada a 4 °C, 0,145 g de BH_4Na y 3,6 mL de glicidol gota a gota. Se dejó la mezcla 16 horas a 24 °C en agitación con palas y se lavó con exceso de agua. La oxidación a grupos aldehído se obtuvo mediante el agregado de 150 mL de una solución 10 mM de NaIO_4 durante 2 horas a 24 °C. Se finalizó con 3 lavados de 50 mL de agua destilada.

Síntesis de celulosa dialdehído

La activación de la celulosa se realizó según Dosadina y cols [151]. Se resuspendieron 70 mg de celulosa en 5 mL de una solución de periodato de sodio 0,5 M en agua para obtener dialdehído celulosa. Se dejó en agitación a 24 °C por 16 h cubierto de la luz. El NaIO_4 remanente se removió con agua destilada.

Síntesis de MANAE

Se incubaron 10 g de agarosa-glioxil con 90 mL de etilendiamina 1 M pH 10,05 por 2 horas en agitación a 25 °C. Se agregó 1 g de NaBH_4 y se incubó por 2 horas en agitación a 25 °C. Posteriormente se lavó con 100 mL de acetato de sodio 100 mM pH 4, seguido de 100 mL de borato de sodio 100 mM pH 9,0 y por último 500 mL de agua destilada.

Síntesis de IDA-Co

Se incubaron 10 g de sefarosa 6BCL en 100 mL de ácido iminodiacético 2 M en tampón bicarbonato de sodio 0,1 M pH 11,0. Se dejó reaccionando 18 horas en agitación a 25 °C para luego ser lavado con agua destilada. El soporte luego se incubó con 100 mL de sulfato de cobalto 40 mg/mL por 2 horas a 25 °C y se lavó con agua destilada.

Síntesis de soportes heterofuncionales: IDA-Epóxido

Se resuspendieron 10 g de sefarosa 6BCL en 10 mL de NaOH 1 M. Se agregó en agitación lentamente 1,7 mL de epicloridrina y se dejó a 22 °C 16 horas en agitación. Se filtró y lavó con agua destilada. Se tomaron los 10 g del soporte previamente preparado y se incubaron en 18 mL de 0,1 M de borato de sodio con 2 M de ácido iminodiacético a pH 9,0, 22 °C en agitación suave 16 h.

Inmovilización de proteínas

Inmovilización de TA en agarosa-IDA Cobalto

La inmovilización se llevó a cabo incubando 10 mL de clarificado celular (proveniente de la expresión de TA en *E. coli*) a 1 g de agarosa-IDA-Co por 60 min a 24 °C en agitación. Se lavó con 25 mL de HEPES 25 mM pH 7,0 con 0,1 mM PLP.

Inmovilización de TA en celulosa

La inmovilización se llevó a cabo incubando 1 mL de TA en fosfato de sodio 25 mM pH 8,0 conteniendo 1 mM de PLP a 0,2 g de soporte celulosa-dialdehído por 16 h a 24 °C en agitación. Se lavó con 25 mL de HEPES 25 mM pH 7,0 con 0,1 mM PLP.

Inmovilización de TA en MANAE

La inmovilización se llevó a cabo incubando 2 mL de TA en fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 conteniendo 1 mM de PLP a 1 g de soporte por 16 h a 24 °C en agitación. Se lavó con 25 mL de HEPES 25 mM con 0,1 mM PLP.

Inmovilización de enzimas en nanopartículas de sílica biomimética

La inmovilización se llevó a cabo mediante el agregado de 0,25 mL de tetrametilortosilicato 0,9 M (previamente hidrolizado con HCl 1mM) a 0,25 mL de polietilenimina (PEI) 10% pH 8,0 en 1mL de tampón fosfato de sodio 100 mM pH 8,0 conteniendo las proteínas de interés. Se centrifugó el precipitado y se lavó con fosfato de sodio 100 mM pH 8,0 con 0,5 M de NaCl y luego con fosfato de sodio 25 mM pH 7,0.

Inmovilización en agarosa-glioxil

Se realizó según el protocolo descrito en Mateo y cols [152]. Las inmovilizaciones fueron realizadas ofreciendo una solución enzimática en tampón 0,1 M bicarbonato de sodio pH 10,0 a agarosa-glioxil (en relación 10:1) previamente equilibrada en dicho tampón.

Una vez culminado el tiempo de incubación, se procedió a incubar con 1 mg/mL de borohidruro de sodio en hielo para reducir las bases de Schiff generadas entre aminas y los grupos aldehído del soporte de manera de generar enlaces covalentes. En todos los casos, se removió el sobrenadante mediante filtración y se lavó el soporte con tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0.

Para TA, la incubación se realizó durante 16 h a 24 °C. Para LDH 15 min a 24 °C en presencia de 300 mM de trehalosa, para FDH 1,5 h a 4°C y luego 1 h a 24 °C. En el caso del derivado de LDH se realizó la incubación con borohidruro de sodio en un volumen 10 veces mayor, a 0,1 mg/mL en hielo (relación soporte: volumen 1:100).

Co-inmovilización de L-LDH:FDH

La co-inmovilización se llevó a cabo ofreciendo 0,25 UI de LDH y 1 UI de FDH por gramo de glioxil-agarosa con 300mM de trehalosa. Se incubó la FDH por 1,5 h 4°C y luego 45 minutos a 24°C, se agregó la L-LDH y se incubó 15 minutos a 24°C. La reducción se llevó a cabo con 0,1 mg/mL de borohidruro de sodio en hielo en volumen 10 veces mayor (relación soporte: volumen 1:100).

Caracterización de preparados inmovilizados.

El porcentaje de inmovilización (% I) se definió como el porcentaje de la diferencia entre la enzima ofrecida y el sobrenadante, con respecto a la enzima ofrecida. El mismo se calculó utilizando la medida de actividad de las enzimas según la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{(Enzima\ ofrecida - Enzima\ en\ sobrenadante) * 100}{Enzima\ ofrecida}$$

Para el rendimiento se resuspendió el derivado en tampón y se midió su actividad. El rendimiento se definió como el porcentaje de actividad recuperada en el derivado con respecto a la diferencia de la enzima ofrecida y el sobrenadante. El mismo se calculó utilizando la medida de actividad de las enzimas según la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{(Actividad\ en\ suspensión) * 100}{Actividad\ de\ enzima\ ofrecida - Actividad\ de\ enzima\ en\ sobrenadante}$$

Estabilidad térmica de TA, LDH y FDH inmovilizadas

Se incubaron 1,8 UI/mL de TA inmovilizada en sílica, MANAE, glioxil, IDA-Co e IDA-Epoxy en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 con 1 mM de PLP, a -20 °C, 4 °C, 60 °C y 70 °C. Para la LDH y FDH, se llevó a cabo la incubación de las enzimas co-inmovilizadas en glioxil en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 a 45 °C y 55 °C.

Para TA, se midió la actividad al inicio y final del ensayo. Se graficó el % de actividad remanente en cada caso. Para LDH y FDH se siguió la cinética de inactivación tomando muestra a períodos cortos de tiempo. En todos los casos se incubaron las enzimas en solución como control del ensayo.

Síntesis de ácido láctico con LDH:FDH co-inmovilizadas

La síntesis de ácido L-láctico con LDH y FDH co-inmovilizadas se realizó en 2 mL de una solución que contenía 3 mM de ácido pirúvico, 0,2 mM de NAD⁺ y 0,1 M de ácido fórmico en tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0. La reacción se inició agregando 0,2 g de LDH/FDH co-inmovilizada (1: 4 UI LDH: UI FDH/g de soporte). Se tomaron alícuotas y la concentración de ácido pirúvico y ácido láctico se determinó por HPLC con una columna Ultra RP C18 (5 µm, 250 X 4,6 mm, Restek), elución isocrática en 98,75% tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 2,5 y 1,25% metanol. Flujo 0,8 ml / min. La detección se realizó a 210 nm. El tiempo de retención de piruvato y ácido láctico fue de 3,6 y 5,4 min, respectivamente. Se contruyeron curvas de calibración para piruvato y lactato (Figura en anexo).

Reuso de la preparación LDH:FDH co-inmovilizadas

La LDH inmovilizada con glioxil-agarosa se reutilizó diez veces. Las reacciones se realizaron como se describe previamente durante 1 hora. Entre cada ensayo, la preparación inmovilizada se lavó dos veces con 2 mL de tampón de fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se añadió una solución de 3 mM de ácido pirúvico y 0,2 mM de NAD⁺ en 2 ml de 25 mM de fosfato de sodio pH 7,0. Las muestras se analizaron por HPLC como se describe previamente.

Resultados y discusión

En esta segunda etapa del trabajo de tesis se llevó a cabo la preparación de los biocatalizadores enzimáticos inmovilizados involucrados en el segundo y tercer paso de la conversión del glicerol hacia ácido L-láctico. Se propuso el uso de una dihidroxiácido dehidratasa y una transaminasa recombinantes para la conversión a piruvato como se indica en la figura 24. El mismo será luego tomado por una lactato deshidrogenasa (de origen comercial) para la conversión a L-lactato, utilizando una formiato deshidrogenasa (de origen comercial) para la regeneración del cofactor (NADH) utilizado (Figura 24).

Expresión y purificación de la enzima dihidroxiácido dehidratasa (DHAD)

La enzima DHAD de *S. solfataricus* fue seleccionada ya que se encontraba reportado que era capaz de convertir el ácido glicérico en piruvato [37,153].

En el reporte de Gao y cols [137] utilizaron la enzima DHAD clonada en el plásmido peTDuet expresada recombinante en *E. coli*. La misma fue purificada por IMAC y utilizada *in vitro* para la conversión de GA a piruvato con una actividad específica de 0,011 U/mg. En este trabajo la DHAD se acopló a otras enzimas para formar una cascada de conversión. En este caso se logró una productividad de conversión de 0,39 mM/L.h de piruvato utilizando una solución de 0,1 U/mL de DHAD.

Otro reporte de uso *in vitro* de DHAD fue realizado por Carsten y cols [153] donde se caracterizó esta enzima en mayor profundidad. Para esto se clonó en peT28a+ y se expresó recombinante en *E. coli*. En este reporte se testearon diferentes estrategias de purificación de la enzima recuperando muy poca actividad en todos los casos. Los autores sugieren que esta baja podría estar relacionada a alguna deficiencia en el cluster [Fe-S]. En comparación con una purificación de Ni-NTA, la purificación a través de precipitación por calor produjo una mayor actividad específica (0,9 UI/mg). Sin embargo, los autores indican que la actividad de esta enzima es aún demasiado baja para aplicaciones industriales y debe ser mejorada.

Basándonos en estos reportes, se llevó a cabo la expresión de la enzima en peTDuet como se reportó en Gao y cols. y se solicitó la construcción en peT28a+ al grupo de Carsten y cols. Tomando en cuenta la afirmación realizada por los autores de la muy baja actividad específica de la enzima, se testeó además su expresión en dos plásmidos adicionales pBAD y peTSUMO los cuales se caracterizan por sus muy altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* [154,155].

Como primera etapa en la construcción de los vectores, se corroboró la presencia del gen de la DHAD en el plásmido comercial sintetizado por la empresa Shinegene observando un amplicón del tamaño esperado (1677 pb) por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 25).

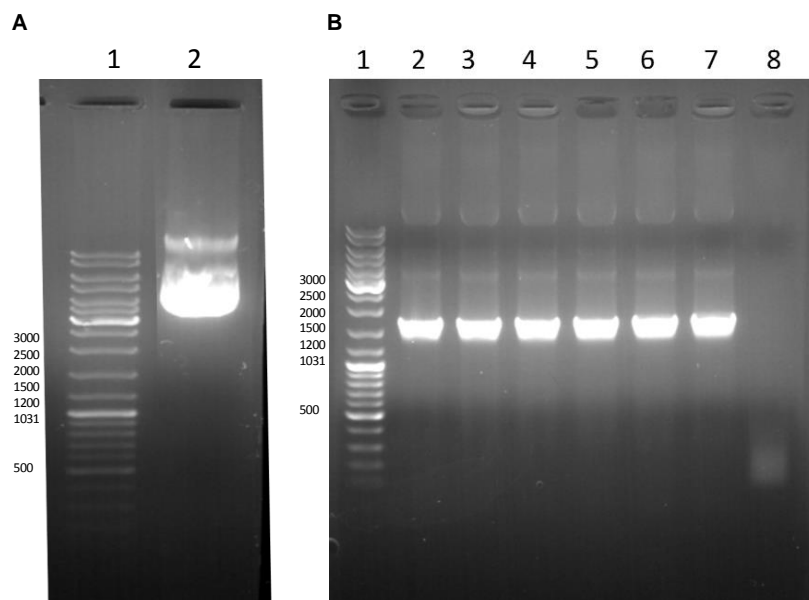


Figura 25: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido PUC57-DHAD adquirido. A, minipreparación de ADN plasmídico PUC57-DHAD. B, PCR del gen DHAD. Carril 1 ADN ladder SM0331 Fermentas, 2 -7 PCR de 6 muestras, 8 blanco de PCR.

Se comenzó con la construcción del plásmido peTSUMO con DHAD como se describe en la sección de metodología. El mismo fue utilizado para transformar células de clonado DH5 α . Se corroboró la presencia del plásmido en las células transformantes por electroforesis en gel de agarosa (Figura 26 A) y del gen por PCR y posterior electroforesis (Figura 26 B).

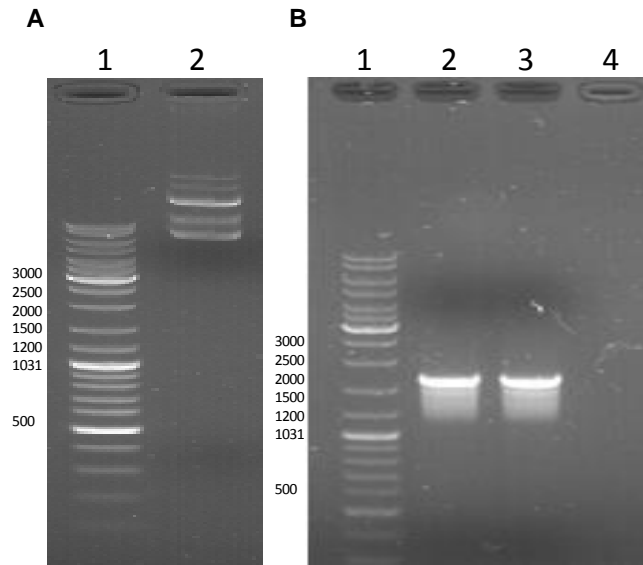


Figura 26: Análisis de petSUMO-DHAD en electroforesis en gel de agarosa 1 %. A, Minipreparación de ADN plasmídico, carril 1 ADN *ladder*, 2 extracción de ADN plasmídico, B, PCR de los plásmidos extraídos, carril 1 ADN *ladder*, 2-3 PCR para DHAD, 3 blanco de reacción.

Para la construcción en los plásmidos peTDuet y pBAD se llevaron a cabo PCR del gen de interés con los cebadores diseñados que agregaban sitios de restricción. Una vez corroborada la amplificación por electroforesis en gel de agarosa (figura 27 A), se llevó a cabo el clonado de la secuencia en los plásmidos de interés con los cuales se transformaron células DH5 α . Se corroboró la presencia del plásmido y del inserto en las transformantes (Figura 27 B y D).

La ligación del gen en pBAD resultó exitosa ya que se visualizó un fragmento correspondiente al largo del gen de la DHAD (1677 pb) en el análisis de la *colony* PCR (Figura 27 D). Sin embargo, para peTDuet no se logró visualizar la banda de DHAD por lo que se repitió el protocolo agregando un paso de desfosforilación del vector previo a la ligación y se ligó nuevamente con relaciones 1:3, 3:1, 1:7, 1:5 de vector:inserto para cada caso. Con esta modificación se obtuvieron colonias transformadas las cuales presentaron la banda correspondiente a DHAD cuando se analizaron por *colony* PCR para los casos de ligación con la relación 1:3, 3:1 y 1:5 (Figura 27 C).

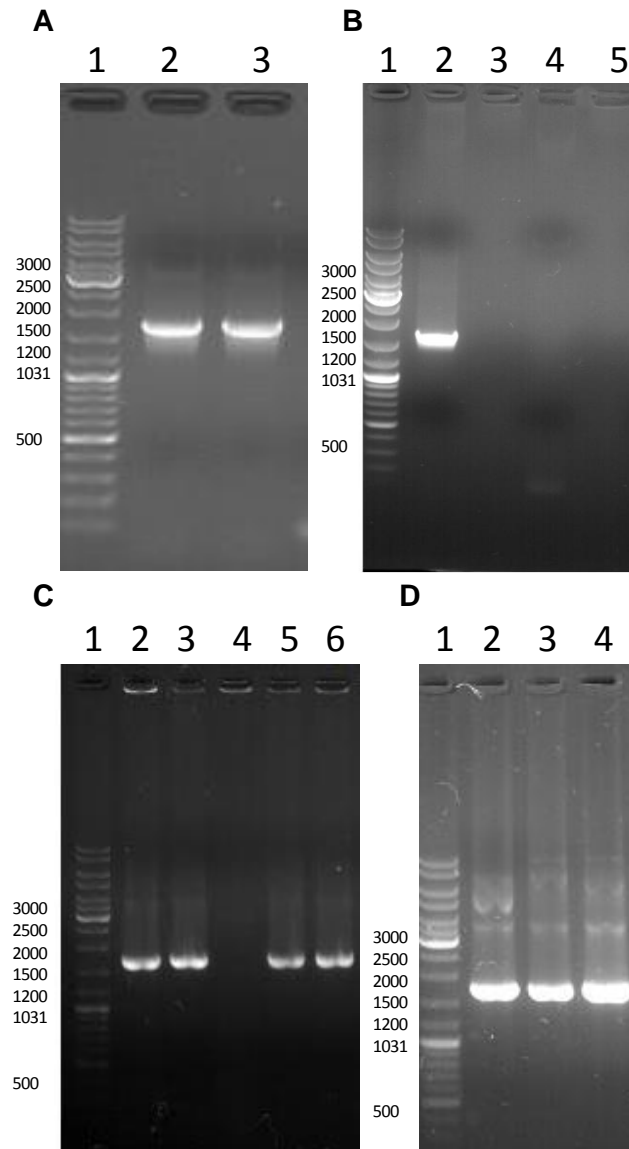


Figura 27: Análisis del clonado en petDuet y pBAD. A, PCR de la secuencia DHAD, carril 1 ADN *ladder*, 2 PCR con cebadores para clonar en petDuet, 3 PCR con cebadores para clonar en pBAD. B, Colony PCR, carril 1 ADN *ladder*, 2 control positivo de PCR de PUC57-DHAD, C *colony* PCR de colonias transformadas con petDuet-DHAD en diferentes relaciones vector:inerte, carril 1 ADN *ladder*, 2 relación 1:3, 3 relación 3:1, 4 relación 1:7, 5 relación 1:5, 6 control con PUC57-DHAD. D, *Colony* PCR, carril 1 ADN *ladder*, 2-3 *colony* PCR de colonias transformadas con pBAD-DHAD, 4 control con PUC57-DHAD.

Una vez obtenidas las contrucciones en petDuet, peTSUMO y pBAD y una vez recibida la contrucción reportada en Carsten y cols [153], se llevó a cabo la transformación de BL21 Codón plus con cada una de las construcciones. Previo a la expresión, se analizó la

presencia del plásmido y de la secuencia de la DHAD por *colony* PCR de las colonias para cada transformación (figura 28).

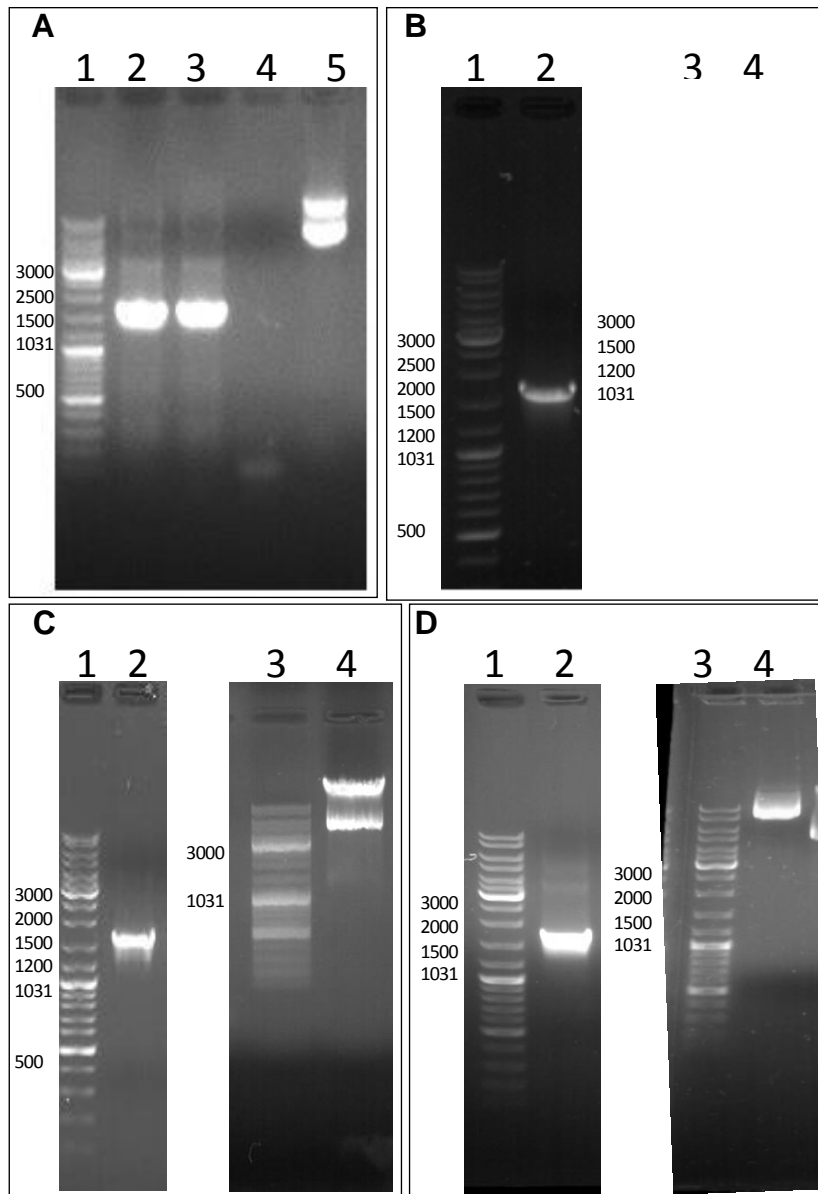


Figura 28: Análisis de la transformación de BL21 codón plus con los plásmidos de expresión previamente obtenidos. A, Clones en pBAD, carril 1 ADN *ladder*, 2-3 *colony* PCR para DHAD, 4 blanco de PCR, 5 minipreparación de ADN plasmídico de BL21 codón plus transformada con pBAD-DHAD. B, Clones en peTDuet, carril 1 ADN *ladder*, 2 *colony* PCR para DHAD, 3 ADN *ladder*, 4 minipreparación de ADN plasmídico de BL21 codón plus transformada con peTDuet-DHAD. C, Clones en peTSUMO, carril 1 ADN *ladder*, 2 *colony* PCR para DHAD, 3 ADN *ladder*, 4 minipreparación de ADN plasmídico de BL21 codón plus transformada con peTSUMO-DHAD. D, Clones en peT28+-DHAD, carril 1 ADN *ladder*, 2 *colony* PCR para DHAD, 3 ADN *ladder*, 4 minipreparación de ADN plasmídico de BL21 codón plus transformada con peT28+-DHAD.

En la figura 28 se observa la presencia de ADN plasmídico al igual que la presencia de la secuencia correspondiente a la DHAD obtenida por *colony* PCR para todos los casos. Se llevó a cabo la expresión de la DHAD en BL21 con las 4 construcciones. Para peTSUMO, peTDuet y pBAD se testeó la inducción con 0,5 y 1 mM de IPTG (Figura 29 A, 30 A y 30 D) en donde se observó un leve aumento de la expresión a 1 mM de IPTG en peTSUMO y peTDuet por lo que se seleccionó esta concentración para los ensayos siguientes.

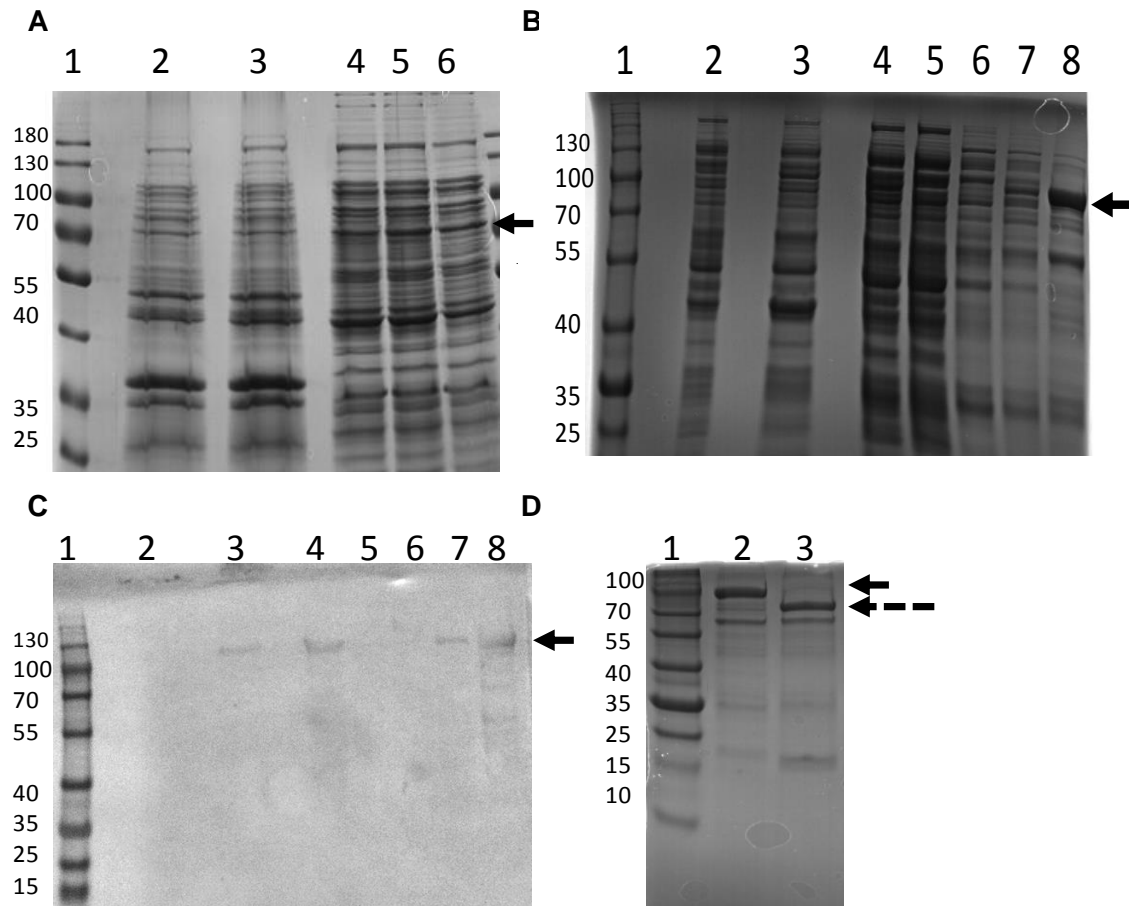


Figura 29: Análisis por SDS-PAGE en gel al 12% de la expresión y purificación de DHAD en sistema peTSUMO. A, Expresión de DHAD, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción insoluble de la inducción con 0,5 mM de IPTG, 3 fracción insoluble de la inducción con 1 mM de IPTG, 4 fracción soluble de la inducción con 0,5 mM de IPTG, 5 fracción soluble de la inducción con 1 mM de IPTG, 6 fracción soluble sin inducir. B, Purificación de DHAD-SUMO por IMAC, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble sin inducir, 3 fracción insoluble inducida 1 mM de IPTG, 4 fracción soluble inducida, 5 percolado de la cromatografía, 6 eluido con 30 mM de imidazol, 7 eluido con 60 mM de imidazol, 8 eluido con 300 mM de imidazol. C Western blot anti-His, orden de sembrado Idem a B. D Proteólisis de la proteína SUMO, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción eluida a 300 mM de imidazol, 3 muestra proteolisada. Se indica con una flecha entera la proteína SUMO-DHAD (~78 KDa) y con flecha punteada la enzima DHAD (~66KDa).

En el caso de pBAD no se observó una expresión significativa de la enzima por lo que se descartó el sistema para futuros ensayos. La proteína expresada en el sistema peTSUMO es una quimera DHAD-proteína SUMO (~78 KDa, 66 KDa correspondiente a DHAD y 12 KDa de proteína SUMO). Es en esta última donde se encuentra la cola de histidina. Se llevó a cabo la purificación de esta enzima por IMAC donde se observó por electroforesis desnaturalizante y western blot (figura 29 B y C) que la enzima se lograba purificar parcialmente mediante esta estrategia. La fracción eluida de la cromatografía anterior fue proteolisada por la proteasa SUMO la cual escinde la proteína SUMO de la quimera obteniéndose la DHAD con alto nivel de pureza sin cola de histidina (figura 29 D).

Para el caso de la proteína expresada en peTDuet, la misma fue también purificada por IMAC donde se logró una purificación parcial que fue corroborada por SDS-PAGE y western blot (Figura 30 B y C).

Finalmente se llevó a cabo la expresión y purificación por precipitación por calor de la proteína obtenida a partir del sistema peT28+ donado por Carsten y cols. El protocolo de expresión y purificación se realizó según el reportado previamente por el grupo [153]. Se obtuvo también la enzima parcialmente pura lo que fue corroborado por SDS-PAGE (Figura 31).

Una vez obtenidas las distintas fracciones parcialmente puras, se llevó a cabo el estudio de la actividad enzimática con ácido glicérico como sustrato.

Se testeó el ensayo propuesto por Gao y cols. [137] donde se incubaba la enzima con ácido glicérico a 50 °C, el análisis por HPLC no mostró consumo de ácido glicérico ni aparición de piruvato. En este mismo trabajo los autores reportan la inhibición parcial de la enzima por iones presentes en el ácido glicérico comercial por lo que se repitió el ensayo con ácido glicérico obtenido de conversiones con *G. frateurii*. En este caso tampoco se observó conversión.

Se testearon concentraciones inferiores a 10 mM de GA en el ensayo ya que Carten y cols. proponen un modelo teórico de inhibición por sustrato de la DHAD [153] y además se testeó un paso de activación con mercaptoetanol que los autores encontraron aumentaba la actividad de la enzima hasta 3 veces.

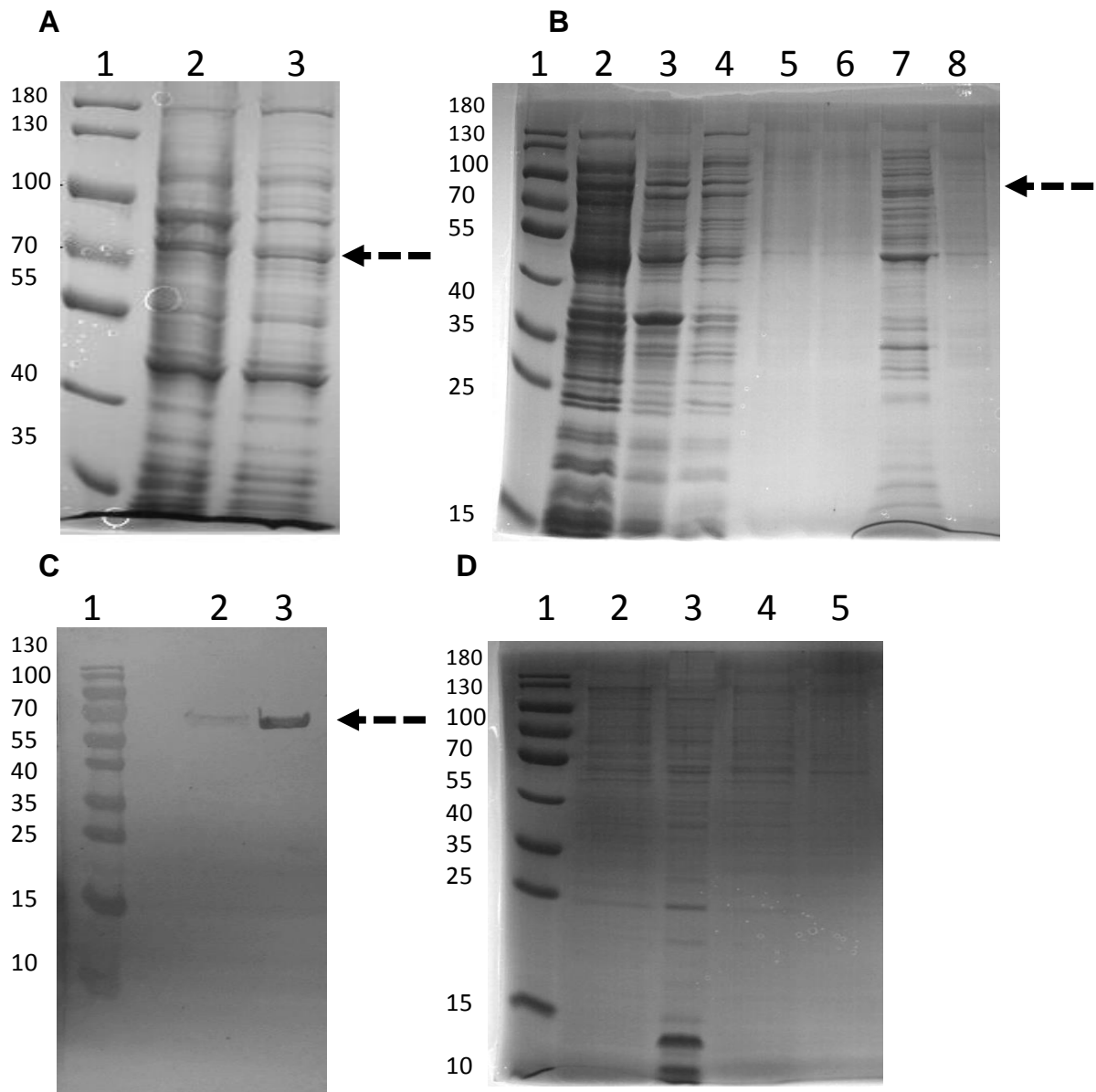


Figura 30: Análisis por SDS-PAGE en gel al 12% de la expresión y purificación de DHAD en sistema peTDuet y pBAD: A, Expresión de DHAD en peTDuet, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción insoluble de la inducción con 1 mM de IPTG, 3 fracción insoluble de la inducción con 0,5 mM de IPTG. B, Purificación de DHAD-peTDuet por IMAC, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble inducida con 1 mM de IPTG, 3 percolado de la cromatografía, 4 eluido con 30 mM de imidazol, 5 eluido con 60 mM de imidazol, 6 eluido con 300 mM de imidazol, 7 eluido con 500 mM de imidazol. C Western blot anti-His, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble inducida con 1 mM de IPTG, 3 eluido con 300 mM de imidazol. D, Expresión de DHAD en pBAD, carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble sin inducir, 3-5 fracción soluble de la inducción con 0,5, 1 y 2 mM de IPTG respectivamente. Se indica con una flecha punteada la enzima DHAD (~66KDa).

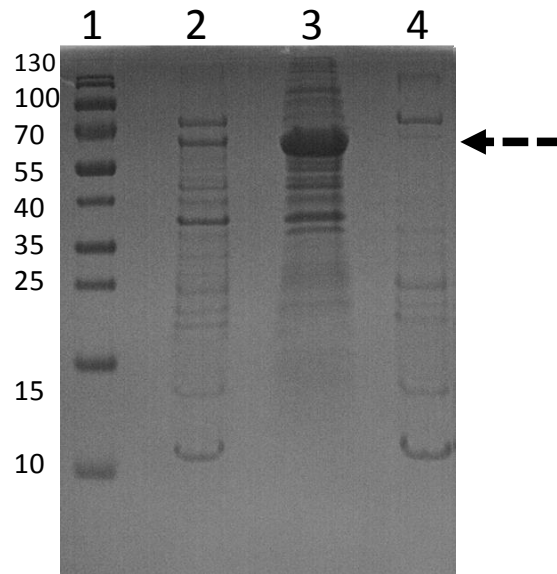


Figura 31: Análisis por SDS-PAGE en gel al 12% de la expresión y purificación de DHAD en sistema peT28+. Carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble de la inducción con 1 mM de IPTG, 3 sobrenadante de la precipitación a 70 °C, 4 proteínas precipitadas a 70 °C. La flecha indica la banda correspondiente a la DHAD.

Carten y cols. también reportan que el agregado de sales de hierro durante la expresión proteica mejora la actividad recuperada de la proteína, un agregado de 1 mg/mL en el medio de cultivo de FeSO_4 no mostró diferencias con los resultados previamente obtenidos ya que tampoco se recuperó actividad en la fracción pura.

Aun cambiando la concentración de GA, el origen del GA utilizado, la cantidad de DHAD utilizada y agregando sales de hierro durante la expresión proteica y un paso de activación, no se logró en ningún caso conversión a piruvato.

Con el propósito de avanzar en los objetivos específicos de la tesis se decidió no utilizar la DHAD en la conversión de GA. Esto fue posible gracias a que se contaba con la cepa *G. oxydans* que produce de manera exclusiva la DHA a partir de glicerol, la cual puede ser tomada por la enzima TA para la generación de piruvato y serinol. Se continuó por lo tanto con los estudios de esta enzima para su acoplamiento a la cascada biosintética.

Se requieren más estudios de expresión, purificación y activación de la enzima DHAD para poder obtener una preparación con suficiente actividad específica para ser inmovilizada y acoplada a la cascada propuesta en este trabajo.

Preparación del catalizador enzimático inmovilizado de TA

Para la bioconversión de piruvato a partir de la dihidroxiacetona generada por cepas de *Gluconobacter* se utilizó una transaminasa de *Pseudomonas fluorescens* expresada de manera recombinante en *E. coli*.

En este trabajo se propone utilizar L-alanina como donante de amina a la DHA lo que permitirá la obtención en un único paso a serinol y piruvato como productos. La utilización de alanina como donante ha sido ampliamente reportada, presentando algunas características como ser una reacción reversible que requiere de un exceso de la misma para mejorar la cinética de la conversión [156].

Expresión y purificación de TA de Pseudomonas fluorescens

La transaminasa utilizada en este trabajo fue expresada de forma heteróloga en *E. coli* BL21 con el protocolo propuesto por Benitez-Mateos y cols. [157] con una cola de Histidina N-terminal (6x His-tag) lo que facilitó su purificación por cromatografía de afinidad con cobalto. En la figura 32 se observa el análisis por SDS-PAGE de la proteína expresada y purificada. El análisis mostró que la enzima fue sobreexpresada en la fracción soluble de la cual se logró obtener una fracción soluble con alto grado de pureza para los ensayos de inmovilización. Se observó además la presencia de TA en la fracción insoluble, la cantidad sembrada el gel no es comparable a la fracción soluble por lo cual no puede inferirse mediante el mismo si la fracción insoluble contiene cantidades significativas de TA.

Una vez confirmada la presencia de la proteína de forma soluble se estudió la actividad de las preparaciones obtenidas por ensayos colorimétricos donde se corroboró que la enzima se expresaba de manera activa. Se obtuvieron bajo estas condiciones $102,8 \pm 6,7$ UI por gramo de precipitado celular.

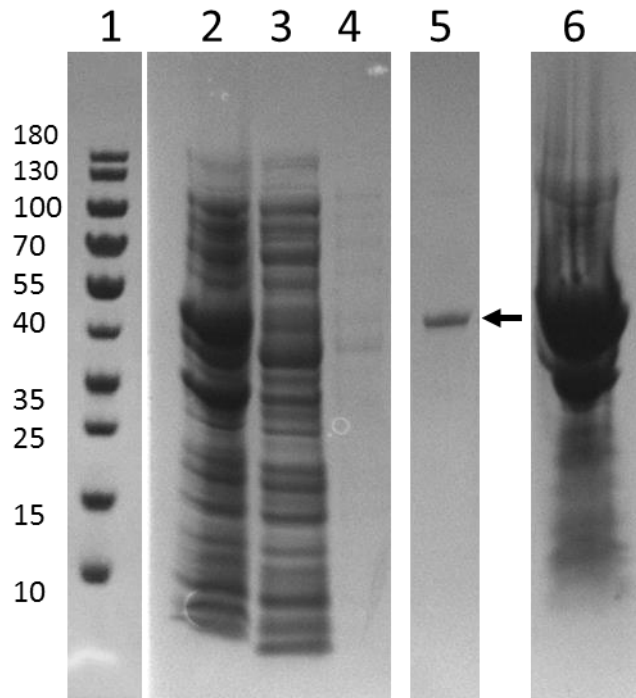


Figura 32: Análisis por SDS-PAGE en gel al 12% de la expresión y purificación de la enzima TA. Carril 1 marcador de peso molecular, 2 fracción soluble inducida, 3 percolado de la IMAC, 4 lavado, 5 eluido con 250 mM imidazol, 5 fracción insoluble inducida. Se indica la TA de 53 KDa con una flecha.

Para conocer la resistencia de la enzima frente a escenarios similares a los que se testearían durante los protocolos de inmovilización, se llevó a cabo el estudio de estabilidad de la enzima soluble frente a diferentes condiciones de temperatura (Tabla 4). En primer lugar, se testeó la estabilidad a 24 °C 1 y 16 h. Se observó que la enzima mantuvo el 100% de su actividad a lo largo de la primer hora, sin embargo pierde más del 80% de la misma en 16 h lo que indica que los protocolos que requieran una incubación prolongada podrían ver comprometida la actividad de la enzima a lo largo del proceso.

Se estudió además la estabilidad de almacenado durante 16 h a 4 y -20 °C donde se observó que la enzima mantenía un $73,5 \pm 0,6$ % de su actividad inicial cuando era conservada a 4 °C pero perdía más de 50% de su actividad a -20°C en el mismo período de tiempo.

Tabla 4: Estudio de estabilidad de la TA en solución

Condición	% Actividad residual
24 °C 60 min	100 ± 1,0
24 °C 16 h	15,9 ± 2,2
4 °C 16 h	73,5 ± 0,6
-20 °C 16 h	47,6 ± 5,84

Se testaron además dos temperaturas, 60 y 70 °C, para determinar la mejor condición para estudiar la estabilidad de los preparados inmovilizados en un período corto de tiempo (Tabla 5).

Tabla 5: Estudio de estabilidad de la TA en solución a 60 y 70 °C

Condición	% Actividad residual
60 °C 60 min	78,2 ± 2,5
70 °C 60 min	6,6 ± 0,8

Se seleccionó 70 °C para realizar dichos experimentos y se realizó el estudio de la cinética de inactivación donde se encontró que se alcanza un valor menor al 25% de actividad residual en menos de 30 minutos (Figura 33).

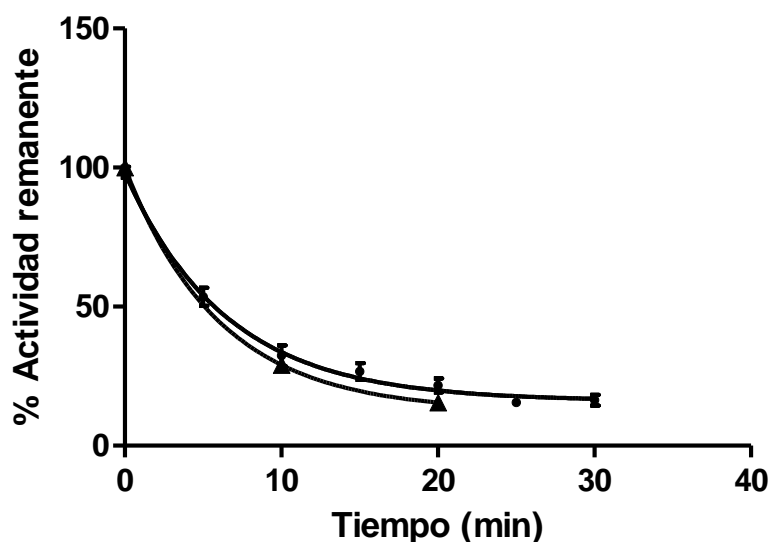


Figura 33: Estudio de estabilidad térmica de la enzima TA en solución a 70 °C. (●) 1,8 UI/mL, (▲) 0,9 UI/mL.

Se observó además que, en principio, la concentración de la enzima presente en la muestra no influye de manera significativa en el decaimiento de la actividad bajo estas condiciones, ya que a 70 °C la vida media para la TA fue de 4,51 y 4,44 min bajo dos condiciones iniciales de partida de 1,8 y 0,9 UI/mL respectivamente. Para confirmar esta hipótesis se deberían testear la estabilidad de concentraciones al menos 10 veces menor.

Inmovilización de la enzima TA

Las transaminasas han sido inmovilizadas por una serie de técnicas como inmovilización en resinas poliméricas [158], unión covalente a quitosano [159] y celulosa [160] o atrapamiento en LentiKats® [161]. Además transaminasas con colas de His han sido inmovilizadas en soportes de afinidad a quelatos metálicos [162,163].

Se seleccionaron para este trabajo una serie de estrategias de inmovilización basados en diferentes químicas de unión. Los sistemas seleccionados fueron por inmovilización covalente multipuntual en agarosa-glioxil, inmovilización por interacción iónica en agarosa MANAE, inmovilización por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética, inmovilización covalente en celulosa aldehído, inmovilización por afinidad a quelatos metálicos en agarosa IDA-Co, y una estrategia bi-modal por afinidad y covalente en agarosa IDA-Co-epóxido. Los resultados de porcentaje de inmovilización y rendimiento se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Inmovilización de Transaminasa *P.f.*

	Estrategia	%I	%R
Silica	Atrapamiento	87,8 ± 4,9	86,9 ± 0,3
Silica-glut	Atrapamiento/ entrecruzamiento	88,5 ± 3,1	16,6 ± 1,5
MANAE	Iónico	99,1 ± 0,1	39,8 ± 0,2
Glioxil	Covalente	100 ± 1,5	2,1 ± 0,1
Celulosa- aldehído	Covalente	100 ± 2,0	0,0 ± 0,1
IDA-Co	Afinidad	95,4 ± 1,1	9,4 ± 0,1
IDA-Epóxido	Afinidad/Covalente	99,1 ± 0,2	8,4 ± 0,4

La estrategia que presentó mayor actividad recuperada en el inmovilizado fue la de atrapamiento en sílica biomimética. Las nanopartículas de sílica han sido usadas en el

atrapamiento de enzimas [164], sin embargo, el estudio de estabilidad térmica de las preparaciones inmovilizadas (Figura 34) mostró que la enzima atrapada presentaba muy baja estabilidad en comparación a la enzima soluble. En un intento de mejorar la estabilidad de la misma se llevó a cabo el entrecruzamiento con glutaraldehído de la enzima previamente atrapada en sílica. El glutaraldehído es un reactivo bifuncional con capacidad de polimerizar. El mismo reacciona principalmente con grupos aminos de las proteínas, pero puede potencialmente interactuar además con grupos tioles, fenoles e imidazoles. Se encuentra ampliamente estudiado cómo su interacción con proteínas en procesos de inmovilización es capaz de estabilizar la estructura de las mismas [112,165,166]. En el caso de la transaminasa atrapada en sílica y entrecruzada con glutaraldehído, esta estrategia disminuyó significativamente la actividad recuperada en el inmovilizado (tabla 6) lo que no se compensó con un aumento significativo de la estabilidad (Figura 34).

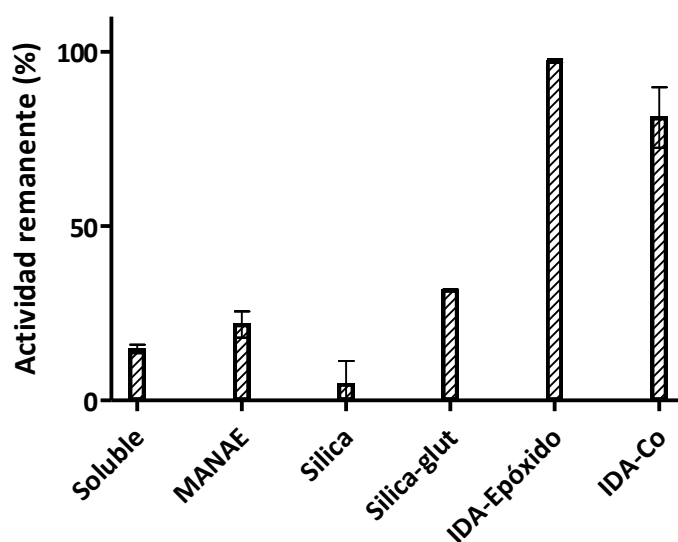


Figura 34: Estabilidad térmica de TA inmovilizada en diferentes soportes. Incubación de 0,5 UI/mL 30 min 70°C.

Una estrategia relativamente sencilla para la inmovilización reversible de proteínas con una fácil regeneración del soporte es la adsorción iónica en resinas de intercambio aniónico como agarosa MANAE [167]. En este caso se obtuvo un % de inmovilización cercano a 100% con un rendimiento de $39,8 \pm 0,2$ % luego de haber sido incubada por 16 h. Al ser una estrategia rápida de adsorción podría ser valioso repetir el protocolo a

períodos más cortos de tiempo que potencialmente podrían dar lugar a una mayor actividad recuperada. De todas formas, el estudio de estabilidad de la enzima inmovilizada mostró que no se ganó una estabilización significativa con respecto a la enzima soluble ya que en tan solo media hora de incubación a 70 °C se perdió casi el 80% de la actividad inicial, resultado similar al obtenido con la enzima soluble donde se pierde 85% de actividad en las mismas condiciones (Figura 34).

Las estrategias de inmovilización covalente por grupos aldehído (agarosa-glioxil y celulosa aldehído) fueron inactivantes para la enzima en las condiciones testeadas ya que no se recuperó actividad en las preparaciones inmovilizadas. La inmovilización covalente multipuntual en agarosa-glioxil ha demostrado ser una estrategia estabilizante para una serie de proteínas [168], el rendimiento inferior a 5% podría estar relacionado a que el PLP que la enzima requiere para su catálisis, se encuentra unido a la enzima por bases de Schiff [169]. Esta unión es crítica para la actividad enzimática por lo que el paso de reducción con NaBH₄ podría reducir este enlace inactivando la enzima. Frente a este escenario se testeó la inmovilización en soportes agarosa-glioxil a pH neutro (7,0) y sin el paso de reducción. Sin embargo, esta alternativa no resultó en un aumento de la actividad recuperada (% R 2,0 ± 0,5) por lo que esta estrategia fue descartada. El estudio de la inmovilización en este soporte en presencia de agentes estabilizantes podría ser muy valioso para lograr el objetivo de obtener una preparación inmovilizada activa y muy estable.

La inmovilización covalente en celulosa aldehído fue testeada debido a la versatilidad del soporte y las ventajas ya mencionadas de su uso en biocatálisis. Se han desarrollado biocatalizadores a base de celulosa utilizando principalmente cuatro enfoques diferentes para retener la enzima en el soporte: atrapamiento, entrecruzamiento, adsorción e Inmovilización covalente. En vista de los resultados obtenidos, en términos de estabilidad del preparado, para las estrategias de atrapamiento y entrecruzamiento en sílica, se testeó directamente la unión covalente a este soporte. La baja actividad obtenida en el preparado inmovilizado podría mejorarse con cambios en la química de unión seleccionada como podría ser la unión a grupos amino o epóxido que ya han sido reportado para esta enzima [160].

Finalmente, se testaron estrategias de inmovilización por afinidad y a un soporte heterofuncional. Los soportes heterofuncionales, como se mencionó anteriormente, se definen como aquellas matrices que presentan varias funcionalidades en su superficie, con diferentes propiedades físicas o químicas, capaces de interactuar con una proteína [125,126]. La estrategia seleccionada en este trabajo cuenta con la ventaja de que permite que se lleve a cabo la purificación y la inmovilización de la enzima recombinante en un solo paso. Esto disminuye los tiempos y costos del proceso. Este soporte se encuentra funcionalizado con grupos IDA-Co capaces de adsorber específicamente una proteína mediante la interacción con colas de His y grupos epóxido capaces de establecer un enlace covalente para hacer que esta interacción enzima-soporte sea irreversible. Por lo tanto, la adsorción selectiva de la proteína producida por la interacción His-IDA-Co permite la purificación de la proteína diana. Por otra parte, los soportes epóxido reaccionan muy lentamente con la proteína libre, de hecho, se requiere una adsorción previa de las proteínas sobre el soporte para tener enzimas inmovilizadas covalentemente utilizando este tipo de soportes, lo cual minimiza la unión de proteínas inespecíficas en este proceso [170].

La TA inmovilizada tanto en IDA-Co como en IDA-Co-Epóxido perdió mucha actividad en el proceso, lo que se vio reflejado en rendimientos de inmovilización inferiores al 10% (Tabla 6). Se estudió la cinética de inactivación frente a temperatura de las mismas donde se determinó que presentaban un factor de estabilización de 9,7 y 10,6 con respecto a la enzima soluble (IDA-Co e IDA-Co-Epóxido respectivamente) (Figura 35). Por lo tanto, la pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización se vio compensada con la alta estabilidad que presentaron ambas preparaciones.

Al no encontrarse diferencias significativas en términos de la estabilización de ambos soportes se verificó que la enzima estuviera efectivamente unida covalentemente por grupos epóxido además de su unión a quelatos metálicos. Esto se realizó mediante la elución de TA de ambos soportes con 250 mM de imidazol donde se logró eluir 17,5 UI/g de soporte IDA-Co y solamente 1,2 UI/g de soporte IDA-Co-epóxido bajo las mismas condiciones. De esta manera se corroboró que efectivamente la enzima se encontraba unida covalentemente además a través de los grupos epóxido.

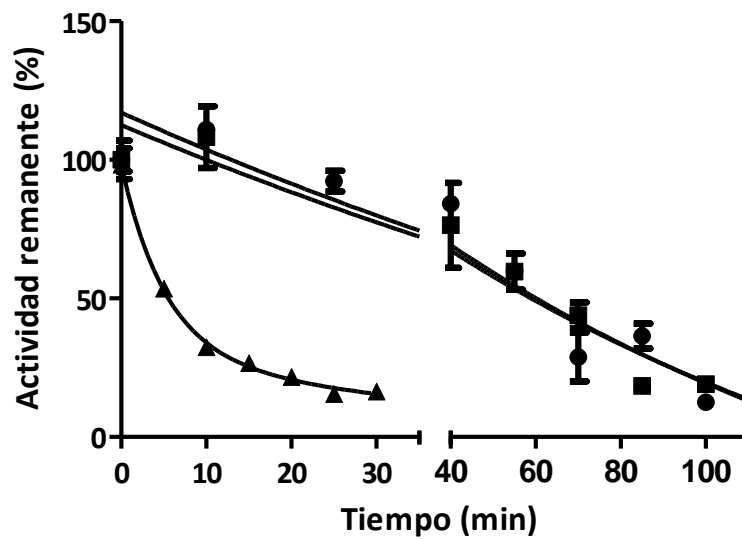


Figura 35: Cinética de inactivación de TA soluble, inmovilizada en soporte IDA-Co e IDA-Co-Epóxido a 70°C partiendo de 0,5 UI/mL. (▲) TA soluble, (●) TA en IDA-CO-Epóxido, (■) TA en IDA-Co.

Finalmente se testeó la pureza de la enzima inmovilizada en soporte IDA-Co incubando el soporte en buffer de carga a 70°C. En el análisis por SDS-PAGE se vió que el aporte de otras proteínas ocupando la superficie del soporte es mínima lo cual es beneficioso ya que no compromete la capacidad de carga del mismo (Figura 36). Dado que en el soporte IDA-Co-Epoxy la primer interacción es mediante las colas de His, se podría inferir que la pureza encontrada en el mismo es similar.

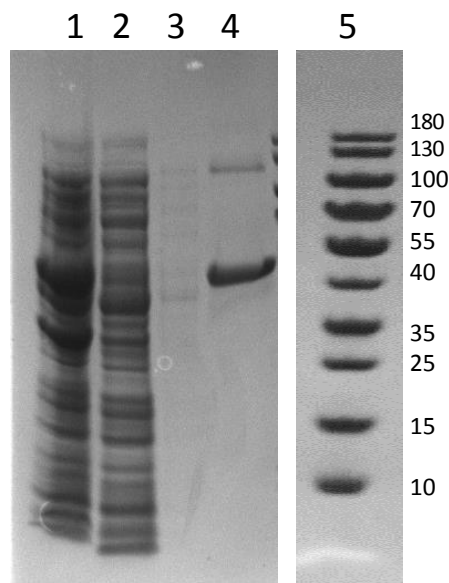


Figura 36: Análisis de la adsorción de TA en agarosa IDA-Co. SDS-PAGE en gel de gradiente 4-12% . Carril 1 Fracción soluble inducida, 2 percolado de la IMAC, 3 lavado, 4 matriz IDA-Co incubada a 95 °C com tampón de carga, 5 marcador de peso molecular. Tinción con *coomassie*.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el soporte agarosa IDA-Co-epóxido ya que presentó la mejor estabilidad con respecto a la enzima soluble y al estar unida la enzima de manera covalente se evita la pérdida de proteína a la mezcla reactiva.

Preparación del biocatalizador bi-enzimático: LDH:FDH

El último paso de la cascada propuesta en este trabajo, implica el acoplamiento de un sistema bi-enzimático coinmovilizado de L-lactato deshidrogenasa (LDH) y formiato deshidrogenasa (FDH) para convertir el piruvato previamente generado en ác. L-láctico (Figura 37). La enzima FDH permite la regeneración *in situ* del cofactor utilizado (NADH) de forma más eficiente.



Figura 37: Esquema del último paso de la cascada biocatalítica planteada. L-LDH, L lactato deshidrogenasa, FDH, formiato deshidrogenasa.

La inmovilización de las enzimas L-LDH y FDH se llevó a cabo en agarosa-glioxil ya que se contaba con reportes previos de la estabilización de la enzima FDH en este soporte. En general, los reportes de inmovilización de LDH son escasos [171,172], previo a este trabajo se llevó a cabo, en el transcurso de los estudios de maestría, el desarrollo de un protocolo de inmovilización óptimo en agarosa-glioxil. El mismo fue ampliamente caracterizado en términos de estabilidad frente a solventes y estabilidad térmica en la cual se obtuvo un preparado inmovilizado 1600 veces más estable que la enzima soluble. Según nuestro conocimiento, esta es la mayor estabilización lograda para la LDH (Tabla 7). La mayoría de los informes anteriores sobre la inmovilización de LDH se refieren a la estabilidad de almacenamiento debido a su aplicación como sensor de lactato. Los factores de estabilidad para aquellos estudios en los cuales la enzima fue inmovilizada para conversiones biocatalíticas se encontraban por debajo de 10 en comparación con la enzima soluble.

Tabla 7. Estabilización obtenida para L-LDH inmovilizada.

Soporte	Estrategia	Estabilidad	Condición	Factor de estabilización *	Aplicación	Referencias
TEOS sol-gel	Adorción física	30 días	4 °C, pH 7,5	ND	Biosensor de lactato	[173]
Ultra bind film	Unión covalente	8 semanas	4°C, pH 7,0	ND	Biosensor de lactato	[174]
Polianilina films	Adorción física	2 semanas	4–10°C, pH 7,0	ND	Biosensor de lactato	[175]
DWCNT-ALG	Adorción, encapsulación y entrecruzamiento	4 semanas	4 °C, pH 7,0	ND	ND	[176]
Np magnéticas	Unión covalente	ND	25°C, pH 7,0	~1.4	Potencial en aplicaciones biológicas y clínicas	[177]
Si-Mag	Unión covalente	ND	45 °C, pH 7,2	5-7	Potencial en Biocatálisis	[172]
Glioxil-agarosa	Unión covalente multipuntual	2 días	55°C, pH 7,0	1600	Potencial en Biocatálisis	Este trabajo

* comparado con enzima libre

Si-Mag, nanoclusters magnéticos cubiertos de sílica, DWCNT-ALG, nanotubos de carbono doble pared en gel de alginato.

La caracterización de este preparado se extendió al estudio de las condiciones óptimas de reacción, estabilidad frente a pH y solventes orgánicos y parámetros cinéticos.

El estudio de condiciones óptimas de reacción indicó que los valores óptimos de reacción se mantuvieron incambiados con respecto a la enzima soluble, sin embargo, el rango de actividad de la enzima se vio ampliado en los extremos para las preparaciones inmovilizadas.

Por otro lado, en el estudio de estabilidad frente a pH se observó cómo el rango de estabilidad fue más amplio para la enzima inmovilizada con respecto a la soluble. El estudio de los parámetros cinéticos de la enzima soluble y de la preparación inmovilizada utilizando ácido pirúvico como sustrato fue de especial importancia debido a que cambios en la constante K_M significarían un cambio en la afinidad aparente de la enzima por el sustrato. En este caso, se observó que la K_M no se vio significativamente modificada por lo que se podría afirmar que la afinidad aparente de la enzima por el piruvato no se ve afectada luego de la inmovilización ($0,130 \pm 0,011$ mM y $0,1338 \pm 0,017$ mM para enzima soluble e inmovilizada respectivamente). El valor de K_{cat} disminuyó

luego de la inmovilización (de $276,5 \pm 7,4 \text{ s}^{-1}$ a $170,7 \pm 8,2 \text{ s}^{-1}$) en concordancia con la pérdida de actividad ocurrida durante la inmovilización.

Reportes previos indicaban que la enzima LDH es inhibida por piruvato, este fenómeno se relaciona con la formación de un complejo enzima-piruvato-NAD⁺ [178,179]. Durante el estudio de parámetros cinéticos se observó este fenómeno a mayores concentraciones de piruvato. El estudio de la constante de inhibición por piruvato en la enzima soluble y la preparación inmovilizada demostró un aumento de KI para la LDH inmovilizada ($5,67 \pm 0,97 \text{ mM}$) en relación a la enzima soluble ($3,30 \pm 0,36 \text{ mM}$). Es posible que la inmovilización imponga restricciones estructurales que afectan a la afinidad por el complejo inhibidor. El valor de KI 1,75 veces mayor en el caso de la enzima inmovilizada implica un aumento en la concentración de piruvato necesaria para generar el mismo grado de inhibición que a la enzima soluble. Esto representa una ventaja a la hora de acoplar el sistema ya que aumenta el rango de concentración de piruvato generada *in situ* donde la enzima permanece activa.

Co-inmovilización de L-LDH:FDH

Teniendo en cuenta el alto costo del cofactor NADH en comparación con NAD⁺, se llevó a cabo la co-inmovilización de la L-LDH con una FDH, una enzima regeneradora de cofactor ampliamente utilizada. La co-inmovilización de L-LDH y FDH se realizó en una relación L-LDH:FDH 1:4 [149] y presentó un % I de $88,6 \pm 0,1\%$: $96,0 \pm 7\%$ y un % R de $72,0 \pm 0,1$ y $50,0 \pm 4,0$ para L-LDH y FDH, respectivamente.

El estudio de estabilidad térmica de las enzimas co-inmovilizadas se observa en la figura 38. La L-LDH no presentó diferencias con respecto a la vida media previamente determinada para la enzima inmovilizada en ausencia de FDH y la FDH co-inmovilizada presentó un factor de estabilización de $150 \pm 5,7$ con respecto a la enzima soluble, similar a lo ya reportado por Bolivar y cols [180].

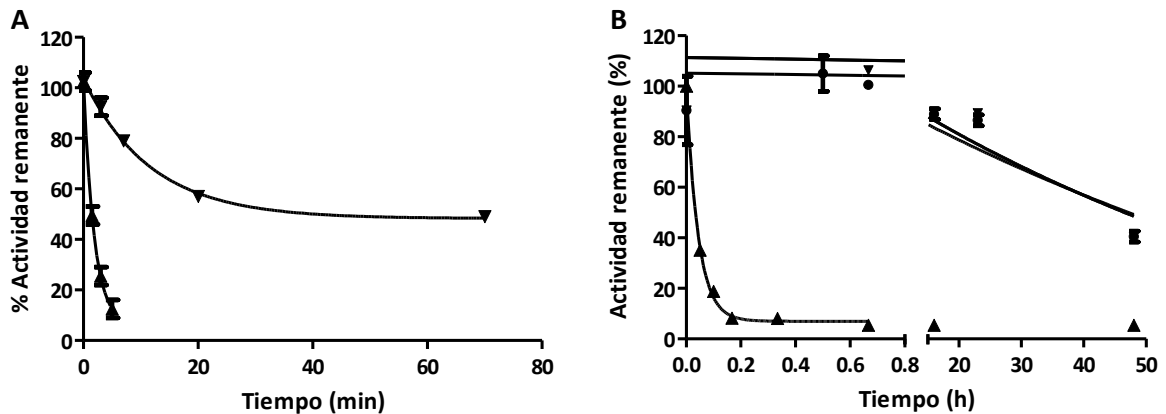


Figura 38: Estudio de estabilidad térmica de A. FDH a 45 °C. (▲)FDH soluble, (▼) FDH co-inmovilizada en glioxil. B. LDH a 55 °C. (▲) LDH soluble, (▼) LDH co-inmovilizada en glioxil, (●)LDH inmovilizada en glioxil.

El preparado co-inmovilizado se probó en la biosíntesis de ácido L-láctico a partir de piruvato de origen comercial en un reactor discontinuo. La conversión de ácido pirúvico en ácido láctico con NAD⁺ como cofactor de partida se puede ver en la Figura 39. El estudio de la conversión de piruvato comercial mostró que la preparación inmovilizada fue capaz de convertir el $74,0 \pm 1,7$ % de una solución 3 mM en 1 h. Resultado similar al obtenido con la enzima LDH inmovilizada en ausencia de FDH (con NADH como cofactor de partida) que fue de $80,5 \pm 2,5$ % de conversión de una solución 3 mM en 1 h.

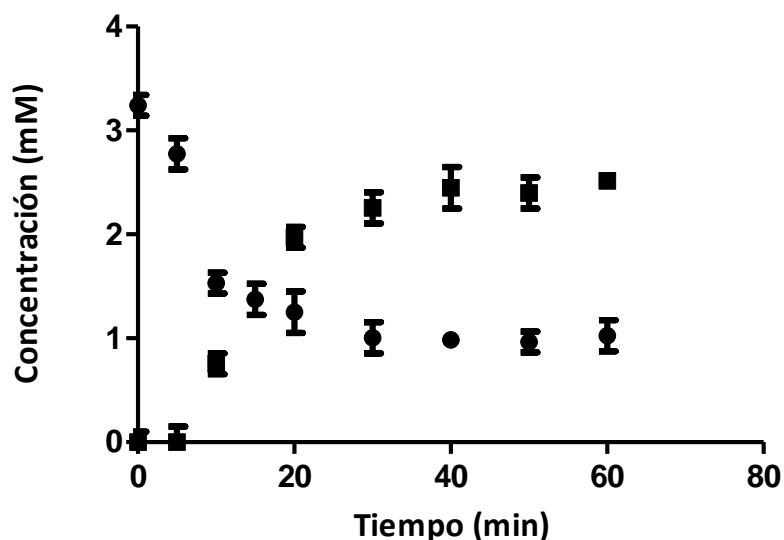


Figura 39: Conversión de piruvato a L-láctico por LDH:FDH co-inmovilizadas en agarosa-glioxil. (●) Piruvato, (■) lactato. Análisis realizado por HPLC.

Los resultados obtenidos para este sistema indicaron la conversión de piruvato a lactato partiendo de NAD⁺ como cofactor en lugar de NADH, lo cual disminuye el costo de la estrategia ampliamente. La preparación inmovilizada demostró ser capaz de convertir el piruvato ofrecido por al menos 10 ciclos de uso con una productividad acumulada de 5,1 μ moles de lactato/g catalizador.min (Figura 40, Tabla 8).

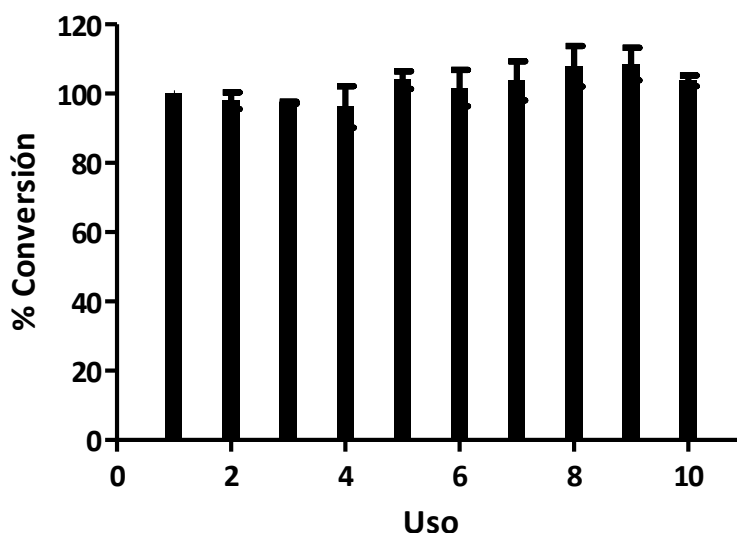


Figura 40: Estudio de reusos del catalizador bi-enzimático inmovilizado para la conversión de piruvato comercial.

Tabla 8: Reusos de LDH:FDH co-inmovilizadas en la conversión de piruvato a lactato.

Uso	Productividad específica*	Productividad específica acumulada*
1	0,50 \pm 0.001	0,50
2	0,49 \pm 0.012	0,99
3	0,49 \pm 0.001	1,48
4	0,48 \pm 0.03	1,96
5	0,52 \pm 0.013	2,48
6	0,51 \pm 0.026	2,98
7	0,52 \pm 0.028	3,50
8	0,54 \pm 0.029	4,04
9	0,54 \pm 0.023	4,59
10	0,52 \pm 0.008	5,10

* μ moles de lactato/g catalizador.min

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

Todo esto apunta a que este sistema podría ser exitosamente acoplado a los sistemas anteriores de TA y *G. oxydans* para la síntesis de láctico a partir de glicerol.

El éxito obtenido en la estabilidad operativa de la síntesis enzimática de ácido L-láctico con la preparación inmovilizada abre además numerosas posibilidades para estudios adicionales de esta bioconversión.

Capítulo 3

Acoplamiento de biocatalizadores para la obtención de ácido L-láctico

Introducción

Cascadas biocatalíticas

Las conversiones biocatalíticas pueden involucrar un biocatalizador que lleva a cabo una reacción específica a la vez, o múltiples biocatalizadores que llevan a cabo una serie de conversiones para obtener un producto deseado [181]. El término "cascadas biocatalíticas" se ha utilizado para describir procesos que consisten en el uso de múltiples catalizadores que operan secuencialmente o en paralelo para la síntesis de compuestos a menudo más complejos [182–184]. El uso de varios biocatalizadores en una ruta permite el diseño de esquemas sintéticos mucho más complejos [181]. Las reacciones en cascada se presentan como una tecnología de gran valor en el desarrollo de procesos industriales, como la síntesis de compuestos farmacéuticos, cosméticos, nutricionales y se han reportado una gran variedad de las mismas [185]. La combinación de biocatalizadores para la formación de cascadas artificiales es un campo en rápido desarrollo y permite generación de químicos quirales complejos de alto valor a partir de precursores simples [186]. Idealmente, tales reactivos serían de bajo costo y provenientes de fuentes renovables. A su vez, con el aumento de la variabilidad de biocatalizadores disponibles, aumentan las opciones de cascadas realizables con diversos grados de complejidad [182]. Las cascadas biocatalíticas pueden clasificarse a grandes rasgos como (i) *in vitro*, (ii) *in vivo* o (iii) mixtas, como se muestra en la figura 41 [181,182]. La selección entre estas tres opciones para una aplicación particular generalmente depende de varios factores, incluida la disponibilidad de secuencias de genes y enzimas heterólogas, necesidad de cofactores en la reacción, toma y liberación de sustratos y productos, y la estabilidad metabólica de los mismos.

i) Cascadas *in vitro*

Las cascadas *in vitro* involucran llevar a cabo reacciones donde las enzimas involucradas se utilizan aisladas, fuera de la célula en la que se produjeron (figura 41 A) [89]. La mayor ventaja del uso de cascadas enzimáticas *in vitro*, en comparación con los sistemas *in vivo*, es la reducción significativa de la complejidad del sistema lo que conlleva a un mejor control

del mismo. Además, la conversión no se ve afectada por limitaciones en la difusión de sustratos y productos desde y hacia la célula.

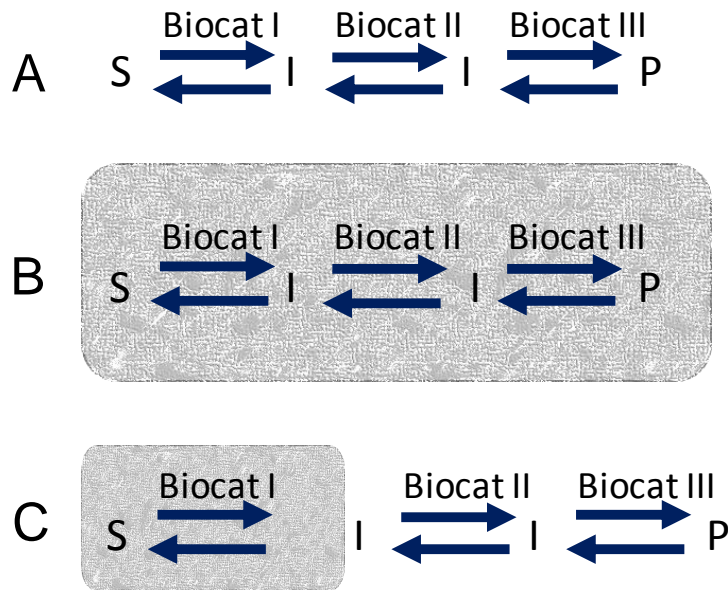


Figura 41: Esquemas de tipos de bioconversión en cascada. A, cascada *in vitro*, B, cascada *in vivo*, C, cascada mixta. Biocat I, II y III, biocatalizadores I, II, III, respectivamente, S, sustrato, I, intermediarias de reacción, P, product final. En gris se enmarcan los biocatalizadores dentro de una célula.

Este tipo de conversiones pueden ser optimizadas fácilmente mediante la variación de las concentraciones de enzimas y sustratos, adición de co-sustratos y disolventes, y/o variación de pH y temperatura. A diferencia de los sistemas *in vivo*, los sustratos pueden ser seleccionados sin tener en cuenta su posible toxicidad hacia la célula ni la posible toxicidad de los intermediarios de la conversión. Otra ventaja es el grado de pureza del producto ya que no hay reacciones secundarias ni metabolitos celulares que contaminen el producto final.

Sin embargo, en este tipo de sistemas se presentan algunas desventajas. Una gran limitante de este sistema es la necesidad de catalizadores enzimáticos en cantidades suficientes para dicha conversión que sean además estables bajo las condiciones operativas. Además, la purificación de las enzimas involucradas puede ser un proceso costoso y lento, especialmente para su escalado y potencial aplicación industrial. Las enzimas pueden requerir el agregado de cofactores complejos, costosos o inestables por

lo que se suele considerar el acoplamiento de un sistema de regeneración del cofactor [181,182].

ii) Cascadas *in vivo*

La construcción de una cascada enzimática dentro de una célula viva puede ofrecer muchas ventajas (figura 41 B). En primer lugar, no se requiere aislar ni estabilizar los catalizadores enzimáticos, además la célula proporciona, en general, un sistema de reciclado de cofactores enzimáticos, lo que elimina la necesidad de suplementar la reacción con los mismos. Sin embargo, la alta complejidad del sistema celular puede dificultar el control de la conversión [181,182]. Dado que se pueden usar células completas sin procesamiento adicional (como la purificación de proteínas) antes de la biotransformación, la biocatálisis *in vivo* puede ser una estrategia más rentable y más fácil de implementar.

Este sistema presenta además algunas desventajas como la difusión de sustratos y productos desde y hacia la célula. Si bien la membrana celular puede mantener estables las proteínas expresadas, también puede dar lugar a problemas de transporte y se pueden generar problemas con la extracción de productos. Debe considerarse además las posibles reacciones secundarias generadas por enzimas propias de la célula al tener contacto con el sustrato, intermediarios o productos de la conversión [182]. Este tipo de sistema se puede llevar a cabo con células en reposo o en medio de cultivo. En la conversión con células en reposo, el crecimiento del biocatalizador ocurre previo a su uso para la conversión del sustrato al producto. Este enfoque trae varias ventajas, comparado con la conversión con células en crecimiento ya discutidas en el capítulo 1, entre ellas se introduce la opción de modificar la concentración celular en la conversión [89].

iii) Cascadas mixtas

Este tipo de cascadas utilizan metodologías tanto *in vitro* como *in vivo* dentro del mismo sistema, aprovechando las ventajas de cada enfoque y minimizando las desventajas de los mismos (Figura 41 C). Este tipo de sistema plantea el uso de enzimas libres con enzimas dentro de células para la generación de un producto determinado.

Este sistema mixto fue el seleccionado en este trabajo. Existen reportes similares de acoplamiento de células y enzimas en una cascada catalítica. Tal es el caso del reporte realizado por Turner y colaboradores que describieron una cascada de tres enzimas para la producción de pirrolidinas [187]. En este caso se acoplaron células de *E. coli* conteniendo una imina reductasa con un lisado crudo de ω -TA la cual fue acoplada a un sistema de lactato deshidrogenasa (LDH) para desplazar el equilibrio de la reacción de la ω -TA y glucosa deshidrogenasa para la regeneración del cofactor.

Estos sistemas, a su vez, pueden llevarse a cabo añadiendo todos los biocatalizadores involucrados simultáneamente (en *one pot*) o secuencialmente en más de un recipiente [181].

La síntesis en *one pot* utiliza más de un biocatalizador en un solo reactor, por lo tanto, los intermedios pueden potencialmente participar en reacciones catalizadas por otros catalizadores simultáneamente. Este tipo de configuración puede mejorar el rendimiento de la conversión impulsando el desplazamiento de los equilibrios de reacción hacia la formación del producto deseado, removiendo además el paso de separación de los biocatalizadores del paso de conversión previo lo que podría resultar en una reducción de tiempo y costos del proceso [185]. Las concentraciones de intermediarios de reacción se mantienen por lo general a un nivel bajo y de esta manera la posibilidad de inhibición por producto de una enzima o inhibición por sustrato de la siguiente puede ser reducida. Sin embargo, presentan la desventaja de que aumenta la complejidad del sistema, dificultando su control. Las condiciones en cada reacción (tales como medios, temperatura, pH, y la estabilidad del catalizador) deben estar bien equilibradas y optimizadas para una productividad máxima [184]. En este caso los biocatalizadores utilizados deben ser compatibles con el medio de reacción, es decir deben mantener su actividad catalítica y ser estables en las mismas condiciones de pH y temperatura.

Las conversiones que se llevan a cabo en más de una etapa, puede presentar algunas desventajas, como bajos rendimientos, altos costos de operación y la potencial necesidad de pasos de separación entre etapas [185].

Sin embargo, pueden ser sumamente valiosas en el caso de sistemas mixtos, si algún componente necesario a lo largo de la conversión puede ser potencialmente internalizado por la célula o si las condiciones óptimas de conversión para los diferentes biocatalizadores involucrados no son similares. Este puede ser el caso de cascadas artificiales en las que la combinación de enzimas puede provenir de diferentes orígenes y para el cual no existe un precedente biológico. Hoy en día, las síntesis con sistemas enzimáticos no se limitan al uso de cascadas de una vía metabólica existente o conocida y cada vez con más frecuencia se proponen secuencias no naturales de enzimas para la síntesis de productos de alto valor agregado [188].

Aún quedan desafíos por abordar en el desarrollo de futuras cascadas, ya sean *in vitro*, *in vivo* o mixtas, para aprovechar al máximo su potencial aplicación a nivel industrial. En este contexto, se ha ido desarrollando una tendencia a llevar a cabo reacciones que utilizan biocatalizadores heterogéneos en los procesos de producción industrial actuales como consecuencia de dos ventajas principales:

En primer lugar, la facilidad de separación y, por lo tanto la potencialidad del reciclado de catalizador y en segundo lugar, la posibilidad del desarrollo de procesos biocatalíticos continuos [189]. Se han descrito diferentes estrategias de preparación de biocatalizadores heterogéneos en casi innumerables variedades, algunas de las cuales se presentan en el capítulo 2 de esta tesis.

La inmovilización de estos sistemas, además de proveer estabilización a los catalizadores involucrados, amplía el rango de configuraciones de reactores que se pueden utilizar en el proceso [6].

Se encuentran en bibliografía casos de éxito de acoplamiento de sistemas mixtos de biocatalizadores celulares y enzimáticos inmovilizados y co-inmovilizados donde se reportan el aumento de la productividad lo que evidencia los beneficios de este tipo de sistema. Los mismos incluyen la producción de galacto-oligosacaridos acoplando β -galactosidasa y *Sacharomyces cerevisiae* [190], la síntesis de oleato de etilo utilizando *Sacharomyces bayanus* y lipasas [191], la biodegradación de contaminantes orgánicos por *Phanerochaete chrysosporium* acopladas a peroxidasa [192].

Bioconversión de glicerol crudo

El glicerol crudo se ha convertido en una responsabilidad financiera y ambiental de la industria del biodiesel. El uso del glicerol crudo en la síntesis de producto de mayor valor agregado se presenta como una potencial ventaja para mejorar la sostenibilidad económica de la industria del biodiesel y reducir los impactos ambientales de la eliminación de desechos de glicerol crudo. En este contexto, para mejorar la viabilidad económica de la industria del biodiesel y superar los desafíos ambientales asociados con el descarte del glicerol, el mismo se ha convertido mediante estrategias biológicas a una serie de compuestos de valor agregado. Ejemplos de los mismos son el 1,2-propanodiol, n-butanol, 2,3-butanodiol, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), cítrico ácido, lípidos y poli (hidroxialcanoatos) (PHA), que se han producido utilizando diferentes tipos de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos y microalgas) a través de diferentes vías con rendimientos variables [19,193,194]. Incluso, se han reportado algunas conversiones de glicerol mediante el uso de microorganismos inmovilizados como *Clostridium pasteurianum* atrapada en partículas de polivinil alcohol para la síntesis de butanol [195] y *Klebsiella sp.* para la síntesis de 1,3-propandiol [196].

Ácido L-láctico

Como ya se mencionó en la introducción general de esta tesis, el ácido láctico, así como sus derivados son ampliamente utilizados en varias áreas de la industria [20]. En los últimos años este compuesto ha incrementado su demanda a nivel industrial debido a su aplicación en la industria de plásticos donde es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero de utilidad en fabricar envases biodegradables. En la industria del plástico, un complejo de PLA conformado por poli D y L láctico presenta propiedades diferentes en comparación con los polímeros individuales por lo que aumenta la demanda por las formas enantioméricamente puras [197]. A su vez, el ácido L-láctico es el más ampliamente utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica ya que es mayoritariamente asimilado por el cuerpo humano mientras que el D-láctico puede llegar a ser dañino para el metabolismo humano y puede llevar a la acidosis y decalcificación [197].

Como se mencionó previamente, la síntesis de ácido láctico a nivel industrial se realiza principalmente mediante dos métodos: la biotransformación microbiana y síntesis química [21]. Actualmente, aproximadamente el 90% de ácido láctico es producido por transformación microbiana. En este caso se requieren etapas de purificación que encarecen el proceso y generalmente se forman subproductos [22]. Una síntesis enantiomérica, verde, limpia y eficiente en términos de cantidad de L-láctico formado podría ser llevada a cabo por biocatalizadores inmovilizados muy estables.

Objetivos específicos

- Acoplar el sistema mixto de células de *Gluconobacter* con catalizadores enzimáticos en solución.
- Síntetizar ácido L-láctico en dos etapas mediante un primer paso de acoplamiento de *Gluconobacter* y TA inmovilizadas para la conversión de glicerol crudo a piruvato y un segundo paso de reducción del piruvato a ácido láctico con LDH:FDH co-inmovilizadas.
- Síntetizar ácido L-láctico en *one pot* mediante el acoplamiento de *Gluconobacter*, TA, LDH y FDH inmovilizadas.

Materiales y metodología

Materiales

La L-Ala, el NADH, el NAD⁺, la L-Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo tipo II y la formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). La dihidroxiacetona fue obtenida de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Metodología

Conversión de DHA en piruvato con TA soluble e inmovilizada

La conversión se llevó a cabo incubando 1,8 UI de TA en 6 mL de fosfato de sodio 25 mM pH 7,5, 1mM PLP, 0,5 M L-Ala, 0,54 M DHA, 2 mM NADH, 100 mM ácido fórmico, por 16 h a 30 °C en agitación. Las muestras se analizaron por HPLC.

Conversión de DHA en L-láctico con TA, LDH y FDH solubles

La conversión se llevó a cabo incubando 1,8:1,8:7,2 UI de TA:LDH:FDH respectivamente en 6 mL de fosfato de sodio 25 mM pH 7,5, 1mM PLP, 0,5 M L-Ala, 0,54 M DHA, 2 mM NADH, 100 mM ácido fórmico, por 16 h a 30 °C en agitación. Las muestras se analizaron por HPLC y NMR.

Conversión de glicerol crudo en L-láctico con *G. oxydans*, TA, LDH y FDH inmovilizados

Conversión en dos etapas

Primera etapa: La conversión se llevó a cabo incubando 2 mg de *G. oxydans* inmovilizado en agar 3%, 1,8 UI de TA inmovilizada en IDA-Co-epóxido en 5 mL de fosfato de sodio 25 mM pH 7,5 conteniendo 0,3 g de glicerol crudo (50 g/L), 1mM PLP, 0,5 M L-Ala, por 48 horas a 30 °C en agitación.

Segunda etapa: La conversión se llevó a cabo incubando 1,8 y 7,2 UI de LDH:FDH inmovilizadas en agarosa-glioxil en 5 mL de fosfato de sodio 25 mM pH 7,5 conteniendo 2 mM NADH, 100 mM ácido fórmico, 48 horas a 30 °C en agitación.

Las muestras se analizaron por HPLC y NMR.

Conversión en *one pot*

La conversión se llevó a cabo incubando 2 mg de *G. oxydans* inmovilizado en agar 3%, 1,8 UI de TA inmovilizada en IDA-Co-epóxido, 1,8 y 7,2 UI de LDH:FDH en 5 mL de fosfato de sodio 25 mM pH 7,5 conteniendo 0,3 g de glicerol crudo (50 g/L), 1mM PLP, 0,5 M L-Ala, 2 mM NADH, 100 mM ácido fórmico, por 48 horas a 30 °C en agitación. Las muestras se analizaron por HPLC y NMR.

Análisis por HPLC, NMR y GC-MS

El análisis por HPLC se llevó a cabo como se describe en el capítulo 1. La detección de piruvato se realizó a 190 nm, tiempo de retención 9,1 min.

El análisis por NMR se llevó a cabo como se describe en capítulo 1.

El servicio de análisis por GC-MS fue realizado por la Dra. Susana Velasco del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza.

Resultados y discusión

En esta última etapa del trabajo se llevó a cabo la síntesis de ácido L-láctico a partir de glicerol crudo mediante el acoplamiento de los biocatalizadores presentados en las secciones anteriores.

Para esto se plantearon dos estrategias, una de síntesis en dos etapas y otra en *one pot*. La síntesis en dos etapas consiste en que el glicerol crudo sea convertido a DHA por *G. oxydans* inmovilizados en agar, como se describió en el capítulo 1, acoplado a la enzima transaminasa inmovilizada en IDA-Co-epóxido, como se describió en el capítulo 2 para la conversión de alanina en piruvato utilizando la DHA como aceptor de grupo amino.

En una segunda etapa el piruvato previamente generado se convierte en ácido L láctico por una L-lactato deshidrogenasa acoplada a una formiato deshidrogenasa para la regeneración del cofactor NADH como se describió en el capítulo 2.

La síntesis en *one pot* consiste en convertir glicerol crudo a ácido L-láctico utilizando los mismos biocatalizadores inmovilizados previamente mencionados, juntos en la reacción.

Como primer paso para abordar este objetivo, se llevaron a cabo una serie de conversiones con los biocatalizadores en solución.

Conversión de DHA con biocatalizadores enzimáticos en solución

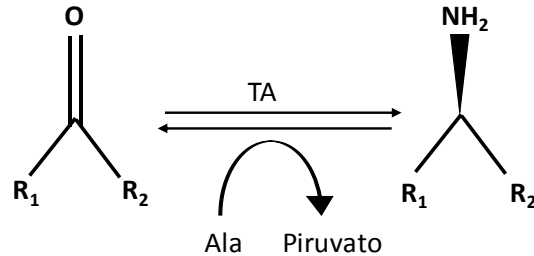
Para llevar a cabo el acoplamiento del sistema, se corroboró en primer lugar que la TA en estudio fuera capaz de llevar a cabo la conversión de alanina en piruvato utilizando la DHA como aceptor de grupo amino generando serinol como producto.

Se encuentra reportado que ω -TAs, como la seleccionada en este trabajo, pueden ser utilizadas para la síntesis asimétrica de aminas a partir de su correspondiente cetona proquiral, utilizando alanina como donante de amino y generando piruvato como co-producto como se muestra en el esquema 1.

El serniol (2-amino-1,3-propanediol) y sus derivados se encuentran en la naturaleza en células eucariotas como segundos mensajeros y en procariotas como intermediarios en síntesis de toxinas. El mismo tiene una amplia aplicación en la industria farmacéutica como precursor de drogas anticáncer, drogas para el manejo dolor, entre otros [198]. La

generación de este subproducto de alto valor añadido implica una ventaja adicional de la cascada propuesta.

Esquema 1



Para esto se incubó la enzima TA con DHA de origen comercial y se analizó la conversión por HPLC (figura 42). Se observó que la enzima era capaz de utilizar la DHA como co-sustrato, aunque la conversión fue inferior a un 1% en 16 h. No se descarta que la concentración de partida de DHA podría haber resultado inhibitoria, sin embargo, se encuentra reportado que la acumulación de piruvato impide el avance de la reacción [199]. Para superar este problema, se han reportado una serie de estrategias para la eliminación del mismo entre ellas el acoplamiento a la enzima LDH para la conversión del piruvato y glucosa deshidrogenasa (GDH) y glucosa para regenerar el cofactor [199]. La conversión del piruvato por esta enzima desplazaría el equilibrio de la reacción hacia la formación de serinol, generando además ácido L-láctico como producto final. Se seleccionó como alternativa la enzima FDH para la regeneración del cofactor como se describe en el capítulo 2.

Conversión de DHA a lactato por TA, LDH y FDH en solución

Al contar con una cepa (*G. oxydans*) que convierte el glicerol de manera exclusiva a DHA, la cascada se vió simplificada, prescindiendo de la DHAD para la conversión del GA. Se llevó a cabo la conversión de DHA a lactato por acoplamiento de las enzimas TA y LDH en solución y FDH para la regeneración del cofactor NADH. En este caso al igual que en el ensayo anterior el consumo de DHA fue inferior al 1% según el análisis por HPLC (Figura 43). Esto se determinó comparando las áreas de los picos que aparecen a 16,7 min a 271 nm, correspondiente a la DHA.

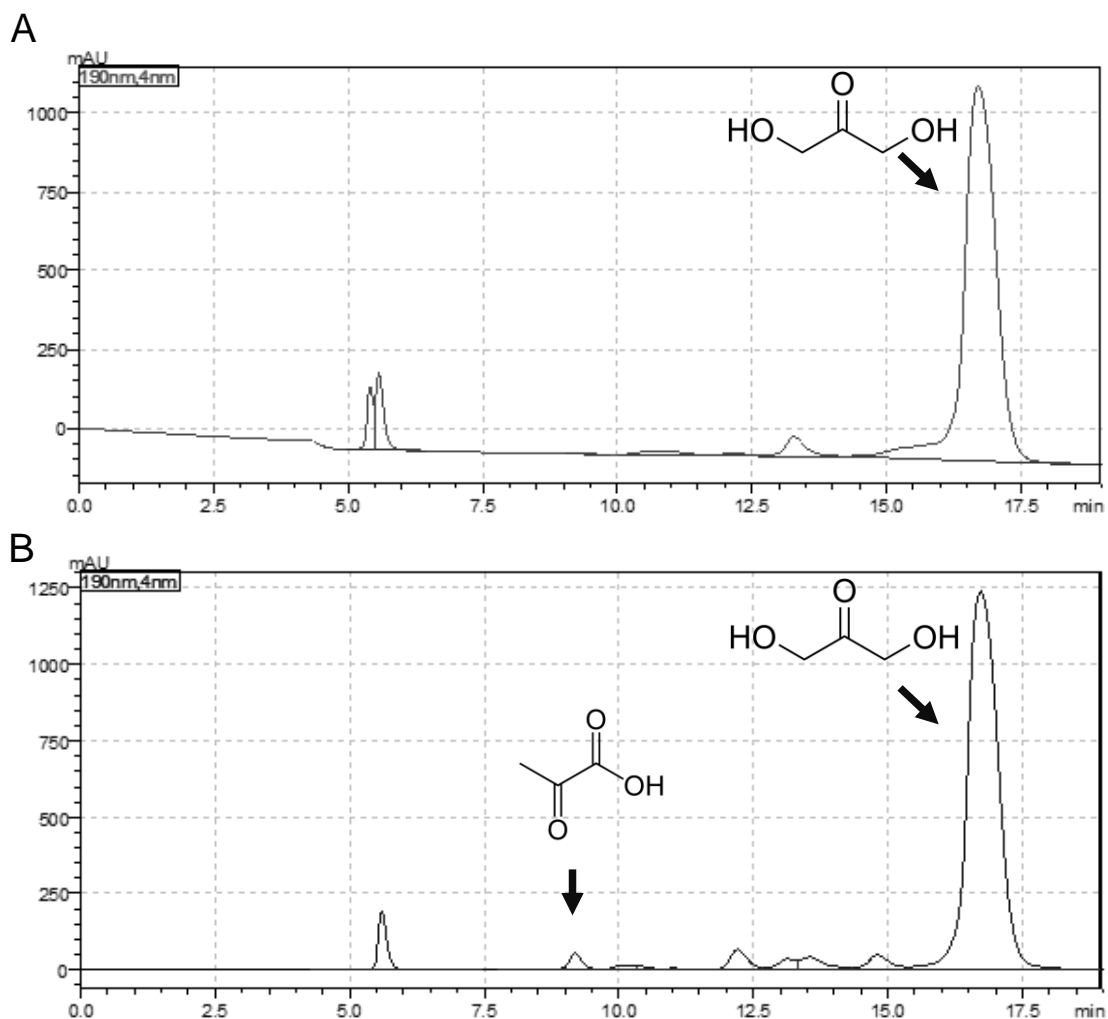


Figura 42: Análisis por HPLC de la conversión de DHA a piruvato por TA soluble. A, tiempo 0 de la reacción. B, tiempo 16 h. Detección a 190 nm. T_R piruvato 9,1 min, T_R DHA 16,7 min.

Sin embargo, en este caso no se observó un pico cuantificable de piruvato a las 16 horas de reacción. El análisis por NMR confirmó la ausencia de piruvato y la presencia de lactato a las 16 h de reacción (figura 44). Esto indica que el acoplamiento de la cascada enzimática fue exitoso ya que la L-Ala fue convertida a piruvato por la TA utilizando la DHA como aceptor de grupos amino (generándose además serinol) y este intermediario fue completamente convertido por la LDH a L-láctico.

Nuevamente, la concentración óptima de partida de DHA debería ser estudiada con más profundidad, lo que potencialmente podría mejorar la eficiencia de la conversión. Con estos resultados se prosiguió al acoplamiento de los biocatalizadores inmovilizados.

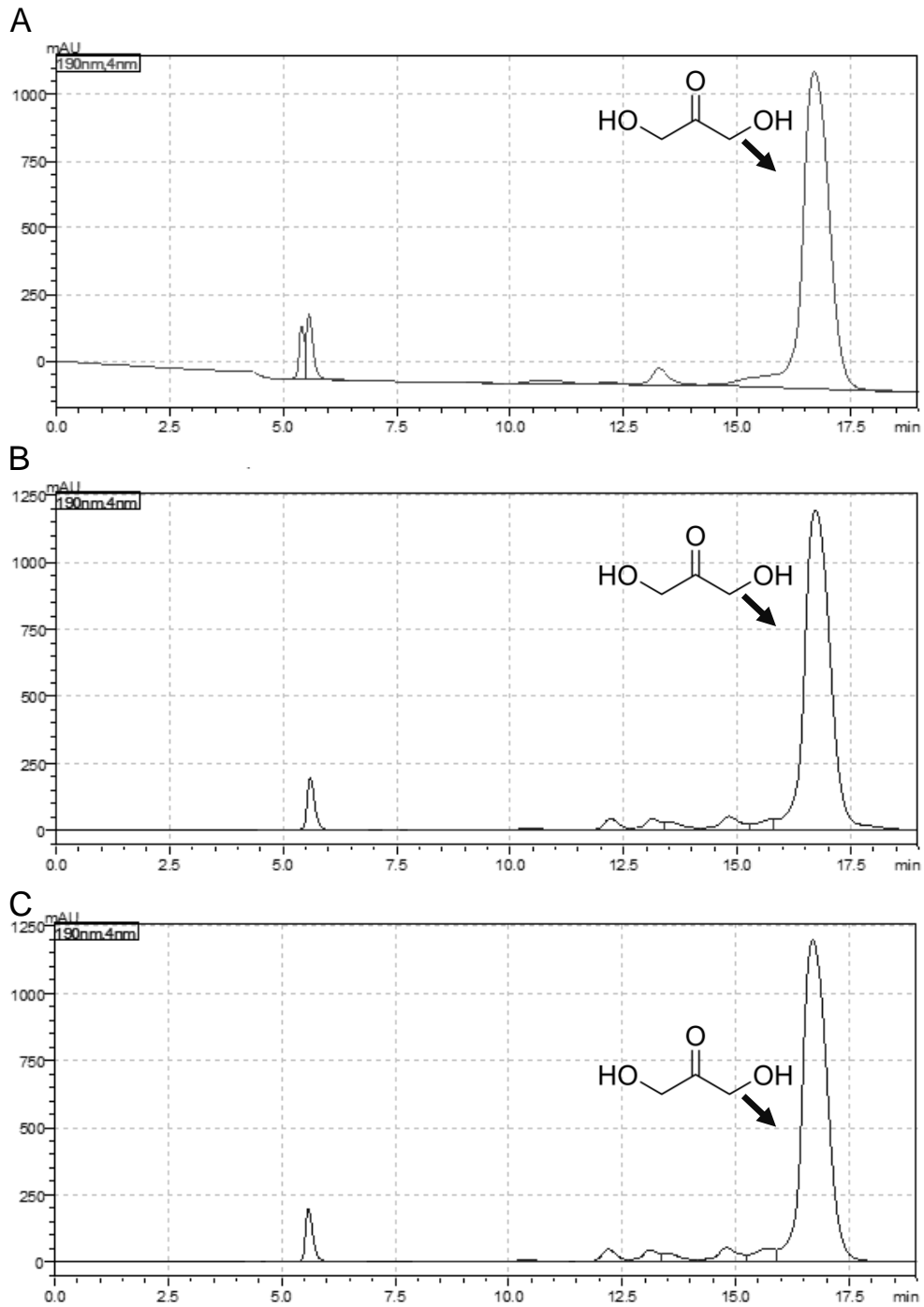


Figura 43: Análisis por HPLC de la conversión de DHA con TA, LDH y FDH en solución. A, tiempo 0 de la conversión. B, tiempo 16 h. C, tiempo 16 h con el agregado de láctico de origen comercial. Detección a 190 nm. T_R piruvato 9,1 min, T_R DHA 16,7 min.

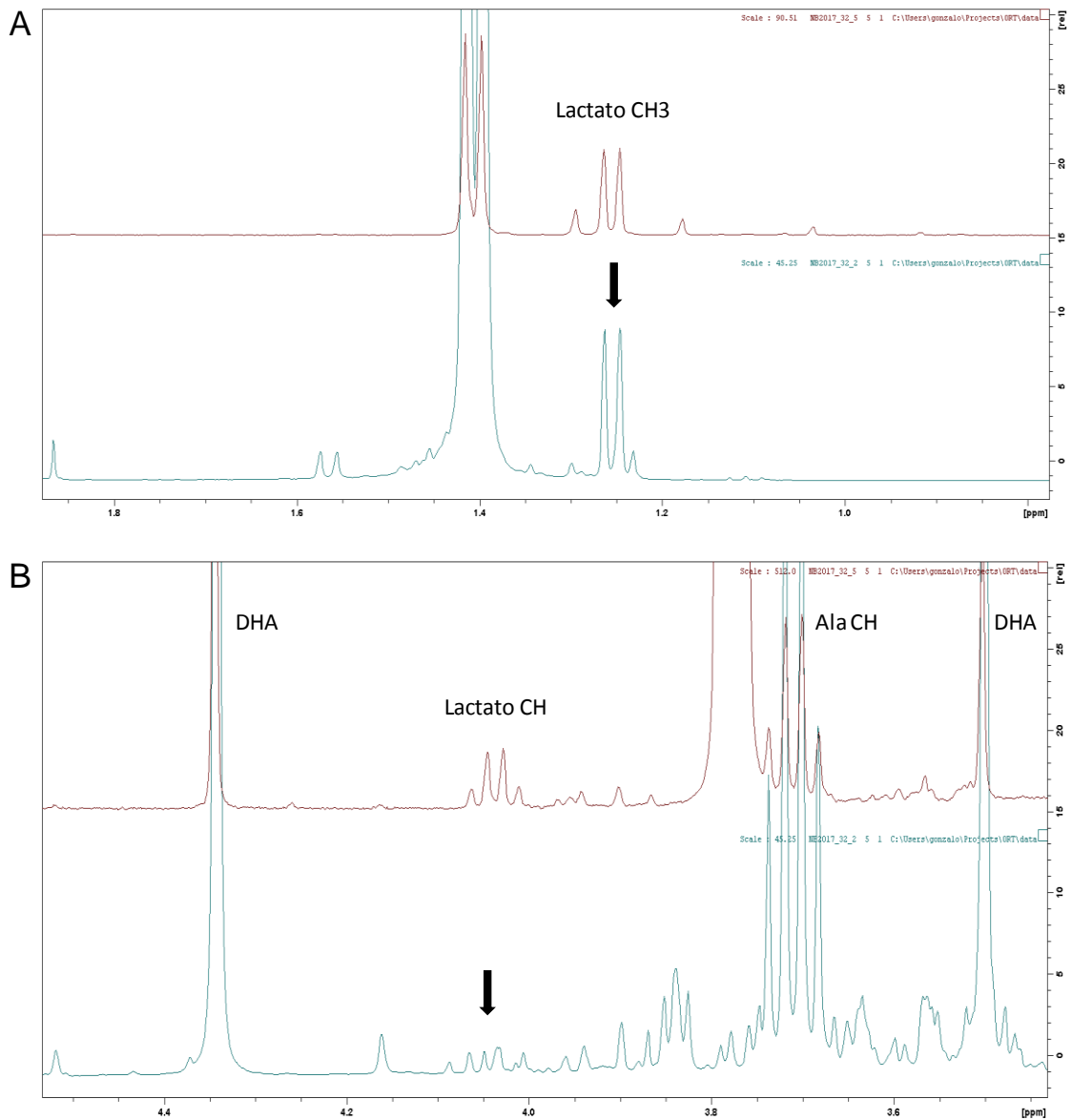


Figura 44: Análisis por ¹HNMR de la conversión de DHA a 16 h por TA, LDH y FDH solubles.

Conversión de glicerol crudo a ácido L-láctico mediante el acoplamiento de biocatalizadores inmovilizados

Finalmente, y una vez demostrada la prueba de concepto con enzimas solubles, nos dispusimos al acoplamiento de la cascada mixta inmovilizada para la obtención de ácido L-láctico a partir de glicerol crudo.

Conversión en dos etapas

En primera instancia, Se llevó a cabo la conversión en dos pasos consecutivos de una solución de 50 g/L de glicerol crudo a ácido L láctico como se describe en la sección de metodología (Figura 45).

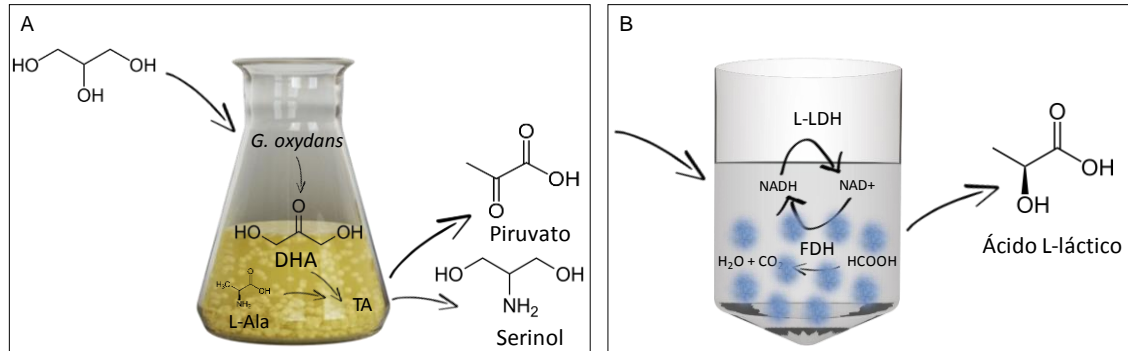


Figura 45: Esquema de la conversión de glicerol crudo en dos etapas.

El avance de la reacción se estudió mediante la detección de DHA, piruvato y serinol ya que una variación menor a 5 mM en el consumo del glicerol de partida no se logra detectar por la estrategia de HPLC utilizada en este trabajo. La primera etapa de la conversión se llevó a cabo mediante el acoplamiento de *G. oxydans* inmovilizado en agar y TA inmovilizada en IDA-Co-epóxido. En esta etapa se esperaba que *G. oxydans* convirtiera el glicerol en DHA y esta, junto a la alanina, fueran transformadas para generar serinol y piruvato por la TA (Figura 45). El análisis por HPLC (figura 46 B y C) mostró la formación de 0,53 mM de piruvato a las 24 horas alcanzando 10,5 mM a las 48 h de reacción, como se observa en la figura 46 C con la aparición de un pico a los 9,1 min de la corrida.

No se detectó DHA a lo largo de la conversión (figura 46 E y F) lo cual indica que efectivamente la misma fue rápidamente convertida por la TA a medida que se fue generando. Ya que el serinol no podía ser detectado por esta misma metodología por HPLC, se llevó a cabo el análisis por GC-MS de las muestras. Los mismos confirmaron la presencia de serinol en esta etapa. La presencia de esta molécula confirma que la DHA fue efectivamente generada y convertida por la TA a serinol.

La segunda etapa de la conversión se llevó a cabo mediante el acoplamiento de LDH y FDH co-inmovilizadas en agarosa-glioxil. Esta configuración apuntó a la conversión de piruvato en lactato y la regeneración del cofactor NADH (figura 47).

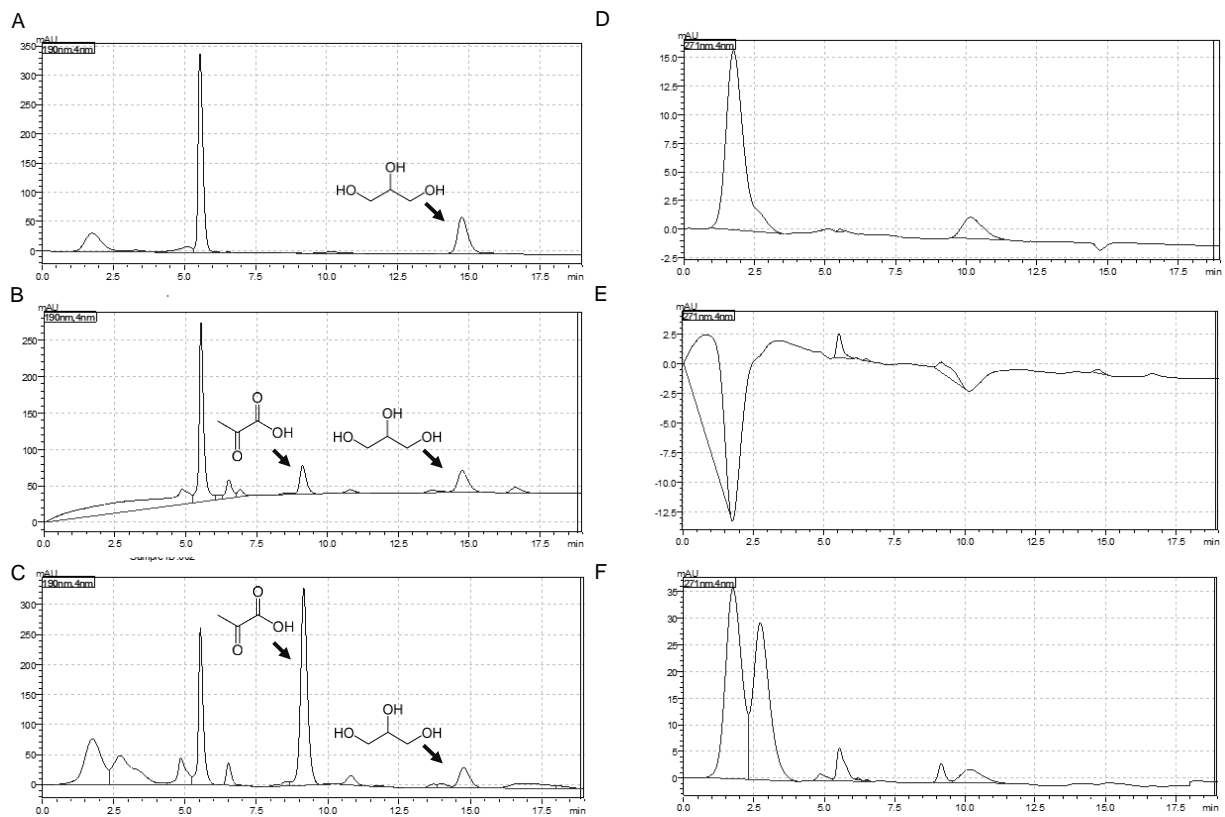


Figura 46: Análisis por HPLC del primer paso de la conversión de glicerol a láctico por *G. oxydans* y TA inmovilizadas. A, B y C detección a 190 nm de tiempo 0, 24 y 48 de reacción. D, E y F detección a 271 nm de tiempo 0, 24 y 48 horas de reacción. T_R piruvato 9,1 min, T_R DHA 16,7 min.

Se partió de 2,6 mM de piruvato convertido previamente, no se tomó la totalidad de lo convertido para evitar la inhibición por sustrato ya mencionada para la enzima LDH en el capítulo 2.

En 24 h los biocatalizadores acoplados lograron la conversión de 79,6 % del piruvato inicial (se observó un 0,53 mM remanente) y luego de 48 horas no se detectó la presencia de piruvato por HPLC (Figura 47 B y C). La desaparición del piruvato a las 48 horas indica que hubo conversión a L-láctico por parte de la LDH. No fue posible detectar el ácido láctico ya que los cromatogramas presentaban picos en el tiempo de retención de este compuesto. La complejidad de la muestra dificulta su análisis por lo que la purificación del L-láctico previo a su análisis por HPLC podría facilitar su visualización por dicha técnica.

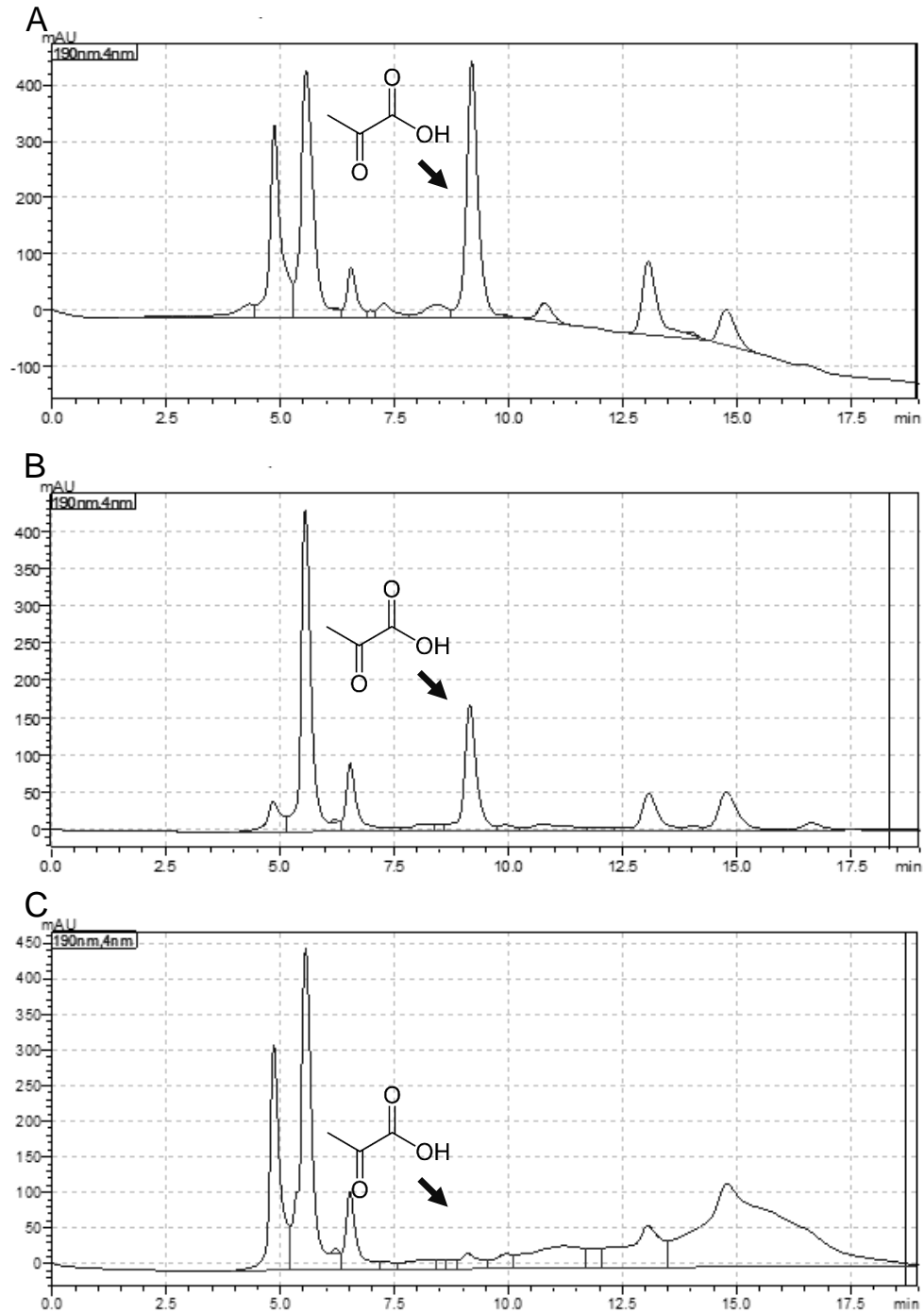


Figura 47: Segundo paso de la conversión de glicerol a láctico por LDH y FDH inmovilizadas. A, B y C detección a 190 nm de tiempo 0, 24 y 48 de reacción.

Conversión *one pot*

Una vez acoplado el sistema en dos etapas, se llevó a cabo la conversión de una solución de 50 g/L de glicerol crudo a ácido L láctico mediante el acoplamiento de *G. oxydans*

inmovilizado en agar, TA inmovilizada en IDA-Co-epóxido y LDH y FDH co-inmovilizadas en glioxil agarosa (Figura 48).

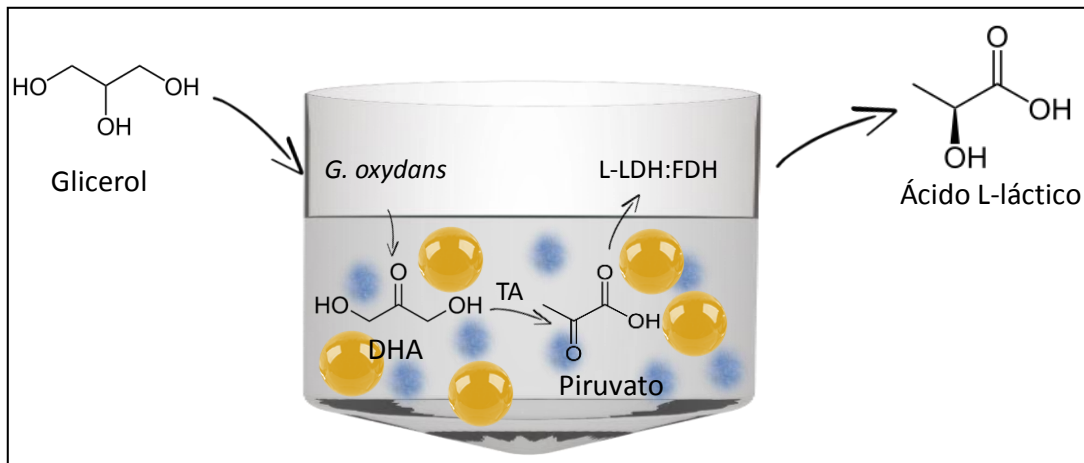


Figura 48: Esquema de conversión *one pot* de glicerol crudo a ácido L láctico.

El avance de la reacción se estudió mediante la detección de DHA, piruvato y serinol. La DHA osciló entre 2,14 y 1,72 mM a las 24 y 48 horas, nuevamente sugiriendo que la DHA que se va formando es convertida rápidamente por la TA. La presencia de serinol confirmada por GC-MS indicó que efectivamente hubo conversión a piruvato a las 24 horas. Sin embargo, a diferencia de la conversión en 2 etapas, el pico correspondiente a piruvato en el cromatograma se encontró levemente por debajo del límite de detección por HPLC (0,5 mM) (figura 49 B).

A las 48 h de conversión se detectaron por HPLC 2,9 mM de piruvato (Figura 49 C), más de 3 veces menos la cantidad de piruvato detectada en el primer paso de la conversión en dos etapas donde a las 48 horas se detectaron 10,5 mM bajo las mismas condiciones y con las mismas unidades de enzima en la conversión. Esto confirma que parte del piruvato generado fue convertido a L-láctico por la LDH. Sería de interés mejorar la relación TA:LDH para lograr una conversión total del piruvato generado en este período de tiempo. El ácido L-láctico nuevamente no pudo ser detectado debido a la complejidad de la muestra. En este caso también sería conveniente abordar la purificación del mismo para su análisis. De todos modos, los resultados obtenidos, en comparación con la síntesis en dos etapas, sugieren que la cascada sintética se logró acoplar para la conversión del glicerol.

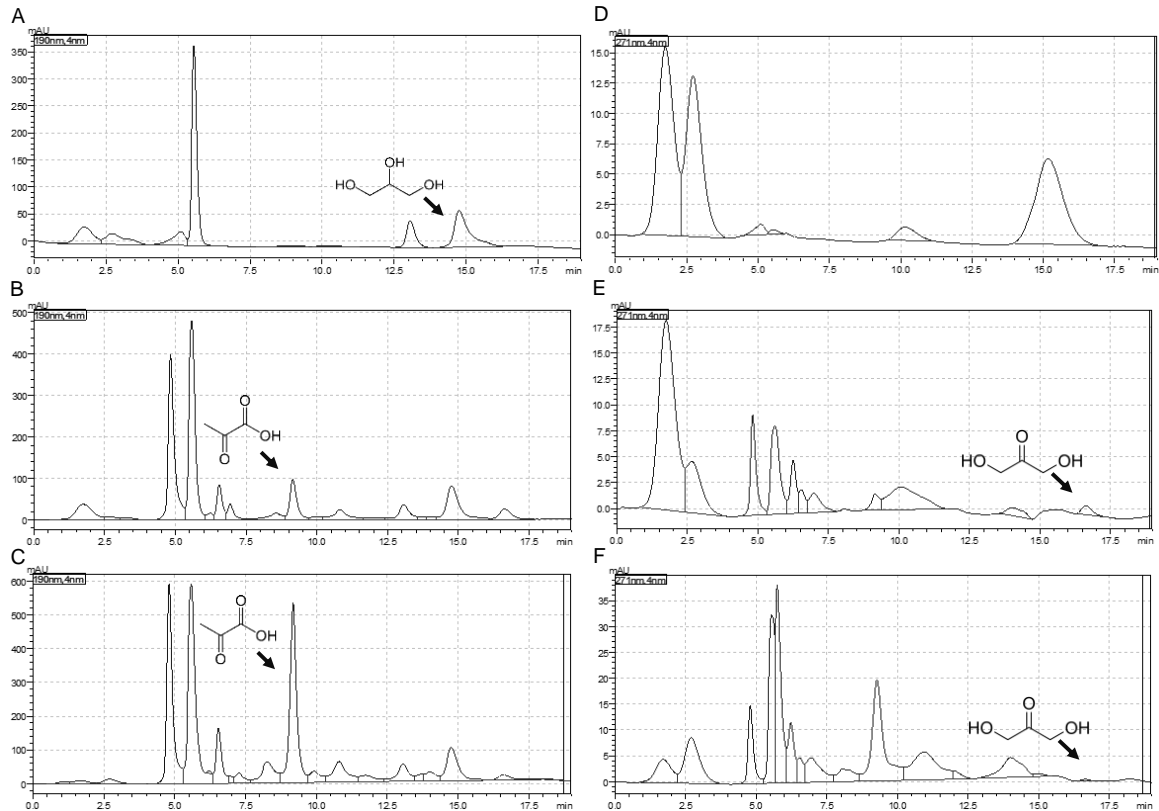


Figura 49: Conversión *one pot* de glicerol crudo a láctico por *G. oxydans*, TA, LDH y FDH inmovilizadas. A, B y C detección de glicerol y piruvato a 190 nm de tiempo 0, 24 y 48 de reacción. D, E y F detección de DHA a 271 nm de tiempo 0, 24 y 48 de reacción.

Tanto en la conversión en 2 etapas como en *one pot* se confirmó la hipótesis planteada en esta tesis sobre la posibilidad de acoplar bacterias y enzimas para la conversión de glicerol a ácido L-láctico. Esta cascada artificial demostró ser capaz de utilizar el glicerol crudo de la industria de biocombustibles para la generación de moléculas de valor agregado. Para poder competir a nivel industrial con los procesos actuales se requiere de una serie de mejoras que incluyan el estudio de las relaciones óptimas de cada catalizador en el sistema, concentración óptima de partida de glicerol y el estudio de la mejor configuración del reactor para llevar a cabo la síntesis. En este contexto se podría evaluar si una configuración en *fed batch* sería beneficiosa para la conversión (sumado a la mejora de las proporciones utilizadas de catalizadores) disminuyendo posibles efectos de inhibición a lo largo de la cascada de síntesis.

Conclusiones generales

En este trabajo nos planteamos la hipótesis de que era posible desarrollar una cascada de biocatalizadores inmovilizados para producir ácido L-láctico a partir de glicerol crudo. Para demostrar esta hipótesis se planteó una cascada mixta de biocatalizadores celulares y enzimáticos acoplados para llevar a cabo la conversión del glicerol crudo en 3 pasos. El primer paso implicó la conversión de glicerol crudo derivado del biodiesel a DHA y GA por bacterias inmovilizadas de *G. frateurii* y *G. oxydans*. Se describió por primera vez la transformación de glicerol puro y crudo por células en reposo de *G. frateurii*, en completa ausencia de medio de cultivo. Para el caso de *G. oxydans*, las productividades obtenidas para glicerol crudo tampoco presentan precedentes en la literatura en las condiciones estudiadas. La simplificación de los medios de reacción, la reducción del volumen de reacción total, la facilidad de separación del catalizador inmovilizado de la muestra y la posibilidad de reuso de las células inmovilizadas, allana el camino para una implementación eficiente de la transformación de glicerol que, como cualquier otro bioproceso, a menudo se encuentra limitado por la productividad de la conversión y los costos del procesamiento posterior. Estos resultados demuestran la viabilidad de utilizar la biotransformación sin medio de cultivo para una revalorización verde, más limpia y más económica del glicerol industrial.

El segundo y tercer paso de la conversión se planteó con biocatalizadores enzimáticos inmovilizados para la transformación de DHA y GA a L-láctico por las enzimas TA, DHAD, LDH y FDH inmovilizadas. Debido a la baja actividad específica recuperada para la enzima DHAD, y para avanzar con los objetivos específicos de la tesis, se continuó con la cascada utilizando la cepa de *G. oxydans* inmovilizada, ya que presentaba la ventaja de producir DHA de manera exclusiva y podía ser reutilizada. La DHA fue utilizada como co-sustrato junto a la alanina para la conversión de piruvato por la enzima TA inmovilizada. Dentro de los diferentes soportes testeados para esta enzima, se seleccionó el soporte agarosa IDA-Co-epóxido, ya que resultaba ser 10 veces más estable que la enzima soluble y al estar unida de manera covalente se evitaba la pérdida de proteína a la mezcla reactiva. Los reportes de inmovilización de TA aisladas son recientes y se acumulan con rapidez posiblemente dado su potencial en biocatálisis. No existen reportes aún de

inmovilización de TA en los soportes utilizados en este trabajo por lo que estos resultados son factibles de ser publicados.

El tercer y último paso de la cascada fue la conversión de piruvato a ácido L-láctico por la enzima LDH co-inmovilizada a una FDH regeneradora del cofactor NADH. Ambas enzimas fueron estabilizadas en el soporte agarosa-glioxil con un factor de estabilización de 1600 veces para LDH, obtenido con un protocolo previamente desarrollado en el marco de mis estudios de Maestría. En el contexto de este trabajo se estudió la co-inmovilización de ambas enzimas, que demostró no afectar la estabilidad de ninguna de ellas y permitió acoplar la cascada partiendo de NAD⁺ como cofactor.

El acoplamiento de la cascada de biotransformación de glicerol se logró siguiendo dos estrategias:

- 1) Una estrategia en dos etapas, en donde el primer paso de la conversión se llevó a cabo mediante el acoplamiento de *G. oxydans* inmovilizado en agar y TA inmovilizada en IDA-Co-epóxido. En esta etapa se observó presencia de piruvato y ausencia de DHA indicando un acoplamiento eficiente célula-enzima. Los resultados indican que sustratos y productos fueron capaces de difundir a través de los soportes. Se detectó además serinol, otro producto de valor agregado generado en este paso.

El segundo paso de la conversión se llevó a cabo mediante el acoplamiento de LDH y FDH co-inmovilizadas donde se comprobó la conversión total de piruvato en el período analizado.

Los buenos resultados obtenidos en dos etapas determinaron las condiciones del acoplamiento completo de la cascada en *one pot*.

- 2) Una estrategia en *one pot* en donde se llevó a cabo la conversión de glicerol crudo a ácido L-láctico con *G. oxydans* inmovilizada en agar, TA inmovilizada en IDA-Co-Epóxido y LDH:FDH en agarosa-glioxil, en un mismo reactor en batch. En este caso, bajo las mismas condiciones de reacción se detectó piruvato, aunque en una concentración 3 veces menor a la obtenida al mismo tiempo que en la primera etapa de la estrategia anterior. Este resultado indica un acoplamiento global exitoso de los biocatalizadores que aún no resulta óptimo, ya que la acumulación de piruvato implica una conversión más lenta por parte de la LDH

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

que podía explicarse por una posible inhibición por sustrato. Para optimizar el rendimiento global de la conversión serían necesarios estudios adicionales para conocer las velocidades de cada paso. Esto permitirá ajustar las cantidades óptimas de cada biocatalizador en la conversión.

Esta tesis se llevó a cabo en el marco del Fondo Sectorial de Energía, FSE_1_2016_1_132115, "Cascada biosintética para la valorización del glicerol a ácido L-láctico". Financiado por ANII.

Se contó además con la financiación de ANII para una beca de posgrado nacional, POS_NAC_2015_1_109879.

Los resultados obtenidos en la conversión de glicerol crudo con cepas de *Gluconobacter* permitieron la elaboración del artículo "Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells" de autores: Erienne Jackson, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor. Aceptado en *Microbiology Open*.

Los resultados obtenidos en la inmovilización de LDH y FDH permitieron la elaboración del artículo "Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering" de autores: Erienne Jackson, Fernando López-Gallego, José Manuel Guisan y Lorena Betancor. Publicado en *Process Biochemistry* [200].

En el marco de las estrategias de inmovilización estudiadas en esta tesis se elaboraron:

El artículo "Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells" de autores: Fernando López-Gallego, Erienne Jackson y Lorena Betancor. Publicado en *Chemistry-A European Journal* [201].

El capítulo de libro "Cellulose-Based Nanosupports for Enzyme Immobilization" de autores: Erienne Jackson, Sonali Correa y Lorena Betancor. Publicado en *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* [202].

El capítulo de libro aceptado “*In situ* immobilization of enzymes in biomimetic sílica” de autores: Erienne Jackson, Sonali Correa y Lorena Betancor. Aceptado en *Immobilization of enzymes and cells*. Editores José Manuel Guisan, Fernando López Gallego y Juan Manuel Bolivar, editorial Springer, 2019.

Los resultados obtenidos permitieron además la presentación una serie de congresos nacionales e internacionales:

- Estudios de conversión de glicerol por células en suspensión de cepas de *Gluconobacter*. Autores: Erienne Jackson, Magdalena Ripoll, Rocío Bravo y Lorena Betancor. VII Encuentro regional de biocatálisis y biotransformaciones / II Simposio Latinoamericano de biocatálisis y biotransformaciones, 2016 (Poster)
- Síntesis de ácido L-láctico mediante un sistema enzimático inmovilizado. Autores: Erienne Jackson, Fernando Lopez-Gallego, Jose Manuel guisán, Lorena Betancor. VII Encuentro regional de biocatálisis y biotransformaciones / II Simposio Latinoamericano de biocatálisis y biotransformaciones, 2016 (Exposición oral).
- Crude glycerol revalorization in media-free biotransformations. Autores: Erienne Jackson, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor. Biotrans2017, 2017 (Poster).
- Inmovilizados de *G. frateurii* para la bioconversión de glicerol. Autores: Erienne Jackson, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor. Enaqui 5, 2017 (Poster).
- Estudios de conversión de glicerol por *Gluconobacter* sp. NBRC3259. Autores: Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor. Enaqui 5, 2017 (Poster).
- Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformation of crude glicerol. Autores: Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor. 3rd Green and sustainable chemistry conference 2018, 2018 (Poster).
- Towards biodiesel biorefinery: Glycerol valorization using immobilized bacteria. Autores: Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor. ANIU CAETS, 2018 (Poster).
- Crude glycerol transformation with immobilized *G. oxydans* in agar. Autores: Erienne Jackson, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor. III Simposio

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

- Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones (SiLaByB) VIII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB), 2018. (Exposición oral).
- Strategies to improve the conversion of crude glycerol with *Gluconobacter* strains. Autores: Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor. III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones (SiLaByB) VIII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB), 2018. (Poster).
 - Microbial conversion of glycerol to dihydroxyacetone in water. Autores: Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor. Biotrans 2019, 2019 (Poster).

Referencias bibliográficas

- [1] A. Madhavan, R. Sindhu, P. Binod, R.K. Sukumaran, A. Pandey, Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications, *Bioresour. Technol.* 245 (2017) 1304–1313. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.031.
- [2] J.M. Choi, S.S. Han, H.S. Kim, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1443–1454. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.
- [3] R.N. Patel, Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 1252–1274. doi:10.1016/j.bmc.2017.05.023.
- [4] J. Wachtmeister, D. Rother, Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale, *Curr. Opin. Biotechnol.* 42 (2016) 169–177. doi:10.1016/j.copbio.2016.05.005.
- [5] J.E. Carrera, P. Clave, Production and Application of Industrial Enzymes, *Rev. Fac. Ciencias Agropecu.* 1 (2003) 7.
- [6] R.A. Sheldon, D. Brady, Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis, (2019) 1–24. doi:10.1002/cssc.201900351.
- [7] C. Bernal, K. Rodríguez, R. Martínez, Integrating enzyme immobilization and protein engineering : An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 1470–1480. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.06.002.
- [8] M. Bilal, Y. Zhao, S. Noreen, S.Z.H. Shah, R.N. Bharagava, H.M.N. Iqbal, Modifying biocatalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint, *Biocatal. Biotransformation.* 37 (2019) 159–182. doi:10.1080/10242422.2018.1564744.
- [9] F.B.H. Rehm, S. Chen, B.H.A. Rehm, Bioengineering toward direct production of immobilized enzymes: A paradigm shift in biocatalyst design, *Bioengineered.* 9 (2018) 6–11. doi:10.1080/21655979.2017.1325040.
- [10] J.M. Palomo, M. Filice, New emerging bio-catalysts design in biotransformations, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 605–613. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.010.
- [11] G.W. Zheng, J.H. Xu, New opportunities for biocatalysis: Driving the synthesis of chiral chemicals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 784–792. doi:10.1016/j.copbio.2011.07.002.
- [12] W.G. Wang, D.W. Lyons, N.N. Clark, M. Gautam, P.M. Norton, Emissions from Nine Heavy Trucks Fueled by Diesel and Biodiesel Blend without Engine Modification, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 933–939. doi:10.1021/es981329b.
- [13] M. Cardone, M.V. Prati, V. Rocco, M. Seggiani, A. Senatore, S. Vitolo, Brassica carinata as an Alternative Oil Crop for the Production of Biodiesel in Italy: Engine Performance and Regulated and Unregulated Exhaust Emissions, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4656–4662. doi:10.1021/es011078y.
- [14] P.S. Kong, M.K. Aroua, W.M.A.W. Daud, Conversion of crude and pure glycerol into

- derivatives: A feasibility evaluation, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 63 (2016) 533–555. doi:10.1016/j.rser.2016.05.054.
- [15] F. Yang, M. a Hanna, R. Sun, Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production, *Biotechnol. Biofuels.* 5 (2012) 13. doi:10.1186/1754-6834-5-13.
- [16] C. Varrone, S. Rosa, F. Fiocchetti, B. Giussani, G. Izzo, G. Massini, et al., Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 1319–1331. doi:10.1016/J.IJHYDENE.2012.11.069.
- [17] Y. Baba, C. Tada, R. Watanabe, Y. Fukuda, N. Chida, Y. Nakai, Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 342–348. doi:10.1016/J.BIORTECH.2013.04.020.
- [18] M. Ayoub, A.Z. Abdullah, Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 2671–2686. doi:10.1016/j.rser.2012.01.054.
- [19] X. Luo, X. Ge, S. Cui, Y. Li, Bioresource Technology Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 144–154. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.042.
- [20] F.A. Castillo Martinez, E.M. Balciunas, J.M. Salgado, J.M. Domínguez González, A. Converti, R.P.D.S. Oliveira, Lactic acid properties, applications and production: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 30 (2013) 70–83. doi:10.1016/j.tifs.2012.11.007.
- [21] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits, *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2015) 10–18. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.003.
- [22] F.L. Marques, A.C. Oliveira, J. Mendes Filho, E. Rodríguez-Castellón, C.L. Cavalcante, R.S. Vieira, Synthesis of lactic acid from glycerol using a Pd/C catalyst, *Fuel Process. Technol.* 138 (2015) 228–235. doi:10.1016/j.fuproc.2015.05.032.
- [23] H. Habe, Y. Shimada, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, et al., Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 1799–1805. doi:10.1271/bbb.90163.
- [24] P. Kumar, S. Kumar, V.S. Moholkar, Bioresource Technology Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1, 3-Dihydroxyacetone production G R A P H I C A L A B S T R A C T, *Bioresour. Technol.* 244 (2017) 362–370. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.136.
- [25] S. Wei, Q. Song, D. Wei, Repeated Use of Immobilized *Gluconobacter oxydans* Cells for Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37 (2007) 67–76. doi:10.1080/10826060601040954.
- [26] P.K. Dikshit, V.S. Moholkar, Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 1058–1065. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.100.
- [27] M. Navrátil, J. Tkáč, J. Švitel, B. Danielsson, E. Šturdík, Monitoring of the bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized *Gluconobacter oxydans* cell using thermometric flow injection analysis, *Process Biochem.* 36 (2001) 1045–1052. doi:10.1016/S0032-9592(00)00298-3.

- [28] O. Valerio, T. Horvath, C. Pond, M. Misra, A. Mohanty, Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters, *Ind. Crops Prod.* 78 (2015) 141–147. doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.019.
- [29] R. Ciriminna, C. Della Pina, M. Rossi, M. Pagliaro, Understanding the glycerol market, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1432–1439. doi:10.1002/ejlt.201400229.
- [30] J.M. Clomburg, R. Gonzalez, Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 20–28. doi:10.1016/J.TIBTECH.2012.10.006.
- [31] R. Dobson, V. Gray, K. Rumbold, Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012) 217–226. doi:10.1007/s10295-011-1038-0.
- [32] H.W. Tan, A.R. Abdul Aziz, M.K. Aroua, Glycerol production and its applications as a raw material: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27 (2013) 118–127. doi:10.1016/J.RSER.2013.06.035.
- [33] X. Yang, H. Suk, J. Hun, S. Kwon, S. Ok, C. Park, et al., Improved production of 1, 3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation, *Chem. Eng. J.* 349 (2018) 25–36. doi:10.1016/j.cej.2018.05.042.
- [34] J. Bonet, J. Costa, R. Sire, J.M. Reneaume, A.E. Pleșu, V. Pleșu, et al., Revalorization of glycerol: Comestible oil from biodiesel synthesis, *Food Bioprod. Process.* 87 (2009) 171–178. doi:10.1016/j.fbp.2009.06.003.
- [35] S. Veiga, J. Bussi, Steam reforming of crude glycerol over nickel supported on activated carbon, *Energy Convers. Manag.* (2016). doi:10.1016/j.enconman.2016.04.103.
- [36] S. Veiga, J. Bussi, Efficient Conversion of Glycerol to a H₂ Rich Gas Mixture by Steam Reforming over NiLaZr Catalysts, *Top. Catal.* 59 (2016) 186–195. doi:10.1007/s11244-015-0444-3.
- [37] C. Gao, Z. Li, L. Zhang, C. Wang, K. Li, C. Ma, et al., An artificial enzymatic reaction cascade for a cell-free bio-system based on glycerol, *Green Chem.* 17 (2015) 804–807. doi:10.1039/C4GC01685H.
- [38] C. Charles, W. Qin, Biotransformation of biodiesel-derived crude glycerol using newly isolated bacteria from environmental consortia, *3 Biotech.* 63 (2017) 177–184. doi:10.1016/j.procbio.2017.08.017.
- [39] D.A. Rzechonek, A. Dobrowolski, W. Rymowicz, A.M. Miro, Bioresource Technology Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*, *3 Biotech.* 271 (2019) 340–344. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.118.
- [40] S. Khanna, A. Goyal, V.S. Moholkar, Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects, *Crit. Rev. Biotechnol.* 32 (2012) 235–262. doi:10.3109/07388551.2011.604839.
- [41] J.A. Trelles, C.W. Rivero, Whole Cell Entrapment Techniques, in: J.M. Guisan (Ed.), *Methods Mol. Biol.*, 3rd ed., Springer, Madrid, 2013: pp. 365–374. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_24.
- [42] P. Zajkoska, M. Rebroš, M. Rosenberg, Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1441–1455. doi:10.1007/s00253-012-4651-6.

- [43] M.K. Julsing, D. Kuhn, A. Schmid, B. Bühler, Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1109–1119. doi:10.1002/bit.24404.
- [44] A. Oliveira, V.S. Junior, Study of bacteria *Gluconobacter* sp.: isolation, purification, phenotypic and molecular identification, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 30 (2010) 106–112. doi:10.1590/S0101-20612010000100016.
- [45] A. Gupta, V.K. Singh, G.N. Qazi, A. Kumar, *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3 (2001) 445–456. doi:11361077.
- [46] H. Habe, T. Fukuoka, D. Kitamoto, K. Sakaki, Biotechnological production of d-glyceric acid and its application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 445–452. doi:10.1007/s00253-009-2124-3.
- [47] S. Sato, N. Morita, D. Kitamoto, T. Yakushi, K. Matsushita, H. Habe, Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol, (2013) 1–7. doi:10.1186/2191-0855-3-20.
- [48] L. Stasiak, S. Blazejak, Acetic acid Bacteria - perspectives of Application in Biotechnology - a Review, *Polish J. Food Nutr. Sci.* 59 (2009) 17–23.
- [49] R. Ciriminna, A. Fidalgo, L.M. Ilharco, M. Pagliaro, Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct, *ChemistryOpen.* 7 (2018) 233–236. doi:10.1002/open.201700201.
- [50] B. Katryniok, H. Kimura, E. Skrzyńska, J.-S. Girardon, P. Fongarland, M. Capron, et al., Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals, *Green Chem.* 13 (2011) 1960. doi:10.1039/c1gc15320j.
- [51] S. Hirasawa, Y. Nakagawa, K. Tomishige, Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over a Pd–Ag catalyst, *Catal. Sci. Technol.* 2 (2012) 1150. doi:10.1039/c2cy20062g.
- [52] P.K. Dikshit, V.S. Moholkar, Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 948–957. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.042.
- [53] S. Sato, T. Morita, T. Fukuoka, D. Kitamoto, H. Habe, Microbial resolution of dl-glyceric acid for l-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains, *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2015) 554–557. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.10.016.
- [54] H. Habe, Y. Shimada, T. Yakushi, H. Hattori, Y. Ano, T. Fukuoka, et al., Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 7760–7766. doi:10.1128/AEM.01535-09.
- [55] S.F. Karel, S.B. Libicki, C.R. Robertson, The immobilization of whole cells: Engineering principles, *Chem. Eng. Sci.* 40 (1985) 1321–1354. doi:10.1016/0009-2509(85)80074-9.
- [56] J.D. Carballeira, M.A. Quezada, P. Hoyos, Y. Simeó, M.J. Hernaiz, A.R. Alcántara, et al., Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 686–714. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.001.
- [57] M. Schlieker, K.-D. Vorlop, A Novel Immobilization Method for Entrapment: LentiKats®, in: 2006: pp. 333–343. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_29.
- [58] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. Banat, R. Marchant, A. Koutinas, Immobilization

- technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiol.* 21 (2004) 377–397. doi:10.1016/J.FM.2003.10.005.
- [59] G.-A. Junter, T. Jouenne, Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse, *Biotechnol. Adv.* 22 (2004) 633–658. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2004.06.003.
- [60] S. Rathore, P.M. Desai, C.V. Liew, L.W. Chan, P.W.S. Heng, Microencapsulation of microbial cells, *J. Food Eng.* 116 (2013) 369–381. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022.
- [61] R.P. John, R.D. Tyagi, S.K. Brar, R.Y. Surampalli, D. Prévost, Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery, *Crit. Rev. Biotechnol.* 31 (2011) 211–226. doi:10.3109/07388551.2010.513327.
- [62] I. Moreno-Garrido, *Microalgal Immobilization Methods*, in: 2013: pp. 327–347. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_22.
- [63] D.J. McHugh, *Production and utilization of products from commercial seaweeds*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1987. <http://www.fao.org/3/X5822E/x5822e00.htm> (accessed April 15, 2019).
- [64] C.S. Black, G.R. Nair, Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconacetobacter xylinus* Cells, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 4 (2013) 310–314. doi:10.7763/IJCEA.2013.V4.316.
- [65] J.C. Beltrán-Prieto, J. Pecha, V. Kašpárková, K. Kolomazník, Development of an HPLC method for the determination of glycerol oxidation products, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 2758–2773. doi:10.1080/10826076.2012.725695.
- [66] S. Khanna, A. Goyal, V.S. Moholkar, Microbial conversion of glycerol : present status and future prospects, 2258 (2011) 1–28. doi:10.3109/07388551.2011.604839.
- [67] L. De Vuyst, R. Callewaert, K. Crabbé, Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions, *Microbiology.* 142 (1996) 817–827. doi:10.1099/00221287-142-4-817.
- [68] I. Poljungreed, S. Boonyarattanakalin, Dihydroxyacetone production by *Gluconobacter frateurii* in a minimum medium using fed-batch fermentation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 2635–2641. doi:10.1002/jctb.5281.
- [69] M.L. Shuler, K. Fikret, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, 2nd ed., Prentice Hall, New Jersey, 2002.
- [70] S. Gómez-Manzo, J.E. Escamilla, A. González-Valdez, G. López-Velázquez, A. Vanoye-Carlo, J. Marcial-Quino, et al., The oxidative fermentation of ethanol in *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a two-step pathway catalyzed by a single enzyme: alcohol-aldehyde Dehydrogenase (ADHa)., *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 1293–311. doi:10.3390/ijms16011293.
- [71] H. Habe, Y. Shimada, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, et al., Use of a *Gluconobacter frateurii* mutant to prevent dihydroxyacetone accumulation during glyceric acid production from glycerol., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 2330–2. doi:10.1271/bbb.100406.
- [72] S. Sato, D. Kitamoto, H. Habe, Chemical mutagenesis of *Gluconobacter frateurii* to construct methanol-resistant mutants showing glyceric acid production from methanol-

- containing glycerol, *J. Biosci. Bioeng.* 117 (2014) 197–199. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.07.004.
- [73] V. Tanamool, P. Hongsachart, W. Soemphol, Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by a potential acetic acid bacteria, *Sains Malaysiana.* 47 (2018) 481–488. doi:10.17576/jsm-2018-4703-07.
- [74] I. Poljungreed, S. Boonyarattanakalin, Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only, *Lett. Appl. Microbiol.* 67 (2018) 39–46. doi:10.1111/lam.12881.
- [75] Z.C. Hu, Y.G. Zheng, Y.C. Shen, Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7177–7182. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.078.
- [76] X. Zhou, X. Zhou, Y. Xu, S. Yu, Improving the production yield and productivity of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol fermentation using *Gluconobacter oxydans* NL71 in a compressed oxygen supply-sealed and stirred tank reactor (COS-SSTR), *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39 (2016) 1315–1318. doi:10.1007/s00449-016-1595-8.
- [77] Z.C. Hu, Z.Q. Liu, J.M. Xu, Y.G. Zheng, Y.C. Shen, Improvement of 1,3-dihydroxyacetone production from *gluconobacter oxydans* by ion beam implantation, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42 (2012) 15–28. doi:10.1080/10826068.2011.563400.
- [78] Z.C. Hu, Y.G. Zheng, Y.C. Shen, Dissolved-oxygen-stat fed-batch fermentation of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15 (2010) 651–656. doi:10.1007/s12257-009-3068-2.
- [79] Z.-C. Hu, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7177–7182. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.078.
- [80] Z.C. Hu, Y.G. Zheng, A high throughput screening method for 1,3-Dihydroxyacetone-producing bacterium by cultivation in a 96-well microtiter plate, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 17 (2009) 233–241. doi:10.1111/j.1745-4581.2009.00173.x.
- [81] C. Van Der Sluis, A.N.T. Mulder, K.C.F. Grolle, G.H.M. Engbers, E.G. Ter Schure, J. Tramper, et al., Immobilized soy-sauce yeasts: Development and characterization of a new polyethylene-oxide support, *J. Biotechnol.* 80 (2000) 179–188. doi:10.1016/S0168-1656(00)00263-7.
- [82] C.-P. Hung, H.-F. Lo, W.-H. Hsu, S.-C. Chen, L.-L. Lin, Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 (2009) 169–169. doi:10.1007/s12010-008-8393-y.
- [83] H.J. Shin, Agarose-gel-immobilized recombinant bacterial biosensors for simple and disposable on-site detection of phenolic compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1895–1904. doi:10.1007/s00253-011-3700-x.
- [84] J.K. Park, H.N. Chang, Microencapsulation of microbial cells., *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 303–19. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022.
- [85] P.K. Dikshit, G.J. Kharmawlong, V.S. Moholkar, Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*, *Bioresour. Technol.* 256 (2018) 302–311. doi:10.1016/j.biortech.2018.02.024.

- [86] Z. Hu, S. Tian, L. Ruan, Y. Zheng, Repeated biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* with glycerol- and urea-feeding strategy in a bubble column bioreactor, *Bioresour. Technol.* 233 (2017) 144–149. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.096.
- [87] P.K. Dikshit, S.K. Padhi, V.S. Moholkar, Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone production, *Bioresour. Technol.* 244 (2017) 362–370. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.136.
- [88] P.K. Dikshit, V.S. Moholkar, Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 948–957. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.042.
- [89] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801–838. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- [90] M. Bilal, H.M.N. Iqbal, Chemical , physical , and biological coordination : An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization, *Coord. Chem. Rev.* 388 (2019) 1–23. doi:10.1016/j.ccr.2019.02.024.
- [91] S. Aldridge, Industry backs biocatalysis for greener manufacturing., *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 95–6. doi:10.1038/nbt0213-95.
- [92] R.A. Sheldon, S. Van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k.
- [93] L. Betancor, C. Berne, H.R. Luckarift, J.C. Spain, Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system., *Chem. Commun. (Camb).* (2006) 3640–3642. doi:10.1039/b604689d.
- [94] M.P. Thompson, S.R. Derrington, R.S. Heath, J.L. Porter, J. Mangas-Sanchez, P.N. Devine, et al., A generic platform for the immobilisation of engineered biocatalysts, *Tetrahedron.* 75 (2019) 327–334. doi:10.1016/J.TET.2018.12.004.
- [95] R. Mateo, Cesar, Palomo, Jose M., Fernandez-Lorente, Gloria, Guisan, Jose M., Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [96] R.A. Sheldon, Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289–1307. doi:10.1002/adsc.200700082.
- [97] W. Tischer, V. Kasche, Immobilized enzymes: crystals or carriers?, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 326–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407405> (accessed June 25, 2015).
- [98] L. Betancor, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, V. Rodríguez, M. Fuentes, et al., Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: Stabilization of D-amino acid oxidase, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 784–788. doi:10.1021/bp025761f.
- [99] C. Mateo, V. Grazu, J.M. Palomo, F. Lopez-Gallego, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1022–1033. doi:10.1038/nprot.2007.133.
- [100] J.C.S. dos Santos, N. Rueda, R. Torres, O. Barbosa, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to

- tune their catalytic properties, *Process Biochem.* 50 (2015) 918–927. doi:10.1016/j.procbio.2015.03.018.
- [101] H. Mallin, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor, *J. Biotechnol.* 191 (2014) 32–37. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.015.
- [102] K.C. Badgujar, B.M. Bhanage, Carbohydrate base co-polymers as an efficient immobilization matrix to enhance lipase activity for potential biocatalytic applications, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 709–717. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.036.
- [103] F.A.A. Manan, J. Abdullah, N.N. Nazri, I.N.A. Malik, N.A. Yusof, I. Ahmad, Immobilization of Tyrosinase in Nanocrystalline Cellulose/Chitosan Film for Amperometric Detection of Phenol, *Malaysian J. Anal. Sci.* 20 (2016) 978–985. doi:http://dx.doi.org/10.17576/mjas-2016-2005-02.
- [104] E. Jackson, M. Ferrari, C. Cuestas-Ayllon, R. Fernández-Pacheco, J. Perez-Carvajal, J.M. de la Fuente, et al., Protein-Templated Biomimetic Silica Nanoparticles., *Langmuir.* 31 (2015) 3687–95. doi:10.1021/la504978r.
- [105] L. Betancor, H.R. Luckarift, Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 566–572. doi:10.1016/j.tibtech.2008.06.009.
- [106] N.R. Haase, S. Shian, K.H. Sandhage, N. Kröger, Biocatalytic nanoscale coatings through biomimetic layer-by-layer mineralization, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 4243–4251. doi:10.1002/adfm.201101202.
- [107] L. Betancor, G.R. Johnson, H.R. Luckarift, Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts, *ChemCatChem.* 5 (2013) 46–60. doi:10.1002/cctc.201200611.
- [108] J. Chapman, A. Ismail, C. Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, *Catalysts.* 8 (2018) 238. doi:10.3390/catal8060238.
- [109] A.M. Girelli, E. Mattei, Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review, *J. Chromatogr. B.* 819 (2005) 3–16. doi:10.1016/j.jchromb.2005.01.031.
- [110] M. Filho, B.C. Pessela, C. Mateo, A. V. Carrascosa, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisán, Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers, *Process Biochem.* 43 (2008) 1142–1146. doi:10.1016/j.procbio.2008.05.016.
- [111] T. Brugnari, M.G. Pereira, G.A. Bubna, E.N. de Freitas, A.G. Contato, R.C.G. Corrêa, et al., A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A, *Sci. Total Environ.* 634 (2018) 1346–1351. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.051.
- [112] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Adv.* 4 (2014) 1583. doi:10.1039/c3ra45991h.
- [113] C. Mateo, O. Abian, G. Fernández-Lorente, B.C.C. Pessela, V. Grazu, J.M. Guisan, et al., Immobilization-Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups, in: 2006: pp. 47–55. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_4.

- [114] J.M. Bolivar, L. Wilson, S.A. Ferrarotti, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, C. Mateo, Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 540–546. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.05.009.
- [115] D. Marques, B.C. Pessela, L. Betancor, R. Monti, A. V Carrascosa, J. Rocha-Martin, et al., Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin., *Biotechnol. Prog.* 27 677–83. doi:10.1002/btpr.600.
- [116] J. Guisán, Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 375–382. doi:10.1016/0141-0229(88)90018-X.
- [117] C. Mateo, J.M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, et al., Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 274–280. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.014.
- [118] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [119] R.M. Blanco, J.J. Calvete, J. Guisán, Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 353–359. doi:10.1016/0141-0229(89)90019-7.
- [120] O.L. Tavano, R. Fernandez-Lafuente, A.J. Goulart, R. Monti, Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme, *Process Biochem.* 48 (2013) 1054–1058. doi:10.1016/j.procbio.2013.05.009.
- [121] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G.D.-O.C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, et al., Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 877–882. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.01.014.
- [122] J. Zheng, Y. Li, Y. Sun, Y. Yang, Y. Ding, Y. Lin, et al., A Generic Magnetic Microsphere Platform with “Clickable” Ligands for Purification and Immobilization of Targeted Proteins, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 7241–7250. doi:10.1021/acsami.5b00313.
- [123] E.-J. Woo, H.-S. Kwon, C.-H. Lee, Preparation of nano-magnetite impregnated mesocellular foam composite with a Cu ligand for His-tagged enzyme immobilization, *Chem. Eng. J.* 274 (2015) 1–8. doi:10.1016/J.CEJ.2015.03.123.
- [124] Q. Zhu, W. Zhuang, H. Niu, L. Ge, B. Villacorta Hernandez, J. Wu, et al., Affinity induced immobilization of adenylate cyclase from the crude cell lysate for ATP conversion, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 164 (2018) 155–164. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.01.033.
- [125] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties, *Biomacromolecules.* 14 (2013) 2433–2462. doi:10.1021/bm400762h.

- [126] C. Mateo, G. Fernández-Lorente, O. Abian, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage., *Biomacromolecules*. 1 (2000) 739–745. doi:10.1021/bm000071q.
- [127] C. Mateo, V. Grazu, J.M. Guisan, Immobilization of Enzymes on Monofunctional and Heterofunctional Epoxy-Activated Supports, in: 2013: pp. 43–57. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_4.
- [128] J.M. Guisan, *Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press, 2013.
- [129] C. Berne, L. Betancor, H.R. Luckarift, J.C. Spain, Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase., *Biomacromolecules*. 7 (2006) 2631–6. doi:10.1021/bm060166d.
- [130] L. Betancor, H. Luckarift, Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 27 (2010) 95–114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415894> (accessed June 25, 2015).
- [131] C. Lechner, C. Becker, C.C. Lechner, C.F.W. Becker, Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 5297–5333. doi:10.3390/md13085297.
- [132] P.A. Santacoloma, G. Sin, K. V. Gernaey, J.M. Woodley, Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis, *Org. Process Res. Dev.* 15 (2011) 203–212. doi:10.1021/op1002159.
- [133] H.K. Chenault, G.M. Whitesides, Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14 (1987) 147–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3304160> (accessed June 25, 2015).
- [134] F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, Enzyme-mediated oxidations for the chemist, *Green Chem.* 13 (2011) 226–265. doi:10.1039/C0GC00595A.
- [135] K.M. Koeller, C.H. Wong, Enzymes for chemical synthesis., *Nature*. 409 (2001) 232–240. doi:10.1038/35051706.
- [136] A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, New Trends in the Recycling of NAD(P)H for the Design of Sustainable Asymmetric Reductions Catalyzed by Dehydrogenases, *Curr. Org. Chem.* 14 (2010) 1000–1021. doi:10.2174/138527210791130514.
- [137] C. Gao, Z. Li, L. Zhang, C. Wang, K. Li, C. Ma, et al., An artificial enzymatic reaction cascade for a cell-free bio-system based on glycerol, *Green Chem.* 17 (2015) 804–807. doi:10.1039/C4GC01685H.
- [138] L. Schocke, C. Bra, ScienceDirect Thermoacidophilic Sulfolobus species as source for extremozymes and as novel archaeal platform organisms " sen and Bettina Siebers, (2019). doi:10.1016/j.copbio.2019.02.012.
- [139] S.A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C.C.R. Allen, T.S. Moody, et al., Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 349–367. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00437.
- [140] M.S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, Features and technical applications of ω -transaminases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 1163–1171. doi:10.1007/s00253-012-4103-3.

- [141] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 324–332. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.003.
- [142] A. Gomm, E. O'Reilly, Transaminases for chiral amine synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 43 (2018) 106–112. doi:10.1016/j.cbpa.2017.12.007.
- [143] S.M.A. De Wildeman, T. Sonke, H.E. Schoemaker, O. May, Biocatalytic reductions: from lab curiosity to “first choice”, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 1260–6. doi:10.1021/ar7001073.
- [144] R. Wichmann, D. Vasic-Racki, Cofactor regeneration at the lab scale., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 92 (2005) 225–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791939> (accessed June 24, 2015).
- [145] F. Hollmann, K. Hofstetter, A. Schmid, Non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin cofactors for monooxygenase catalysis., *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 163–71. doi:10.1016/j.tibtech.2006.02.003.
- [146] R.N. Patel, Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug., *Biomol. Eng.* 17 (2001) 167–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337276> (accessed June 25, 2015).
- [147] A.S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals—examples and perspectives, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5 (1998) 1–11. doi:10.1016/S1381-1177(98)00009-5.
- [148] B. Seisser, I. Lavandera, K. Faber, J.H.L. Spelberg, W. Kroutil, Stereo-Complementary Two-Step Cascades Using a Two-Enzyme System Leading to Enantiopure Epoxides, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1399–1404. doi:10.1002/adsc.200700027.
- [149] J. Rocha-Martín, B.D. Las Rivas, R. Muñoz, J.M. Guisán, F. López-Gallego, Rational co-immobilization of bi-enzyme cascades on porous supports and their applications in bio-redox reactions with insitu recycling of soluble cofactors, *ChemCatChem.* 4 (2012) 1279–1288. doi:10.1002/cctc.201200146.
- [150] R.E. Brown, K.L. Jarvis, K.J. Hyland, Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances, *Anal. Biochem.* 180 (1989) 136–139. doi:10.1016/0003-2697(89)90101-2.
- [151] E.E. Dosadina, E.E. Savelyeva, A.A. Belov, The effect of immobilization, drying and storage on the activity of proteinases immobilized on modified cellulose and chitosan, *Process Biochem.* 64 (2018) 213–220. doi:10.1016/j.procbio.2017.10.002.
- [152] C. Mateo, O. Abian, M. Bernedo, E. Cuenca, M. Fuentes, G. Fernandez-Lorente, et al., Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins, *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 456–462. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.03.020.
- [153] J.M. Carsten, A. Schmidt, V. Sieber, Characterization of recombinantly expressed dihydroxy-acid dehydratase from *Sulfobus solfataricus*—A key enzyme for the conversion of carbohydrates into chemicals, *J. Biotechnol.* 211 (2015) 31–41. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.384.
- [154] L.M. Guzman, D. Belin, M.J. Carson, J. Beckwith, Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter., *J. Bacteriol.* 177 (1995) 4121–4130. doi:10.1128/JB.177.14.4121-4130.1995.

- [155] P.C. Hanington, D.R. Barreda, M. Belosevic, A Novel Hematopoietic Granulin Induces Proliferation of Goldfish (*Carassius auratus* L.) Macrophages, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 9963–9970. doi:10.1074/jbc.M600631200.
- [156] C. Iglesias, P. Panizza, S. Rodriguez Giordano, Identification, expression and characterization of an R- ω -transaminase from *Capronia semiimmersa*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 5677–5687. doi:10.1007/s00253-017-8309-2.
- [157] A.I. Benítez-Mateos, M.L. Contente, S. Velasco-Lozano, F. Paradisi, F. López-Gallego, Self-Sufficient Flow-Biocatalysis by Coimmobilization of Pyridoxal 5'-Phosphate and ω -Transaminases onto Porous Carriers, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 13151–13159. doi:10.1021/acssuschemeng.8b02672.
- [158] W. Neto, M. Schürmann, L. Panella, A. Vogel, J.M. Woodley, Immobilisation of ω -transaminase for industrial application: Screening and characterisation of commercial ready to use enzyme carriers, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 117 (2015) 54–61. doi:10.1016/j.molcatb.2015.04.005.
- [159] H. Mallin, U. Menyes, T. Vorhaben, M. Hçhne, Immobilization of two (R) -Amine Transaminases on an Optimized Chitosan Support for the Enzymatic Synthesis of Optically Pure Amines, (2013) 588–593. doi:10.1002/cctc.201200420.
- [160] S.P. de Souza, I.I. Junior, G.M.A. Silva, L.S.M. Miranda, M.F. Santiago, F. Leung-Yuk Lam, et al., Cellulose as an efficient matrix for lipase and transaminase immobilization, *RSC Adv.* 6 (2016) 6665–6671. doi:10.1039/C5RA24976G.
- [161] M. Bajić, I. Plazl, R. Stloukal, P. Žnidaršič-Plazl, Development of a miniaturized packed bed reactor with ω -transaminase immobilized in LentiKats[®], *Process Biochem.* 52 (2017) 63–72. doi:10.1016/j.procbio.2016.09.021.
- [162] A. Abdul Halim, N. Szita, F. Baganz, Characterization and multi-step transketolase- ω -transaminase bioconversions in an immobilized enzyme microreactor (IEMR) with packed tube, *J. Biotechnol.* 168 (2013) 567–575. doi:10.1016/J.JBIOTECH.2013.09.001.
- [163] K. Engelmark Cassimjee, M. Kadow, Y. Wikmark, M. Svedendahl Humble, M.L. Rothstein, D.M. Rothstein, et al., A general protein purification and immobilization method on controlled porosity glass: biocatalytic applications, *Chem. Commun.* 50 (2014) 9134. doi:10.1039/C4CC02605E.
- [164] S. V Patwardhan, Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications., *Chem. Commun. (Camb).* 47 (2011) 7567–7582. doi:10.1039/c0cc05648k.
- [165] A. a Mendes, L. Freitas, A.K.F. de Carvalho, P.C. de Oliveira, H.F. de Castro, Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies., *Enzyme Res.* 2011 (2011) 967239. doi:10.4061/2011/967239.
- [166] F. López-Gallego, J.M. Guisán, L. Betancor, Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization, in: 2013: pp. 33–41. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_3.
- [167] F. Lopez-Gallego, L. Betancor, A. Hidalgo, G. Dellamora-Ortiz, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, et al., Stabilization of different alcohol oxidases via immobilization and post immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 278–284. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.021.
- [168] T. Jiang, C. Gao, P. Dou, C. Ma, J. Kong, P. Xu, Rationally re-designed mutation of NAD-independent L-lactate dehydrogenase: high optical resolution of racemic mandelic acid by the engineered *Escherichia coli*., *Microb. Cell Fact.* 11 (2012) 151. doi:10.1186/1475-

2859-11-151.

- [169] C. López, S.D. Ríos, J. López-Santín, G. Caminal, G. Álvaro, Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 414–421. doi:10.1016/j.bej.2010.02.004.
- [170] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 435–456. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.
- [171] N. Nesakumar, K. Thandavan, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, J.B.B. Rayappan, An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 90–96. doi:10.1016/j.jcis.2013.09.052.
- [172] Yusdy, S.R. Patel, M.G.S. Yap, D.I.C. Wang, Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds, *Biochem. Eng. J.* 48 (2009) 13–21. doi:10.1016/j.bej.2009.07.017.
- [173] K. Ramanathan, M. Kamalasanan, Immobilization and characterization of lactate dehydrogenase on TEOS derived Sol-Gel films, *J. Sol-Gel.* 316 (1997) 309–316. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1018329518938>.
- [174] V. Casimiri, C. Burstein, Co-immobilized L-lactate oxidase and L-lactate dehydrogenase on a film mounted on oxygen electrode for highly sensitive L-lactate determination, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 783–789. doi:10.1016/0956-5663(96)85929-X.
- [175] A. Chaubey, K.K. Pande, V.S. Singh, B.D. Malhotra, Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films, *Anal. Chim. Acta.* 407 (2000) 97–103. doi:10.1016/S0003-2670(99)00797-7.
- [176] L. Ma, J. Wen, W. Lu, Q. Caiyin, Y. Liang, Efficient immobilization of lactate dehydrogenase in biocomposites of double-walled carbon nanotube-doped alginate gel, *Enzyme Microb. Technol.* 42 (2008) 235–241. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.014.
- [177] Z.Q. Samra, S.N.A.Z. Mirza, N. Dar, Z. Mahmood, M.A. Athar, Characterization of Lactate Dehydrogenase Enzyme Immobilized to Magnetic Nanoparticles, *Pakistan J. Zool.* 38 (2006) 327–332.
- [178] M.C. Reed, A. Lieb, H.F. Nijhout, The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions, *BioEssays.* 32 (2010) 422–429. doi:10.1002/bies.200900167.
- [179] D. Poso, A.R. Clarke, S.G. Burston, A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions in a single-ring mutant of GroEL, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 969–977. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.010.
- [180] J.M. Bolivar, L. Wilson, S.A. Ferrarotti, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, C. Mateo, Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose, *J. Biotechnol.* 125 (2006) 85–94. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.01.028.
- [181] F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert, Multi-enzymatic synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 174–183. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.023.
- [182] S.P. France, L.J. Hepworth, N.J. Turner, S.L. Flitsch, Constructing Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways, *ACS Catal.* 7 (2017)

710–724. doi:10.1021/acscatal.6b02979.

- [183] A. Bruggink, R. Schoevaart, T. Kieboom, Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert, *Org. Process Res. Dev.* 7 (2003) 622–640. doi:10.1021/op0340311.
- [184] R. Xue, J.M. Woodley, Process technology for multi-enzymatic reaction systems, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 183–195. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.033.
- [185] E.T. Hwang, S. Lee, Multienzymatic Cascade Reactions via Enzyme Complex by Immobilization, *ACS Catal.* 9 (2019) 4402–4425. doi:10.1021/acscatal.8b04921.
- [186] L. Rios-Solis, P. Morris, C. Grant, A.O.O. Odeleye, H.C. Hailes, J.M. Ward, et al., Modelling and optimisation of the one-pot, multi-enzymatic synthesis of chiral amino-alcohols based on microscale kinetic parameter determination, *Chem. Eng. Sci.* 122 (2015) 360–372. doi:10.1016/j.ces.2014.09.046.
- [187] S.P. France, S. Hussain, A.M. Hill, L.J. Hepworth, R.M. Howard, K.R. Mulholland, et al., One-Pot Cascade Synthesis of Mono- and Disubstituted Piperidines and Pyrrolidines using Carboxylic Acid Reductase (CAR), ω -Transaminase (ω -TA), and Imine Reductase (IRE) Biocatalysts, *ACS Catal.* 6 (2016) 3753–3759. doi:10.1021/acscatal.6b00855.
- [188] E. Busto, N. Richter, B. Grischek, W. Kroutil, Biocontrolled Formal Inversion or Retention of L- α -Amino Acids to Enantiopure (R)- or (S)-Hydroxyacids, *Chem. - A Eur. J.* 20 (2014) 11225–11228. doi:10.1002/chem.201403195.
- [189] J.M. Bolivar, I. Eisl, B. Nidetzky, Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts, *Catal. Today.* 259 (2015) 66–80. doi:10.1016/j.cattod.2015.05.004.
- [190] C. Aburto, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, A. Illanes, Co-immobilized β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides, *Enzyme Microb. Technol.* 118 (2018) 102–108. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.08.003.
- [191] M.A. Kiss, É. Sefanovits-Bányai, Á. Tóth, L. Boross, Extractive Synthesis of Ethyl-Oleate Using Alginate Gel Co-Entrapped Yeast Cells and Lipase Enzyme, *Eng. Life Sci.* 4 (2004) 460–464. doi:10.1002/elsc.200420047.
- [192] Y. Li, Z. Wang, X. Xu, L. Jin, A Ca-alginate particle co-immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* cells and the combined cross-linked enzyme aggregates from *Trametes versicolor*, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 464–469. doi:10.1016/J.BIORTECH.2015.09.032.
- [193] C.S. Lee, M.K. Aroua, W.M.A.W. Daud, P. Cognet, Y. Pérès-Lucchese, P.-L. Fabre, et al., A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42 (2015) 963–972. doi:10.1016/J.RSER.2014.10.033.
- [194] R. Gallardo, M. Alves, L.R. Rodrigues, Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol, *Biomass and Bioenergy.* 71 (2014) 134–143. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2014.10.015.
- [195] M. Pl̃, V. Kras, A.C. Marr, K. Markõ, M. Rosenberg, M. Rebrõ, Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*, 134 (2018) 114–119. doi:10.1016/j.bej.2018.03.005.

- [196] K. He-, C. Wong, C. Huang, W. Chen, J. Chang, Converting crude glycerol to 1, 3-propandiol using resting and immobilized Biomass Acetate, *Biochem. Eng. J.* 58–59 (2011) 177–183. doi:10.1016/j.bej.2011.09.015.
- [197] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 413–423. doi:10.1007/s00253-009-2280-5.
- [198] B. Andreeßen, A. Steinbüchel, Serinol: small molecule - big impact, *AMB Express.* 1 (2011) 12. doi:10.1186/2191-0855-1-12.
- [199] I. Slabu, J.L. Galman, R.C. Lloyd, N.J. Turner, Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts, *ACS Catal.* 7 (2017) 8263–8284. doi:10.1021/acscatal.7b02686.
- [200] E. Jackson, F. López-Gallego, J.M. Guisan, L. Betancor, Enhanced stability of l-lactate dehydrogenase through immobilization engineering, *Process Biochem.* 51 (2016) 1248–1255. doi:10.1016/j.procbio.2016.06.001.
- [201] F. López-Gallego, E. Jackson, L. Betancor, Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells, *Chem. - A Eur. J.* (2017). doi:10.1002/chem.201703593.
- [202] E. Jackson, S. Correa, L. Betancor, Cellulose-Based Nanosupports for Enzyme Immobilization, in: 2019: pp. 1235–1253. doi:10.1007/978-3-319-77830-3_42.

Anexo

Curva estándar de BSA con método del ácido bicinónico

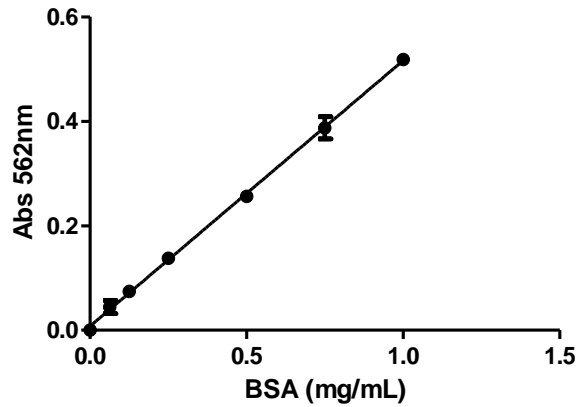


Figura A1: Curva estándar con BSA como proteína modelo. Absorbancia medida a 562 nm. Ec. Recta $y=0,5x+0,007$, R^2 0,99.

Análisis de estándares de glicerol, DHA, GA y piruvato por HPLC obtenidos mediante separación en columna Aminex® HPX-87C 300 x 7.8 mm.

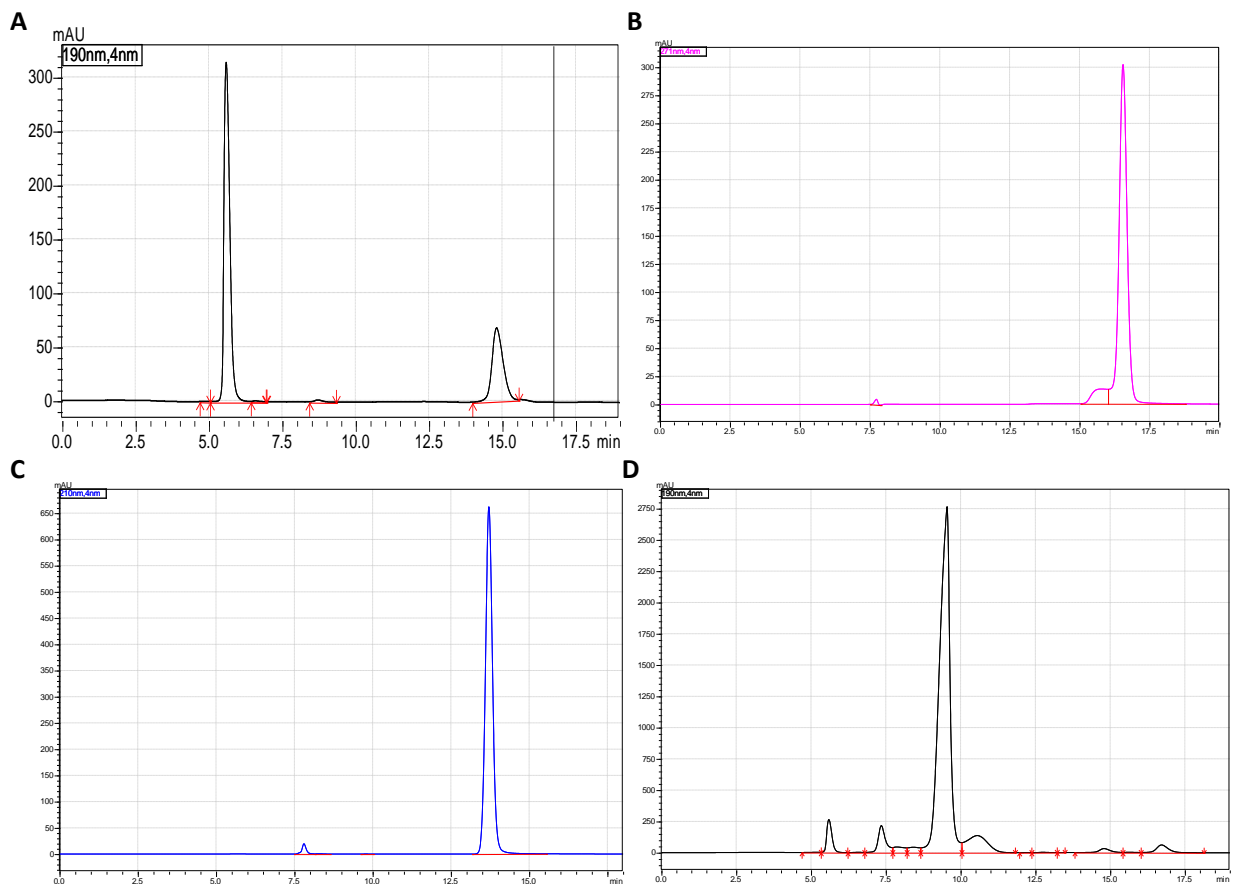


Figura A1: Cromatogramas para (A) glicerol a 190 nm, T_R 14,7 min, (B) DHA a 271 nm, T_R 16,7 min, (C) GA a 210 nm, T_R 13,6 min y (D) piruvato a 190 nm, T_R 9,1 min.

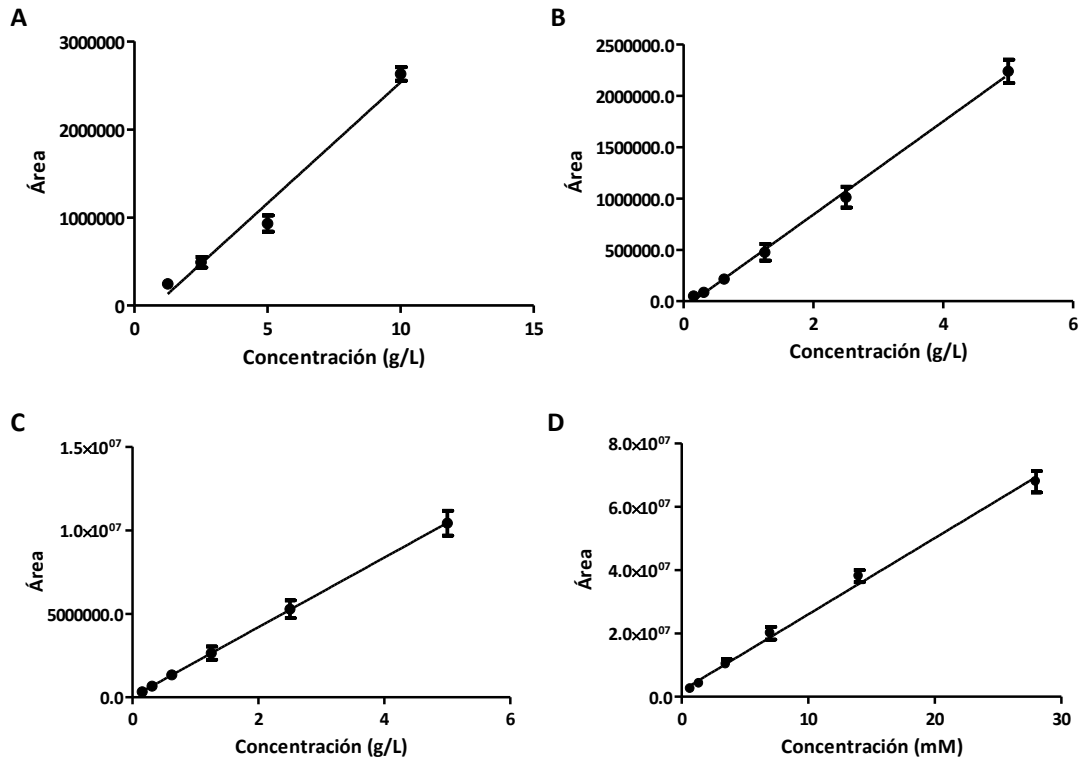


Figura A2: Curvas de calibración para (A) glicerol, Ec. Recta $y=274800x+212800$, R^2 0,98 (B) DHA, Ec. Recta $y=453700x+64690$, R^2 0,99 (C) GA, Ec. Recta $y=2084000x+30380$, R^2 1 y (D) piruvato, Ec. Recta $y=2407000x+1910000$, R^2 0,99.

Análisis de estándares de piruvato y ácido L-láctico por HPLC obtenidos mediante separación en columna Ultra RP C18 250 X 4,6 mm.

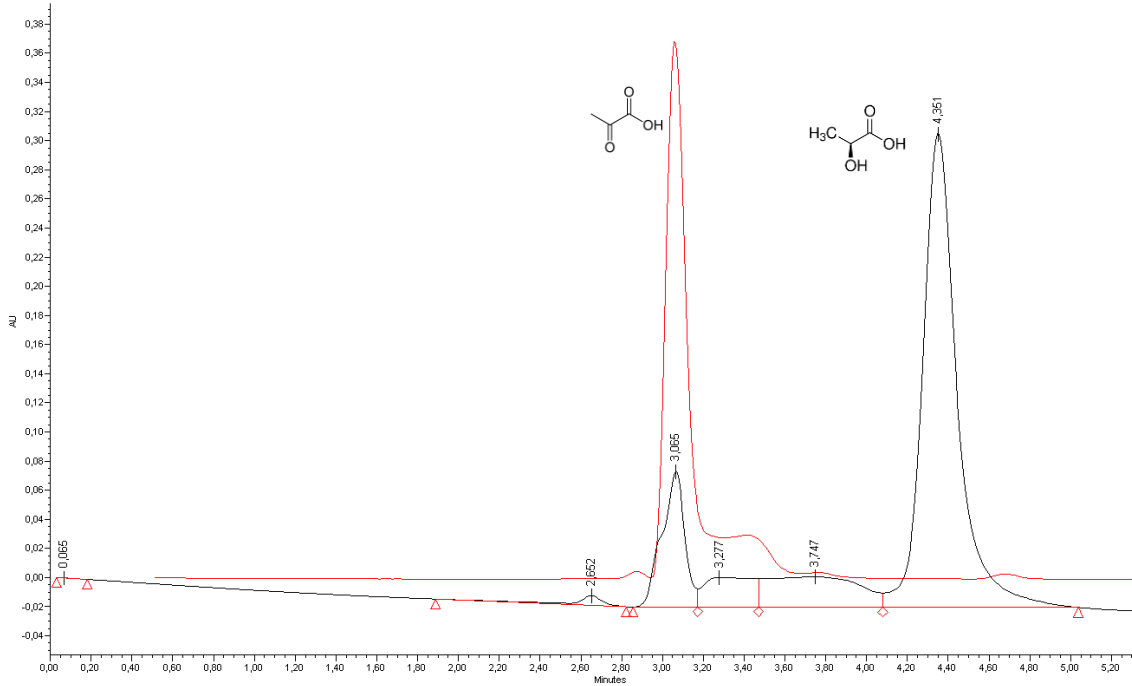


Figura A3: Cromatogramas para piruvato a 190 nm, T_R 3,06 min (em rojo), lactato a 190 nm, T_R 4,35 min (em negro).

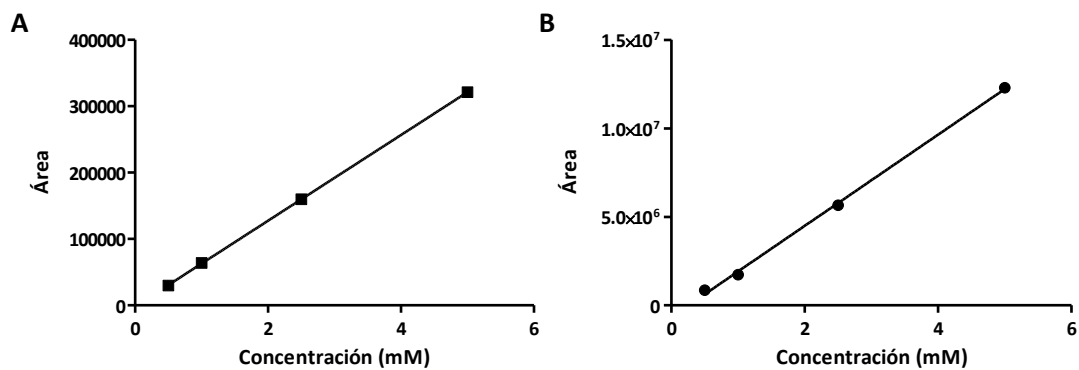


Figura A4: Curvas de calibración para (A) glicerol, (B) DHA, (C) GA y (D) piruvato.

Producción

A continuación se adjunta la producción elaborada en el marco de esta tesis.

Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells

Erienne Jackson^a, Magdalena Ripoll^a, Lorena Betancor^{a,*}

^a*Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, Montevideo, Uruguay*

***Correspondence**

Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237,

Montevideo, Uruguay

Tel: +59829021505 ext 7002

E-mail: betancor@ort.edu.uy

Abstract

In the present work, glycerol biotransformation using *Gluconobacter* strains was studied with a process intensification perspective that facilitated the development of a cleaner and more efficient technology from those previously reported. Starting from the industrial byproduct, crude glycerol, resting cells of *G. frateurii* and *G. oxydans* were able to convert glycerol under batch reactor conditions in water with no other additive but for the substrate. The study of strains, biomass:solution ratio, pH, growth stage, and simplification of media composition in crude glycerol bioconversions facilitated productivities of glyceric acid of 0.03 g/L.h and 2.07 g/L.h (71.5 g/g % pure by NMR) of dihydroxyacetone (DHA). Productivities surmounted recent reported fermentative bioconversions of crude glycerol and were unprecedented for the use of cell suspended solely in water. This work proposes a novel approach that allows higher productivities, cleaner production, reduction in water and energy consumption, and demonstrates the applicability of the proposed approach.

Keywords: Glycerol; *Gluconobacter*; glyceric acid; dihydroxyacetone; biotransformation

1. Introduction

Glycerol is a side product of fat and oil transesterification with alcohols in the production of biodiesel. This feedstock byproduct contains varying amounts of contaminants such as salts, ashes, methanol, and fats with low levels of purity (60–80%) that compromise its market value (Ayoub and Abdullah, 2012; Yang *et al.*, 2012). The current glycerol production will exceed the demand in 2020 in more than 400% (Ayoub and Abdullah, 2012). Therefore, new processes able to convert glycerol into novel value-added products need to be developed to sustain the viability of the biofuels economy (Ayoub and Abdullah, 2012; Yang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2018). In this context, glycerol has been converted into high value-added products by both homogeneous and heterogeneous catalysis or through more sustainable methods using biocatalysts (Habe, Fukuoka, Kitamoto, *et al.*, 2009a; Khanna *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2018). The vast majority of biocatalytic processes involve the microbial transformation of glycerol under growing conditions using culture media in the reaction mixture (Andreeßen and Steinbüchel, 2012; Szymanowska-Powalowska and Białas, 2014; Yang *et al.*, 2018). Therefore, products are generated in complex media that complicates the downstream purification of the target chemical and therefore augment the economic demands of the biotransformation. In contrast, the use of non-growing resuspended cells or resting cells could provide a number of operational advantages such as facilitating product separation (Julsing *et al.*, 2012) or avoid secondary reactions and undesired growth metabolites that could contaminate the system. However, for applied purposes the use of resting cells should counterbalance the loss in productivities that are often observed when compared with growing cells conversions. Therefore, the design of new strategies for the microbiological conversion of glycerol that address these limitations, is not only appropriate but also necessary, and is of fundamental and applied value.

The oxidative metabolism of glycerol generates glyceric acid (GA) and dihydroxyacetone (DHA) in *Gluconobacter* and *Acetobacter* species (Habe, Fukuoka, Kitamoto, *et al.*, 2009a; Khanna *et al.*, 2012). Particularly *Gluconobacter* catalyzes the oxidation of sugars and sugar alcohols, being large producers of both DHA and GA. DHA, is a marketable chemical worth more than 250-fold that of crude glycerol produced around the globe *via* biotechnological processes and broadly used as a precursor for the synthesis of fine chemicals in the chemical and pharmaceutical industry, and in cosmetic industry as an active component in sunless tanning products (Yang *et al.*, 2012; Dikshit and Moholkar, 2016; Ciriminna *et al.*, 2018). The alternate oxidation product of glycerol, GA, has potential as a building block for many chemicals and although it has a lesser demand in the industrial market, its market value is more than 1000 times that of the DHA (Habe, Shimada, Fukuoka, *et al.*, 2009). Traditionally obtained by metal catalytic oxidation of glycerol, its biocatalytic production has recently emerged and literature is still piling up on process improvements that provide economic advantages of the biotechnological over the chemical production process.

In this work, the biological transformation of glycerol to GA and DHA was studied using *Gluconobacter frateurii* NBRC13465 (*G. frateurii*) and *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 (*G. oxydans*). Our work demonstrates that active non-growing cells suspended solely in water were able to catalyze the transformation of glycerol to target compounds with unprecedented productivities under the studied conditions.

2. Results and Discussion

2.1. Conditions for pure glycerol conversions using resting cells

Bacterial metabolism changes throughout the different growth stages and therefore, the stage at which cells are collected during growth for resting cell bioconversions might affect the rate of substrate transformation. As primary metabolites involved in glycolysis,

DHA and GA production were likely to increase during the exponential phase (De Vuyst *et al.*, 1996). However, *Gluconobacter* differentiated cells in the stationary phase have been reported to produce twice as much DHA than undifferentiated exponential phase cells in bioconversions (Khanna *et al.*, 2012). The temperature selected for all assays was 30°C, as previously reported for the growth of species of the genus *Gluconobacter* (Deppenmeier *et al.*, 2003; Habe, Fukuoka, Kitamoto, *et al.*, 2009b; Habe, Shimada, Yakushi, *et al.*, 2009; Black and Nair, 2013). The reaction was supplemented with KH_2PO_4 , K_2HPO_4 and MgSO_4 as it has been described that these salts have a significant impact in the amount of DHA formed in fermentative conversions of *G. frateurii* (Poljungreed and Boonyarattanakalin, 2017). After a period of 20 h, results showed that higher conversions of glycerol were obtained when resting cells from both strains were collected during the mid-exponential phase (Fig. 1 A and B). Under these conditions, conversion by *G. frateurii* was $1.7 \pm 0.1\%$ to GA and $18.3 \pm 0.9\%$ to DHA, resulting in a total conversion of $20.0 \pm 0.1\%$ of glycerol, and *G. oxydans* showed a conversion of $36.8 \pm 3.9\%$ of DHA with no production of GA (Fig. 1 A and B). Reaction kinetics under these conditions (Fig. 1 C and D) showed *G. frateurii* reached $52.2 \pm 2.7\%$ conversion of glycerol after 50 h ($47.35 \pm 0.7\%$ for DHA and $4.1 \pm 0.1\%$ for GA). In the case of *G. oxydans*, a conversion of $46.6 \pm 14.9\%$ to DHA free of GA was achieved after the same time period. The lower glycerol conversion shown by *G. oxydans* could be attributed to inhibition by DHA as it has been reported that high concentrations of this product inhibit the pentose phosphate pathway as well as the enzyme glycerol dehydrogenase, causing cell damage (Khanna *et al.*, 2012).

Overall, the results obtained for pure glycerol conversions with resting cells correlate with those of Khanna *et al.*, 2012 and Sato *et al.*, 2015 that differently from this work, used growing cells for pure glycerol transformation. Therefore, under the studied conditions

the bacterial behavior in the transformation did not change in the absence of nutrients and additives.

[Fig. 1]

pH is an important parameter to take into account in biotransformations as it directly affects the activity of the enzymes and consequently the microbial growth and metabolism (Shuler and Fikret, 2002). Therefore, the impact of the initial pH of the reaction medium was investigated using resting cells of *G. frateurii* and *G. oxydans* collected in the mid-exponential phase (Figure S1). Variations in the initial pH proved to have an impact in the production of DHA and GA by *G. frateurii*. The production of DHA and GA increased with initial pH, reaching a maximum of almost 50% conversion at 50 h at pH 8.0. For *G. oxydans*, however, it was observed that at an initial pH 6.0 led to a higher conversion of DHA $46.6 \pm 7.4\%$ after 50 h of reaction with no significant production of GA. pHs of maximum conversions for both strains were selected for further experiments.

A ten-fold increase in the inoculum had a significant impact in the glycerol conversion for both *Gluconobacter* strains. After 50 h, the production of GA by resting cells of *G. frateurii* increased from $4.1 \pm 0.2\%$ to $9.1 \pm 0.1\%$. However, the production of DHA decreased slightly from $44.7 \pm 4.1\%$ to $38.1 \pm 2.2\%$. For *G. oxydans*, the increase in the production of DHA was significant, as a 100% conversion to this product was achieved after 50 h.

As previously described, initial glycerol concentration in the reaction media affects the production of DHA and GA (Habe, Shimada, Yakushi, *et al.*, 2009; Habe *et al.*, 2010; Black and Nair, 2013). To test a possible substrate/product inhibition effect, several initial concentrations of pure glycerol were evaluated (Fig. 2). For *G. frateurii*, a change in the ratio of products associated with increasing initial concentrations of glycerol was

observed. The substrate or product concentrations may affect the rate of conversion of the enzymes involved in the biotransformation. GA production improved significantly at higher initial concentrations of glycerol, while DHA production decreased (Fig. 2A).

The increase in glycerol concentration caused a reduction in the conversion for both strains. Considering the latter, for subsequent experiments the initial glycerol concentration selected was the highest with which it was possible to achieve a 100% conversion. Quantitative conversion of glycerol to products after 45 h was achieved starting from 25 g/L and 50 g/L for *G. frateurii* and *G. oxydans*, respectively (Fig 2).

[Fig. 2]

2.2. Crude glycerol conversion using resting cells

Conversion kinetics were studied in the selected conditions, using crude glycerol as substrate (Fig. 3). A lower conversion to DHA and GA was found for *G. frateurii* using crude glycerol when compared to pure glycerol after 45 h of reaction. Another notorious difference in production was the lower GA to DHA ratio produced using crude glycerol as a substrate. This low GA productivity may be associated to the presence of methanol from crude glycerol which has an inhibitory effect on the enzyme mADH, responsible for the production of GA in *Gluconobacter* (Fig. 3A). This result correlates with Sato et al. that reported a decrease in the productivity of GA in the presence of methanol by the same strain of *G. frateurii* used in this study, and improved it by removal of the alcohol from the reaction medium (Habe, Shimada, Fukuoka, *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2013).

Interestingly, for *G. oxydans*, the conversion after 45 h was similar for both types of glycerol (Fig. 3B). This indicates that, unlike *G. frateurii*, *G. oxydans* maintains its ability to convert glycerol independently of the crude glycerol contaminants present.

[Fig. 3]

Samples of the biotransformations were analyzed by ^1H NMR spectroscopy in order to confirm and identify the major components in the starting reaction and the final components of the reaction after 24 h (Figure S2). The analysis of ^1H -1D spectrum of the starting reaction media shows two major components, glycerol and methanol, together with minor amounts of fatty acids. This result confirms the usual components in crude glycerol obtained as a byproduct of the biodiesel industry.

The analysis of 1H-1D spectrum of the final reaction points (24h) of samples from *G. frateurii* and *G. oxydans* conversions allowed the identification of signals corresponding to DHA (71.5%), glycerol (18.8%), acetate (2.6%) and methanol (7.1%), in the case of *G. oxydans* and an additional signal of GA in reactions with *G. frateurii* (DHA 71.0%, glycerol 13.0%, MeOH 5.4%, acetate 2.1%, glyceric acid 8.4%). No phosphate was identified confirming that glycerol is not being used by the cells as a metabolic precursor at least in identifiable quantities. The ^1H NMR spectroscopy results support those obtained by HPLC analysis where no GA was observed for the *G. oxydans* biotransformations. They also confirm the absence of any other conversion product or metabolite in significant concentrations, highlighting the benefits of using resting cells to produce media contaminant free compounds in biotransformations.

2.3 Process intensification for conversion of crude glycerol

The potential reuse of resting cells was evaluated in the conversion of 50 g/L of crude glycerol. *G. frateurii* maintained its capacity to convert glycerol to DHA after 5 uses. However, productivities decreased gradually throughout the experiment reaching 11.7 % conversions after the fifth use (Fig. 4). DHA production by reused resting cells of *G. oxydans* could not be achieved since the capacity to convert glycerol was completely lost after the first use (Fig. 4). The differences in resistance to repeated batch conversions of

the strains might be explained better by the ability of the metabolic machinery to withstand cell death or enzyme inactivation, or support cofactor regeneration.

[Figure 4]

We have also studied the possibility of using the cells in a fed-batch process. A slight increase in the amount of DHA produced was obtained for both *G. frateurii* and *G. oxydans* after the first addition of substrate (24 h) which were 25 g/L for *G. frateurii* and 50 g/L in for *G. oxydans* (Fig. 5). Successive additions of the substrate did not translate into accompanying product formation. In the case of *G. frateurii*, product inhibition could be the main cause of this behavior as observed before for growing cells transformation of glycerol (Dikshit et al., 2018). This hypothesis was also supported by results obtained in glycerol conversions initiated with DHA in the reaction media (Figure S3). Product formation in the presence of DHA was significantly decreased for *G. frateurii* strain. For *G. oxydans*, DHA increased from 38.1 ± 0.1 g/L to 52.7 ± 4.2 g/L after the third glycerol spike (Fig. 5B). This strain seems to be less sensitive to product inhibition than *G. frateurii* when in suspension.

[Fig. 5]

These results indicate that glycerol conversion with *Gluconobacter* strains could benefit from strategies that include flow through configurations to continuously remove the produced DHA minimizing inhibition.

Further strategies were studied to increase product formation while improving or maintaining the costs of the process. The approach involved the permeabilization of bacterial membrane. The biochemical pathway of DHA synthesis is mediated by a FAD and Pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound glycerol dehydrogenase enzyme (GDH) that incompletely oxidizes glycerol to DHA and in turn

accumulates it outside the cell. However, the active site of the GDH has been described to be oriented towards the periplasm (Khanna *et al.*, 2012) and therefore, permeabilization strategies might facilitate glycerol and DHA transport to and from the bacterial periplasm. Resting cells of *G. frateurii* and *G. oxydans* were treated with EDTA and PEI, both well-known gram-negative outer membrane permeabilizers (Cánovas *et al.*, 2005). EDTA is a chelating agent that removes divalent cations interacting with lipopolysaccharides (LPS) present in the outer membrane, while the polycationic nature of the polymer PEI provokes an interaction with said LPS and causes a disruption of the outer membrane structure (Vaara, 1992; Helander *et al.*, 1997). No differences were observed for treated and non-treated cells nor in rates or final productivities in the bioconversions which might imply a poorly restricted transport of both glycerol and DHA through the outer bacterial membrane of both strains.

Given the promising results obtained for the transformation of glycerol to DHA using resting *G. oxydans* cells, further investigations were centered on process intensification on this strain.

A series of transformations were carried out in which we simplified the composition of the reaction media. Neither the KH_2PO_4 or K_2HPO_4 , nor the MgSO_4 proved necessary for the conversion as even when crude glycerol was offered in water to the cells, the amount of product obtained after 20 h did not vary (Figure S4). This is the first report on a resting cell transformation of glycerol to DHA performed solely in water.

In order to expand the implementation prospect of this bioconversion at large scale, the conversion was studied using regular water and a reduced amount of water without varying the total amount of substrate in the reaction. Results demonstrate that there is no need for the use of distilled water in the reaction and that a 50% decrease in the total reaction volume did not affect the productivity of the conversion (Fig. 6). These results

are of paramount importance in the light of a possible industrial application of this transformation.

[Figure 6]

This work is the first report of *G. frateurii* transformation of pure and crude glycerol in media-free conditions using resting cells. The results for GA production showed herein reached lower levels of productivities than others reported in the literature (Habe *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2014). However, DHA was comparatively produced in a less complex media which would facilitate its further processing (Poljungreed and Boonyarattanakalin, 2018; Tanamool *et al.*, 2018).

Apart from a sole report from Hu et al (Hu *et al.*, 2011) where pure glycerol is biotransformed by *G. oxydans* ZJB09113, reports on the use of resting cells of *G. oxydans* starting from crude glycerol has not yet been explored. In the aforementioned work, a productivity of 2.16 g/L.h was achieved for DHA using pure glycerol in a fed batch airlift reactor. Herein, the productivity reached 1.91 g/L.h for pure glycerol and 2.07 g/L.h for the unprecedented conversion of crude glycerol with resting cells of *G. oxydans* in water. Moreover, an additional advantage of the conversions described in this work lays in the amount of biocatalyst used in the reactions as it was 15 times less than that used by Hu et al (0.67 g/L in this work compared to 10 g/L).

Maximum conversions for glycerol to DHA have been reported by Zhou et al in 2016 reaching productivities of 9.41 g/L.h using *G. oxydans* NL71 but again, using pure glycerol and under growing conditions (Zhou *et al.*, 2016). Future investigations will focus on the use of alternate reactor configurations that may benefit the yields as in (Habe, Shimada, Yakushi, *et al.*, 2009) or (Sato *et al.*, 2013).

In conclusion, efficient conversions of glycerol, both pure and crude, to DHA and GA were demonstrated using resting cells of species of the genus *Gluconobacter* carried out in simple media. Significant results were specially obtained when using biodiesel-derived crude glycerol. Simplification of the reaction media and reduction of the total reaction volumen, paves the way to an efficient implementation of glycerol transformation which as any other bioprocess is often limited by the productivity of the conversion and costs of downstream processing. These results demonstrate the feasibility of using media-free biotransformation for a green, cleaner, and more economical revalorization of industrial glycerol.

3. Experimental Procedures

3.1. Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. Crude glycerol, product of the splitting process (water < 12%, ashes < 7%, glycerol 70-80%, lipids < 1%, methanol < 5%, chlorides < 3%) was donated by Alcoholes del Uruguay (ALUR).

3.2. Growth curve analysis

Freeze-dried strains of *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 and *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 were obtained from the National Institute of Technology and Evaluation (NITE) (Tokyo, Japan). 1 L flasks containing 250 mL of glycerol medium (glycerol 100 g/L, peptone 9 g/L, yeast extract 1 g/L, KH₂PO₄ 0.9 g/L, K₂HPO₄ 0.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6.0) were inoculated with 250 µL of *G. frateurii* NBRC 103465 pre-culture (OD_{600 nm} value of 3) or with 2.5 mL of *G. oxydans* NBRC 14819 pre-culture (OD_{600 nm} value of 0.6) and incubated for 76 h at 30°C and 180 rpm. OD_{600 nm} was measured periodically and a correlation with dry cell weight (g/L) was established by

constructing a graphic model ($OD_{600\text{ nm}}$ vs dry cell weight). The protocol for dry cell weight measurements was adapted from Black and Nair (Black and Nair, 2013).

3.3. Inoculum preparation for glycerol conversion

250 mL cultures were incubated at 30°C and 180 rpm. The volume needed to obtain a required amount of dry weight of cells was then centrifuged for 15 minutes at 5,000 rpm. The bacterial pellet was washed with 30 mM phosphate buffer (NaH_2PO_4 4.14 g/L, K_2HPO_4 5.23 g/L, pH 7.0) to remove the growth medium and was centrifuged at 5,000 rpm for 15 minutes, discarding the supernatant.

3.4. Glycerol conversion to GA and DHA

All conversions of glycerol by resting cells were carried out in 30 mL volume of reaction medium supplemented with pure or crude glycerol (glycerol 25-170 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 3–8). Additional experiments were conducted solely in water with no other supplement but for the substrate glycerol. The inoculum for each reaction was 2 mg or 20 mg of dry cell weight. Conversion kinetics was elucidated by taking samples at different time points during the reaction and analyzing them by HPLC.

3.4.1. Conversions using resting cells from different growth stages

Cells were collected and washed as previously described when the cultures' $OD_{600\text{ nm}}$ values reached 0.4, 1.0, 2.5 and 3.0 for early exponential, mid-exponential, late exponential, and stationary phase, respectively. The reactions were carried out for 20 h in duplicates, with 2 mg of dry cell weight and starting 50 g/L of glycerol.

3.4.2. Effect of initial pH in the conversion

Different initial pH values for the reaction media were evaluated (3.0, 4.0, 6.0, 7.0 and 8.0). Each reaction was inoculated with 2 mg of dry cell weight, obtained from a culture

with an OD_{600 nm} value of 1. The reactions were carried out for 50 h in duplicates, starting from 50 g/L of glycerol.

3.4.3. Reuse of resting cells in the conversion of crude glycerol

Resting cells were reused up to 5 times after 20 h of reaction. Cells were harvested by centrifugation and washed with 30 mM phosphate buffer before each use.

3.5. HPLC analysis

Each sample was centrifuged at 15,000 rpm for 15 minutes to remove the bacterial pellet. The supernatant was dissolved 5 times in mQ water and filtered with a 0.22 µm polyvinylpyrrolidone (PVP) treated filter for HPLC analysis. Samples were analyzed using a Shimadzu Nexera X2 HPLC (Kyoto, Japan), with a diode array detector. An Aminex[®] HPX-87C 300 x 7.8 mm from Bio Rad (California, USA) was used with a 4 x 3.0 mm Carbo-H cartridge precolumn from Phenomenex (California, USA). 5 mM sulfuric acid was used as the mobile phase. Detection was carried out at 70°C following 210 nm for GA, 271 nm for DHA and 190 nm for glycerol with a flow rate of 0.6 ml/min for 20 minutes. Injection volume was 20 µl. Calibration curves were constructed for GA, DHA and glycerol with solutions of 0.15, 0.30, 0.60, 1.25, 2.50, 5.00 and 10.00 g/L. Samples were analyzed using Shimadzu's LabSolutions software.

3.6. NMR analysis

NMR data was acquired in a Bruker Avance Neo operating at a 1 H frequency of 400.13 MHz, using a spectral window of 6.25 KHz, a 90° pulse width of 14µs, acquisition time of 3 seconds and a relaxation delay of 2 seconds. Water suppression was accomplished through pre-saturation during the relaxation delay. Typically, 16 scans were acquired for each sample. Raw FID data was processed using software package TopSpin 4.0.2 using

an exponential window of 0.3 Hz and 65536 points. Samples were prepared by dissolving 50 μL of sample into 540 μL of D_2O and were transferred to a 5 mm NMR tube.

5. Acknowledgements

EJ and MR would like to thank PEDECIBA Química and the National Research and Innovation Agency (ANII) from Uruguay. This work was supported by ANII [FSE 1_2016_132115]. EJ, MR and LB declare they do not have conflict of interest.

6. References

- Andreeßen, B. and Steinbüchel, A. (2012) Biotechnological conversion of glycerol to 2-amino-1,3-propanediol (serinol) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 357–365.
- Ayoub, M. and Abdullah, A.Z. (2012) Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renew Sustain Energy Rev* **16**: 2671–2686.
- Black, C.S. and Nair, G.R. (2013) Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconacetobacter Xylinus* Cells. *Int J Chem Eng Appl* **4**: 310–314.
- Cánovas, M., Torroglosa, T., and Iborra, J.L. (2005) Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzyme Microb Technol* **37**: 300–308.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L.M., and Pagliaro, M. (2018) Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct. *ChemistryOpen* **7**: 233–236.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., and Prust, C. (2003) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 233–242.
- Dikshit, P.K., Kharmawlong, G.J., and Moholkar, V.S. (2018) Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour Technol* **256**: 302–311.
- Dikshit, P.K. and Moholkar, V.S. (2016) Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. *Bioresour Technol* **216**: 1058–1065.

- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., and Sakaki, K. (2009a) Biotechnological production of d-glyceric acid and its application. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 445–452.
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., and Sakaki, K. (2009b) Biotransformation of glycerol to d-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 1033–1039.
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., et al. (2009) Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 1799–1805.
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., et al. (2010) Use of a *Gluconobacter frateurii* mutant to prevent dihydroxyacetone accumulation during glyceric acid production from glycerol. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 2330–2.
- Habe, H., Shimada, Y., Yakushi, T., Hattori, H., Ano, Y., Fukuoka, T., et al. (2009) Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7760–7766.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., and Koski, P. (1997) Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology* **143**: 3193–3199.
- Hu, Z.C., Zheng, Y.G., and Shen, Y.C. (2011) Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresour Technol* **102**: 7177–7182.
- Julsing, M.K., Kuhn, D., Schmid, A., and Bühler, B. (2012) Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product

- inhibition. *Biotechnol Bioeng* **109**: 1109–1119.
- Khanna, S., Goyal, A., and Moholkar, V.S. (2012) Microbial conversion of glycerol: Present status and future prospects. *Crit Rev Biotechnol* **32**: 235–262.
- Poljungreed, I. and Boonyarattanakalin, S. (2017) Dihydroxyacetone production by *Gluconobacter frateurii* in a minimum medium using fed-batch fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*.
- Poljungreed, I. and Boonyarattanakalin, S. (2018) Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only. *Lett Appl Microbiol* **67**: 39–46.
- Sato, S., Kitamoto, D., and Habe, H. (2014) Chemical mutagenesis of *Gluconobacter frateurii* to construct methanol-resistant mutants showing glyceric acid production from methanol-containing glycerol. *J Biosci Bioeng* **117**: 197–199.
- Sato, S., Morita, N., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., and Habe, H. (2013) Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. *AMB Express* **3**: 20.
- Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kitamoto, D., and Habe, H. (2015) Microbial resolution of dl-glyceric acid for l-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains. *J Biosci Bioeng* **119**: 554–557.
- Shuler, M.L. and Fikret, K. (2002) *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, 2nd ed. Guerrieri, P. (ed) New Jersey: Prentice Hall.
- Szymanowska-Powalowska, D. and Bialas, W. (2014) Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol. *BMC Microbiol* **14**: 1–10.

- Tanamool, V., Hongsachart, P., and Soemphol, W. (2018) Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by a potential acetic acid bacteria. *Sains Malaysiana* **47**: 481–488.
- Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**: 395–411.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., and Crabbé, K. (1996) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **142**: 817–827.
- Yang, B., Liang, S., Liu, H., Liu, J., Cui, Z., and Wen, J. (2018) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. *Bioresour Technol* **267**: 599–607.
- Yang, F., Hanna, M. a, and Sun, R. (2012) Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels* **5**: 13.
- Zhou, J.J., Shen, J.T., Wang, X.L., Sun, Y.Q., and Xiu, Z.L. (2018) Stability and oscillatory behavior of microbial consortium in continuous conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 8291–8305.
- Zhou, Xin, Zhou, Xuelian, Xu, Y., and Yu, S. (2016) Improving the production yield and productivity of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol fermentation using *Gluconobacter oxydans* NL71 in a compressed oxygen supply-sealed and stirred tank reactor (COS-SSTR). *Bioprocess Biosyst Eng* **39**: 1315–1318.

7. Figure legends

Fig. 1. Pure glycerol bioconversion with *Gluconobacter* strains. GA (◻) and DHA (◼) production after 20 h by resting cells of *G. frateurii* (A) and *G. oxydans* (B) collected during different growth stages. Kinetics of DHA and GA production from pure glycerol with resting cells of *G. frateurii* (C) and *G. oxydans* (D). DHA (●), GA (■), pH (▲). Reactions were performed in 30 mL total volume at 30°C using 2 mg dry cell weight and 50 g/L initial glycerol concentration. Further conditions are described in Methods.

Fig. 2. DHA and GA production after 45 h starting from different glycerol concentrations. *G. frateurii* (A), *G. oxydans* (B). % Conversion (dotted line), DHA (◼), GA (◻). Reactions were performed in 30 mL total volume at 30°C using 20 mg dry cell weight. Further conditions are described in Methods.

Fig.3. DHA and GA production after 45 h starting from crude and pure glycerol. A (*G. frateurii*), B (*G. oxydans*). Products from pure glycerol (full line), products from crude glycerol (dotted line). DHA (●), GA (■), glycerol (▲).

Fig. 4. Reuses of resting cells of *G. frateurii* (A) and *G. oxydans* (B) in the conversion of crude glycerol to DHA and GA. DHA (◼), GA (◻). Reactions were performed in 30 mL total volume at 30°C using 20 mg dry cell weight. Each use cycle was after 20 h. Further conditions are described in Methods.

Fig. 5. Fed-batch conversion of crude glycerol using resting cells of *G. frateurii* (A) and *G. oxydans* (B). DHA (full line), Glycerol (dashed line), Glycerol applications (arrows) were 25 g/L in (A) and 50 g/L in (B).

Fig. 6. DHA production intensification using *G. oxydans* as a catalyst. 1) Starting conditions (glycerol 50 g/L, KH₂PO₄ 0.9 g/L, K₂HPO₄ 0.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH

8 in distilled water, 2 mg of dry cell weight), 2) 10-fold inoculum increase (20 mg of dry cell weight) conditions as in 1, 3) Reaction media without salts, 4) Use of regular water as reaction media, 5) Decrease in final total volume (20 mg of dry cell weight, 100 g/L glycerol in 15 mL regular water). All the reactions were performed at 30°C.

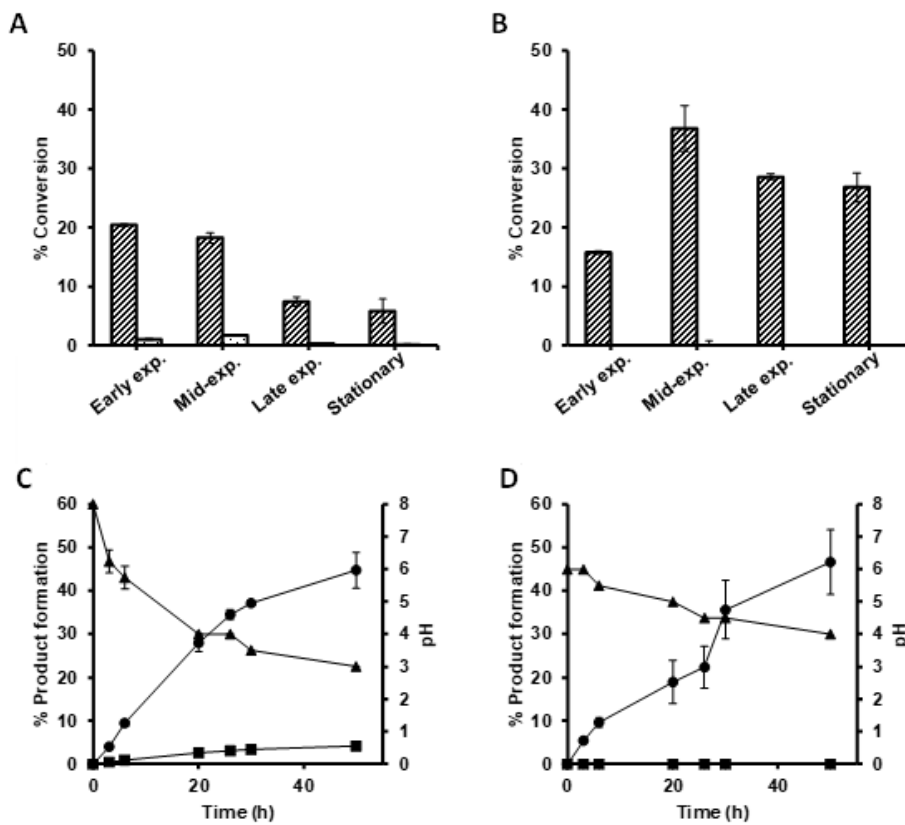


Figure 1

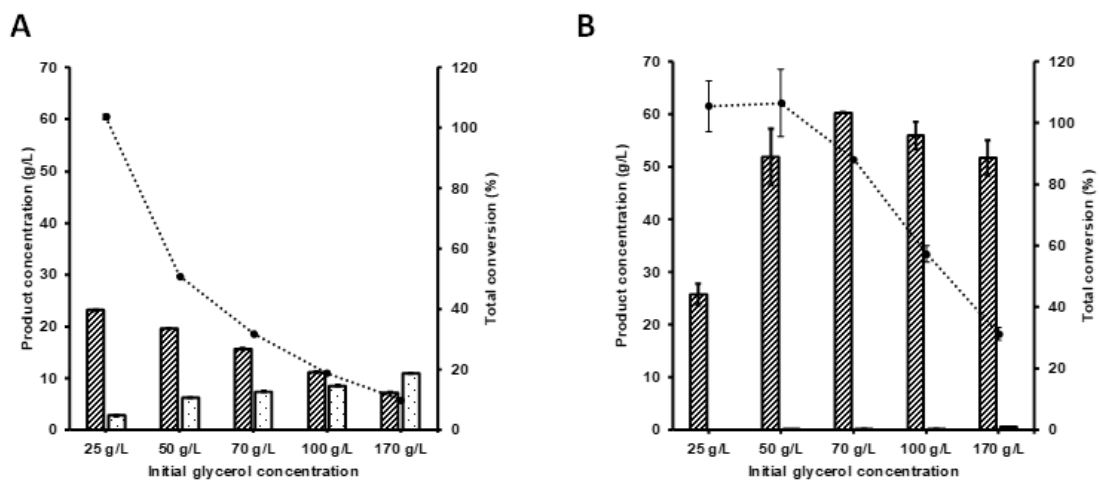
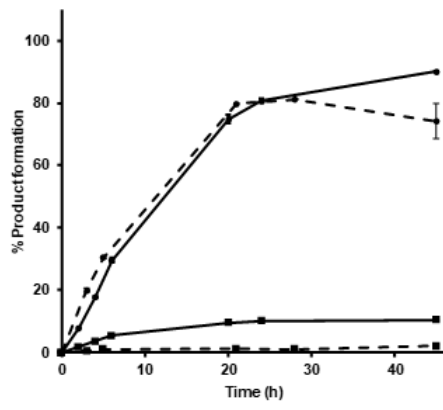


Figure 2

A



B

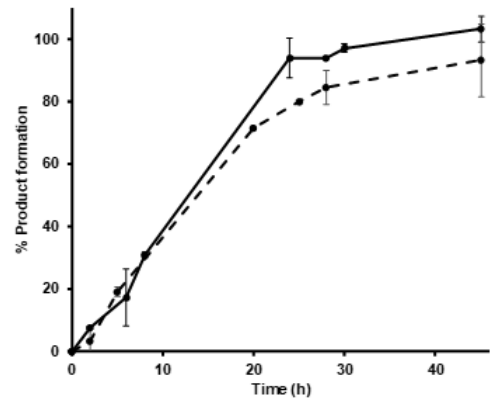
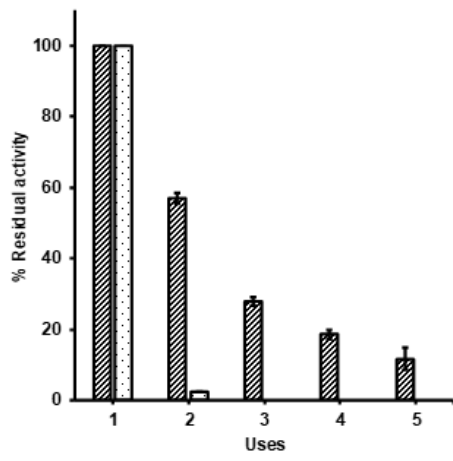


Figure 3

A



B

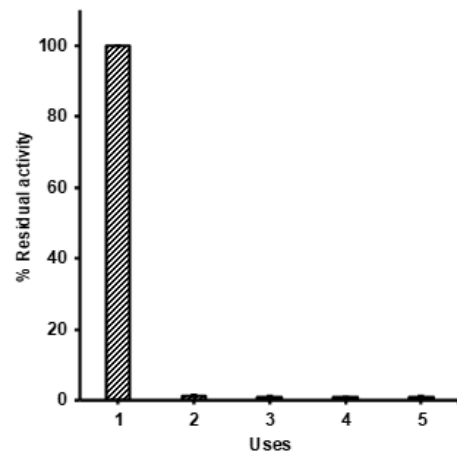
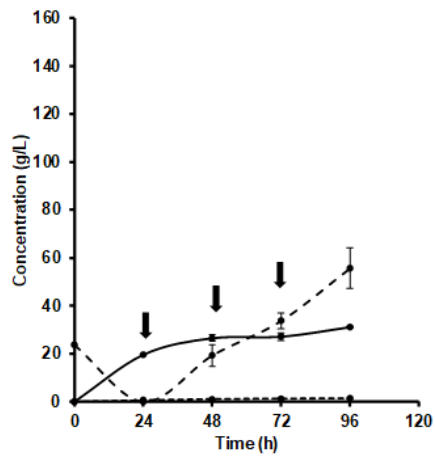
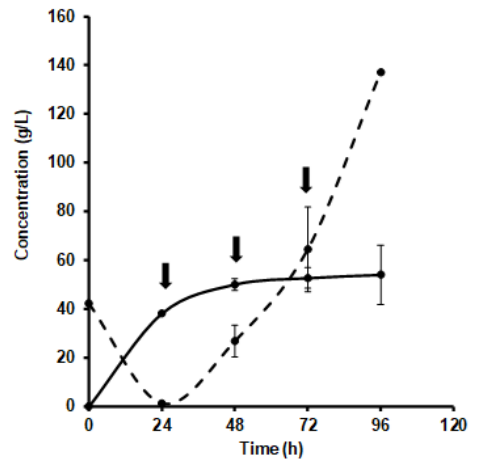
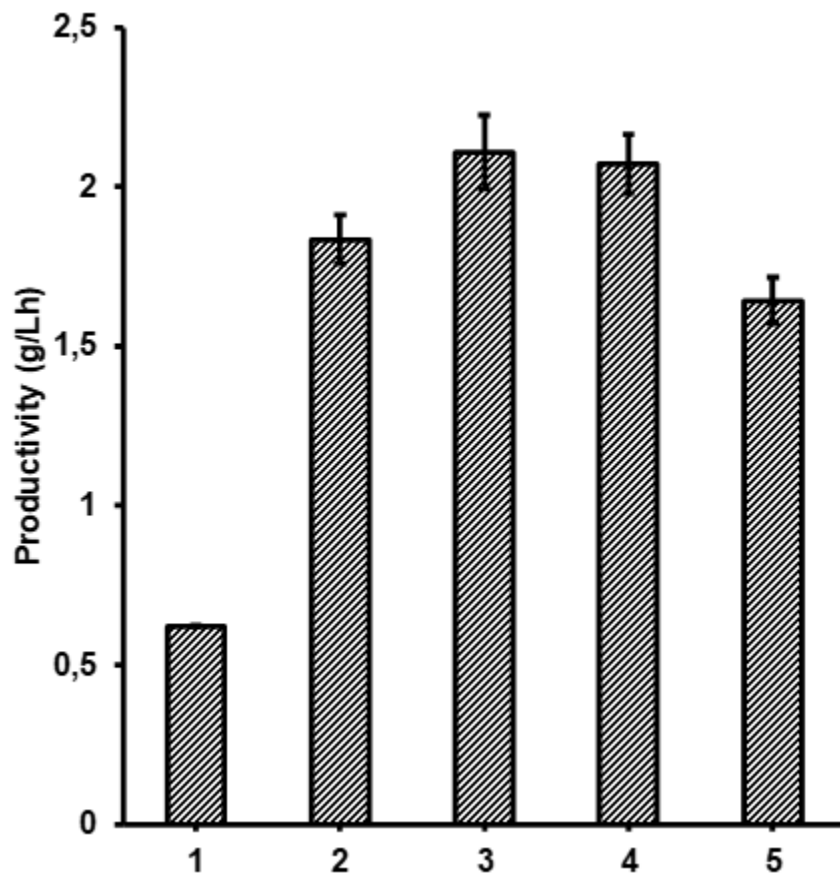
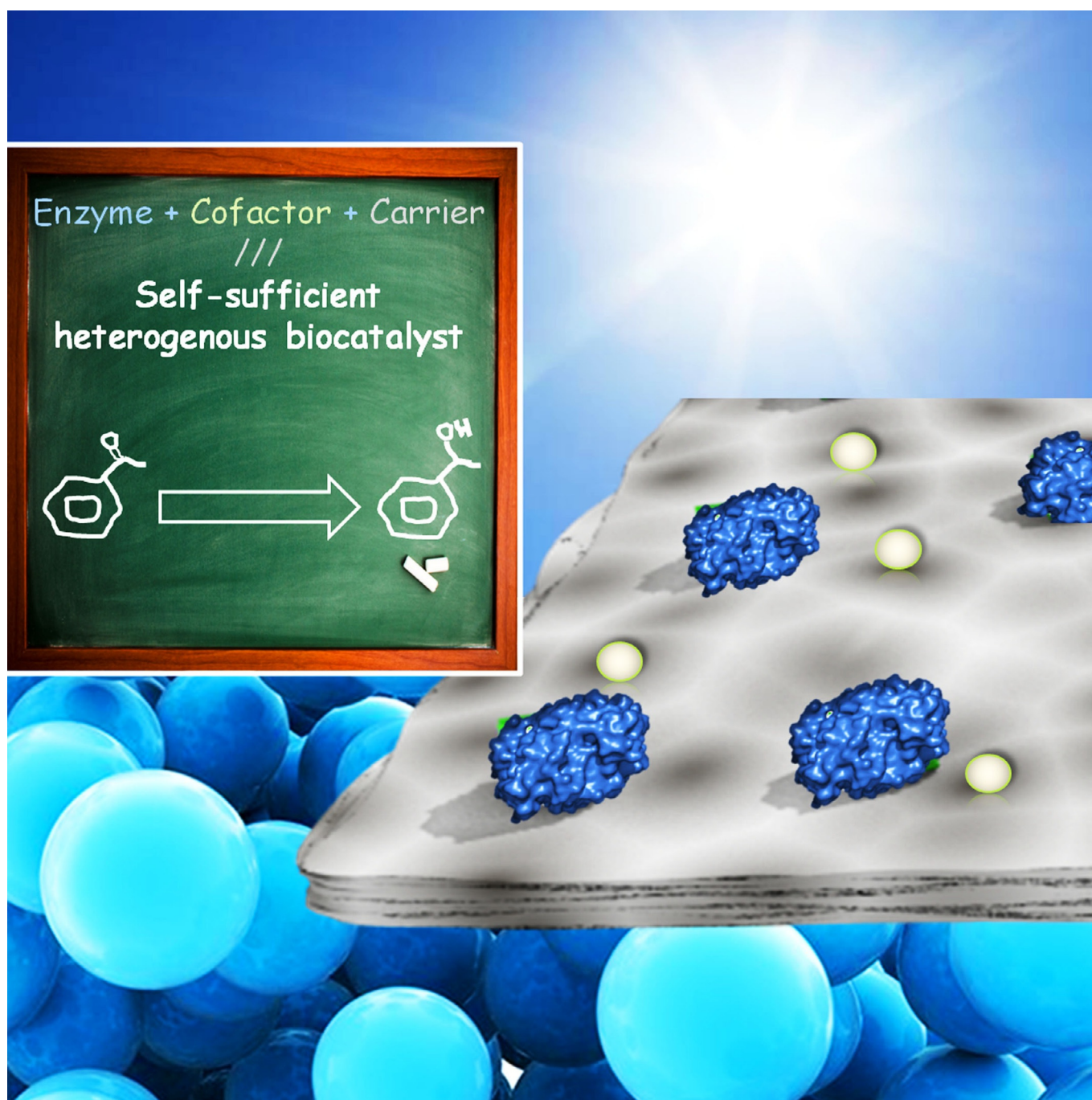


Figure 4

A**B****Figure 5****Figure 6**

Autonomous Artificial Cells

Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells

Fernando López-Gallego,^{*,[a, b]} Erienne Jackson,^[c] and Lorena Betancor^[c]

Abstract: Industrial biocatalysis is playing a key role in the development of the global bio-economy that must change our current productive model to pair the socio-economical development with the preservation of our already harmed planet. The exploitation of isolated multi-enzyme systems and the discovery of novel biocatalytic activities are leading us to manufacture chemicals that were inaccessible through biological routes in the early past. These endeavors have been grouped under the concept of systems biocatalysis. However, by using isolated biological machineries, fundamental features underlying the protein confinement found inside the living cells are missed. To re-gain these properties, such concepts can be expanded to a new concept; heterogeneous systems biocatalysis. This new concept is based on the fabrication of heterogeneous biocatalysts inspired by the spatial organization and compartmentalization that orchestrate metabolic pathways within cells. By assembling biological machineries (including enzymes and cofactors) into artificial solid chassis, one can fabricate self-sufficient and robust cell-free systems able to catalyze orchestrated chemical processes. Furthermore, the confinement of enzymes and “artificial cofactor” inside solid materials has also attracted our attention because these self-sufficient systems exert *de novo* and non-natural functionalities. Here, we intend to go beyond immobilization of multi-enzyme systems, discussing only those enzymatic systems that have been co-immobilized with their cofactor or exogenous partners to enhance their cooperative action. In this article, we review the latest architectures developed to fabricate self-sufficient heterogeneous biocatalysts with application in chemical manufacturing, biosensing or energy production.

Introduction

Cell-free multi-enzyme systems are broadening the repertoire of organic reactions that can be performed under mild conditions with an exquisite selectivity in non physiological environments.^[1] This approach has been referred to as systems biocatalysis and seeks the simplest biology to make the most com-

plex chemistry.^[2] The use of isolated enzymes has also been defined as cell-free metabolic engineering and emerges as an alternative to the classical metabolic engineering in which metabolic fluxes of the existing living cells must be re-adapted and re-wired towards the production of a target chemical. Systems biocatalysis has been extended to fully artificial pathways that occasionally include steps catalyzed by organometallics or organocatalysts.^[3] The exploitation of *in vitro* or cell-free enzymatic pathways was last reviewed by many investigators discussing their advantages and drawbacks.^[2,4] The major limitations of these systems are their solubility and low stability, which make the downstream processing difficult and hamper the re-usability of the biocatalysts for several operational cycles.^[5] Furthermore, the use of enzymes out from their cellular context may negatively impact the performance of multi-enzyme systems because they lose the spatial organization of metabolic pathways found in living cells.^[6] The spatial organization enhances the catalytic coupling between the different active sites that form the multi-enzyme systems as well as increases the effective cofactor concentration in the vicinity of the cofactor-dependent enzymes.^[7]

Protein engineering and immobilization have been synergistically employed to boost the enzyme kinetics of cell-free enzymatic cascades as well as to improve their performance under industrial conditions that usually differ from physiological environments (higher temperatures, organic media, drastic pH).^[8] Using suitable immobilization chemistries and carrier architectures in combination with properly engineered enzymes, cell-free multi-enzyme systems can be spatially organized across the micro/nanostructure of the solid materials.^[9] We have named this strategy as heterogeneous systems biocatalysis; this concept is inspired by natural organization of metabolic pathways inside the living cells, in which multi-enzyme systems are often spatially distributed within the cellular chassis.^[10] The first consequence of the heterogenization is that the biological systems gain the capability to be re-utilized in several operational processes and the adaptability to be used either in discontinuous or continuous operations.^[5] Additionally, enzyme immobilization is widely used to stabilize enzymes, which contributes to improving the operational stability of the resulting heterogeneous biocatalysts.^[8,11] However, the immobilization itself does not guarantee the enzyme stabilization, thus, both the type of carrier and the immobilization chemistry must be carefully selected in the quest for maximum activity and selectivity, and increasing the stability of the immobilized enzymes.^[12] Unfortunately, no immobilization protocol is universal and consequently the immobilization of one specific enzyme is a trial-and-error exercise.

Alternatively, the *in vitro* use of cofactors or co-enzymes in synergy with the enzymes broadens the chemical repertoire accessible by biocatalytic methods.^[13] Likewise, the combination of enzymes and chemical co-catalysts has paved the way to highly efficient chemo-enzymatic routes.^[3] Based on the possibilities offered by the enzyme immobilization, biological systems including enzymes and cofactors—both natural and artificial ones—can be integrated into solid material to fabricate self-sufficient heterogeneous biocatalysts that act as artifi-

[a] Dr. F. López-Gallego
Heterogeneous biocatalysis group
CIC biomaGUNE, Edificio Empresarial “C”
Paseo de Miramón 182, 20009, Donostia (Spain)
E-mail: flopez.ikerbasque@cicbiomagune.es

[b] Dr. F. López-Gallego
IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao (Spain)

[c] E. Jackson, Prof. L. Betancor
Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay
Mercedes 1237, CP 11100, Montevideo (Uruguay)

 The ORCID number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.201703593>.

cial metabolic cells capable of performing complex cascade reactions in one-pot. These systems are self-sufficient because they only need to be exogenously supplemented with the substrates; all the active elements are incorporated into the solid phase facilitating their reutilization during sequential operational cycles (Figure 1).

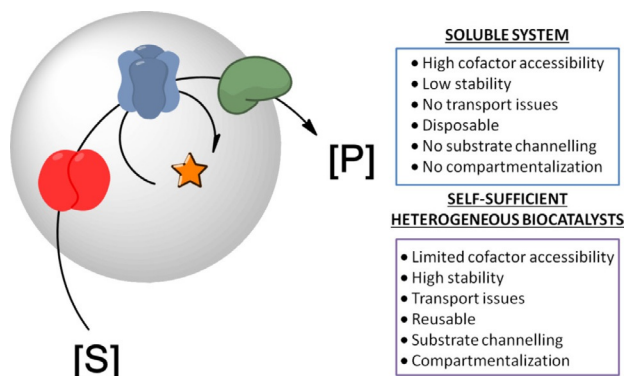


Figure 1. Overview of self-sufficient heterogeneous biocatalysts composed of three enzymes and one cofactor (star). In the boxes, the main features of this concept are highlighted and compared to the conventional multi-enzyme systems in solution.

To this aim, the immobilized cofactors must be catalytically active and accessible for the immobilized enzymes, and they also need to remain confined in the solid phase to prevent their lexiviation to the bulk (Figure 1). These systems harness the simplicity of the isolated multi-enzyme systems and the robustness and the efficiency of the whole cells. An optimal co-immobilization of multi-enzyme systems on solid materials can protect both enzymes and cofactor from inactivation, and spatially organize them to channel the chemical fluxes towards the desired pathway (Figure 1). The benefits of substrate and intermediate channeling on systems efficiency by using immobilized multi-enzyme systems has been widely reviewed during the last decade.^[9,14] Another advantage of co-immobilizing enzymes and cofactors like metal catalysts is the physical compartmentalization of these two elements. Enzymes and chemical catalysts like Cu, Pd or Ru in solution are sometimes incompatible because the former can be inhibited by the latter, and the latter poisoned by the former.^[15] In this scenario, the chemo-enzymatic routes fail catalyzing concurrent chemical reactions in one-pot. The coupling of Wacker oxidation catalyzed by CuI with an asymmetric bioreduction catalyzed by a NADPH dependent ketoreductase is a clear example of such incompatibility. As solution, the metal catalyst was macroscopically compartmentalized in polymeric thimbles as semi-permeable reservoirs that avoid the contact between the enzyme and the Cu. This system makes it possible to concurrently catalyze two incompatible reactions in one-pot.^[15a]

Nevertheless, the co-immobilization of several enzymes and cofactor faces several challenges to fabricate robust self-sufficient heterogeneous biocatalysts. Hence, the co-immobilization of different enzymes and cofactors must guarantee an optimal system coordination in terms of selectivity, activity, and stability.

ty.^[16] These properties must be tuned to avoid unproductive reaction cascades or premature system inactivation. For example, the stability of both cofactors and enzymes should be similar to avoid premature inactivation of any functional element that would reduce the product yield after short operational times. Considering that the fabrication of self-sufficient heterogeneous biocatalysts in which all enzymes and cofactors show the same operational stability is a very hard task. The selective elution and re-loading of the less stable component (enzyme or cofactor) greatly facilitate the coordination of the system. This scenario is only possible if the less stable elements are immobilized through specific and reversible interactions.^[17]

In this concept article, we review the different methodologies to fabricate self-sufficient heterogeneous biocatalysts that work as a system in many different applications. We provide examples in which enzymes and co-enzymes, co-catalysts or prosthetic groups are integrated into the same solid-phase to perform the chemical processes without exogenously adding any other reactant rather than the reaction substrates.

Modification of Cofactors and Enzymes with Polymers

Due to the much smaller size of the cofactors compared to the enzymes, the retention of these two biomolecules for their simultaneous re-utilization is highly challenging. Thus, the cofactor conjugation with bulky polymers has been previously approached to enable the retention of both cofactor and enzymes in ultra-filtration membrane reactors (Figure 2). The modification of redox cofactors NAD(P)H and NAD(P)⁺ with polymers has been widely reported since the 1970s.^[18] Tethering the polymers to position N6 of the adenine ring of NADH seems to retain higher biological activity than chemical modifications at other positions, likely because polymeric cofactor still has sufficient access to the enzyme active site.^[19] A plethora of alcohol dehydrogenases (ADHs) are able to utilize these polymeric redox cofactors for the synthesis of different chemicals.^[18a,b]

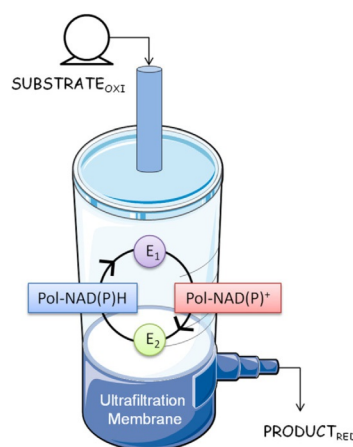


Figure 2. Scheme of an ultrafiltration membrane reactor for the continuous production of chemicals catalyzed by soluble enzymes and polymeric cofactors (Pol-NAD(P)⁺/H).

Other cofactor such as redox mediators have also been anchored to polymers for water decontamination processes catalyzed by laccases in membrane reactors. The retention and regeneration of the mediator and enzyme allows for the use of a lower concentration of mediator that avoids the laccase inactivation^[20] and the process stream contamination during water decolorization processes.^[21] Therefore, the membrane reactor trapping enzymes and cofactors is a macroscopic example of a self-sufficient biocatalyst although enzymes, cofactor, and substrate are all in a homogeneous phase. For this reason their separation requires highly energy-demanding systems such as ultrafiltration membranes.

Covalent Tethering of Cofactors to Immobilized Enzymes

The structure of the cofactor-dependent enzymes can be directly modified with the corresponding cofactors to permanently locate the cofactor in the vicinity of the active site. In a pioneering work, NADH-ADH complex was immobilized on agarose porous beads activated with cyanogens bromide groups in which both enzyme and cofactor were irreversibly anchored to the solid surface, stabilizing the cofactor-enzyme complex.^[22] Similarly, FAD⁺, NADH, and pyrrolo-quinolone quinone (PQQ) were covalently anchored to planar surfaces and beads to covalently attach apo-enzymes. The sugar group of these cofactors was chemically aminated to assure their biological activity after covalently tethering them to the solid surfaces.^[23] Glucose oxidase and Bayer–Villiger monooxygenase are two examples in which the immobilized cofactor-enzyme covalent complexes can be re-utilized for several operational cycles.^[24] This idea was extended to self-powered biofuel cell-based biosensors for detection of glucose and lactate.^[23]

Other cofactor independent enzymes have been functionalized with artificial cofactors or co-catalysts. These non-biological molecules (i.e., organometallics complexes) add non-natural functionalities to the enzymes to catalyze chemo-enzymatic routes. To achieve an optimal interplay of the enzyme and the artificial cofactor, the latter must be selectively anchored to the enzyme active site. The site-selective anchoring of the artificial cofactor requires protein engineering tools that introduce a specific residue (i.e., cysteine) at the active center of the enzyme, allowing a selective reaction between the artificial group and the protein structure. The insertion of synthetic molecules into the active sites seeks to expand the catalytic properties of the enzymes and their uses thereof. Particularly, the lipase 2 from *Geobacillus thermocatenolatus* has been immobilized on several porous carriers and its active site has been covalently and selectively modified with different prosthetic groups that alter the lipase properties such as the activity and substrate selectivity.^[25] This enzyme was immobilized on porous agarose beads activated with butyl groups and further covalently modified with a copper complex to carry out a tandem reaction in which the enzyme catalyzes the hydrolysis of a nitroarene esters (colorless) to the corresponding 4-nitrophenol (yellow color) that is subsequently reduced by the

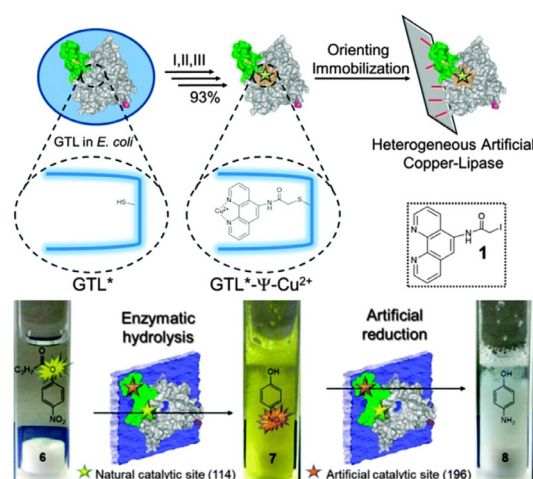


Figure 3. Immobilized lipase 2 from *Geobacillus thermocatenolatus* (GTL2) selectively conjugated with a copper complex (1) and its application in cascade reactions. The yellow star represents the catalytic serine of the lipase (position 114), and the orange star represents the lipase cysteine (position 196) in which the metal complex is tethered. Reproduced from ref. [26] with permission of The Royal Society of Chemistry.

metal cofactor to the corresponding aminoarene (colorless)^[26] (Figure 3).

These examples highlight the possibilities to integrate different catalytic reactions in the environment of the active sites. This fact is particularly important for cascade reactions in which the intermediates are highly labile and need to be rapidly converted into the next product. Expanding this approach to more complex organometallic complexes, we can gain access to more sophisticated chemo-enzymatic routes in solid-phase.

Irreversible Co-Immobilization of Cofactor and Enzymes on Solid Materials

Cofactors and enzymes can be co-immobilized on a pre-existing carrier in an irreversible manner, which prevents the cofactor lixiviation during the operational performance. Unlike cofactor conjugated with polymers, the immobilization of cofactors on solid particles offers a higher versatility for their integration into different reactor designs (stirred tank, plug-flow, be-packed reactors). However, this approach normally fails in those systems in which cofactors must be regenerated by auxiliary enzymes. As a solution, several ADHs and NADH were irreversibly attached to polymeric beds anchored to the surface of the solid materials. This strategy endows the cofactor with enough flexibility to reach the active sites, making the enzyme reaction possible, although with low cofactor total turnover numbers.^[27] The recycling efficiency has been improved by precisely designing the molecular distances between the enzymes and the cofactors that are irreversibly tethered to non-porous surfaces through flexible linkers conjugated to topologically programmed DNA scaffolds.^[28] In a different approach, ADHs and NADH were separately and irreversibly immobilized on non-porous polystyrene nanoparticles^[29] in which the cofactor regeneration took place due to particle collisions driven by

Brownian motions. The cofactor recycling efficiency of this system was further increased by using superparamagnetic nanoparticles under moderate alternating magnetic field. The magnetic field increases the particle motion, which in consequence increases the reaction rate and the recycling efficiency of the cofactor.^[30]

The concept of self-sufficient heterogeneous biocatalysts in which all their components are irreversibly attached to the solid surface has also been exploited for chemo-enzymatic routes to access more complex and enantiopure chemicals. Here the cofactor, which is fully artificial, acts a chemical co-catalyst; then enzyme and cofactor operate independently. This approach avoids the frequent enzyme inhibition/inactivation caused by the chemical catalyst and vice versa. The enzyme and the chemical catalyst can be immobilized on two different carriers^[31] or co-immobilized on the same one. The latter case has been much less exploited than the former one, being the most remarkable example of highly efficient dynamic kinetic resolution (DKR) of amine groups performed by a self-sufficient heterogeneous system that co-immobilizes palladium nanoparticles and lipase B from *Candida antarctica* on silanaceous mesoporous foams^[32] (Figure 4). The enzyme is covalently attached to the silica surface through glutaraldehyde chemistry, whereas the Pd nanoparticles are anchored to the amino groups grafted in the silica. Within the same cavity, the lipase catalyzes the enantioselective amidation of the amine, whereas Pd nanoparticles are able to racemize the amine to accomplish the DKR. This hybrid heterogeneous catalyst yielded 100% of the enantiopure amide ($ee > 99\%$) starting from the corresponding racemic amine under water-free toluene at 70 °C. Under these conditions, the catalytic systems could only be satisfactorily reutilized three times due to the enzyme inactivation along the operational performance. The authors of this work suggest that the biocatalyst inactivation is due to the enzyme denaturation triggered by the polarity of the solid sur-

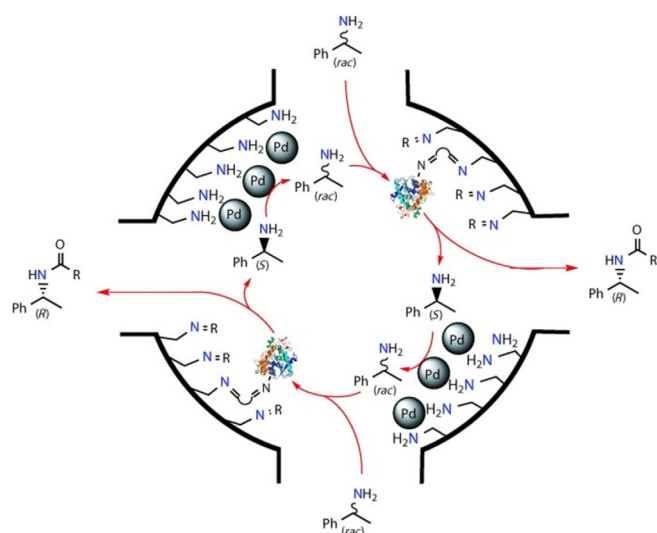


Figure 4. Self-sufficient heterogeneous biocatalysts for the dynamic kinetic resolution of primary amines. Lipase from *Candida antarctica* lipase B and a nanopalladium species are co-immobilized on mesoporous silica. Reproduced from ref. [32] with permission from Wiley.

face, but the drastic conditions of the process (high temperature and high solvent concentration) can also contribute to the enzyme denaturation.

Light-driven water splitting for energy production is a recent interesting application of biological complexes irreversibly immobilized on solid surfaces. Different cell-free components of the photosystem I and II have been immobilized on different photovoltaic devices to mimic sun-driven water oxidation accomplished by natural photosynthesis.^[33] In a recent example, a non-photosynthetic glycosylated enzyme, the laccase from *Trametes hisurta*, has been irreversibly immobilized on fluorinated tin oxide electrodes doped with In_2S_3 and functionalized with amino-aryl groups.^[34] In this system, the laccase is able to oxidize the water to produce electricity at very low applied potential under sun illumination. The proximity between the laccase and the inorganic artificial cofactor (In_2S_3 particles) enables the light-driven water splitting reaction with catalytic constants similar to the best systems reported for photobioelectrical systems^[35] (Figure 5).

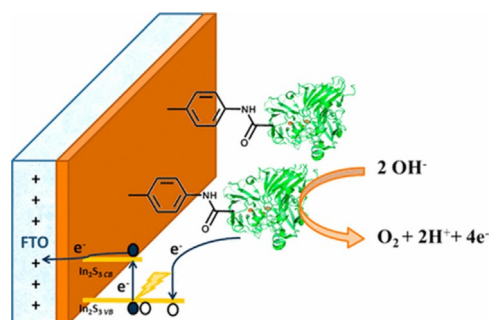


Figure 5. Co-immobilization of laccase from *Trametes hisurta* and In_2S_3 clusters on electrode surfaces (fluorinated tin oxide, FTO) as self-sufficient heterogeneous biocatalysts for light-driven water oxidation. The copper cluster of the laccase transfers the FTO electrode from the water through the In_2S_3 clusters activated by the light-producing molecular oxygen as product. Reprinted with permission from ref. [34], Copyright 2017 American Chemical Society.

The irreversible immobilization of enzymes and cofactors, both natural and artificial ones, on solid carriers can accomplish a plethora of functions from synthetic chemistry to energy production. The major advantage of this approach is that both enzyme and cofactor hardly release to the reaction media because they are irreversibly linked to the solid surfaces. However, the whole heterogeneous biocatalysts must be discarded when either the cofactor or the enzymes become inactive during the operational process, because the inactive element cannot be selectively removed from the solid phase. Furthermore, the covalent modification of the cofactors to establish irreversible bonds with the surface may negatively affect their biological activity, lowering the system efficiency. This is especially dramatic for the cofactors utilized by alcohol dehydrogenases in redox reactions.

Dynamic Ionic Immobilization of Cofactors on Porous Particles Containing Covalently Attached Enzymes

As we have described throughout this article, cofactors, particularly redox cofactors, and enzymes have been co-immobilized on a broad variety of solid materials, giving rise to self-sufficient heterogeneous biocatalysts that do not require an exogenous cofactor supply during the reaction.^[17a,28a,29,31d,36] In the context of chemical manufacturing, one of the most promising approaches is the electrostatic adsorption of cofactors and enzymes to solid and porous micrometric particles^[31d,36] to avoid the cofactor chemical modification and facilitate the catalysts recovery and downstream processing. These solid materials are modified with positively charged groups that can ionically interact with the negative charges of phosphorylated cofactors. As a result, the cofactor is physically adsorbed using an association/dissociation equilibrium within the porous environment, having some cofactor molecules bound to the solid materials, whereas others can be freely moving within the intraporous space.^[37] Remarkably, 15 out of 29 natural cofactors contain phosphate groups, which theoretically makes this strategy useful for many biotransformations catalyzed by cofactor-dependent enzymes such as transaminases, kinases, dehydrogenases, sulfotransferases, flavo-enzymes, ligases, etc. This strategy has succeeded for asymmetric reductions catalyzed by ketoreductases in organic media, but fails in buffered media due to the lixiviation of both NADH and enzymes.^[31d,36a,b] In this scenario, the association/dissociation equilibrium makes the cofactor accessible for the immobilized enzyme, but simultaneously, may cause the cofactor lixiviation to the reaction bulk. A similar behavior was observed for the non-ionic co-absorption of PLP (pyridoxal-5-phosphate) and *E.coli* cells harboring a *R*-selective ω -transaminase on a polymethacrylic porous bead.^[38] In a recent work, a versatile and simple architecture has been designed for the fabrication of self-sufficient heterogeneous biocatalysts based on commercial porous carriers coated with polyethyleneimine (PEI). In this architecture, enzymes and PEI are irreversibly bound to the agarose microbeads, whereas the cofactors (NAD⁺, PLP or FAD⁺) are ionically adsorbed to the polymeric bed; the enzymes are completely surrounded by the cofactor molecules^[17a] (Figure 6).

Single-particle experiments demonstrate that the immobilized enzymes are catalytically active and the immobilized cofactors are catalytically available and retained in the solid phase under operando conditions. In the light of these experimental evidences, it is proposed that the confinement of the association/dissociation equilibrium inside the nanometric pores creates a temporary pool of dissociated cofactor molecules that is long enough to reach the enzyme active sites but too short to leave the porous microbeads. This scenario may explain the simultaneous availability of the immobilized cofactor that keeps the immobilized enzymes active and avoids the cofactor lixiviation. As a result, this self-sufficient heterogeneous biocatalyst retained 100% of its initial activity after four batch cycles and continuously operated at its maximum performance for more than 92 hours without exogenous addition

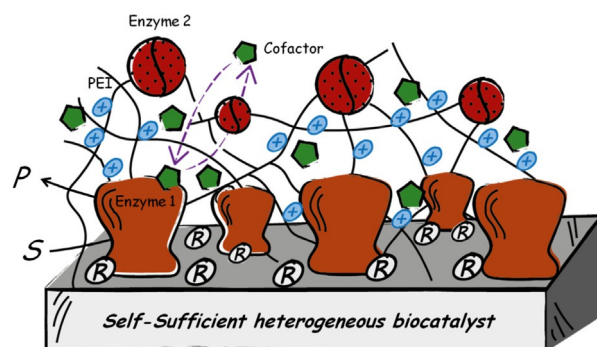


Figure 6. Self-sufficient heterogeneous multi-functional biocatalyst with capability to perform bio-redox cascade without exogenous addition of NADH.^[17a] Enzyme 1 (brown) is a NADH-alcohol dehydrogenase that catalyzes the asymmetric reduction of ketones. This enzyme is covalently attached to the porous surface. Enzyme 2 (red circle) is a NAD⁺-formate dehydrogenase that transforms formic acid into CO₂ and is covalently anchored to a polyethyleneimine (PEI) bed (black fibers with positive charges in blue). The cofactor (green diamond) is ionically adsorbed to the PEI bed and shuttles from enzyme 1 to 2 for its regeneration.

of NAD⁺, recycling each molecule of immobilized cofactor 80 times. Another important feature of this architecture is the selective elution (high NaCl concentration) and re-loading (low NaCl concentration) of NADH once it is inactivated; this fact extends the useful life-time of the immobilized enzymes and the carrier. A similar strategy was also successfully applied for the co-immobilization of ω -transaminase and PLP. The design of architectures that guarantee an irreversible attachment of enzymes to the solid phase and facilitate the dynamism of the cofactors across the porous structure will so far enhance the global kinetics of biocatalytic systems. This concept can be readily extended to more complex systems in which several cofactors, either natural or artificial, are needed.

Entrapping Strategies for Multi-Enzyme and Cofactor Immobilization.

As an ever-growing field in material science, in situ formation of composites stands out as an advantageous approach for the integration of enzyme molecules, cofactors and/or other organic/inorganic molecules that may assist in the catalysis or stability of heterogeneous biocatalysts. Entrapment strategies have long proved advantageous in the stabilization of all kind of enzymes as most of the methodologies are carried out at ambient conditions in a fast and simple manner, compatible with enzymatic biological activity.^[39] Moreover, this immobilization approach prevents subunit dissociation in multimeric enzymes, increasing their stability and allows intimate crosstalk between co-immobilized cooperating enzymes. Considering that the methodology for encapsulation implies the mixture of the molecules that include the reagents for heterogeneization, any molecule in the mixture becomes entrapped after formation of the particles. It is therefore simple to include any cofactor or co-catalyst as additives in the immobilization process.

As described above for other heterogeneization strategies, covalent attachment of cofactors is key for preventing leakage

in entrapment strategies, thus increasing the operational stability of the immobilized biocatalyst. Chemical bonding of NAD^+ to silica precursors has allowed the preparation of more stable sol-gel films and durable bioelectrocatalytic responses when coupling a dehydrogenase and diaphorase for the bio-sensing of sorbitol.^[40] Furthermore, in the same work, a ferrocene derivatized poly(etheleneimine) (PEI) was used as a redox mediator to improve the operation of diaphorase in the regeneration of the cofactor. The response was three times more intense compared to that when the mediator was added in solution and preserved 70% of activity after 14 hours of continuous use under hydrodynamic conditions.

In addition, using mediators to tunnel electrons to electric responsive surfaces have been determinant in the sensibility of enzyme-based biosensors and used with a number of entrapped coupled biocatalysts.^[41] With a further elaborated approach, mediators have been immobilized on the surface of conducting gold nanoparticles that were then entrapped with an enzymatic system to detect D-sorbitol through NADH oxidation. The strategy addressed the problem of the insulating properties of the silica matrix and facilitated the participation of the entrapped enzymes on the catalysis. The mediator functionalized entrapped gold nanoparticles proved to boost the generation of the catalytic current transferred from sol-gel thin films containing enzymes to flat surfaces or nanoparticles of gold. Moreover, integration of other molecules or materials that a priori are not necessarily cofactors or prosthetic groups have proven to enhance the activity of biocatalysts.^[42]

Despite the advances on in situ immobilization of enzyme systems and aiding catalytic molecules in biosensing, fundamental progress has been made in the entrapment of multiple components to mimic metabolic cascades. A recent example demonstrated the feasibility of entrapping an artificial photosynthesis system by incorporating the photo-regeneration of NADH with the cascade reduction of CO_2 to methanol^[43] in aqueous media. The system included the reduction of CO_2 to methanol by the sequential action of formate, formaldehyde, and alcohol dehydrogenases. The photoregeneration system comprises an electron mediator and a photosensitizer that drive the NADH recycling under visible-light irradiation. The combination of co-axial electrospinning and layer-by-layer self-assembly allowed the spatially and precisely controlled arrangement of the multiple functional components involved in both the biocatalysis and photocatalysis. The hollow fiber housed the four dehydrogenases and NADH, whereas the outer layer-by-layer covering the hollow fiber contained the mediator and a photosensitizer (Figure 7). A similar architecture also worked for the methanol production by alternatively using an enzymatic regeneration system.^[36d] A careful design of the immobilized preparation improved the reaction thermodynamics and the final equilibration of the reaction was substantially shifted towards the synthesis of methanol (Figure 7).

This work opened up new avenues in the development of heterogeneous catalysts complex systems, demonstrating not only the efficient conversion of CO_2 into methanol but also the necessity of crowding and spatial organization to improve the system efficiency. Using a similar strategy, glucose oxidase and

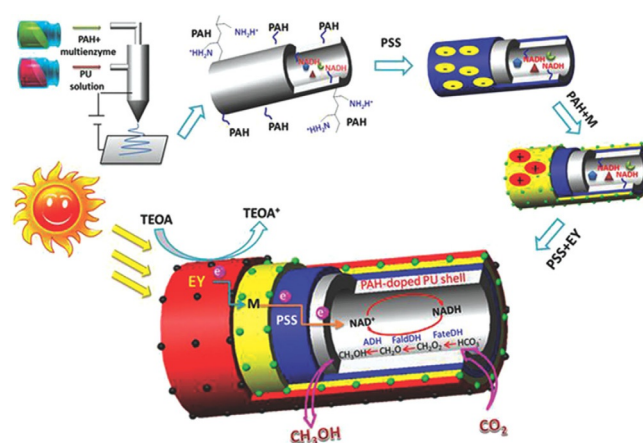


Figure 7. Preparation of polyelectrolyte-doped hollow nanofibers and integration of biocatalyzed artificial photosynthesis system for solar-energy-driven conversion of CO_2 to methanol. Three different dehydrogenases (ADH, FALDH and FADH) and the NADH are co-entrapped into the hollow, whereas the photosensitizer (eosin-Y, EY) and the mediator (M) are absorbed outer layers of the fiber. EY absorbs the light to reduce the mediator. Finally, the reduced mediator regenerates the pool of NADH consumed during the biotransformation. Reproduced from ref. [43] with permission of Wiley.

lipase from *Candida antarctica* B have been entrapped into hollow nanofibers to catalyze the epoxidation of oleic acid in a bi-phasic system with an in situ H_2O_2 supply.^[44] The use of nanofibers has also been exploited for glucose sensing incorporating the required enzymes and mediator.^[45]

To similar aims, different strategies have been developed to entrap more complex biological machineries into liposomes and hydrogels such as cell-free protein synthesis systems.^[46] The approach may be integrated with other complex designs that allow the preparation of heterogeneous artificial cells with integrated metabolic circuits. Finally, we remark self-regulation as a novel feature of these systems. Recently, urease has been entrapped into a pH-responsive and fluorescent sol-gel to keep the system out-of-equilibrium by continuously consuming chemical energy.^[47] This innovative approach paves the way to the fabrication of self-sufficient and self-regulated artificial cells.

Conclusions

In this concept, we have discussed a variety of self-sufficient heterogeneous biocatalysts with applications in fine, environmental and analytical chemistries. The latest advances in material sciences are opening unexplored paths to heterogenize more complex multi-enzyme systems. The integration of enzymes and cofactors (both natural and artificial ones) into solid-materials results in self-sufficient systems capable of catalyzing a large repertoire of cascade reactions. Furthermore, the heterogeneous nature of these systems enables their re-utilization during several operational cycles as well as their integration into flow-systems for process intensification. The examples discussed here demonstrate that the architectural design of the self-sufficient heterogeneous biocatalyst is fundamental to tune their properties. Optimal designs have enabled the con-

trol of the localization and confinement of multi-enzyme assemblies into the microstructure of the solid materials, mimicking the spatial organization and the molecular crowding found in living cells. These two features favor the channeling of the chemical fluxes from the substrates to the products through the enzyme pathway, increasing the global catalytic efficiency of the cascade reactions. The concept of a self-sufficient heterogeneous biocatalyst suggests the integration of more complex natural and semi-synthetic metabolic circuits, in which chemical and biological catalysts can work together under the same working conditions.

In summary, the concept of self-sufficient heterogeneous biocatalysis has revealed its potential as a driving force to boost different areas such as chemical biomanufacturing, bio-sensing, bioremediation, and bioenergy. All these areas are the foundations of the emerging bio-economy that must replace, or at least complement, the fossil-based economy that is currently dominating the economical development of our society. Future advances in this concept aided by protein engineering and material sciences can consolidate cell-free systems as a real alternative to whole-cell biotransformations in a diversity of biotechnology applications.

Acknowledgements

We would like to thank IKERBASQUE foundation for funding F. L.-G. and the support of COST Action CM1303 Systems Biocatalysis. E.J. would like to thank PEDECIBA Química and the National Resesarch and Innovation Agency (ANII) from Uruguay.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: biocatalysis · cofactor · enzymes · immobilization · solid materials

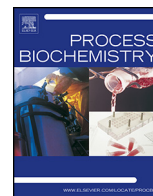
- [1] W. D. Fessner, *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 658–664.
- [2] a) V. Köhler, N. J. Turner, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 450–464; b) J. A. Rollin, T. K. Tam, Y. H. P. Zhang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1708–1719.
- [3] H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171–179.
- [4] a) Q. M. Dudley, A. S. Karim, M. C. Jewett, *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 69–82; b) J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5798–5811.
- [5] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437–6474.
- [6] T. A. Bobik, B. P. Lehman, T. O. Yeates, *Mol. Microbiol.* **2015**, *98*, 193–207.
- [7] K. H. Siu, R. P. Chen, Q. Sun, L. Chen, S. L. Tsai, W. Chen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *36*, 98–106.
- [8] A. S. Bommarius, M. F. Paye, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6534–6565.
- [9] a) S. Schoffelen, J. C. M. van Hest, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1736–1746; b) S. Schoffelen, J. C. van Hest, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 613–621.
- [10] F. Hinzpeter, U. Gerland, F. Tostevin, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 767–779.
- [11] a) C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904; b) A. M. Klibanov, *Anal. Biochem.* **1979**, *93*, 1–25.
- [12] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290–6307.
- [13] H.-P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29–40.
- [14] F. Jia, B. Narasimhan, S. Mallapragada, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 209–222.
- [15] a) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488–4492; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4570–4574; b) N. Rios-Lombardía, C. Vidal, M. Cocina, F. Moris, J. Garcia-Alvarez, J. Gonzalez-Sabin, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10937–10940.
- [16] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, *Biocatal. Biotransform.* **2017**, *1*–11.
- [17] a) S. Velasco-Lozano, A. I. Benítez-Mateos, F. López-Gallego, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 771–775; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 789–793; b) S. Peirce, J. J. Virgen-Ortiz, V. G. Tacias-Pascacio, N. Rueda, R. Bartolome-Cabrero, L. Fernandez-Lopez, M. E. Russo, A. Marzocchella, R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 61707–61715.
- [18] a) J. Obón, M. J. Almagro, A. Manjón, J. Iborra, *J. Biotechnol.* **1996**, *50*, 27–36; b) R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-r. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 2789–2802; c) Y. Yamazaki, H. Maeda, H. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, *18*, 1761–1775; d) W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369–384.
- [19] S. Riva, G. Carrea, F. M. Veronese, A. F. Bückmann, *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8*, 556–560.
- [20] R. Khlifi, S. Sayadi, L. Belbahri, S. Woodward, T. Mechichi, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 1828–1833.
- [21] L. Mendoza, M. Jonstrup, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *49*, 478–484.
- [22] S. Gestreluis, M.-O. Mansson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 529–535.
- [23] E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10752–10753.
- [24] M. Krzek, H. L. van Beek, H. P. Permentier, R. Bischoff, M. W. Fraaije, *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *82*, 138–143.
- [25] a) M. L. E. Gutarra, O. Romero, O. Abian, F. A. G. Torres, D. M. G. Freire, A. M. Castro, J. M. Guisan, J. M. Palomo, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1902–1910; b) F. López-Gallego, O. Abian, J. M. Guisán, *Biochemistry* **2012**, *51*, 7028–7036.
- [26] M. Filice, O. Romero, J. Gutierrez-Fernandez, B. de Las Rivas, J. A. Hermoso, J. M. Palomo, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9324–9327.
- [27] a) B. El-Zahab, H. Jia, P. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 178–183; b) W. Liu, S. Zhang, P. Wang, *J. Biotechnol.* **2009**, *139*, 102–107.
- [28] a) J. Fu, Y. R. Yang, A. Johnso nBuck, M. Liu, Y. Liu, N. G. Walter, N. W. Woodbury, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 531–536; b) O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 249–254.
- [29] B. El-Zahab, D. Donnelly, P. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 508–514.
- [30] M. Zheng, S. Zhang, G. Ma, P. Wang, *J. Biotechnol.* **2011**, *154*, 274–280.
- [31] a) H. Huang, C. A. Denard, R. Alamillo, A. J. Crisci, Y. Miao, J. A. Dumesic, S. L. Scott, H. Zhao, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2165–2168; b) P. Mäki-Arvela, S. Sahin, N. Kumar, J.-P. Mikkola, K. Eränen, T. Salmi, D. Y. Murzin, *Catal. Today* **2009**, *140*, 70–73; c) A. C. Marr, C. L. Pollock, G. C. Saunders, *Organometallics* **2007**, *26*, 3283–3285; d) G. Rulli, M. Heidlindemann, A. Berkessel, W. Hummel, H. Gröger, *J. Biotechnol.* **2013**, *168*, 271–276.
- [32] K. Engström, E. V. Johnston, O. Verho, K. P. Gustafson, M. Shakeri, C. W. Tai, J. E. Backvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14006–14010; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14256–14260.
- [33] a) M. Kato, T. Cardona, A. W. Rutherford, E. Reisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10610–10613; b) K. Nguyen, B. D. Bruce, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 1553–1566.
- [34] C. Tapia, S. Shleev, J. C. Conesa, A. L. De Lacey, M. Pita, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4881–4889.
- [35] K. P. Sokol, D. Mersch, V. Hartmann, J. Z. Zhang, M. M. Nowaczyk, M. Rogner, A. Ruff, W. Schuhmann, N. Plumere, E. Reisner, *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9*, 3698–3709.
- [36] a) M. Heidlindemann, G. Rulli, A. Berkessel, W. Hummel, H. Gröger, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1099–1103; b) H. Li, J. Moncecchi, M. D. Truppo, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 695–700; c) X. Ji, Z. Su, P. Wang, G. Ma, S. Zhang, *ACS Nano* **2015**, *9*, 4600–4610.
- [37] E. S. da Silva, V. Gómez-Vallejo, J. Llop, F. López-Gallego, *Catal. Sci. Tech.* **2015**, *5*, 2705–2713.
- [38] a) L. H. Andrade, W. Kroutil, T. F. Jamison, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6092–6095; b) D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4810–4812.

- [39] G. R. Johnson, H. R. Luckarift in *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols* (Ed.: S. D. Minter), Springer, New York, **2017**, pp. 61–73.
- [40] Z. Wang, M. Etienne, F. Quilès, G.-W. Kohring, A. Walcarius, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 111–117.
- [41] a) M. M. Rahman, X.-b. Li, J. Kim, B. O. Lim, A. J. S. Ahammad, J.-J. Lee, *Sens. Actuators B* **2014**, *202*, 536–542; b) M. J. Cooney, H. R. Luckarift in *Enzymatic Fuel Cells*, Wiley, Hoboken, **2014**, pp. 225–241; c) P. O. Saboe, E. Conte, M. Farell, G. C. Bazan, M. Kumar, *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 14–42.
- [42] Y. Bon Saint Côme, H. Lalo, Z. Wang, G.-W. Kohring, R. Hempelmann, M. Etienne, A. Walcarius, A. Kuhn, *Electroanalysis* **2013**, *25*, 621–629.
- [43] X. Ji, Z. Su, P. Wang, G. Ma, S. Zhang, *Small* **2016**, *12*, 4753–4762.
- [44] X. Ji, Z. Su, P. Wang, G. Ma, S. Zhang, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 4548–4559.
- [45] X. Ji, Z. Su, P. Wang, G. Ma, S. Zhang, *Analyst* **2014**, *139*, 6467–6473.
- [46] a) F. Caschera, J. W. Lee, K. K. Y. Ho, A. P. Liu, M. C. Jewett, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5467–5469; b) N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. Xu, D. Luo, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 432–437.
- [47] H. Che, B. Buddingh, J. van Hest, *Angew. Chem.* **2017**, <https://doi.org/10.1002/ange.201706716>.

Manuscript received: August 1, 2017

Accepted manuscript online: September 26, 2017

Version of record online: November 22, 2017



Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering



E. Jackson^a, F. López-Gallego^{b,c}, J.M. Guisan^{d,*}, L. Betancor^{a,*}

^a Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Cuareim 1441, 11100, Montevideo, Uruguay

^b IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011, Bilbao, Spain

^c CICBiomagune. Parque Tecnológico de San Sebastián, Edificio Empresarial C, Paseo Miramón 182, 20009 Donostia-San Sebastián, Guipúzcoa, Spain

^d Instituto de Catálisis y Petroquímica. CSIC, c/Marie Curie N2, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2016

Received in revised form 1 June 2016

Accepted 2 June 2016

Available online 7 June 2016

Keywords:

L-lactate dehydrogenase

Enzyme immobilization

Enzyme stabilization

Glyoxyl-agarose

L-lactic acid

ABSTRACT

L-lactate dehydrogenase (LDH) catalyzes the conversion of pyruvate to L-lactate using NADH as a cofactor. In this work, we have optimized the immobilization of LDH from rabbit muscle in glyoxyl-agarose to have an active and stable preparation which is able to synthesize L-lactic acid. Optimization of various parameters during immobilization allowed the preparation of an active and highly stable immobilized derivative of LDH. A 90.1% immobilization and 72.0% yield was achieved using 300 mM trehalose during the immobilization process. Thermal stabilization factors attained for the immobilized LDH were 1600 times greater as compared to its soluble counterpart. The immobilized preparation was also stabilized against ethanol where it recovered 75% of its initial activity after 48 h while the soluble enzyme was completely inactivated after only 10 min under the same conditions. The enzyme activity profile versus pH and temperature showed a wider range for the immobilized preparation as compared to the soluble enzyme, whilst maintaining optimal values. Production of L-lactic acid was achieved in a batch reactor with the immobilized LDH and this preparation resisted 15 reuses without the loss of activity. We believe that the immobilization strategy optimized here broadened the possibilities of utilizing LDH for biocatalytic applications.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dehydrogenases are a class of enzymes that find applications as biocatalysts in enantioselective biotransformations, biosensing, and as cofactor regeneration systems [1–3]. Their success in the in vitro production of various chiral compounds such as unnatural chiral amino acids, alcohol, and hydroxyl acids have stimulated investigations on their discovery, recombinant production, and stabilization [4]. In particular, L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) has been exploited in the asymmetric reduction of pyruvate to yield the enantiopure L-lactic acid in the context of microbial factories [5,6]. This NAD⁺-dependent oxidoreductase is highly stereospecific. However, it has been scarcely utilized in its isolated form for the production of L-lactic acid. To the best of our knowledge the only report on this application has been presented by Liu et al. [7].

An estimated worldwide demand for lactic acid of 130 000–150 000 tons per year and the ever growing demand of its pure enantiomer L-lactic acid, is fuelling improvements in the conventional fermentative and chemical lactic acid production processes for more efficient and sustainable methods [8]. Polymers of L-lactic acid have high optical purity and provide polylactic acids with high crystallinity and a high melting point which are used in food packaging, textiles, and biomedical devices [9]. The synthesis of the pure L-enantiomer is generally achieved by microbial fermentation. However, these processes often require costly and time consuming downstream processing which could be avoided through enzymatic synthesis [10]. For instance, a recent report on the preparation of L-lactic acid using *Bacillus coagulans* requires nine different downstream processing technologies to obtain the pure product [11]. The use of immobilized enzymes could have a dramatic impact on the downstream processing by obtaining pure L-lactic acid in only one step with the possibility of reutilizing the biocatalyst. Both advantages have a direct influence on the overall cost of the process.

However, enzymes are labile, a property that usually hampers in vitro studies, let alone their industrial utilization. Stability

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jmguisan@icp.csic.es (J.M. Guisan), betancor@ort.edu.uy (L. Betancor).

of enzymes is strongly dependent of their quaternary structure [12,13]. LDH is a 140 kDa tetrameric enzyme with monomers related by two perpendicular axes. Structural analyses have revealed that LDH tetramers can be treated as a dimer of dimers, due to differential chemical crosstalk between the monomers [14]. The architecture of the enzyme structure should be taken into consideration when addressing the stabilization of enzymes, as inactivation mechanisms for multimeric enzymes usually start by subunit dissociation [13,16,17].

The issue of enzyme stability has been tackled by many scientists with approaches that range from molecular biology to physico-chemical strategies, enabling the preservation of enzyme activity over time [18–21].

Enzyme immobilization is generally adopted as means to improve enzyme stability to meet industrial requirements. Apart from gaining stability, attachment of an enzyme to a support attracts attention as a strategy that also allows the reuse of the biocatalyst and facilitates the product separation of reaction mixtures [22,23]. Furthermore, it could improve the enzyme properties such as specificity or reduction of inhibitory effects [24].

The availability of enzymes with potential to replace conventional synthetic routes has encouraged the development of new strategies for enzyme immobilization [25–28]. However, enzyme immobilization lacks universality. Literature offers a great variety of physico-chemical tools to immobilize enzymes on solid surfaces, but each tool needs to be adapted accordingly [23]. In fact, many methods of immobilization cause significant structural deformation of an enzyme (leading to reduction in activity and stability) while contrarily stabilizing others [29]. Among the parameters affecting activity and stability in immobilized enzymes, the intensity of the interaction between the enzyme and the support plays a key role in the immobilization results [13,30]. Several previous studies have shown that a high number of enzyme/support linkages improve the enzyme structure rigidity which leads to increased stabilities towards inactivating factors (i.e. temperature, organic solvents, pH) [31,32]. Nevertheless, very strong interactions may impose structural constraints that lead to enzyme inactivation.

Glyoxyl-agarose has been used in the past for the immobilization and stabilization of a significant variety of enzymes, specifically, for multimeric enzymes as in the case of LDH [31,33]. It is an aldehyde functionalized support that reacts with deprotonated amino groups on the surface of the proteins. This implies that the conditions for immobilization should include a pH above pH 10 for deprotonation of amino groups from Lys residues (pKa 9.2). As most proteins expose a high number of the amine containing amino acid Lys on their surfaces, enzymes are immobilized on glyoxyl-agarose in a multipoint manner [34,35]. The reaction between aldehydes from the support and amines from the protein results in the formation of Schiff's bases which needs to be reduced to form a covalent linkage. This reduction step is crucial for the formation of a stable protein-support interaction but may affect the biological activity of the protein.

In this work, we aim to prepare an active and very stable immobilized derivative of L-LDH from rabbit muscle on glyoxyl-agarose. Our approach will include the fine tuning of the immobilization by controlling different parameters such as temperature, immobilization time, and presence of additives to achieve maximum activity and stability, furthermore, the evaluation of its operational stability in the conversion of pyruvate to L-lactic acid.

2. Materials and methods

L-lactate dehydrogenase from rabbit muscle Type II in ammonium sulfate suspension 800–1200 units/mg (LDH), formate dehydrogenase (FDH) from *Candida boidinii*, Polyethylenimine (PEI)

(Mw 1300), molecular weight marker, pyruvate and lactic acid standards for HPLC analysis, sepharose 6BCL, and polyethylene glycol (PEG) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Tetramethyl orthosilicate (TMOS) and trehalose were from MERCK (Whitehouse Station, NJ). Dibasic sodium phosphate and sodium acetate were from Biopack (Buenos Aires, Argentina). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was from AppliChem (Darmstadt, Germany). All other chemicals used were analytical grade reagents.

2.1. Determination of protein concentration

Protein concentration was determined by Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination [36] using the protocol recommended by the manufacturer with bovine serum albumin as a standard.

2.2. Determination of LDH enzyme activity

LDH activity from rabbit muscle was measured spectrophotometrically in a 2.5 mL reaction with pyruvate (0.8 mM) and NADH (0.2 mM) in sodium phosphate buffer (0.025 M, pH 7.0) at 25 °C. LDH solution (0.05 mL, 0.15 mg mL⁻¹) was then added. The solution was measured at 340 nm (ϵ M=6220 M⁻¹ m⁻¹) over 3 min.

Formate Dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically in a 2 mL reaction with 0.1 M formic acid and 5 mM NAD⁺ sodium phosphate buffer (0.025 M, pH 7.0) at 25 °C. FDH solution (0.05 mL, 0.02 mg mL⁻¹) was then added. The solution was measured at 340 nm (ϵ M=6220 M⁻¹ cm⁻¹) over 2 min. One enzyme unit (IU) was defined as the amount of enzyme able to consume 1 μ mol of substrate per minute in the above defined conditions.

2.3. Soluble LDH stability at pH 10.0

A solution of LDH (0.015 mg/mL) was incubated for 15 min in 0.1 M sodium bicarbonate pH 10.0 with each of the following solutions: 75, 150, 300 mM of trehalose, 0.1 mM NADH, 10 mM pyruvate and 5% PEG. Activity was measured at the beginning and end of experiment. Percentage of the remaining activity after 15 min was calculated to determine the stability of the enzyme.

2.4. Preparation of glyoxyl-agarose

Glyoxyl-agarose support was prepared as previously described in Guisán [37]. The concentration of glyoxyl groups was controlled by the addition of sodium periodate (each mol of this reactive generates one mol of glyoxyl groups).

2.5. Immobilization of LDH on glyoxyl-agarose

Immobilization was carried out by adding 1 g of support to a 10 mL solution of LDH (0.15 mg of soluble LDH in 0.1 M sodium bicarbonate pH 10.0) with each of the following solutions: 75, 150, 300 mM of trehalose, 0.1 mM NADH, 10 mM pyruvate and 5% PEG for 15 min at 24 °C. The incubation for the immobilized preparation with 300 mM of trehalose was also assayed for 16 h at 24 °C and 16 h at 4 °C. In all cases the derivative was reduced over 30 min with sodium borohydride (1 mg/mL). The immobilized preparation which was incubated at 15 min at 24 °C was alternatively reduced with a 0.1 mg/mL sodium borohydride solution in a volume of 100 mL of 0.1 M sodium bicarbonate pH 10.0. All immobilized preparations were washed twice with 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0.

Co-immobilization of LDH and formate dehydrogenase (FDH) was performed by adding 1 g of support to a 10 mL solution of FDH (0.2 mg of soluble FDH in 0.1 M sodium bicarbonate pH 10.0) at 4 °C for 1.5 h followed by 45 min at 24 °C. The solution was filtered and 10 mL of a solution of LDH was added (0.15 mg of soluble LDH

with 300 mM of trehalose in 0.1 M sodium bicarbonate pH 10.0) for 15 min at 24 °C. The derivative was then reduced over 30 min with sodium borohydride (0.1 mg/mL).

Immobilization percentage was defined as:

$$\%I = \frac{(\text{Initial activity} - \text{Activity in supernatant}) * 100}{\text{Initial activity}}$$

Immobilization yield was defined as:

$$\%I = \frac{(\text{Activity in immobilized preparation}) * 100}{\text{Initial activity} - \text{Activity in supernatant}}$$

2.6. Thermostability of LDH preparations

The different LDH preparations (soluble and immobilized) both of 0.13 IU were incubated in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 50 °C and 55 °C. Samples of soluble enzyme and the suspension were withdrawn at different time intervals and their residual activity was measured as previously described. Stabilization factor was calculated as the ratio of half-life of the immobilized preparation compared to the soluble enzyme.

2.7. pH effect on LDH stability

LDH preparations (soluble and immobilized, 15 min at 24 °C) were incubated in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, 7.0, and 8.0, 25 mM sodium acetate, pH 3.0, 4.0, and 5.0, and 25 mM sodium bicarbonate, pH 9.0, 10.0, and 11.0 at 25 °C. Samples of soluble enzyme and the suspension were withdrawn and their residual activity was measured as previously described after 1 h of incubation.

2.8. Determination of optimum temperature

For determining the optimum temperature of LDH preparations, activities were measured at different temperatures, in the range of 25–90 °C at pH 7.0. The optimum temperatures were tested by heating the buffer solutions to the corresponding temperatures. Once the equilibrium temperature was attained, LDH was added and the activity was measured as previously described.

2.9. Determination of optimum pH

Optimum pH to analyze the activity of LDH preparations was determined in the pH range of 3.0–11.0 by using 25 mM sodium phosphate buffer at pH 6.0, 7.0, and 8.0, 25 mM sodium acetate at pH 3.0, 4.0, and 5.0 and 25 mM sodium bicarbonate at pH 9.0 and 10.0.

2.10. Kinetics of LDH preparations

The reaction rates of LDH preparations were measured as previously described using a pyruvate concentration in the range of 0.025–0.75 mM. Results were adjusted to a Michaelis–Menten hyperbola by Graph Prism Software (GraphPad Software, Inc.) and Km and Vmax values were obtained.

2.11. LDH substrate inhibition

The activities of LDH preparations were measured as previously described using a pyruvate concentration in the range of 0.025–6 mM. Results were adjusted to a substrate inhibition curve using Graph Prism Software (GraphPad Software, Inc.) and the KI parameter was obtained.

2.12. Synthesis of lactic acid with immobilized LDH and co-immobilized LDH-FDH

Synthesis of L-lactic acid with immobilized LDH was performed in a reaction mixture containing 3 mM of pyruvic acid and 5 mM of NADH in 2 mL of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The reaction was then initiated by adding 0.2 g of immobilized LDH (1.3 IU/g).

Synthesis of L-lactic acid with co-immobilized LDH was performed in a reaction mixture containing 3 mM of pyruvic acid and 0.2 mM of NAD⁺, and 0.2 M of formic acid in 2 mL of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The reaction was then initiated by adding 0.2 g of co-immobilized LDH/FDH (1:4 IU LDH: IU FDH/g of support). Concentration of pyruvic acid and lactic acid was determined at various time points by HPLC with a reversed-phase HPLC column Ultra RP C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm, Restek) with an isocratic elution in 98.75% 0.05 M PBS, pH 2.5, 1.25% methanol with a flow rate of 0.8 mL/min. Detection was performed at 220 nm. Retention time for pyruvate and lactic acid was 3.6 and 5.4 min, respectively. Analysis of aliquots of the reaction mixture from different time points were compared to the calibration curves of Abs/concentration of standards of pyruvate and L-lactic acid (Fig. 1Sa and b)

2.13. Reusability assay

Glyoxyl-agarose immobilized LDH was reused fifteen times. Reactions were performed as described in Section 2.12 for 1 h. After each assay, the immobilized preparation was washed twice with 2 mL of 0.025 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 and a solution of 3 mM of pyruvic acid and 5 mM of NADH in 2 mL of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 was added for a new reaction cycle. The consumption of pyruvic acid was determined by HPLC as described in Section 2.12.

3. Results and discussion

3.1. Immobilization of L-LDH on glyoxyl-agarose

The structure of LDH seems to be an excellent candidate for stabilization through multipoint immobilization on glyoxyl-agarose as it contains numerous Lys on its surface that could react with the aldehyde groups of the support (Fig. 1). Unfortunately, our first attempt demonstrated that although immobilization occurred rapidly (15 min) the enzyme lost 92% of its activity after incubation with the support. Analysis of the controls under immobilized conditions proved that the enzyme was unable to resist at pH 10 which was necessary for the amine-aldehyde reaction. Generally, enzymes tend to be inactivated by extreme pH conditions due to the changes in the ionization of key residues involved in the catalysis or structure preservation. The structure of LDH is plastic as it involves important conformational rearrangements upon substrate binding and release [14,15]. Therefore, as in the case of other flexible enzymes, stability may be gained in the presence of substrates, and cofactors of additives [38]. When incubated in the presence of pyruvate, there was no contribution to its stability after 15 min (5.2 ± 0.2% residual activity), similar to what was achieved in the absence of the additive (6.1 ± 0.1), while the other additives investigated *viz* NADH, PEG, and trehalose provided a high stabilization (78.5 ± 0.5, 81.1 ± 1 and 98.5 ± 0.5, respectively, see Fig. 2S, Supplementary information) after 15 min of incubation at pH 10. The concentrations of additives used were similar to those used either in the activity assay (NADH and pyruvate) or based on previous reports of stability studies of LDH (trehalose and PEG) [39–42]. Immobilization on glyoxyl-agarose was then performed in the presence of all the additives which were stud-

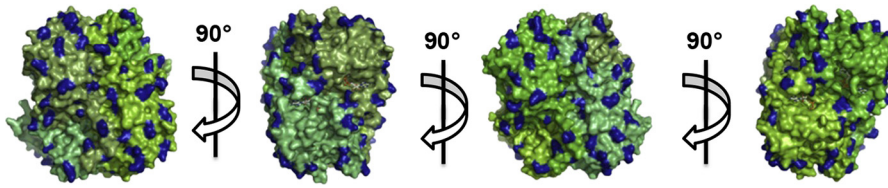


Fig. 1. Crystal structure of the L-LDH. Structure from Protein Data Bank (PDB code 3H3F). Lys residues are shown in blue. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Immobilization on L-LDH in glyoxyl-agarose with additives.

Additive	I (%)	Y (%)
Control	93.0 ± 1	6.0 ± 0.5
Trehalose ^a	80.3 ± 1.3	18.0 ± 1.0
NADH ^a	98.0 ± 1.0	13.8 ± 0.2
Pyruvate ^a	100.0 ± 0.5	2.5 ± 0.2
PEG ^a	98.8 ± 1.0	10.1 ± 1.2

I, immobilization, Y, Yield.

^a Concentrations of all additives are indicated in experimental section.

Table 2
Immobilization of L-LDH in glyoxyl-agarose with different concentrations of trehalose.

Trehalose (mM)	I (%)	Y (%)
75	97.3 ± 1.0	6.0 ± 0.3
150	80.3 ± 1.3	18.0 ± 1.0
300	94.7 ± 1.0	30.6 ± 0.2
300 ^a	90.1 ± 2.0	72.0 ± 0.1

I, immobilization, Y, Yield.

^a Reduction was performed with 0.1 mg/mL sodium borohydride instead of 1 mg/mL.

ied for the soluble enzyme. High immobilization percentages were obtained in all cases after a rapid attachment process (Table 1). However, the amount of enzyme remaining active after immobilization varied with the additives. The best immobilization yield (Y) (18.0 ± 1.0%) was obtained using trehalose. Aiming to improve this yield in the immobilized preparations, we studied additional trehalose concentrations during immobilization (Table 2). A concentration of 300 mM of trehalose allowed an activity recovery of 30.6 ± 0.2% that was improved up to 72 ± 0.1% after modifying the reduction protocol by using 0.1 mg/mL NaBH₄ instead of 1 mg/mL and increasing the dilution up to 10 times that of the immobilized preparation during reduction. The result for a yield above 70% is similar to the one obtained by Patel and co-workers [43–45]. This report is amongst the few that studied the remaining activity of the enzyme after attachment to a support in LDH immobilization, whereas, most of the works focused on its integration on biosensors and the performance of the final device.

3.2. Thermal stability of different L-LDH immobilized and soluble preparations

Previous studies on variables such as contact time between the enzyme and the support or temperature of incubation have displayed a key role in the stabilization of diverse enzymes immobilized on glyoxyl-agarose [46]. Even if the enzymes are quickly attached to the matrix, additional enzyme support linkages are formed when the immobilized preparations are kept at pH 10 for additional periods of time. Increased temperatures also facilitate a high number of interactions during the immobilization. The intensity of attachment is therefore increased through multiple enzyme support linkages which rigidify the enzyme structure and may prevent negative structural rearrangements that typi-

Table 3
Immobilization on L-LDH in glyoxyl-agarose under different conditions.

Conditions	I (%)	Y (%)
15 min 4 °C	76.0 ± 2.0	72.0 ± 0.1
15 min 25 °C	88.6 ± 0.1	30.6 ± 0.4
16 h 25 °C	96.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2
16 h 4 °C	98.2 ± 0.6	50.0 ± 0.1

I, immobilization, Y, Yield.

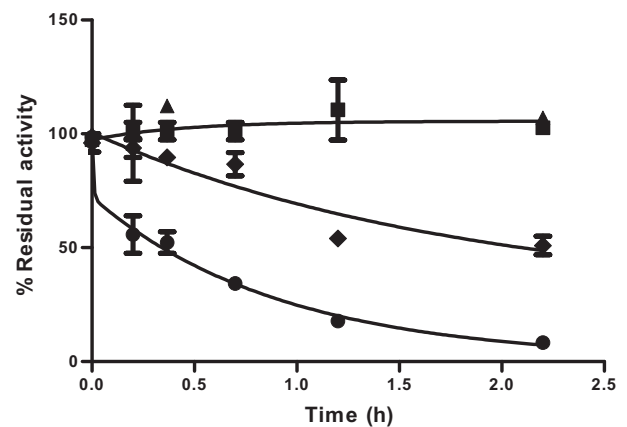


Fig. 2. Thermostability of LDH of L-LDH-glyoxyl derivatives at 50 °C. Free enzyme (●), derivate incubated 15 min 25 °C (▲), derivate incubated 16 h at 4 °C (■) and derivate incubated 15 min at 4 °C (◆).

cally lead to inactivation of the enzyme. In view of these previous findings, we studied how different conditions like immobilization time and temperature affect both the enzyme activity and stability (Table 3). Incubation at 25 °C during 16 h was completely deleterious for the enzyme. However, we obtained three immobilized preparations with recovered activities above 30%. Stability assays were performed at 50 °C to establish the half-life of the soluble and immobilized enzyme within a short period of time, these preparations showed an increased thermostability of immobilized LDH compared to the soluble enzyme (Fig. 2). The experimental data was fitted using the exponential model from Henley and Sadana [47]. The most unstable immobilized preparation (15 min, 4 °C) was 7 times more stable than its soluble counterpart. However, this immobilized derivative demonstrated lesser stability than the preparations incubated at 25 °C for 15 min and 16 h at 4 °C. As expected, the enzyme stability strongly depended on the intensity of the enzyme-support attachment. The assay was repeated with a higher temperature in search of a difference between the half-lives of the two most stable preparations. At 55 °C, the half-lives of the preparations were 2 min for the soluble enzyme, 216 min for the enzyme immobilized at 4 °C, and 2880 min for the enzyme immobilized at 25 °C. These results proved that immobilization at 4 °C drove an enzyme to be 120 times more stable than the soluble whereas the immobilization at 25 °C achieved a significant stabilization of 1600 times compared to the soluble enzyme (Fig. 3).

Table 4
Stabilizations obtained for L-LDH immobilized preparations.

Support	Strategy	Stability ^a	Conditions	Stabilization factor ^b	Application	Reference
TEOS sol-gel	Physical adsorption	30 days	4 °C, pH 7.5	ND	Lactate biosensor	[40]
Ultra bind film	Covalent attachment	8 weeks	4 °C, pH 7.0	ND	Lactate biosensor	[41]
Polyaniline films	Physical adsorption	2 weeks	4–10 °C, pH 7.0	ND	Lactate biosensor	[42]
DWCNT-ALG	Adsorption, encapsulation and cross-linking	4 weeks	4 °C, pH 7.0	ND	ND	[43]
Magnetic nanoparticles	Covalent attachment	ND	25 °C, pH 7.0	~1.4	Potential in Biological and clinical applications	[44]
Si-Mag	Covalent attachment	ND	45 °C, pH 7.2	5–7	Potential in Biocatalysis	[35]
Glyoxyl	Multicovalent attachment	2 days	55 °C, pH 7.0	1600	Potential in Biocatalysis	Present work

Si-Mag, silica-coated magnetic nanoclusters, DWCNT-ALG, double-walled carbon nanotube-doped alginate gel.

^a Reported as the time enzyme maintains over 50% of its initial activity.

^b Compared to free enzyme.

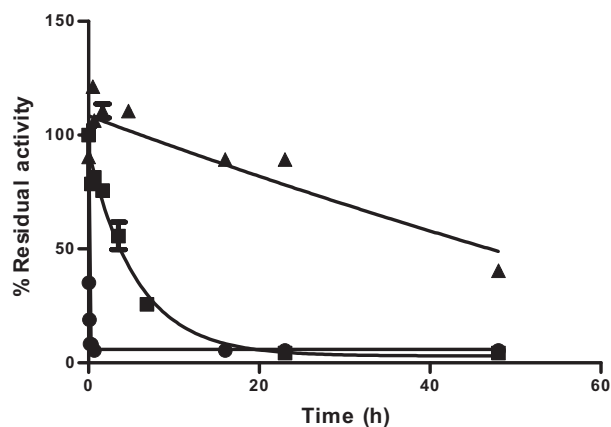


Fig. 3. Thermostability of L-LDH-glyoxyl derivatives at 55 °C. Free enzyme (●), Derivate incubated 15 min 25 °C (▲) and derivate incubated 16 h at 4 °C (■).

To the best of our knowledge, this is the highest stabilization achieved on LDH (Table 4). Most of the previous reports on LDH immobilization refer to storage stability studies in view of its application as a lactate sensor. Stability factors for those studies in which the enzyme was immobilized for biocatalytic conversions were below 10 compared to the soluble enzyme (Table 4). However, the analysis of results in Table 4 regarding stabilization should consider that the assay conditions were more dramatic when compared to the other two preview reports. These work conditions were established to accomplish a rapid inactivation of the soluble enzyme.

Multimeric enzymes normally undergo a denaturing path that starts with the dissociation of subunits [13]. Preparation of immobilized enzyme by multipoint covalent immobilization could not only rigidify the enzyme structure but also prevent the dissociation of subunits that might be attached to the support.

Furthermore, in this context, thermal stability of multimeric enzymes is frequently dependent on the protein concentration as higher dilutions provoke a shift in the structural equilibrium towards the dissociated state. It is worth noting that even though LDH is a tetramer, when the immobilized enzyme was diluted 20 times and incubated at 50 °C, it showed no dependence on the thermal stability with the change in concentration (data not shown). Nevertheless, since it has been studied that pH and temperature can affect subunit dissociation, it could be worth studying the release of enzyme units from the support as it is unlikely that all enzyme subunits are attached to the agarose.

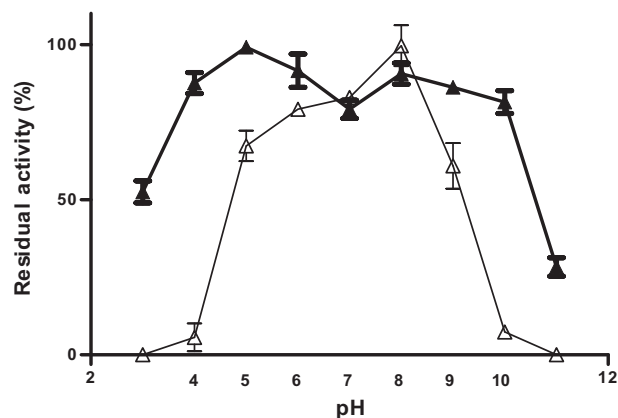


Fig. 4. pH effect on L-LDH stability. Free enzyme (Δ) and optimized immobilized preparation of L-LDH (▲). Incubation at different pH was carried out at 25 °C during 1 h.

3.3. Stability of the optimally immobilized LDH against other inactivating agents

The immobilized enzyme at 25 °C for 15 min was selected as the optimal derivative for further experiments. We first studied the behavior of the soluble and immobilized preparations at different pH as resistance towards extreme pH may amplify the possible applications of the immobilized LDH. As seen in (Fig. 4) immobilization of LDH on glyoxyl-agarose also provided stabilization against pH. Incubation of the soluble and immobilized enzyme for 1 h at 25 °C at different pH showed a bimodal behavior, wherein, residual activity seemed less at pH 7.0 and pH 8.0. but there was significant resistance towards various extreme pH by the immobilized preparation. This effect was especially significant at pH 3.0, pH 4.0, and pH 10.0. This result is particularly important for possible biocatalytic applications, wherein, the enzyme is required to function in environments with varying pH. Additionally, it expands the possibility of applications of immobilized LDH in biosensing under harsh pH conditions. Such a heterogeneous biocatalyst presents the ability of being coupled with enzymes from either acidophilic or alkaliphilic origins due to their broad spectrum of pH tolerance, this feature eases the integration of this immobilized LDH into multienzyme cascades with pH restrictions as the one described by Rosini et al. [48].

Enzyme immobilization in addition may increase stability against organic solvents. Wang et al. [49] reported a multienzyme catalytic system involving LDH that uses carbon dioxide and ethanol to produce L-lactate. In this context we decided to test the

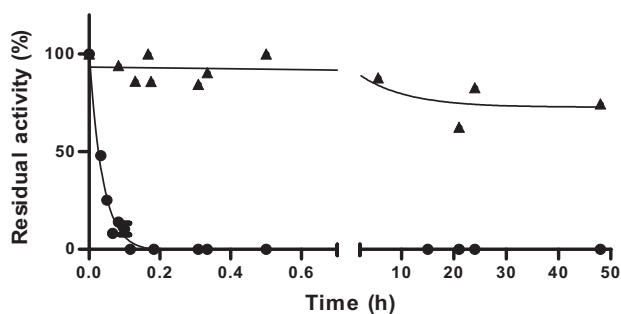


Fig. 5. Stability of L-LDH preparations in the presence of 30% ethanol. Free enzyme (●) and optimized immobilized preparation of L-LDH (▲). Stability was carried out at 25 °C and pH 7.0.

immobilized preparation in the presence of ethanol. Fig. 5 shows the inactivation of free and immobilized LDH at 25 °C in aqueous mixtures of ethanol, with a co-solvent content of 30% (v/v). The experimental data was fitted using an exponential model. Stabilization against ethanol was as significant as the thermo-stabilization provided by the immobilization strategy used in this work. The activity of the soluble enzyme in the presence of ethanol was completely inactivated within 10 min, whereas, the immobilized LDH preserved more than 50% of its activity after 48 h (Fig. 5).

3.4. Kinetic parameters and optimal parameters of immobilized LDH

Evaluation of the kinetic parameters of the free and immobilized enzyme demonstrated no significant changes in the K_m values, being 0.13 ± 0.011 mM 0.1328 ± 0.017 mM for the soluble and immobilized enzyme, respectively. This result indicated the absence of mass transfer problems in the immobilized preparation which is advantageous for applied purposes. The value of k_{cat} was decreased after immobilization from 276.5 ± 7.4 s⁻¹ to 170.7 ± 8.2 s⁻¹, in accordance with the loss in activity which occurred during the immobilization process (Fig. 3S Supplementary information).

The structure of the LDH is highly dynamic with an active site loop that switches between an open and closed conformation, both in the absence and presence of substrates. Alteration of the enzymatic structure may easily cause a decrease in the catalytic performance of the enzyme. Nevertheless, in the immobilized preparation developed herein, we have been able to provide stabilization by structural rigidification without compromising the catalytic parameters of the biocatalyst.

Substrate inhibition by pyruvate has been reported in the past for LDH. This inhibition is related to the formation of an enzyme-pyruvate-NAD⁺ complex. A study of the inhibition constant for pyruvate in the soluble and immobilized preparations demonstrated an increased K_I for the immobilized LDH (5.66 ± 0.97 mM) with respect to that of the soluble enzyme (3.29 ± 0.36 mM) (Fig. 4S supplementary information). This phenomenon was proposed to be correlated to a mechanism of steric hindrance by Yusdy et al. [43]. In this context, the interaction with the support or the orientation of the immobilized enzyme could be involved in the reduction of this steric hindrance which resulted in a higher K_I . Analysis of the optimal pH and temperature of the soluble and immobilized LDH showed no significant differences. Optimal pH was 7.0 which was consistent with data provided in the literature (Fig. 6A). A range of optimal T between 45–55 °C was observed for both preparations (Fig. 6B). It was thus possible to test the immobilized LDH in various acidic pH and extreme T such as 90 °C attributing to the stabilization provided by immobilization. In the light of these results, we suggest that immobilization has a negligible effect on the catalytic performance of L-LDH while having a significant impact on its stability.

It is worth mentioning that although enzyme precipitation in the soluble samples were not noticed, aggregation that affected the results for the soluble enzyme may have occurred under our experimental conditions [13]. This effect is avoided after enzyme immobilization.

3.5. Synthesis of lactic acid with immobilized LDH

The optimized derivative was tested in the biosynthesis of L-lactic acid from pyruvate in a batch reactor. The conversion of pyruvic acid into lactic acid by immobilized LDH can be seen in Fig. 7. The immobilized preparation was able to convert $80.5 \pm 2.5\%$ of a 3 mM solution in 1 h and the results were consistent upon 15 reuses of the immobilized catalyst (Fig. 5S). Considering the enzyme units incubated in the reaction, a complete conversion should have been achieved within 25 min of the reaction (see Section 2). Further optimization of the reaction design is needed in order to improve this conversion. The success obtained in the operational stability of the enzymatic synthesis of L-lactic acid with the immobilized LDH prepared opened up numerous possibilities for further studies of this bioconversion.

3.6. Synthesis of lactic acid with co-immobilized LDH-FDH

Considering the high cost of the cofactor NADH compared to NAD⁺, we co-immobilized a widely used cofactor regenerator enzyme, FDH, along with LDH. Co-immobilization of LDH and FDH

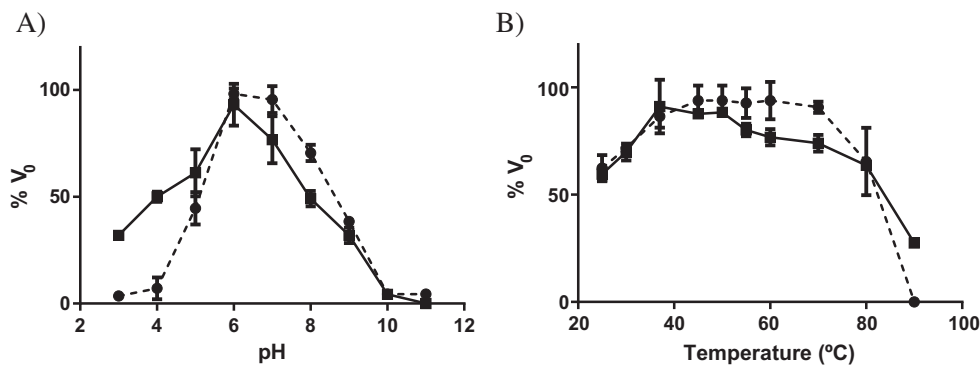


Fig. 6. Optimum pH and Temperature for L-LDH preparations. A) Activity vs pH profile. Free enzyme (●) and optimized immobilized preparation of L-LDH (■). Experiments were carried at 25 °C. B) Activity vs Temperature profile. Free enzyme (●) and optimized immobilized preparation of L-LDH (■). Experiments were performed at pH 7. Buffers used in this study: 25 mM sodium acetate for pH 3–5, 25 mM sodium phosphate for pH 6–8 and 25 mM sodium bicarbonate for pH 9–11.

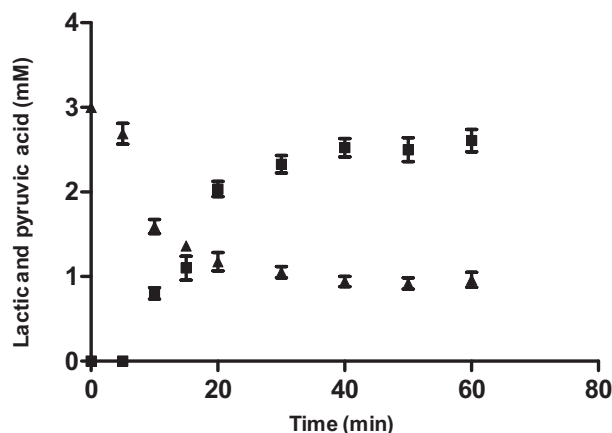


Fig. 7. Conversion of pyruvic acid into L-lactic acid by immobilized LDH. Pyruvic acid (▲) and Lactic acid (■). Synthesis of L-lactic acid was performed by adding 0.2 g of immobilized LDH to a reaction mixture containing 3 mM of pyruvic acid and 5 mM of NADH in 25 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 at 25 °C for 5 h. Concentration of pyruvic acid and lactic acid was determined at various times by HPLC.

was performed using the optimized protocol for LDH and presented a% I of 90.1 ± 2 and 96.0 ± 7.0 and a% Y of 72.0 ± 0.1 and 50.0 ± 4.0 for LDH and FDH, respectively. Preliminary results showed that the immobilized preparation was able to convert 74% of a 3 mM solution in 1 h.

4. Conclusion

Multipoint covalent immobilization has proved successful in the preparation of immobilized derivatives of LDH with unprecedented stabilization factors of 1600 when compared to the soluble enzyme. An engineering approach that studied diverse conditions during immobilization facilitated the preparation of highly active and stable LDH immobilized derivatives of 1.3 IU/g with a percentage of immobilization of 90.1 ± 2.0 and an immobilization yield of 72.0 ± 0.1 . The chemistry used in the immobilization strategy could be easily extrapolated to other materials apart from agarose. This fact together with the high stabilization provided against temperature, pH, and organic solvents, and its performance in the bioconversion of L-lactic acid augment the possibilities of utilization of glyoxyl-LDH in sensing devices or biocatalytic processes.

Acknowledgements

We would like to thank IKERBASQUE, Basque foundation for Science for the funding of F. López-Gallego, the National Agency of Research and Innovation (ANII, Uruguay) for funding E. Jackson, PEDECIBA and Universidad ORT Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.001>.

References

- [1] S. Thitprasert, S. Sooksai, N. Thongchul, In vivo regulation of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae* to improve L-lactic acid fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164 (2011) 1305–1322.
- [2] N. Nesakumar, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, J.B.B. Rayappan, Fabrication of lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized on cerium oxide nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 410 (2013) 158–164.
- [3] C.M. Nealon, M.M. Musa, J.M. Patel, R.S. Phillips, Controlling substrate specificity and stereospecificity of alcohol dehydrogenases, *ACS Catal.* 5 (2015) 2100–2114.
- [4] N.G. Karagüler, R.B. Sessions, B. Binay, E.B. Ordu, A.R. Clarke, Protein engineering applications of industrially exploitable enzymes: *Geobacillus stearothermophilus* LDH and *Candida methylica* FDH, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1610–1615.
- [5] K.T. Koivuranta, M. Ilmén, M.G. Wiebe, L. Ruohonen, P. Suominen, M. Penttilä, L-lactic acid production from D-xylose with *Candida sonorensis* expressing a heterologous lactate dehydrogenase encoding gene, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 107.
- [6] C. Gao, W. Zhang, C. Ma, P. Liu, P. Xu, Kinetic resolution of 2-hydroxybutanoate racemic mixtures by NAD-independent L-lactate dehydrogenase, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 4595–4599.
- [7] W. Liu, S. Zhang, P. Wang, Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with in situ cofactor regeneration, *J. Biotechnol.* 139 (2009) 102–107.
- [8] T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar, T. Aqil, Z. Zulfiqar, A. Tariq, M. Kamran, N. Ehsan, S. Mehmood, Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7 (2014) 222–229.
- [9] A. Pellis, E.H. Acero, H. Weber, M. Obersriebnig, R. Breinbauer, E. Srebotnik, G.M. Guebitz, Biocatalyzed approach for the surface functionalization of poly(L-lactic acid) films using hydrolytic enzymes, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1739–1749.
- [10] L.V. Reddy, Y.-M. Kim, J.-S. Yun, H.-W. Ryu, Y.-J. Wee, L-lactic acid production by combined utilization of agricultural biosources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1, *Bioresour. Technol.* 209 (2016) 187–194.
- [11] A.-K. Neu, D. Pleissner, K. Mehlmann, R. Schneider, G.I. Puerta-Quintero, J. Venus, Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure l(+)-lactic acid production, *Bioresour. Technol.* 211 (2016) 398–405.
- [12] A. Ausili, A. Vitale, T. Labella, F. Rosso, A. Barbarisi, J.C. Gimenez-Fernandez, S. D'Auria, Alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: stability at high temperature, *Arch. Biochem. Biophys.* 525 (2012) 40–46.
- [13] R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation, *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 405–418.
- [14] K. Świderek, I. Tuñón, S. Martí, V. Moliner, Protein conformational landscapes and catalysis. influence of active site conformations in the reaction catalyzed by L-lactate dehydrogenase, *ACS Catal.* 5 (2015) 1172–1185.
- [15] K. Świderek, A. Panczakiewicz, A. Bujacz, G. Bujacz, P. Paneth, Modeling of isotope effects on binding oxamate to lactate dehydrogenase, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 12782–12789.
- [16] L. Betancor, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, V. Rodríguez, M. Fuentes, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: stabilization of D-amino acid oxidase, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 784–788.
- [17] V.M. Balcão, M.M.D.C. Vila, Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 93 (2015) 25–41.
- [18] J.C.Y. Wu, C.H. Hutchings, M.J. Lindsay, C.J. Werner, B.C. Bundy, Enhanced enzyme stability through site-directed covalent immobilization, *J. Biotechnol.* 193 (2015) 83–90.
- [19] V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, J. Damborsky, Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents, *ACS Catal.* 3 (2013) 2823–2836.
- [20] C.A. Denard, H. Ren, H. Zhao, Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 25C (2015) 55–64.
- [21] L. Betancor, G.R. Johnson, H.R. Luckarift, Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts, *ChemCatChem* 5 (2013) 46–60.
- [22] R.A. Sheldon, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289–1307.
- [23] J.C.S. dos Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes, *ChemCatChem* 7 (2015) 2413–2432.
- [24] J. Rocha-Martin, A. Acosta, J. Berenguer, J.M. Guisán, F. Lopez-Gallego, Selective oxidation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by covalently immobilized glycerol dehydrogenases with higher stability and lower product inhibition, *Bioresour. Technol.* 170 (2014) 445–453.
- [25] L. Qiao, B. Lv, X. Feng, C. Li, A new application of aptamer: one-step purification and immobilization of enzyme from cell lysates for biocatalysis, *J. Biotechnol.* 203 (2015) 68–76.
- [26] D.I. Bezbradica, C. Mateo, J.M. Guisán, Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102 (2014) 218–224.
- [27] J.Y. Lee, H.Y. Shin, J.H. Lee, Y.S. Song, S.W. Kang, C. Park, J.B. Kim, S.W. Kim, A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59 (2009) 274–278.
- [28] J.C.S. dos Santos, N. Rueda, R. Torres, O. Barbosa, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties, *Process Biochem.* 50 (2015) 918–927.
- [29] S.V. Rao, K.W. Anderson, L.G. Bachas, Oriented immobilization of proteins, *Mikrochim. Acta.* 128 (1998) 127–143.
- [30] J.C.S. dos Santos, N. Rueda, O. Barbosa, J.C. Fernández-Sánchez, A.L. Medina-Castillo, T. Ramón-Márquez, M.C. Arias-Martos, M.C. Millán-Linares, J. Pedroche, M. del M. Yust, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to

- immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin, RSC Adv. 5 (2015) 20639–20649.
- [31] C. Mateo, J.M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, B.C.C. Pessela, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, Enzyme Microb. Technol. 39 (2006) 274–280.
- [32] J.M. Bolivar, L. Wilson, S.A. Ferrarotti, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, C. Mateo, Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports, Biomacromolecules 7 (2006) 669–673.
- [33] O.L. Tavano, R. Fernandez-Lafuente, A.J. Goulart, R. Monti, Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme, Process Biochem. 48 (2013) 1054–1058.
- [34] C.A. Godoy, B. de las Rivas, J.M. Guisán, Site-directing an intense multipoint covalent attachment (MCA) of mutants of the *Geobacillus thermocatenulatus* lipase 2 (BTL2): Genetic and chemical amination plus immobilization on a tailor-made support, Process Biochem. 49 (2014) 1324–1331.
- [35] J.M. Guisan, New opportunities for immobilization of enzymes, Methods Mol. Biol. 1051 (2013) 1–13.
- [36] R.E. Brown, K.L. Jarvis, K.J. Hyland, Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances, Anal. Biochem. 180 (1989) 136–139.
- [37] J. Guisán, Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, Enzyme Microb. Technol. 10 (1988) 375–382.
- [38] C. Vásquez, D. Anderson, M. Oyarzún, A. Carvajal, C. Palma, Method for the stabilization and immobilization of enzymatic extracts and its application to the decolorization of textile dyes, Biotechnol. Lett. 36 (2014) 1999–2010.
- [39] N.K. Jain, I. Roy, Effect of trehalose on protein structure, Protein Sci. 18 (2009) 24–36.
- [40] S. Rawat, C. Raman Suri, D.K. Sahoo, Molecular mechanism of polyethylene glycol mediated stabilization of protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 392 (2010) 561–566.
- [41] K. Kawai, T. Suzuki, Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage, Pharm. Res. 24 (2007) 1883–1890.
- [42] S. Kolappan, D.L. Shen, R. Mosi, J. Sun, E.J. McEachern, D.J. Vocadlo, L. Craig, Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 71 (2015) 185–195.
- [43] S.R. Patel, M.G.S. Yap, D.I.C. Wang, Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds, Biochem. Eng. J. 48 (2009) 13–21.
- [44] H.K.W. Kallwass, W. Parris, E.L.A. Macfarlane, M. Gold, J.B. Jones, Site-specific immobilization of an L-lactate dehydrogenase via an engineered surface cysteine residue, Biotechnol. Lett. 15 (1993) 29–34.
- [45] J.M. Bolivar, J. Rocha-Martín, C. Mateo, J.M. Guisan, Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques, Process Biochem. 47 (2012) 679–686.
- [46] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, Enzyme Microb. Technol. 40 (2007) 1451–1463.
- [47] J.P. Henley, A. Sadana, Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism, Enzyme Microb. Technol. 7 (1985) 50–60.
- [48] E. Rosini, C. Allegretti, R. Melis, L. Cerioli, G. Conti, L. Pollegioni, P. D'Arrigo, Cascade enzymatic cleavage of the β -O-4 linkage in a lignin model compound, Catal. Sci. Technol. 6 (2016) 2195–2205.
- [49] X. Tong, B. El-Zahab, X. Zhao, Y. Liu, P. Wang, Enzymatic synthesis of L-lactic acid from carbon dioxide and ethanol with an inherent cofactor regeneration cycle, Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 465–469.



Cellulose-Based Nanosupports for Enzyme Immobilization

41

Erienne Jackson, Sonali Correa, and Lorena Betancor

Contents

1	Introduction	1236
2	Cellulose Architectures for Enzyme Immobilization	1237
2.1	Natural Cellulose Supports for Enzyme Immobilization	1237
2.2	Microfibrillated Cellulose	1238
2.3	Cellulose Nanocrystals	1238
2.4	Bacterial Cellulose Nanosupports	1239
2.5	Electrospun Cellulose	1239
2.6	Synthetic Supports	1241
3	Strategies for the Immobilization of Enzymes in Cellulose-Based Nanocarriers	1241
3.1	Immobilization by Cross-Linking	1241
3.2	Immobilization by Physical Adsorption	1243
3.3	Covalent Immobilization	1244
3.4	Combined Strategies	1245
3.5	Immobilization by Entrapment	1247
4	Cellulose-Based Nanobiocatalysts at Work	1247
4.1	Biomedical Applications	1247
4.2	Food Applications	1249
4.3	Environmental Applications	1249
5	Conclusion	1250
	References	1250

Abstract

Integration of biocatalysts and nanoscale materials offer multiple advantages over micro-scaled heterogeneous biocatalysts. Apart from providing reusability and sustainability of the enzyme, the use of nanosupports is aimed at increasing

E. Jackson · S. Correa · L. Betancor (✉)
Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay,
Montevideo, Uruguay
e-mail: betancor@ort.edu.uy

© Springer Nature Switzerland AG 2019
Md. I. H. Mondal (ed.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*,
Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series,
https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_42

1235

the surface area available for biocatalyst immobilization and improving the yields in bioconversions through better biocatalyst mobility and less diffusional problems. Among many nanomaterials for enzyme immobilization, cellulose stands out as biocompatible, biodegradable, and environmentally-friendly regarding its biological source. In this chapter, we discuss the steady advancement in utilizing different nanostructured cellulosic materials for enzyme immobilization. We address the use of hybrid materials that include cellulose and improve the properties of the heterogeneous biocatalyst. The methodologies for functionalization and integration of enzymes on nanocellulose hydrogels are discussed including covalent linkage through chemical modification, entrapment, and cross-linking. We consider its applications to biomedicine, food industry, and environmental science with a special emphasis on the impact of the enzymatic properties caused after immobilization on cellulosic supports.

Keywords

Enzyme immobilization · Cellulose · Nanosupports · Biocatalysis · Nanobiotechnology

1 Introduction

Nanobiocatalysis is a new frontier of emerging nanosized material supports in enzyme immobilization application. Enzymes are remarkable biocatalysts and have been used in biotechnology for many years because of their interesting characteristics such as substrate and product specificity, ease of preparation, and ability to function under mild conditions with no toxic by-products for more environmentally-friendly conversions.

Enzyme association to insoluble materials, commonly known as enzyme immobilization, provides a number of advantages to the applied use of enzymes: immobilized enzymes can be reused, minimizes costs and time of analysis, facilitates the continuous use of the biocatalyst, and may improve enzyme properties such as operational or thermal stability [1, 2]. A wide variety of techniques are now available for the preparation of immobilized enzymes that may include chemical or physical mechanisms, addition of aiding agents during immobilization, or combination of different strategies to obtain more active and stable preparations. Moreover, investigations on material science have contributed with a plethora of new supports compatible with enzyme activity and better physical and mechanical properties. Such is the case of nanosupports, rapidly adopted for enzyme immobilization, as they reduce diffusion limitations and maximize the functional surface area to increase enzyme loading. Active immobilized enzymes in nanomaterials, also known as nanobiocatalysts, have been studied for a wide variety of applications [3].

Cellulose, as a natural polymer resource is abundant, renewable, and biocompatible and has gained interest due to its optical, mechanical, chemical, and rheological properties that make it suitable for materials applications, actuators/sensors, drug delivery systems, biomedical science, and biotransformations [4]. As it is produced

from plants and bacteria, the nature of its structure varies and offers numerous possibilities for the attachment of enzymatic molecules and functionalization with non-natural reactive groups which further expands the possibility of associating biocatalysts to its structure. It was only in the last 10 years that researchers were able to develop and study strategies for the preparation of cellulose-based nanostructures. These studies have rampaged from a mere 4 articles in 2006 and 2007 related to “nanocellulose” to 365 articles published in 2016 (source Scopus). The recent interest on these materials is not fortuitous but the result of a slow unveiling of the opportunities that this material has on biotechnological applications. It is therefore timely to revise the piled evidence of nanocellulose materials that have been used in the immobilization of enzymes, the different methodological approaches to obtain them and their suitability for biocatalytic applications with a view of the future impact of these composites in biocatalysis.

2 Cellulose Architectures for Enzyme Immobilization

There are a number of cellulose nanostructures able to support enzyme immobilization: cellulose nanofibers (CNF), which can be electrospun, microfibrillated cellulose (MFC), nanocrystalline cellulose (CNC), or bacterial nanocellulose (BC). CNF can be produced from both cellulose I source, such as wood fibers, cotton, and agricultural crops, and cellulose II source, such as lyocell fibers using various techniques such as grinding, high-pressure homogenization, and sonication. There are four different polymorphs of cellulose: cellulose I, II, III, and IV. Cellulose I, native cellulose, is the form found in nature, and it occurs in two allomorphs, I α and I β . Cellulose II, or regenerated cellulose, the most stable crystalline form, emerges after recrystallization or mercerization with aqueous sodium hydroxide. The major distinction between these two forms of cellulose lies in the layout of their atoms: cellulose II has antiparallel packing, whereas the chains in cellulose I run in a parallel direction. Finally, cellulose III $_I$ and III $_{II}$ are obtained by ammonia treatment of cellulose I and II, respectively, and with the modification of cellulose III with glycerol, cellulose IV is finally produced [5].

The isolation of cellulose from its sources can be carried out by top-down or bottom-up method. The bottom-up approach is used to process material from small molecules into complex structures [6]. The top-down method usually involves various mechanical, chemical, and biological treatments, or a combination of two or more methods which is used for the removal of plant constituents apart from cellulose.

2.1 Natural Cellulose Supports for Enzyme Immobilization

Natural sources of cellulose could be generalized as rigid and partially crystalline. Cellulose is the main constituent in the most abundant organic compound on earth, especially within wood and natural fibers (kenaf, palm, cotton, hemp, flax, etc.). Almost 65–70% of cellulose compound is contained in plant fibers and comprised C,

H, and O elements [1, 7, 8]. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) is a lignocellulosic fiber having a high cellulose content, low specific gravity, and good mechanical properties along with good chemical characteristics, large surface area, and low coefficient thermal expansion. The isolation process of kenaf raw bast fiber has been done by using combinations of chemical and physical treatments which can remove matrix substances such as lignin and hemicellulose, and disintegrate the micron-sized cellulose fiber into nanofiber [9]. This process results in changes in the appearance of the material from micron-sized to nanosized fibers. It is organized as web-like network structure with long entangled cellulosic filaments with an average diameter ranged as less than 100 nm right up to less than 10 nm depending on the ultrasonication output power. Thus, ultrasonication disintegration plays an important role in the determination of the diameter of the fiber. The nanofibril has been successfully observed as an individual wire-like fiber [10], arranged in longitudinal direction as aggregated fibers with high specific surface area and strong association due to interfiber hydrogen bonding between hydroxyl groups of adjacent fibers.

2.2 Microfibrillated Cellulose

Microfibrillated cellulose (MFC) is a material derived by disintegrating digested cellulose through a homogenizing process in a reciprocating motion producing a high pressure drop. The strategy results in shearing and impact forces that in turn expose microfibrils regardless of the starting material [11]. The production of MFC by fibrillation of cellulose fibers involves intensive mechanical treatment. Additionally, it could involve prior chemical treatments to purify the cellulose depending on the raw material. MFC consists of aggregates of cellulose microfibrils. Its diameter is in the range 20–60 nm and it has a length of several micrometers. If we consider that the microfibrils have a 2–10 nm-thick fibrous cellulose structure and a length of several tens of microns, then MFC is composed of 10–50 microfibrils [5]. The raw materials and fibrillation techniques dictate the cellulose degree of polymerization, morphology, and nanofiber aspect ratio. MFC can further be subclassified depending on the treatment it undergoes. On transverse cleavage of the microfibrils along the amorphous regions and subsequent sonication, they form rod-like structures called “cellulose whiskers” with a typical diameter of 2–20 nm and wide length distribution of 100–600 nm. Their almost perfect crystalline arrangement makes them a potential reinforcing material [12].

2.3 Cellulose Nanocrystals

Cellulose nanocrystals (CNCs) are rod-like cellulose nanomaterials that can be economically prepared from various cellulosic materials by the elimination of amorphous regions of cellulose. This material is interesting as a nanofiller due to its nanoscale dimensions, high specific area, and highly rigid crystalline structure [11, 13]. Generally, CNCs are formed upon the elimination of disordered or amorphous regions of cellulose through several strategies, including acid hydrolysis,

microfluidization, and TEMPO-mediated oxidation. BC and cotton linter cellulose long fiber (CLC) can also produce cellulose nanocrystals (CNC) [14]. Reports from Roman et al. have shown that CNCs are much safer than other nanomaterials in use in biomedicine as targeted drug delivery systems. They have been used to immobilize various enzymes such as lysozyme, papain, and glucose oxidase [4, 13, 15]. The CNC-CLC and CNC-BC showed higher loading capacity of the protein, enhanced stability and activity, and overall a potential support for application in biomedicine, bioelectronic, and biocatalytic fields.

2.4 Bacterial Cellulose Nanosupports

Cellulose synthesized by bacteria is called bacterial cellulose (BC) or sometimes microbial cellulose and is obtained as a gel-like three-dimensional mat formed by entangled nanofibrils of cellulose [16]. Different from cellulose from wood pulp, BC is devoid of other contaminating polysaccharides which provide high crystallinity and purity to the material and its isolation and purification are relatively simple, not requiring energy- or chemical-intensive processes. The ability to naturally synthesize BC is restricted to a few genre of bacteria being the most common bacteria associated with the synthesis of cellulose *Gluconacetobacter xylinus* as it is the only one able to produce it at the industrial level [17]. After polymerization of glucose residues occurring in the cytoplasm, an extracellular secretion of the glucan chains occurs in a hierarchically linear arrangement favored by van der Waals forces and hydrogen bridges. Intra- and interfiber hydrogen bonding favor crystalline packing of the fiber for amorphous and crystalline regions [18]. The resulting microfibrils aggregate to produce a typical ribbon assembly with a lateral width of 40–60 nm. This structuration provides a specific density, tensile strength, and hydrophilicity that suit the material for functionalization and application to cosmetic industry, paper industry, food processing and packaging, and tissue engineering. Furthermore, the unique fibrillar nanostructure of BC (Fig. 1) determines its distinguished physical and mechanical properties such as high porosity, large surface area, excellent mechanical strength, and good biocompatibility [19]. BC-forming microorganisms can be cultivated in mannitol-based medium with alternative source of carbons and the supernatant freeze-dried to form a BC sponge after purification. Acid hydrolysis of BC form bacterial cellulose nanocrystals (BCNs) that have a higher hydrophilicity due to increased number of hydroxyl groups while being able to establish hydrophobic interactions due to its highly ordered crystalline organization (Fig. 1). This amphiphilic capacities can be applied to stabilize surfactant-free emulsions [20].

2.5 Electrospun Cellulose

Electrospinning is a simple, cost-effective, and scalable technique that utilizes electrical charge to form fine fibers from a polymer solution or polymer melt. In the past decades, electrospinning has emerged as a facile, economical, and scalable

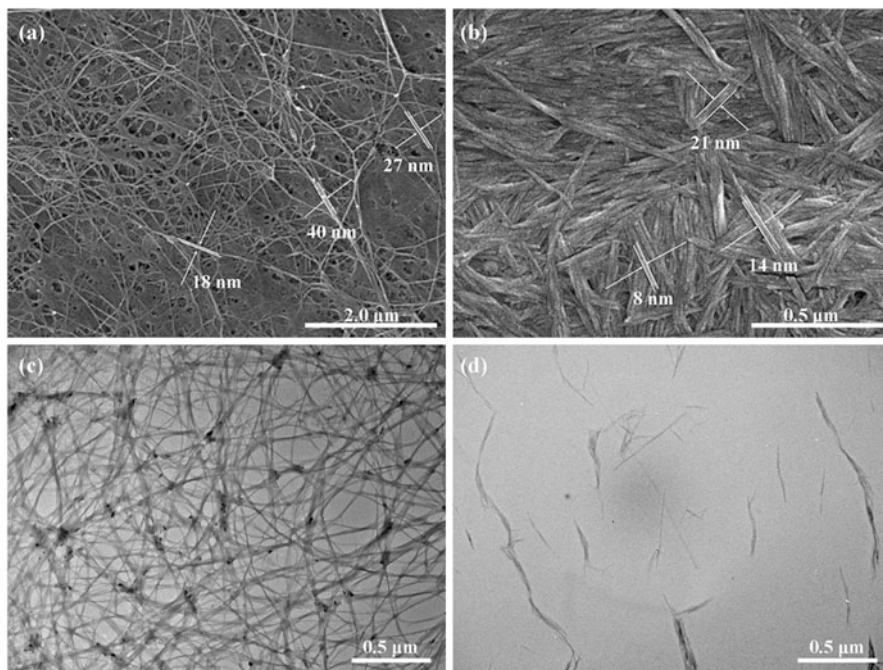


Fig. 1 An example of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum*. SEM images of (a) BC and (b) BCNs; TEM images of (c) BC and (d) BCNs. (Reproduced with permission from [20])

technique to produce polymeric fibers with a diameter ranging from micro- to nanometer scale. The biggest advantages of electrospun nanofibers are the high specific surface area, high porosity, and interconnectivity [21]. In biocatalysis, electrospun nanofibers could be used as the support for enzyme immobilization, and the immobilized enzyme could be reused and simultaneous biocatalytic reaction and enzyme-product separation is possible.

Substrates of this technique can be salts of cellulose such as cellulose acetate. The properties of the final material obtained can vary depending on the concentration and electrical conductivity of the starting solution, applied electrical potential, fiber collection distance and time, flow rate, and inner diameter of the reservoir during the process [6].

Electrospun cellulose has been used in a layer-by-layer self-assembled (LBL) configurations based on the electrostatic interactions of additional materials sequentially added to cellulose mats. This material was prepared by alternate adsorption of highly positively charged enzyme Naringinase (NA) and negatively charged alginate (ALG) from dilute solutions on the surface of negatively charged cellulose acetate nanofibrous mats via electrostatic attraction. The self-assembly of NA and ALG gave the reversal of the surface charge, demonstrating the successful polyelectrolyte multilayer deposited onto electrospun cellulose acetate nanofibers [21].

2.6 Synthetic Supports

In the recent years, the preparation of lignocellulose-based materials and biomimetic synthetic wood composites containing cellulose, hemicellulose, and lignin by using ionic liquids (ILs) as well as cellulose/starch/lignin film, lignocellulose aerogel, and all-wood composites have been reported [8, 22]. The major components of wood have been reported to be dissolved in ILs and successfully reconstituted as hydrogels, thin films, and electrospun materials. Fabrication of homogeneous composites from cellulose/hemicellulose/lignin has been achieved via an uncomplicated process by using in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate resulting in hydrogel beads composites with controllable properties [8]. The material shows a regular spherical shape and it is noted that the surface could be controlled by altering the ratio of cellulose, xylan, and lignin. When all three components were present, it was referred to as a wood mimetic composite which was a viable support for the entrapment of lipase and stabilization of its activity.

3 Strategies for the Immobilization of Enzymes in Cellulose-Based Nanocarriers

There are many enzyme immobilization approaches in cellulose-based nanocarriers already available and many more are being developed. Most of these approaches share the goals of finding a biocompatible support for enzyme immobilization, provide a higher surface area to increase the enzyme loading, and achieve high stability and reusability of the biocatalyst with a simple and mild methodology. In this regard, cellulose materials have been studied due to its low cost and biocompatibility [23, 24]. Cellulose materials have been proven to be environmentally friendly and are able to work under mild conditions [23, 25].

Among many strategies for enzyme immobilization, cellulose-based nanobiocatalysts have been developed mainly using four different approaches to retain the enzyme in the cellulosic support: entrapment, cross-linking, adsorption, and covalent immobilization.

In this chapter, we describe these four immobilization strategies in cellulosic-based nanosupports and examine the impact of the immobilization process on the biocatalyst activity and stability through several examples.

3.1 Immobilization by Cross-Linking

Chemical modification of enzymes after immobilization such as chemical cross-linking is a widely used strategy in the preparation of insoluble biocatalysts [26]. The enzyme is generally adsorbed to the nanosupport and then cross-linked with a bifunctional agent such as glutaraldehyde (Fig. 2). This approach can improve the enzyme stability as well as reduce enzyme leakage, a common problem in

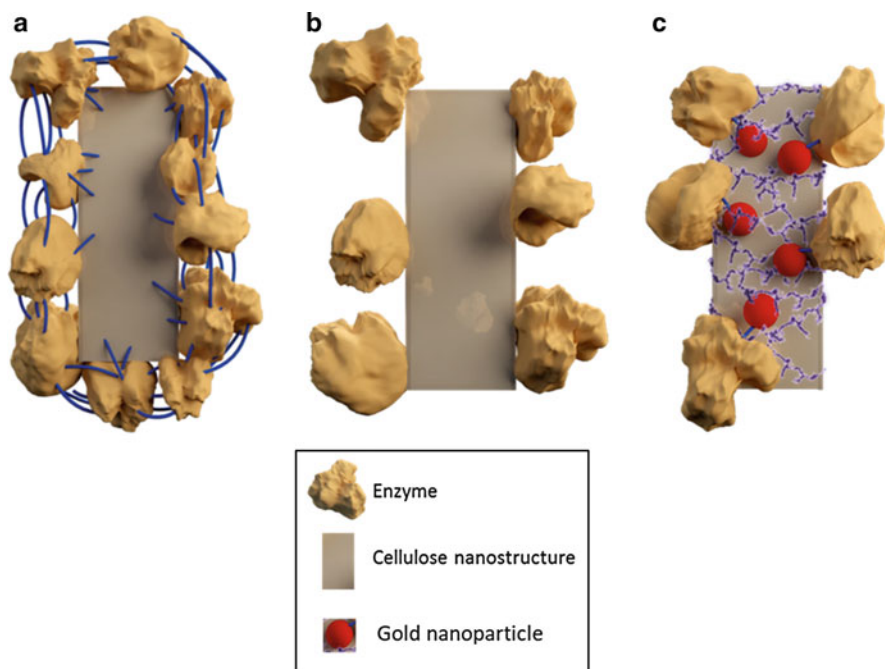


Fig. 2 Schematic representation of an enzyme immobilized on cellulose nanosupport via (a) adsorption and cross-linking, (b) physical adsorption, and (c) covalent immobilization to gold nanoparticles (AuNPs) attached to the support

noncovalently attached enzymes to supports. An alternative approach to a previous adsorption of the enzyme on a support is its precipitation and further cross-linking. Further advantages could be obtained if additives or other material are present during the precipitation. For instance, magnetic nanoparticles can be added to the mixture to form a hybrid nanobiocatalyst to ease its separation from reaction media.

Magnetic cellulose nanocrystals (MCNCs) have been used as a support for enzyme immobilization [13, 27]. The enzyme can be mixed with an aqueous suspension of MCNC and be deposited on its surface in the presence of a precipitant such as ethanol. Upon precipitation, addition of a cross-linking agent such as glutaraldehyde generates a chemical attachment between the immobilized molecules [23].

Immobilization on MCNCs via the described precipitation-cross-linking process was successfully accomplished with different types of enzymes [13, 27]. For instance, following this strategy, a nanobiocatalyst papain/MCNC has been prepared with high enzyme-loading capacity (333 mg protein/g MCNCs). The highest enzyme activity recovery was 80.1% at a mass ratio of 1:3 papain to MCNC. This could be attributable to the abundant active $-OH$ groups of the cellulose nanocrystals that contribute to the cross-linking of the enzymes on the MCNC. When comparing the nanobiocatalyst with the free enzyme, the optimal pH value increased from 6.5 to 7.0 and the temperature for the highest activity was 75 °C, 5 degrees higher

than that of the free enzyme. The change in optimal temperature was attributed to an increase in the enzyme conformational rigidity (seen in a secondary structure study). When comparing the kinetic behavior of free and immobilized papain, a higher V_{\max} (2.07×10^{-2} compared to 1.19×10^{-2} $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$) and lower K_M (0.85–1.27 mM) were found, thus demonstrating the increase in enzyme-substrate apparent affinity. This phenomenon could be attributable to the fact that the enzyme was anchored on the surface of MCNC, making the substrate accessible to the enzyme and in turn increasing the apparent affinity, or that the immobilization of papain onto the MCNC may have resulted in the conformational changes, helping the enzyme to suitably orient its active site toward the substrate. The immobilized enzyme was also proved to be more thermally stable. When comparing at the same temperature, the immobilized enzyme exhibited higher activity recovery than its free counterpart, 30% after 7 h incubation at 80 °C, while the free enzyme was inactivated after only 3 h. Moreover, the nanobiocatalyst showed no significant loss of activity when stored at 4 °C for 30 days. Finally, the reusability of the immobilized preparation was successful in maintaining 52.4% of its initial activity after 6 cycles.

3.2 Immobilization by Physical Adsorption

Physical adsorption of the enzymes on insoluble cellulose-based nanosupports has been reported elsewhere for the production of stable immobilized preparations that avoided leakage provided a strong enzyme-support interaction was established [28]. This immobilization approach has a major advantage considering the simplicity of the steps required, although functionalization of bare cellulose with ionizable/hydrophobic groups is sometimes necessary to achieve strong enzymatic adsorption of enzymes.

Physical adsorption of enzymes is feasible onto cellulose nanocrystals (CNCs) by incubating both the support and the enzyme under shaking at room temperature [13]. At neutral pH, a high fraction of sulfonate groups on the CNCs are ionized and the cationic sites or amino groups of the enzyme may have ionic interaction with anionic groups of CNCs (Fig. 2). The adsorption level of enzymes onto cellulose increases by the oxidation of cellulose primary hydroxyl groups to carboxyl groups; this strategy has been tested with cellulose fibers and could be translated to nanostructures [29].

When immobilizing a lipase from a *C. rugose* with this approach, an immobilization yield was low (51%) [13]. The decrease of lipase activity after immobilization may be due to the changes in spatial conformation of lipase and lower accessibility of substrate to the active site. However, the thermal stability can be enhanced by this approach. In the case of lipases, an immobilized enzyme to CNCs maintained over 50% of the residual activity when incubated at 60 °C for 1 h. Under the same conditions, the residual activity of the free lipase was only 11%. When comparing the half-lives, the immobilized enzyme was 27 times higher than of the free lipase. This increase in thermal stability may be associated to the enhanced ionic

interactions between anionic sulfonate groups of CNCs and the lipase, and the increased interactions caused by the higher surface area of the nanomaterial [13]. With this strategy, the pH profiles of free and immobilized lipase were similar, pH 8 being the optimal for both. A difference was found at pH 5, where the relative activity of immobilized lipase was 3.7 times higher than that of free lipase, and at pH 10, where free lipase showed no activity while the relative activity of immobilized lipase was 27.8%. The pH profiles for the stability of free and immobilized lipase were also very similar after a 5h incubation. The residual activities of immobilized lipase in buffers from pH 3 to pH 8 were approximately 140% higher than those of the free lipase. At alkaline pH, the stability of the lipase was significantly enhanced by immobilization on CNC (8.8 times higher at pH 10). Increased activity and stability in alkaline pH may be caused by increased ionic interaction between anionic groups of CNCs and the lipase since the anionic form of the sulfate half-ester in CNC is dominant at an alkaline pH.

Physical adsorption of lipase not always results in a more stable preparation. In a study where the adsorption of a *Candida rugosa* lipase was performed on a cellulose nanofiber membrane, the preparation demonstrated a low enzyme loading and poor enzyme stability [30]. These types of examples still prove the necessity of protocol optimization in order to tailor the immobilization strategy to a particular support or a desired enzyme.

Functionalization of nanocellulose-based supports for adsorption of enzymes has also been achieved via coverage of the cellulose surface with ionic polymers. Efficient immobilization of papain was achieved using CNCs associated to polyethyleneimine (PEI) modified Fe_3O_4 nanoparticles [16]. Magnetic nanoparticles embedded on CNCs facilitated the separation of the particles from a reaction mixture, simplifying the reuse of the biocatalysts. This support was successfully used for the immobilization and separation of papain from the reaction mixture which under optimal conditions resulted in a preparation with an enzyme activity of 227 $\mu\text{g}/\text{min.g}$. When studying the kinetic parameters of this preparation, the immobilized papain required higher substrate concentration compared to the free papain which could be explained by the increased steric hindrance and diffusion impediments. However, compared with free papain, the immobilized papain still demonstrated high catalytic efficiency.

Also, the immobilized papain exhibited higher relative activity in both acidic and alkaline pH ranges when compared to its free form. The immobilized enzyme retained over 90% of its original activity after incubation for 1 h at 40 °C, almost twice the activity measured for the free enzyme [16].

3.3 Covalent Immobilization

Covalent immobilization of enzymes is often chosen over adsorption strategies because it overcomes the primary disadvantage of adsorption which is enzyme dissociation (leakage) [28]. A number of functionalization strategies have been developed for cellulose nanomaterials for the covalent bonding of enzymes

[13, 31, 32]. One of this approaches involved functionalization of cellulose nanocrystals (CNCs) with cyanogen bromide, a functional group that is able to react with amino-terminal groups of enzymes under neutral pH [31]. Peroxidase has been immobilized in CNCs following this approach resulting in a highly active preparation (594 IU/g) with a higher catalytic efficiency when compared to the free enzyme.

Modification of CNCs can be also obtained via esterification with amino acids such as glycine through the abundant hydroxyl groups on the CNC surface. Lysozyme, for example, can be covalently immobilized via amide linkage of its glutamate and aspartate residues to the surfaces of amino-modified materials. In this case, lysozyme-amino-glycine-CNC conjugates were created using a carbodiimide-activated coupling reaction. The prepared nanobiocatalyst showed a high enzyme loading (604 mg/g CNCs) and high antimicrobial activity (1500 IU/mg biocatalyst) against *Micrococcus lysodeikticus* [32].

An alternative strategy for covalent immobilization can involve the addition of another material to the system. An approach described by Boluk et al. [33] involved the immobilization of a glucose oxidase (GOx) through the formation of covalent bonds between the enzyme and gold nanoparticles (AuNPs) attached to rod-like cellulose nanocrystals (Fig. 2). The AuNPs must be previously functionalized with thiol linkers and later activated, offering a multipoint attachment of GOx molecules to the nanocomposite surface. In this approach, the CNCs have been incubated with cationic PEI which covers the nanocrystals by ionic interactions; then negatively charged AuNPs were deposited on the CNC/PEI electrostatically resulting in a CNC/PEI/AuNPs nanocomposite. The enzyme (GOx) was covalently attached to the thiol-functionalized nanocomposite by activation of the $-\text{COOH}$ group using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). The best case resulted in a 25.2 mg of GOx loaded per gram of support. Interestingly, the amount of GOx immobilized on this support increased with decreasing thiol-linker length. The difference could be attributed to their ability to access the AuNPs, as these particles are densely packed.

3.4 Combined Strategies

A new trend in the preparation of immobilized nanobiocatalysts is the combination of different strategies previous to, during, and/or after the immobilization process. The different strategies may have a synergistic effect on the desired properties of the final enzymatic preparation. To improve both loading and stability of enzymes, a three-step approach of enzyme precipitate coating (EPC), consisting of covalent enzyme attachment, enzyme precipitation, and crosslinking, has been successful in achieving both high enzyme loading and stability of enzymes on cellulose nanofibers (CNFs) (Fig. 3a) [34]. Such is the case of immobilization of α -chymotrypsin (CT) on CNFs by the EPC approach. In this approach, magnetic nanoparticles can be added to the enzyme mixture during the precipitation and cross-linking steps to produce

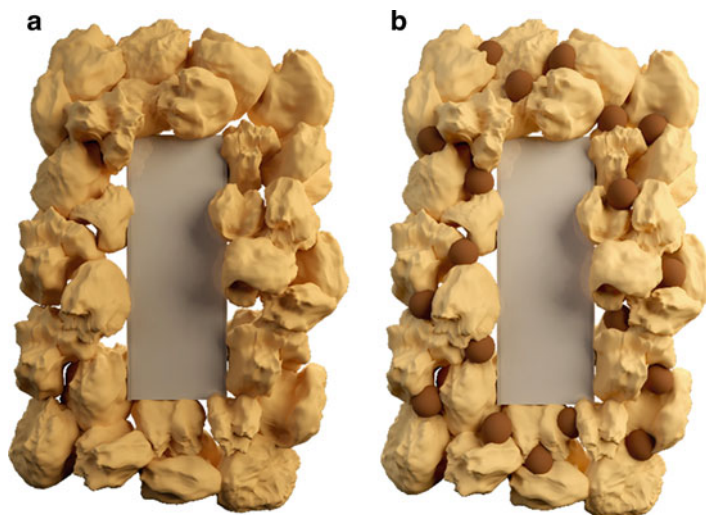


Fig. 3 Schematic representation of enzymes immobilized to cellulose nanofibers by (a) enzyme precipitate coating (EPC) and (b) magnetically separable EPC (Mag-EPC)

magnetically separable EPC (Mag-EPC) allowing for facile nanobiocatalyst separation (Fig. 3b).

As previously mentioned, this immobilization process consists of three steps. First, carboxyl groups of CNFs can be modified by EDC/NHS reaction for the covalent attachment between enzymes and CNFs, second, enzyme precipitation by ammonium sulfate, and third, enzyme cross-linking with glutaraldehyde treatment. The amine-functionalized magnetic nanoparticles can be added to enzyme solution in the step of enzyme precipitation (Fig. 3b).

The enzyme loadings with (Mag-EPC) and without (EPC) magnetic nanoparticles were estimated to be 3.5 and 3.0 mg CT/mg CNF, respectively. Interestingly, Mag-EPC showed two times higher activity than EPC. The efficiency of cross-linking between enzymes and magnetic nanoparticles was improved possibly due to a higher amount of amine groups on the surface of magnetic nanoparticles, resulting in an increased enzyme loading of Mag-EPC than EPC, as reflected in the activity data (0.43 and 0.74 IU/mg CT for EPC and Mag-EPC, respectively). After incubation under rigorous shaking for 30 days, EPC and Mag-EPC maintained 77% and 50% of their initial activities, respectively, while the free enzyme showed only 0.2%. High stability of EPC can be explained by ammonium sulfate precipitation and cross-linking of CTs. Enzyme precipitation by ammonium sulfate allows enzyme molecules to be closely packed based on “salting out” effect. Interestingly, the Mag-EPC residual activity was lower than that of EPC; this could be caused by the release of large aggregates of CTs and magnetic nanoparticles which would make the enzyme more vulnerable to denaturation under rigorous shaking [34].

3.5 Immobilization by Entrapment

Immobilization by entrapment involves the physical confinement of one or more enzymes in an insoluble matrix. In this strategy, the matrix is usually formed during the immobilization process. The bibliography related to immobilization by entrapment in cellulose nanosupports is scarce. The main drawback for this approach could be related to the very low solubility of cellulose in an aqueous solution since is highly crystalline. Nonetheless, there are successful cases using micro-sized supports. For example, a lipase from *C. rugose* was entrapped in a hydroxypropylmethyl-cellulose and chitosan matrix. Although this strategy involved many steps and over 48 h of synthesis, the result was a highly active and stable preparation [35].

Also, the rapid development of more and greener ionic liquids, which can dissolve cellulose, opens a new window of opportunities in this field. Again, successful examples can be found with cellulose-based micro-supports. Lipase from a *C. rugose* was entrapped into a cellulose–biopolymer using a biocompatible ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium. This strategy also resulted in a preparation with good residual activity [36].

The technological approach employed on these successful cases could be applied for the development of similar strategies involving nanocellulose.

4 Cellulose-Based Nanobiocatalysts at Work

Application of immobilized enzymes on cellulose spans a wide variety of fields. The biodegradability of cellulosic materials has recently drawn the attention of researchers which boosted investigation of its potential in sensitive biotechnological areas such as biomedicine or environmental sciences. In this section, a few recent examples of cellulose-based nanobiocatalysts will be described to provide the reader with a sense of the applicability of these materials.

4.1 Biomedical Applications

Reactive oxygen species are implicated in cellular injuries, the initiation and progression of the aging process, and a vast variety of clinical abnormalities. In order to reduce the damage generated by these compounds, a nanofibrous cellulose mat containing attached catalase was prepared and tested in vitro on human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs). The immobilized preparation based on electrospun nanofibers proved to have a protective effect on cells previously exposed to H₂O₂ which in turn pointed to a potential strategy to prevent cell damage by reactive oxygen species. The work also showed that the number of coating bilayers in the catalase-modified nanofibrous mats acted as important factor affecting their cytotoxicity and biocompatibility. This was an explorative work with potential to overcome H₂O₂-induced adverse effects at the cellular levels [37].

The antibacterial properties of lysozyme, a hydrolytic enzyme that catalyzes the breakdown of peptidoglycan polymers found in the bacterial cell wall, has been exploited and tested while using immobilized preparations on cellulosic materials. In comparison to many other antibacterial nanoparticles in use, lysozyme immobilized on cellulose possesses low toxicity, high biocompatibility, and selectivity. Researching its potential in a biomedical wound dressing, lysozyme was immobilized via different approaches to cellulose nanofibers aerogels (CNFs) [38]. The performance of the nanobiocatalysts was evaluated against nonimmobilized enzyme and silver nanoparticles. The antimicrobial activity of the preparations was tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* demonstrating the feasibility of using lysozyme-modified CNFs for this application. The preparation containing lysozyme was not only inhibitory of bacterial growth but was also more stable than the soluble enzyme, which amplifies the possibilities of its application considering the importance of shelf life of biological based products.

A work from Abouhmad et al. [39] also investigated the antibacterial properties of a lysozyme immobilized on CNC. Following different approaches for the integration of hen egg white- and T4 lysozyme, the work demonstrated that the surface modification and the mode of immobilization are critical for the retention of the enzymatic (lytic and hydrolytic) and antibacterial activity as well as stability of the immobilized enzymes. The positive charge on the nanocrystals and lysozyme activity improved the enzymatic action and broadened the scope to Gram-negative bacteria that are normally more challenging to inactivate.

Biosensors offer simple, portable, and disposable analytical devices applicable in clinical diagnosis, food quality control, and environmental monitoring. They depend on a biological recognition capable of being translated on a signal proportional to a target analyte. Particularly, paper-based sensors that offer affordability and ease of preparation although protein immobilization could be challenging to achieve an even distribution of oriented enzyme molecules that could increase the sensibility of the sensing device. A recent work on the development of a lactate biosensor has tackled this problem by using a recombinant lactate dehydrogenase fused with a cellulose-binding domain (CBD) which in nature promotes arbohydrate binding functionality for cellulases. The tag allowed a highly specific binding affinity on filter paper. Moreover, it enhanced enzyme binding capacity and stability, leading to much improved sensor sensitivity and lifetime. The one-step binding procedure using enzyme crude extract aimed at an efficient sensor fabrication strategy for production of high-performance paper sensors that could be extended to nanocellulosic materials for increased sensibility [40].

In another biosensing approach, glutamate dehydrogenase was immobilized on bacterial cellulosic nanofiber with a view on its application in artificial kidney machines and their dialysate liquid regeneration systems as a glutamate-sensing device. The study showed the success of cross-linked immobilization of glutamate dehydrogenase on 30–70 nm bacterial cellulosic nanofiber from *Gluconacetobacter xylinum*. The enzyme was cross-linked to the nanofibers using glutaraldehyde. The study provided an inexpensive, simple, efficient, and reliable technique for

immobilization of glutamate dehydrogenase on bacterial nanofiber which may contribute to find alternative for glutamate determination in solution [41].

4.2 Food Applications

Stem bromelain is a cysteine protease obtained from stems of pineapples (*Ananas comosus*). Although it finds some applications in medicine, this protease is widely used in food industries such as beer clarification, meat tenderization, and baking industries. Using casein as a model substrate, Talingtaisong et al. demonstrated that when the enzyme was immobilized on gauze-reinforced regenerated cellulose (RC) fibers, it became more heat resistant [42]. The enzyme was attached to the RC fibers through covalent immobilization via aldehyde groups introduced by activation with glutaraldehyde and was able to resist up to nine reuses in casein hydrolysis with 40% loss in activity. The results provide an opportunity for bromelain to be reused and used in other processing conditions.

Another interesting application of a cellulose-immobilized biocatalyst is that of naringinase. Naringin and limonin are two of the major compounds that contribute to a bitter taste in citrus juices. Enzymatic and physicochemical treatments have been applied to reduce bitterness, naringinase being one of the enzymes applied as it is able to break down naringin in flavorless products. Naringinase was immobilized within a hybrid layer-by-layer self-assembled material containing alginate and electrospun cellulose acetate nanofibers [21]. As expected, the activity of immobilized naringinase increased with multilayer increasing. The immobilized preparation was applied to remove the bitterness in the grapefruit juice. About 22.72% naringin and 60.71% limonin were removed from the grapefruit juice by adsorption and hydrolysis. The results demonstrated that naringinase-immobilized electrospun cellulose acetate nanofibrous mat are potential materials to remove bitterness for fruit juice.

4.3 Environmental Applications

Biobased treatments of contaminant compounds have received a great deal of interest due to their minimal impact on the ecosystem, their higher efficiency, and their cost effectiveness. Application of immobilized decontaminant biocatalysts is one of the approaches followed to treat, sense, or remove contaminant wastes from water and soil. Although the literature on cellulose-immobilized enzymes on decontamination is not abundant, a few recent examples have demonstrated the potential of cellulosic-supported enzymes for this application. For example, laccase, a well-known phenol/polyphenol decontaminant biocatalyst, was immobilized on cellulose nanofiber and utilized for reactive dyes and simulated dye effluent (SDE) decoloration [43]. After covalent immobilization on electrospun nanofibers, the immobilized preparation was able to decolorate solutions of six different reactive dyes. Optimization of the conversion was performed after statistical analysis revealing that both the concentration of immobilized enzyme and type of

mediator for the catalysis were determinant in the result of the decontamination reactions. The immobilized preparations could be recycled more than 10 times while maintaining more than 50% of its initial activity.

Another example that represents a promising application of immobilized enzymes in cellulosic materials is the utilization of an ether hydrolase enzyme for the decontamination of 2,4-dinitroanisole (DNAN) [44]. This compound is nowadays preferred to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) given that it is less heat and shock sensitive. Strategies to decontaminate firing ranges and wastes from manufacturing sites should comply with biosafety and environmental regulations and therefore there is a constant search for new strategies to remediate explosive components. Additionally, analytical devices for the evaluation of contamination levels are also needed. The work described by the group of Prof. J C Spain used a DNAN demethylase entrapped in biomimetic silica which was further attached to cellulose discs. The immobilized enzyme became more stable and was able to detect 15–500 μM DNAN concentration.

5 Conclusion

Ideal supports for enzyme immobilization should be biocompatible, easy to functionalize, inexpensive, and biodegradable. Additionally, immobilization strategies should provide advantages for enzyme applications over the use of soluble enzymes to counterbalance any additional cost in the preparation of the biocatalyst (i.e., stabilization, increased activity, possibility of reuse). We believe this chapter compiles evidence that proves the benefits of nanocellulosic materials as supports for enzyme immobilization. Moreover, the methodologies for enzyme immobilization on cellulose-based nanocarriers presented suggest that cellulose can be a viable and dynamic material for stable and efficient enzyme immobilization via different approaches. Finally, the variety of applications, which are now in a continuous growth phase, only serve to foretell a promising future for the development of technological solutions involving cellulose-immobilized nanobiocatalysts.

Acknowledgments The authors acknowledge ANII, PEDECIBA, and Universidad ORT Uruguay for providing financial support.

References

1. Sulaiman S, Mokhtar MN, Naim MN, Baharuddin AS, Sulaiman A (2014) A review: potential usage of cellulose nanofibers (CNF) for enzyme immobilization via covalent interactions. *Appl Biochem Biotechnol* 175:1817–1842. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1417-x>
2. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym Microb Technol* 40:1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
3. Misson M, Zhang H, Jin B (2015) Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *J R Soc Interf* 12:20140891

4. Esmaili C, Abdi MM, Mathew AP, Jonoobi M, Oksman K, Rezayi M (2015) Synergy effect of nanocrystalline cellulose for the biosensing detection of glucose. *Sensors (Switzerland)* 15:24681–24697. <https://doi.org/10.3390/s151024681>
5. Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, Bras J (2012) Microfibrillated cellulose – its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. *Carbohydr Polym* 90:735–764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>
6. Panatadasirisuk W, Vongsetskul T, Sucharitakul J, Chaiven P, Tangboriboonrat P (2015) Functionalized electrospun regenerated cellulose fibers for immobilizing pyranose 2-oxidase. *React Funct Polym* 86:47–51. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.11.008>
7. Sulaiman S, Mokhtar MN, Naim MN, Baharuddin AS, Salleh MAM, Sulaiman A (2015) Study on the preparation of cellulose nanofibre (CNF) from Kenaf Bast fibre for enzyme immobilization application. *Sains Malaysiana* 44:1541–1550
8. Park S, Kim SH, Won K, Choi JW, Kim YH, Kim HJ, Yang YH, Lee SH (2015) Wood mimetic hydrogel beads for enzyme immobilization. *Carbohydr Polym* 115:223–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.096>
9. Karimi S, Tahir PM, Karimi A, Dufresne A, Abdulkhani A (2014) Kenaf bast cellulosic fibers hierarchy: a comprehensive approach from micro to nano. *Carbohydr Polym* 101:878–885. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.106>
10. Sulaiman S, Cieh NL, Mokhtar MN, Naim MN, Kamal SMM (2017) Covalent immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on kenaf cellulose nanofiber and its application in ultrafiltration membrane system. *Process Biochem* 55:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.025>
11. Pandey JK, Takagi H, Nakagaito AN, Kim HJ (2015) Handbook of polymer nanocomposites. Processing, performance and application: volume C: polymer nanocomposites of cellulose nanoparticles. In: *Handb Polym Nanocomposites process perform Appl Vol C Polym nanocomposites Cellul nanoparticles C: 1–511*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45232-1>
12. Shahrousvand M, Tabar FA, Shahrousvand E, Babaei A, Hasani-Sadrabadi MM, Sadeghi GMM, Jafari H, Salimi A (2017) High aspect ratio phospho-calcified rock candy-like cellulose nanowhiskers of wastepaper applicable in osteogenic differentiation of hMSCs. *Carbohydr Polym* 175:293–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.001>
13. Kim HJ, Park S, Kim SH, Kim JH, Yu H, Kim HJ, Yang YH, Kan E, Kim YH, Lee SH (2015) Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. *J Mol Catal B Enzym* 122:170–178. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.007>
14. Uth C, Zielonka S, Hörner S, Rasche N, Plog A, Orelma H, Avrutina O, Zhang K, Kolmar H (2014) A Chemoenzymatic approach to protein immobilization onto crystalline cellulose Nanoscaffolds. *Angew Chemie Int Edgl* 53(46):12618–12623. <https://doi.org/10.1002/anie.201404616>
15. Mahmoud KA, Lam E, Hrapovic S, Luong JHT (2013) Preparation of well-dispersed gold/magnetite nanoparticles embedded on cellulose nanocrystals for efficient immobilization of papain enzyme. *ACS Appl Mater Interf* 5:4978–4985. <https://doi.org/10.1021/am4007534>
16. Pacheco G, Nogueira CR, Meneguín AB, Trovatti E, Silva MCC, Machado RTA, Ribeiro SJL, da Silva Filho EC, da S, Barud H (2017) Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. *Ind Crop Prod* 107:13–19. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.026>
17. Keshk SM (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J Bioprocess Biotech* 4:150–160. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>
18. Iris SL, Calvar L, Liu JMCJ, Cheng ADK (2013) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* 20:2191–2219. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>
19. Sampaio LMP, Padrão J, Faria J, Silva JP, Silva CJ, Dourado F, Zille A (2016) Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydr Polym* 145:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.009>
20. Yan H, Chen X, Song H, Li J, Feng Y, Shi Z, Wang X, Lin Q (2017) Food hydrocolloids synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in

- the stabilization of olive oil Pickering emulsion. *Food Hydrocoll* 72:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>
21. Huang W, Zhan Y, Shi X, Chen J, Deng H, Du Y (2017) Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering. *Int J Biol Macromol* 98:630–636. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.018>
 22. Kang Y, Ahn Y, Lee SH, Hong JH, Ku MK, Kim H (2013) Lignocellulosic nanofiber prepared by alkali treatment and electrospinning using ionic liquid. *Fibers Polym* 14:530–536. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-0530-8>
 23. Cao S, Xu P, Ma Y, Yao X, Yao Y, Zong M, Li X, Lou W (2016) Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. *Cuihua Xuebao/Chinese J Catal* 37:1814–1823. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(16\)62528-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(16)62528-7)
 24. Sulaiman S, Mokhtar MN, Naim MN, Baharuddin AS, Sulaiman A (2015) A review: potential usage of cellulose nanofibers (CNF) for enzyme immobilization via covalent interactions. *Appl Biochem Biotechnol* 175:1817–1842. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1417-x>
 25. Ayissi Eyebe G, Bideau B, Boubekour N, Loranger É, Domingue F (2017) Environmentally-friendly cellulose nanofibre sheets for humidity sensing in microwave frequencies. *Sensors Actuators B Chem* 245:484–492. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.130>
 26. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R (2014) Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv* 4:1583–1600. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>
 27. Cao SL, Xu H, Li XH, Lou WY, Zong MH (2015) Papain@magnetic Nanocrystalline cellulose Nanobiocatalyst: a highly efficient biocatalyst for dipeptide biosynthesis in deep eutectic solvents. *ACS Sustain Chem Eng* 3:1589–1599. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00290>
 28. Liu Y, Chen JY (2016) Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *J Bioact Compat Polym* 31:553–567. <https://doi.org/10.1177/0883911516637377>
 29. Karra-Châabouni M, Bouaziz I, Boufi S, Botelho Do Rego AM, Gargouri Y (2008) Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 66:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.06.010>
 30. Huang X-J, Chen P-C, Huang F, Ou Y, Chen M-R, Xu Z-K (2011) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B Enzym* 70:95–100. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.010>
 31. Yang R, Tan H, Wei F, Wang S (2008) Peroxidase conjugate of cellulose nanocrystals for the removal of chlorinated phenolic compounds in aqueous solution. *Biotechnology* 7:233–241. <https://doi.org/10.3923/biotech.2008.233.241>
 32. Edwards JV, Prevost NT, Condon B, French A, Wu Q (2012) Immobilization of lysozyme-cellulose amide-linked conjugates on cellulose I and II cotton nanocrystalline preparations. *Cellulose* 19:495–506. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9637-5>
 33. Incani V, Danumah C, Boluk Y (2013) Nanocomposites of nanocrystalline cellulose for enzyme immobilization. *Cellulose* 20:191–200. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9805-2>
 34. Je HH, Noh S, Hong SG, Ju Y, Kim J, Hwang DS (2017) Cellulose nanofibers for magnetically-separable and highly loaded enzyme immobilization. *Chem Eng J* 323:425–433. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.110>
 35. Badgujar KC, Bhanage BM (2015) Carbohydrate base co-polymers as an efficient immobilization matrix to enhance lipase activity for potential biocatalytic applications. *Carbohydr Polym* 134:709–717. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.036>
 36. Kim MH, An S, Won K, Kim HJ, Lee SH (2012) Entrapment of enzymes into cellulose-biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. *J Mol Catal B Enzym* 75:68–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.011>
 37. Huang R, Deng H, Cai T, Zhan Y, Wang X, Chen X, Ji A, Li X (2014) Layer-by-layer immobilized catalase on electrospun Nanofibrous Mats protects against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J Biomed Nanotechnol* 10:1346–1358. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1802>

38. Uddin KMA, Orelma H, Mohammadi P, Borghei M, Laine J, Linder M, Rojas OJ (2017) Retention of lysozyme activity by physical immobilization in nanocellulose aerogels and antibacterial effects. *Cellulose* 24:2837–2848. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1311-0>
39. Abouhmad A, Dishisha T, Amin MA, Hatti-Kaul R (2017) Immobilization to positively charged cellulose nanocrystals enhances the antibacterial activity and stability of hen egg white and T4 lysozyme. *Biomacromolecules* 18:1600–1608. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00219>
40. Dai G, Hu J, Zhao X, Wang P (2017) Sensors and actuators B : chemical a colorimetric paper sensor for lactate assay using a cellulose-binding recombinant enzyme. *Sensors Actuators B Chem* 238:138–144. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.008>
41. Pesaran M, Amoabediny G (2017) Study on the stability and reusability of glutamate dehydrogenase immobilized on bacterial cellulose nanofiber. *Fibers Polym* 18:240–245. <https://doi.org/10.1007/s12221-017-6864-x>
42. Talingtaisong S, Vongsetskul T (2017) Gauze-reinforced electrospun regenerated cellulose ultrafine fibers for immobilizing bromelain. *Cellulose* 24:2967–2975. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1307-9>
43. Sathishkumar P, Kamala-Kannan S, Cho M, Kim JS, Hadibarata T, Salim MR, Oh BT (2014) Laccase immobilization on cellulose nanofiber: the catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *J Mol Catal B Enzym* 100:111–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>
44. Karthikeyan S, Kurt Z, Pandey G, Spain JC (2016) Immobilized biocatalyst for detection and destruction of the insensitive explosive, 2,4-Dinitroanisole (DNAN). *Environ Sci Technol* 50:11193–11199. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03044>

Chapter

***In situ* immobilization of enzymes in biomimetic silica**

Erienne Jackson, Sonali Correa and Lorena Betancor*.

Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay. Mercedes
1237, 11100, Montevideo, Uruguay

Running Head: bio-inspired silica encapsulation of proteins

***Corresponding author**

Prof. Lorena Betancor

Laboratorio de Biotecnología

Facultad de Ingeniería,

Universidad ORT Uruguay

Mercedes 1237, 11100, Montevideo, Uruguay

betancor@ort.edu.uy

Abstract

In this chapter we describe different strategies for enzyme immobilization in biomimetic silica nanoparticles. Synthesis of this type of support is performed under mild and biocompatible conditions and has been proven suitable for the immobilization and stabilization of a range of enzymes and enzymatic systems in nanostructured particles. Immobilization occurs by entrapment while the silica matrix is formed *via* catalysis of a polyamine molecule and the presence of silicic acid. Parameters such as enzyme, polyamine molecule or source of Si concentration have been tailored in order to maximize enzymatic loads, stabilities and specific activities of the catalysts. We provide different approaches for the immobilization and co-immobilization of enzymes that could be potentially extensible to other biocatalysts.

Keywords: biomimetic silica, enzyme immobilization, entrapment.

1. Introduction

Enzyme encapsulation or entrapment refers to a non-covalent immobilization strategy where polymers self-assemble in the presence of soluble enzymes. Various matrices can be used for entrapment, such as chitosan, collagen, cellulose triacetate, poly acrylamide, agar, silicon rubber, polyvinyl alcohol, etc [1–3]. In any approach to immobilize enzymes, the goal is to achieve a high specific activity without compromising any other advantages of immobilization such as higher stability. In recent years, several methods have been reported that achieve higher volumetric activities. Silica sol-gel encapsulation of enzymes is an example of such methods and has been widely used for the immobilization of biocatalysts[4,5] One of the primary limitations of the sol-gel technique, however, is poor loading efficiency and enzyme leakage. Additionally, these methods often include harsh sol-gel processing conditions that result in the loss of enzyme activity. Inspired from silaffin proteins used by unicellular diatoms[6], the utilization of the so called biomimetic approaches in the production of organic-inorganic nanostructures is of great interest to the scientific and industrial community due to the relatively moderate physicochemical conditions needed for its synthesis[7]. Biomimetic silica can be synthesized within minutes under mild and green conditions, as nanostructured silica with divergent morphologies[8]. The synthesis necessitates a source of Si and an organic aminated small molecule or polymer in order to catalyze the precipitation of the nanoparticles in phosphate buffer at pH 8 (Scheme 1). Any material contained in the synthetic mixture may become entrapped within the biomimetic silica nanoparticles and therefore this strategy has been commonly used for enzyme immobilization[9–12].

A fundamental attribute of this immobilization methodology is its versatility which allows it to be widely applicable to a range of biomolecules. Since a primigenial work from Luckarift

et al[13] and due to its biocompatibility and facile and quick synthesis, this entrapment strategy has been used to immobilize oxidases, hydrolases and coupled enzyme systems.

Co-immobilization of enzymes using *in situ* immobilization approaches benefit from the close proximity of the different biocatalysts which translates into higher catalytic efficiencies of the overall reaction. Biomimetic silica encapsulation has been used in the past for the co-entrapment of a variety of multienzyme configurations as well as the preparation of combi robust biocatalysts for bioconversions of biosensing applications [14,15].

However, the synthetic strategy for biomimetic silica nanobiocatalysts can provide distinct properties to different enzymes and may be tailored to improve a desired attribute [13]. For instance, optimization of immobilized conditions to achieve active and stable nanobiocatalysts has included in the past studies of the synthetic precursors ratios, alternate aminated molecules or inclusion of organic solvents during synthesis. Addition of enzyme stabilization molecules for the *in situ* entrapment or post immobilization strategies such as crosslinking could further improve the stability of the biocatalysts.

Results on the biomimetic silica entrapment of different enzymes seem to indicate a dependence of the physical and textural properties of the Si nanoparticles with properties of such as size, shape or chemistry of the surface of the enzymatic molecule[16]. As in any other immobilization strategy, parameters such as loading capacity of the nanobiocatalysts or specific activity are also directed influenced by the properties of the enzyme to be immobilized. However, in *in situ* immobilization strategies they also play a fundamental role in the synthesis of the material support to the extent of preventing its formation under certain unbalanced ratios of the synthetic precursors and enzyme concentration[10].

In this chapter, we describe strategies for the *in situ* immobilization and co-immobilization of enzymes in biomimetic Si nanoparticles selecting a few examples that highlight the

potential of the technique and providing insight into the main parameters that should be considered when extending the strategy to other biomolecules.

2. Materials

1. Solution 1: 1mg/mL of Horseradish peroxidase (HRP), Type IV in deionized water.
2. Solution 2: 85 mM potassium phosphate, pH 5.0, 0.45 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 0.03% (w/w) hydrogen peroxide solution (H_2O_2) previously prepared in deionized water.
3. Solution 3: 0,8 mM of piruvate, 0,2 mM of NADH in 25mM sodium phosphate buffer at pH 7.0.
4. Solution 4: 0.015 mg/mL of LDH in 25mM sodium phosphate buffer at pH 7.0.
5. Solution 5: 0.1mM ribostamycine, 0.5mM γ -Glu-AHBA-SNAC and 0.2mM de DTNB in buffer HEPES 50 mM pH 7.0
6. Solution 6: 20 mM oNPG and 1 mM $MgCl_2$ in potassium phosphate buffer.
7. Solution 7: 60 mM sodium phosphate buffer pH 6.0, 0.3 M glucose, 0.06 mg/mL ABTS in distilled water.
8. Solution 8: 1.6 mg/mL of HRP, 154 mM sodium chloride in 10 mM sodium phosphate, pH 7.2.
9. Solution 9: 43 mg/mL sodium periodate in distilled water (see **Note 1**)
10. Solution 10: 10 % of polyethylenimine (PEI) or 12 mg/mL of spermidine (SP) in deionized water.
11. Solution 11: 157 μ L of tetramethyl orthosilicate (TMOS, 1 M) in 1 mL of 1 mM hydrochloric acid (see **Note 2**).

12. Solution 12: Sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0, 0.5 M NaCl (*see Note 3*)

3. Methods

3.1 Enzyme activity

1. Horseradish peroxidase activity assay contained 2 mL of assay solution 2 at 25°C and 10 µl of solution 1. The oxidation of ABTS ($\epsilon_M=36.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm for 2 min.

2. Lipase from *Rhizomucor miehei* (RML) activity was performed by continuously measuring the increase in the absorbance at 348 nm produced by the released p-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM pNPP in 25mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 at 30°C.

3. L-Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in 2.5 mL of solution 3 at 25°C. The reaction was started by addition of 20 µl of solution 4 and followed during 120 seconds at 340nm ($\epsilon_{\text{MNADH}}= 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4. The activity of the aciltransferase BtrH was measured in 108 µL of solution 5 at 25°C. The reaction was started by addition of 0.2mg of BtrH and the SNAC release was followed during 10 min at 412nm ($\epsilon_M= 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5. β -Galactosidase (Grade VIII), activity was determined spectrophotometrically by following the increase in absorbance at 405 nm caused by the hydrolysis of o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (oNPG) in solution 6 2 min at 25°C.

6. Glucose oxidase activity was determined spectrophotometrically by the increase in absorbance at 414 nm resulting from the oxidation of 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-tiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) by a coupled peroxidase-catalyzed reaction. The reaction mixture consisted of 1 mL of solution 7 and 0.1 mL of solution 1.

One enzyme unit (IU) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of product per minute under the specified conditions.

3.2 Oxidation of HRP

1. Add 1.8 mL of solution 8 to 200 μL of solution 9.
2. Keep sample in gentle agitation in the dark for 1 h at 25°C. To stop the reaction, add 2.5 μL of glycerol and purify the oxidized enzyme using a desalting PD10 column equilibrated with 100 mM sodium phosphate pH 7.0 containing 154 mM sodium chloride.
3. Evaluate the activity of the enzyme to consider any activity loss after chemical modification.

3.3 In situ enzyme immobilization by entrapment in biomimetic silica.

The following is a general procedure with ratios of the component of the synthetic mixture (TMOS, aminated molecule, enzymatic solution) that usually provides good immobilization yields for a range of enzymes. However, the ratios may be varied to optimize the performance for a specific enzyme [10].

1. Prepare a 10 mL enzymatic solution with a desired concentration in 0.1 M sodium phosphate dibasic buffer pH 8.0, add 2.5 mL of solution 10 and mix.
2. Add 2.5 mL of solution 11, mix by inverting the tube several times and keep in agitation for 5 min at room temperature (*see Note 4*)
- 3 Centrifuge for 10 min at 4600g and wash once in solution 12 and twice with sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0.

4. Sonicate for 5 min to improve monodispersity.
5. Evaluate the activity of the enzymatic mixture prior to immobilization and in the immobilized suspension.

3.4 Cross-linking of entrapped HRP

1. HRP immobilization by entrapment is performed as previously described, using the oxidized enzyme.
2. Incubate 1 g of immobilized HRP in silica nanoparticles in 10 mL of sodium bicarbonate 25 mM at pH 10.0, 16 h at 4°C.
3. Finally, reduce the preparation by adding sodium borohydride (1 mg/ml) to the mixture under gentle agitation for 30 min (*see Note 5*). Centrifuge and resuspend in 0.025 M sodium phosphate buffer pH 7.0 for activity measurement.
4. Evaluate the activity of the immobilized cross-linking suspension.

4. Results

4.1. In situ immobilization of enzymes in biomimetic silica nanoparticles.

1. Prepare solutions of enzyme of varying concentrations in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 8.
2. Measure the activity of the different enzymatic preparations.
3. Perform the *in situ* immobilization described in 3.3 of the different enzymatic preparations using PEI 10% or Spermidine 12 mg/ml keeping the supernatant of the immobilization after the first centrifugation. It is worth mentioning that a number of additional aminated

molecules have been used for Si deposition. In fact, proteins with high amounts of Lys on their surface are able to auto catalyse their own Si entrapment [17].

4. Measure the activity of the supernatant after silica precipitation.

5. Measure the activity after resuspension of the biocatalysts in working buffer solution of the enzyme.

6. Weight the amount of biocatalyst formed after immobilization.

7. Evaluate the amount of enzyme immobilized by difference of activity in the starting enzymatic preparation and the supernatant after immobilization (Immobilization %). Measure the immobilization yield either in terms of protein (YP) and/or activity (YA) according to Eqs. (1) and (2), respectively:

$$Y_P(\%) = \frac{P}{P_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Y_A(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

where P_0 represents the amount of offered protein, P the amount of loaded protein in the biocatalyst, A_0 the offered enzyme activity and A the activity expressed in the biocatalyst.

8. Y_p and Y_a as well as the amount of Si nanoparticles of the biocatalysts obtained, and specific activity depend on multiple factors related to physico-chemical and biochemical nature of the enzyme to be immobilized. Table 1 shows the results obtained for the enzymes analyzed in this chapter and examples of previous works using PEI 10% for the Si deposition. It is worth noting that these results have been obtained under similar conditions from those described above.

1.7 Regarding stabilization, there are multiple examples of stabilized *in situ* entrapped enzymes. Figure 1 shows thermos stabilization achieved for β -galactosidase and glucose oxidase after immobilization using this approach.

4.2. Stabilization of HRP through 3D cross-linking in biomimetic silica nanoparticles.

1. Perform a mild oxidation *via* NaIO_4 as previously described (*see* 3.2). This treatment generates aldehyde groups on the sugar moieties of this highly glycosylated enzyme. Any glycosylated protein could be crosslinked after *in situ* entrapment in biomimetic silica. Additionally, any other chemical modification of the enzyme surface protein to introduce aldehyde groups could also allow for a 3D multipoint covalent immobilization of the encapsulated enzyme.
2. Assay the catalytic activity of the preparation after gel filtration in a PD-10 column into phosphate buffer 0.1 M pH 8.0.
3. Entrap the oxidized enzyme in silica nanoparticles as described in 3.3 using PEI 10%.
4. Incubate the immobilized preparation at pH 10 as described in 3.4. This incubation promotes the formation of Schiff's bases between the aldehyde groups of the enzyme (obtained by its oxidation) and unreacted amino groups of the PEI near the entrapped enzymatic structure. The reducing step *via* Na_2BH_4 transform the first reversible interaction between the enzyme and the matrix, into a three-dimensional multiple covalent attachment of HRP within the silica particles.
5. After reduction, wash twice with phosphate buffer by centrifugation for 10 min at 4500g and resuspend in 25 mM phosphate buffer pH 7.0. Optimal results in terms of specific activity are obtained when using 5-7.5 mg/mL as starting HRP concentration (Table 2).
6. The studies on thermal stability demonstrated that the entrapped and cross-linked enzyme preparation presented a half life time of 156 min, significantly higher compared to the solely entrapped enzyme or the non immobilized HRP (53 and 2.4 min for their half-life time respectively) (Fig. 2).

4.3 Use of alternate aminated catalysts for *in situ* entrapment of lipase from *Rydomucor miehei* (RML).

1. Perform a gel filtration of the commercial enzyme in a PD-10 column using sodium phosphate buffer 0.1 M pH 8.0. Measure the activity of the preparation.

Use of spermidine for *in situ* entrapment:

2. Prepare a 12 mg/mL solution of spermidine in sodium phosphate buffer 0.1 M pH 8.0 and a solution of silicic acid as described in the Methods section 3.3.

3. Mix 1 mL of gel filtrated RML with 0.5 mL spermidine solution.

4. Add 0.5 mL of silicic acid solution.

5. Centrifuge for 10 min at 4600g and wash once in sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0, 0.5 M NaCl and twice with sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0.

6. Measure the activity in the suspension.

Use of PEI for *in situ* entrapment:

7. Prepare a 10% PEI solution in sodium phosphate buffer 0.1 M pH 8.0 and a solution of silicic acid as described in the Methods section 3.3.

8. Mix 1 mL of gel filtrated RML with 0.1 mL of PEI solution.

9. Add 0.5 mL of silicic acid solution.

10. Centrifuge for 10 min at 4600g and wash once in sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0, 0.5 M NaCl and twice with sodium phosphate buffer 0.025 M, pH 7.0.

11. Measure the activity in the suspension.

12. Both immobilized preparations were significantly more stable than the soluble RML (Fig 3).

4.4 Co-immobilization of the coupled enzyme system BtrH and BtrG.

The acyltransferase (BtrH) and γ -glutamyl cyclotransferase (BtrG) are two of the eight enzymes involved in the natural production of Butirosin B[21], a glycosidic antibiotic of relevance used to treat resistant infections. Previous works demonstrated the concerted action of these enzymes starting from synthetic precursors such as N-acetylcysteamine (SNAC) derivatives[22]. The following example involve the co-entrapment of both enzymes as a model of immobilized enzymatic system.

1. Prepare 1 mL solution of 0.2 mg of BtrH and 0.4 mg of BtrG in sodium phosphate buffer 0.1 M pH 8 and measure BtrH activity.
2. Add 0.25 mL of PEI 10% and mix.
3. Rapidly add 0.25 mL of previously hydrolyzed TMOS (silicic acid solution).
4. Mix the solution by inverting the tube three times.
5. Centrifuge for 10 min at 4600g and wash once in sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0, 0.5 M NaCl and twice with sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0.
6. Measure BtrH activity in the suspension to evaluate any possible loss in activity during immobilization.
7. *In situ* immobilization for the co-entrapment of BtrG and BtrH did not affect significantly the %I (Table 3).
8. Although the Y_A obtained for BtrH, the only activity that was possible to measure uncoupled with a chromogenic substrate, was low (Table 3), analysis by LC-MS using γ -Glu-AHBA-SNAC and ribostamycin as substrate showed the presence of butirosin B. This compound is the expected product of the concerted action of both enzymes which proved that BtrH was active in the nano-co-entrapped biocatalysts.

9. Characterization by scanning electron microscopy of the *in situ* co-entrapped preparation showed dispersed as well as interconnected nanoparticles of a mean diameter of ~110 nm (Fig 4). The shape and polydispersity obtained is similar for previously entrapped isolated proteins. However, the mean size obtained for the nanobiocatalyst is significantly smaller than reported entrapped proteins [16,17].

5. Notes

1. Sodium periodate solution should be prepared fresh and keep protected from light.
2. Vortex until solution is clear. This solution should be freshly prepared.
3. NaCl is sometimes necessary to remove non-entrapped ionically adsorbed enzymatic molecules to the surface of the nanoparticles.
4. Solutions should be added in the specified order.
5. Keep the vessel open as small amounts of H₂ are formed during reduction.

6. References

- [1] V. Krasňan, R. Stloukal, M. Rosenberg, M. Rebroš, Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (2016) 2535–2553.
- [2] M. Monier, I. Youssef, D.A. Abdel-Latif, Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of β -galactosidase enzyme, React. Funct. Polym. 124 (2018) 129–138.
- [3] J. Zdarta, A. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility, Catalysts. 8 (2018) 92-119.
- [4] D. Cazaban, L. Wilson, L. Betancor, Lipase immobilization on siliceous supports: Application to synthetic reactions, Curr. Org. Chem. 21 (2017) 96-103.
- [5] L. Ronda, S. Bruno, B. Campanini, A. Mozzarelli, S. Abbruzzetti, A. Cupane, M. Levantino, S. Bettati, Immobilization of Proteins in Silica Gel: Biochemical and

- Biophysical Properties 19 (2015) 1653–1668.
- [6] N. Kröger, N. Poulsen, Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology., *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 83–107.
- [7] C. Lechner, C. Becker, Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 5297–5333.
- [8] S.H. Yang, Biomimetic silica nanostructures on the surface, controlled by polyvalent counteranions, *Solid State Sci.* 23 (2013) 1–7.
- [9] L. Betancor, H.R. Luckarift, Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis., *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 566–572.
- [10] D. Cazaban, A. Illanes, L. Wilson, L. Betancor, Bio-inspired silica lipase nanobiocatalysts for the synthesis of fatty acid methyl esters, *Process Biochem.* (2018) In press.
- [11] S.K.S. Patel, S. V. Otari, Y. Chan Kang, J.-K. Lee, Protein–inorganic hybrid system for efficient his-tagged enzymes immobilization and its application in xylulose production, *RSC Adv.* 7 (2017) 3488–3494.
- [12] G.R. Johnson, H.R. Luckarift, Enzyme stabilization via bio-templated silicification reactions, 679 (2017) 85-97.
- [13] H.R. Luckarift, J.C. Spain, R.R. Naik, M.O. Stone, Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 211-213.
- [14] F. López-Gallego, E. Jackson, L. Betancor, Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells, *Chem. - A Eur. J.* 19 (2017) 17841-17849.
- [15] L. Betancor, G.R. Johnson, H.R. Luckarift, Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts, *ChemCatChem.* 5 (2013) 46–60.
- [16] E. Jackson, M. Ferrari, C. Cuestas-Ayllon, R. Fernández-Pacheco, J. Perez-Carvajal, J.M. De La Fuente, V. Grazú, L. Betancor, Protein-templated biomimetic silica nanoparticles, *Langmuir.* 31 (2015) 3687–3695.
- [17] L. Zhou, C. Wang, Y. Jiang, J. Gao, Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property, *Chinese J. Chem. Eng.* 21 (2013) 670–675.
- [18] H. Li, W. Xiao, P. Xie, L. Zheng, Co-immobilization of enoate reductase with a cofactor-recycling partner enzyme, *Enzyme Microb. Technol.* 109 (2018) 66–73.
- [19] C. Berne, L. Betancor, H.R. Luckarift, J.C. Spain, Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase., *Biomacromolecules.* 7 (2006) 2631–2636.
- [20] J.P. Henley, A. Sadana, Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism, *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 50–60.

- [21] Y. Li, N.M. Llewellyn, R. Giri, F. Huang, J.B. Spencer, Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: Possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway, *Chem. Biol.* 12 (2005) 665–675.
- [22] N.M. Llewellyn, J.B. Spencer, Chemoenzymatic acylation of aminoglycoside antibiotics, *Chem. Commun.* (2008) 3786-3788.

Figures captions

Scheme 1. General procedure for the preparation of A) biomimetic Si nanoparticles and B) *in situ* immobilized enzymes in biomimetic SI nanoparticles.

Fig 1. Thermal stability of soluble and *in situ* entrapped enzymes in biomimetic silica. A) β -galactosidase preparations at 54 °C, B) glucose oxidase preparations at 50 °C. In both graphs solid circles: PEI; open diamonds: soluble.

Fig 2. Graphical representation of the thermal stability at 50°C of the soluble (\blacktriangle), entrapped enzyme (\bullet) and the crosslinked entrapped enzyme (\blacksquare). The half-life increased from 2.5 min to 53 min and 156 min, respectively. The experimental data was fitted to the exponential model from Henley and Sadana[20].

Fig 3. Thermal stability at 60°C of different RML preparations. Soluble enzyme (RML) (\bullet), *in situ* entrapped enzyme using PEI (\blacksquare), and *in situ* entrapped enzyme using spermidine (\blacktriangle). The preparations were incubated in 25 mM sodium phosphate buffer pH 7.

Fig 4. A) SEM analysis of *in situ* co-immobilized preparations of BtrH and BtrG. B) Histogram representation of nanoparticle diameters using Image J.

Tables.

Table 1. Examples of the results obtained for different enzymes immobilized by *in situ* entrapment in biomimetic silica.

Enzyme	Immobilization (%)	Y _A (%)	Source
Peroxidase from Horseradish	82 ± 4	49 ± 6	This work
Lipase from <i>Rizomucor miehei</i>	90 ± 1	24 ± 1	This work
Acyltransferase from <i>Bacillus circulans</i>	90 ± 2	20 ± 4	This work
Lipase from <i>Trametes versicolor</i>	82 ± 7	71 ± 1	[10]
β-galactosidase from <i>E. coli</i>	76 ± 7	42 ± 8	This work
Glucose oxidase from <i>Aspergillus niger</i>	50 ± 5	71 ± 2	This work
Enoate reductase recombinant from <i>E coli</i>	34	92	[18]
Papain from <i>Carica papaya</i>	83	83	[17]*
Nitroreductase from <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	80 ± 5	60 ± 5	[19]

*No aminated molecule was needed for Si precipitation

Table 2. Results obtained after *in situ* immobilization of HRP in biomimetic silica nanoparticles.

HRP (mg/ml)	Immobilization (%)	Y _A (%)	UI (UI/mg)
0.5	94 ± 3	50 ± 2	1.042 ± 4E-03
1	85 ± 2	59 ± 2	1.025 ± 2E-03
3	83 ± 2	53 ± 3	1.286 ± 4E-03
5	82 ± 4	49 ± 6	1.700 ± 7E-03

7.5	63 ± 4	42 ± 2	2.125 ± 5E-03
10	54 ± 3	12 ± 3	1.887 ± 8E-03
20	34 ± 5	10 ± 5	1.900 ± 7E-03

Table 3. Results obtained for the entrapment and co-entrapment of BtrH and BtrG

Encapsulated enzymes	Immobilization (%)	Y _A (%)
BtrG	96.8 ± 1.1*	ND
BtrH	89.7 ± 2.2	13.5 ± 2.01
BtrG and BtrH	75.2 ± 1.1	20 ± 3.5

*Determined using protein concentration

Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de L-láctico utilizando una cascada biosintética. MSc. Erienne Jackson

