

FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PEDECIBA QUÍMICA

## **“Biotransformación del Glicerol, obtenido en la producción de biodiésel en productos de mayor valor agregado”**

---

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones  
Departamento de Química Orgánica  
Departamento de Biociencias

Trabajo que presenta  
**Wilson Sierra**  
para aspirar al título de Doctor en Química

### **ORIENTADORES:**

Dra. Sonia Rodríguez

Dra. Pilar Menéndez

Dr. Andrés González  
(Director Académico)



FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PEDECIBA QUÍMICA

## “Biotransformación del Glicerol, obtenido en la producción de biodiésel en productos de mayor valor agregado”

---

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones  
Departamento de Química Orgánica  
Departamento de Biociencias

Trabajo que presenta  
**Wilson Sierra**  
para aspirar al título de Doctor en Química

### TRIBUNAL

Dra. Matilde Soubes

Dr. Alfredo Martínez

Dra. Gianna Cecchetto

### ORIENTADORES:

Dra. Sonia Rodríguez

Dra. Pilar Menéndez

Dr. Andrés González  
(Director Académico)

Montevideo, diciembre de 2017.



*para Paula  
y sus tres hijos.*

***Fuera locura...***



## Agradecimientos

La concreción de este trabajo ha sido posible gracias a un sinnúmero de personas y muchas instituciones de las que seguramente al intentar hacer una lista no haré otra cosa que omitir merecidas menciones, pese a eso haré el intento... vaya mi agradecimiento:

En primer lugar a Facultad de Química de la UdelaR, que logra que cuando se me pregunta por mi profesión responda que soy Ingeniero Químico (*pero... más químico que ingeniero*).

A PEDECIBA Química, que es un socio imprescindible para permitir que la ciencia local avance.

Al programa PDT, que junto con el FPTA del INIA fueron los apoyos económicos más importantes para que este trabajo iniciara.

A ANII por todo lo que ha significado el Timbó para este trabajo, y en esa línea también recordar a todos los que colaboraron al inicio vía “*dale que va*” (ejemplo de cómo hacer las cosas cuando no hay muchos recursos pero abunda la solidaridad) y más recientemente a los “rusos” por hacer que la publicación sea algo más que un abstract.

A UdelaR nuevamente, en este caso a través de CSIC, por el apoyo en esta empresa novedosa que viene siendo el intentar patentar parte de lo que aquí se describe.

A otras instituciones que de alguna manera u otra realizaron un valioso aporte entre ellos UNESCO (si Donald... algunos seguimos valorando el papel de esta institución), a la OPCW por su apuesta pacífica (al final tan lejos no andábamos...) y los fondos aportados para una pasantía que no fue y a ALUR por el aporte de muestras.

Finalmente en lo institucional mi agradecimiento al tribunal por dignificar este trabajo con su mirada crítica, comentarios, aportes, correcciones y su evaluación.

En lo personal en el ámbito laboral es aún más larga la lista, ya que ha sido mucha la gente que ha estado dispuesta siempre a dar una mano o responder una duda. Para abreviar, (cosa que algunos ya saben me cuesta), voy a mencionar personas sin aclarar en muchos casos mucho el porqué... Sin duda creo que esta lista debe comenzar con los serenos de Facultad y en Edgard, Valeria y Zapata hacer extensivo el reconocimiento a todos los funcionarios que sábados, domingos, feriados y muchas madrugadas, me hicieron el aguante (además de darme algún que otro susto...). Al Jefe (Dr. Spam), que un día me preguntó si no tenía ganas de hacer algo de laboratorio y cambió radicalmente con esa pregunta mi futuro hasta el día de hoy. A Carmen, Andrés, María Laura, Lucía y toda la gente del LEC, a todo Micro, muy especialmente a Matilde, María Julia, Gianna, María Inés, Lucía, Silvana Tarlera, las Marianas y también a Analía, Andrea, María y Guadalupe (que si bien ya no están pudimos conversar en extenso acerca de las implicancias de los resultados negativos), a todo el DQO, en particular a Gustavo, a Nacho, Carlos, Valeria, Quique, Gloria, Danilo, Laura, Ana, Joaquín, Mariela y el Fiera entre otros tantos. A Guillermo y Viviana de Paysandú y ya que estoy en la parte analítica e instrumental a Gabriel y a Horacio. A Gustavo, Álvaro, Fernando, Silvia e Inés por los pasajes en Higiene buscando cambiar la pisada. A la gente del Cubba fundacional convertido, mediante evolución dirigida en el LBB, a David, Emiliana, Luis, Victoria, Agustina, Diego, César, Larissa, Paola, Facundo y Adriana (que ha sido mi coartada para seguir estando

en el laboratorio cuando debería estar escribiendo), a todos, gracias por el aguante, por las inyecciones cuasi-automáticas, por hacer el lugar más que agradable para ir a trabajar... y por trabajar con ganas. Paralelamente, a mis compañeros de Renovables de la DNE por disimular un período de ausencia mientras duró la escritura (Viviana, Martín, Laura, Nicolás, Pía, Ignacio, Verónica, María José, Víctor, Florencia, Mariana y María Ester (así como antes Paula) gracias por hacer que me fuera a escribir muchas veces. A Adriana por alentarnos a continuar con la propiedad intelectual. A los pingüinos, grupo al que apenas me sumé salí con licencia para encarar esto que hoy termino.

En el último tramo ya totalmente personal, comienzo agradeciendo a Sonia y Pilar, dos personas que seguramente durante este proceso deben de haber desarrollado su capacidad de paciencia para lidiar con los caprichos e ideas firmes (eufemismo de terquedades) del estudiante eterno. Tratando de abreviar (pedido que me hicieron durante meses) diría: a Sonia por la libertad y confianza que me dio desde el comienzo para encarar el trabajo, a Pilar por jugar a ser Moisés y separar las aguas en la mesada de Farmacognosia para ubicarme entre la Parda y Paula, allá por octubre del 2003. A la vez que a ambas, les agradezco por su infinita generosidad al momento de compartir conocimientos y experiencias.

En lo familiar, no me canso de repetir que nada de esto hubiera pasado si mis viejos en marzo del '89 no se hubieran animado a arriesgarse mucho y dejar todo atrás porque era la única forma de que yo pudiera seguir estudiando... a la vez que mis hermanos aportaron mucho de sí en ese período para que yo me pudiera dedicar a FQ.

También en lo familiar, a Jorge -personaje super especial- que nos ha dejado un espacio que nos está resultando extremadamente difícil llenar.

A mis amigos, Fede, Virginia, Arianna y Pato, a quienes muchas veces dejé esperando porque tenía que ir al laboratorio. A los cófrades Agustín, Ismael, Rodrigo, Garlos, Gabriel y los Alejandros....con quienes tenemos en común que la Facultad pasó por nosotros (y sigue pasando) y no solo nosotros pasamos por ella.

Ya llegando al final es imposible que no mencione a la gente que día a día me ha visto entusiasmado con este trabajo. En primer término a Joaquín con quien espero ahora poder encarar la escritura en conjunto del otro libro (ahora si... uno infantil) y de esa manera ponerme a tiro con el tiempo, que no sin queja me cedió, para que terminara este, mi primer libro.

A Lucía e Inés (y junto con ella a Calamardito) por lo disfrutable que se me hicieron los días de escritura en casa compartiendo los mediodías con ustedes y por haberles aplazado algún plan a causa de mis obligaciones.

Por último a Paula, (y la lista de causas sería larguísima relacionada con esta tesis,...) pero prefiero en este momento centrarme en la escritura y creo que se entiende si digo: *por ser la única persona que me convenció escribir con tan solo cuatro letras (tres consonantes y una vocal), una obra inmensa de la que soy co-autor....*

# Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
1.1 Las energías renovables, el transporte y los biocombustibles en el contexto internacional	8
1.2 Producción de biocombustibles – tendencia global	10
1.3 Producción de biocombustibles – contexto local	11
1.4 Desafíos aún existentes asociados a la producción de biodiésel en Uruguay	12
1.5 La valorización del glicerol como una oportunidad	16
1.6 Antecedentes relacionados a la valorización de glicerol	16
1.6.1 Uso directo como forma de valorización	17
1.6.2 Valorización orientada a la obtención de nuevos productos	19
1.6.2.1 Productos obtenidos por síntesis química	19
1.6.2.2 Productos obtenidos biotecnológicamente	27
1.6.2.3 Obtención biotecnológica de 1,2-propanodiol	43
1.6.2.4 Enzimas con potencial aplicación en la síntesis de 1,2-propanodiol	56
1.6.2.5 Síntesis de derivados de 1,2-propanodiol	61
1.7 Alcance del presente trabajo	64
<b>2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA</b>	<b>65</b>
2.1 Objetivo general	67
2.2 Objetivos específicos	67
2.3 Estrategia - Biotransformaciones	67
2.3.1 Vía metabólica propuesta	68
2.3.2 Estrategia 1	69
2.3.3 Estrategia 2	70
2.4 Estrategia de valorización del 1,2-propanodiol (2) obtenido	73
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
Resultados obtenidos en la Estrategia 1	76
3.1 Construcción de biocatalizadores de la Estrategia 1	76
3.1.1 Desarrollo de sistemas que permitan la expresión simultánea de los genes GRE2/YOL151W e YPR1/YDR368W	76
3.1.2 Clonado directo de GRE2 e YPR1 en pACYCDuet-1 y en pETDuet-1	76
3.1.3 Desarrollo de sistemas de expresión de los genes GRE2 e YPR1, a través de su clonado en plásmidos auxiliares	78
3.1.4 Subclonado a vectores de expresión	81
3.1.5 Verificaciones desarrolladas sobre pWS4 (GRE2 e YPR1 en pETDuet-1)	84
3.1.6 Construcción de los biocatalizadores asociados a la Estrategia 1	88
3.1.7 Verificación de actividad de los biocatalizadores construidos	89
3.1.8 Biotransformación de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) con los biocatalizadores construidos en el marco de la Estrategia 1	90
3.1.9 Discusión de resultados obtenidos asociados al desarrollo de biocatalizadores	91

3.2 Biotransformaciones en el marco de la Estrategia 1	91
3.2.1 Verificación adicional sobre construcciones asociadas a la Estrategia 1.	92
3.3 Discusión de resultados obtenidos con la ejecución de la Estrategia 1.	95
Resultados obtenidos en la Estrategia 2	95
3.4 Construcción de biocatalizadores de la Estrategia 2	95
3.4.1 Transformación de <i>E.coli</i> (HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116) con vector pBT20- $\Delta$ bla-T7pol	95
3.4.2 Conjugación de cepa <i>E.coli</i> (HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116)(pBT20- $\Delta$ bla-T7pol) con <i>E. coli</i> FMJ39	95
3.4.3 Verificación de la condición de doble mutante de la cepa obtenida de la Conjugación	96
3.4.4 Transformación de cepa <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT con vectores pWS3, pPP8 y pWS4	97
3.4.5 Verificaciones sobre la serie de biocatalizadores construidos a partir de la cepa <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT	97
Verificación 1: Mantenimiento de la condición de doble mutante ( <i>ldh-pfl</i> )	97
Verificación 2 y 3: Funcionamiento del sistema de expresión T7 polimerasa y mantenimiento del perfil de biotransformación original en este contexto	97
3.4.6 Discusión de los resultados parciales obtenidos	98
3.5 Biotransformaciones en el marco de la Estrategia 2	99
3.5.1 Biotransformación de glicerol (1) en régimen de células en crecimiento con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT	99
3.5.2 Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6) en régimen de células en crecimiento con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT	99
3.5.3 Biotransformaciones iniciales con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT en régimen de células en reposo	101
Biotransformación preliminar de glicerol (1)	102
Biotransformación preliminar de glicerol (1) y glucosa (6)	103
Biotransformación preliminar de metilglioxal (3)	104
3.5.4 Ajustes en condiciones de biotransformación anaerobia en régimen de células en reposo	107
3.5.5 Biotransformación de metilglioxal (3) con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT (pWS4) en presencia de glucosa (6)/glicerol (1) en diferentes concentraciones y modalidades de adición	108
3.5.5.1 Biotransformación de metilglioxal (3) agregado en forma de pulso en presencia de glicerol (1)/glucosa (6) con el biocatalizador <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo en anaerobiosis	108
3.5.5.2 Biotransformación de metilglioxal (3) agregado fraccionadamente en presencia de glicerol (1) y glucosa (6) con el biocatalizador <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo	122
3.5.5.3 Comparación de resultados obtenidos en las diferentes modalidades de adición de sustrato.	131
3.5.6 Efecto de la relación glicerol (1)/glucosa (6) en biotransformaciones de metilglioxal (3) con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT (pWS4) en régimen de células en reposo	132

3.5.7 Biotransformación de lactaldehído (4)- Producción de 1,2-propanodiol (2)	<b>133</b>
3.5.8 Resumen de resultados obtenidos	<b>134</b>
3.5.9 Revisión de la estrategia 2 e introducción de mejoras (Estrategia 2.5)	<b>135</b>
3.5.9.1 Construcción del biocatalizador <i>E. coli</i> FMJ39T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4)(pWS5)	<b>135</b>
3.5.9.2 Verificación de actividad frente a glicerol (1) y glicerol (1)/glucosa (6) del biocatalizador <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS4)(pWS5)	<b>136</b>
3.5.10 Optimización multivariable con <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4)(pWS5)	<b>138</b>
3.6 Caracterización del producto de biotransformación	<b>150</b>
3.7 Estereoquímica del producto obtenido	<b>151</b>
3.8 Biotransformación con <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo de glicerina obtenida en proceso industrial	<b>152</b>
3.9 Síntesis de productos de interés a partir de (R)-1,2-propanodiol (2a)	<b>154</b>
3.10 Síntesis de lactaldehído (4)	<b>160</b>
3.10.1 Síntesis quimio-enzimática de lactaldehído (4)	<b>160</b>
3.10.2 Síntesis química de lactaldehído (4)	<b>161</b>
3.11 Valorización obtenida en las biotransformaciones realizadas	<b>162</b>
<b>4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>163</b>
4.1 Conclusiones	<b>165</b>
4.2 Perspectivas	<b>168</b>
4.3 Comentarios finales	<b>169</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>171</b>
5.1 Materiales y métodos microbiológicos	<b>173</b>
5.1.1 Secuencias de genes de interés	<b>173</b>
5.1.2 Vectores utilizados y construidos	<b>173</b>
5.1.3 Secuencias de oligonucleótidos utilizados	<b>174</b>
5.1.4 Cepas utilizadas y construidas en el presente trabajo	<b>174</b>
5.1.5 Enzimas	<b>178</b>
5.1.6 Otros insumos microbiológicos	<b>178</b>
5.1.7 Medios de cultivo	<b>179</b>
5.1.8 Mantenimiento de cepas	<b>180</b>
5.1.9 Métodos de biología molecular	<b>181</b>
5.1.10 Condiciones de PCR	<b>181</b>
5.1.11 Secuenciado de los genes	<b>181</b>
5.1.12 Gel de proteínas	<b>181</b>
5.1.13 Condiciones de conjugación	<b>182</b>
5.2 Materiales y métodos biocatalíticos	<b>182</b>
5.2.1 Sustratos y reactivos	<b>182</b>
5.2.2 Biotransformaciones en régimen de células en crecimiento en aerobiosis	<b>183</b>
5.2.3 Biotransformaciones en régimen de células en crecimiento en anaerobiosis	<b>183</b>
5.2.4 Biotransformaciones en régimen de células en reposo en anaerobiosis	<b>183</b>
5.2.5 Muestreo de Biotransformaciones	<b>184</b>
5.3 Materiales y métodos de síntesis orgánica	<b>184</b>
5.3.1 Solventes y reactivos	<b>184</b>

5.3.2 Procedimientos generales	185
5.3.3 Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol (8)	185
5.3.4 Síntesis de (R)-2-metoxi metoxi-1-propanol (8a)	187
5.3.5 Síntesis de propilencarbonato (7)	187
5.3.6 Síntesis de (R)-propilencarbonato (7a)	187
5.3.7 Síntesis enzimática de (R)-propilencarbonato (7a)	187
5.3.8 Síntesis quimio-enzimática de lactaldehído(4) a partir de metilglioxal 1,1- dimetilacetal (32)	188
5.3.9 Síntesis enzimática de lactaldehído (4) a partir de metilglioxal (3)	188
5.3.10 Síntesis química de DL-lactaldehído (4)	189
5.3.11 Datos de espectroscopía y rotación óptica	189
5.4 Técnicas analíticas	190
5.4.1 Cromatografía en capa fina	190
5.4.2 Cromatografía gaseosa	190
5.4.3 Cromatografía líquida	192
5.4.4 Espectrometría de masas (MS-ID)	192
5.4.5 Cromatografía gaseosa - espectrometría de masas (GC-MS)	193
5.4.6 Cromatografía gaseosa- espectrometría de masas con SPME (Solid Phase Micro Extraction)	193
5.4.7 Resonancia magnética nuclear	193
5.4.8 Asignación de compuestos en cromatogramas de HPLC Tiempos de retención asignados en las condiciones de cromatografía usadas en HPLC	193
5.4.9 Asignación de compuestos en cromatografía gaseosa Análisis de la bio-reducción de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5)	194
5.4.10 Determinación de rotación óptica	195
5.4.11 Separación e identificación de productos de biotransformación	195
5.4.12 Parámetros utilizados para caracterizar las biotransformaciones a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas.	196
5.4.13 Certificados de ensayo y especificaciones técnicas de glicerina obtenida en proceso productivo de biodiésel	197
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>199</b>
<b>6. ANEXOS</b>	<b>221</b>
Anexo I Curvas de calibración	221
Anexo II Lactaldehído (4) como intermediario de biotransformaciones de metilglioxal (3)/glicerol (1)/glucosa (6)	229
Anexo III RMN - Síntesis enzimática de (R)-propilencarbonato (7a)	233
Anexo IV Estimación de incertidumbre en las determinaciones cuantitativas en HPLC Estimación de incertidumbre en las determinaciones cuantitativas	237

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Participación de EnergíasRenovables	8
<b>Figura 1.2:</b> Biocombustibles líquidos, Materias primas y Tecnologías asociadas	9
<b>Figura 1.3:</b> Biocombustibles líquidos y gaseosos, madurez de la tecnología	10
<b>Figura 1.4:</b> Meta de mezcla (%) de biodiésel por país	11
<b>Figura 1.5:</b> Producción de biodiésel en Uruguay	12
<b>Figura 1.6:</b> Evolución internacional de precios materias primas biodiésel y Petróleo Brent	13
<b>Figura 1.7:</b> Reacción de transesterificación. Producción de biodiésel y glicerol	14
<b>Figura 1.8:</b> Usos tradicionales del glicerol	15
<b>Figura 1.9:</b> Producción (total) y precios de glicerina refinada y cruda	15
<b>Figura 1.10:</b> Productos obtenibles a partir de glicerol por síntesis química	20
<b>Figura 1.11:</b> a) Producción radicalaria de acroleína, b) Producción iónica de acroleína	21
<b>Figura 1.12:</b> Productos de tert-butilación de glicerol	22
<b>Figura 1.13:</b> Productos de esterificación del glicerol	22
<b>Figura 1.14:</b> Síntesis de glicerol carbonato y de glicidol a partir de glicerol	23
<b>Figura 1.15:</b> Síntesis de epiclorhidrina a partir de glicerol	24
<b>Figura 1.16:</b> Producción de gas de síntesis y metanol renovable	24
<b>Figura 1.17:</b> Reformado del glicerol	25
<b>Figura 1.18:</b> Síntesis clásica de 1,3-propanodiol a partir de óxido de etileno	26
<b>Figura 1.19:</b> Síntesis de 1,3-propanodiol a partir de glicerol	26
<b>Figura 1.20:</b> Síntesis de propilenglicol a partir de glicerol	27
<b>Figura 1.21:</b> Algunos de los productos obtenibles biológicamente a partir de glicerol	28
<b>Figura 1.22:</b> PHAs estructura y denominación	30
<b>Figura 1.23:</b> Vía metabólica para la obtención de butanol a partir glicerol	36
<b>Figura 1.24:</b> Vía metabólica para la obtención de D-lactato a partir glicerol en <i>E. coli</i>	40
<b>Figura 1.25:</b> Síntesis de 3-hidroxi propionaldehído a partir de glicerol	42
<b>Figura 1.26:</b> Producción de 1,2-propanodiol mediante metabolismo de metilpentosas	45
<b>Figura 1.27:</b> Producción de 1,2-propanodiol mediante degradación acética de ácido láctico	46
<b>Figura 1.28:</b> Producción de 1,2-propanodiol a partir de glucosa	49
<b>Figura 1.29:</b> Respiración de glicerol en <i>E. coli</i>	49
<b>Figura 1.30:</b> Producción natural de 1,2-propanodiol en <i>E. coli</i>	49
<b>Figura 1.31:</b> Fermentación de glicerol en <i>E. coli</i> vías centrales y vías auxiliares	50
<b>Figura 1.32:</b> Sistemas auxiliares utilizados en la fermentación anaerobia de glicerol con formación de 1,2-propanodiol en <i>E. coli</i>	51
<b>Figura 1.33:</b> Producción de 1,2-propanodiol en <i>S. cerevisiae</i> modificada genéticamente	54
<b>Figura 1.34:</b> Modificaciones genéticas en <i>S. cerevisiae</i> con el propósito de obtener 1,2-propanodiol	55
<b>Figura 1.35:</b> Mecanismo de reacción propuesto para Gre2p	58
<b>Figura 1.36:</b> Mecanismo de reacción propuesto para la metilglicoxal sintasa actuando sobre dihidroxiacetona fosfato	60
<b>Figura 1.37:</b> Síntesis de PMPA a partir de ( <i>R</i> )-propilencarbonato	61
<b>Figura 1.38:</b> Retrosíntesis de briostatina (fragmento C17-C27)	63
<b>Figura 1.39:</b> Retrosíntesis y esteroeisómeros del metolaclor	64
<b>Figura 1.40:</b> Síntesis de <i>N</i> -tiazol 2-il- benzamidas fusionadas a cicloalquilo	64
<b>Figura 2.1:</b> Vía metabólica “ <i>de novo</i> ” propuesta	68
<b>Figura 2.2:</b> Clonado de <i>GRE2</i> en pACYCDuet-1 y de <i>YPR1</i> en pETDuet-1	69
<b>Figura 2.3:</b> Subclonado de <i>GRE2</i> en pETDuet-1 <i>YPR1</i>	70
<b>Figura 2.4:</b> Esquema Estrategia 2	72
<b>Figura 2.5:</b> Esquema propuesto de valorización del glicerol	73
<b>Figura 3.1:</b> Construcción de vectores de expresión - método directo a partir de pETDuet-1	77

<b>Figura 3.2:</b> Construcción de vectores de expresión - clonado en plásmidos auxiliares	<b>78</b>
<b>Figura 3.3:</b> Selección de transformantes en función de la orientación deseada del gen <i>GRE2</i>	<b>79</b>
<b>Figura 3.4:</b> Verificación de orientación del gen <i>YPR1</i> en pGem-T-Easy a partir de amplificación de ADN plasmídico extraído de cepas transformantes	<b>80</b>
<b>Figura 3.5:</b> Subclonado de <i>YPR1</i> en pET-Duet1	<b>82</b>
<b>Figura 3.6:</b> Subclonado de <i>GRE2</i> en pACYC-Duet1	<b>83</b>
<b>Figura 3.7:</b> Subclonado de <i>GRE2</i> en pWS3 (pETDuet-1 <i>YPR1</i> )	<b>86</b>
<b>Figura 3.8:</b> Búsqueda de transformantes con potencial incorporación de <i>GRE2</i> en pWS3	<b>85</b>
<b>Figura 3.9:</b> Amplificación con oligonucleótidos ws1 <i>YPR1</i> f/ws1 <i>YPR1</i> r y ws1 <i>GRE2</i> r/ws1 <i>GRE2</i> r	<b>86</b>
<b>Figura 3.10:</b> Amplificación con pETUpstream primer y T7terminator primer	<b>86</b>
<b>Figura 3.11:</b> Amplificación con oligonucleótidos ws1 <i>YPR1</i> f y primer ws1 <i>GRE2</i> r	<b>87</b>
<b>Figura 3.12:</b> Digestión del vector pWS4 con KpnI	<b>88</b>
<b>Figura 3.13:</b> Conjunto de vectores construidos y verificados satisfactoriamente	<b>89</b>
<b>Figura 3.14:</b> $\alpha$ -Etil acetoacetato de etilo y posibles productos de su biorreducción	<b>90</b>
<b>Figura 3.15:</b> Biotransformaciones de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo con los diferentes biocatalizadores. Evaluación de actividad <i>syn/anti</i>	<b>91</b>
<b>Figura 3.16:</b> Distribución de productos en biotransformación de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo con biocatalizador <i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS4) en presencia/ausencia de glicerol	<b>93</b>
<b>Figura 3.17:</b> Verificación de mantenimiento de condición doble mutante de cepas conjugadas	<b>96</b>
<b>Figura 3.18:</b> Biotransformación de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo con biocatalizadores construidos a partir de <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	<b>98</b>
<b>Figura 3.19:</b> Esquema de biotransformaciones en secuencia aerobiosis – anaerobiosis	<b>100</b>
<b>Figura 3.20:</b> Producción de 1,2-propanodiol con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT en biotransformaciones anaerobias de glicerol/glucosa a tiempos iniciales	<b>101</b>
<b>Figura 3.21:</b> Productos de biotransformación anaerobia de glicerol, régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	<b>102</b>
<b>Figura 3.22:</b> Productos de biotransformación anaerobia de glicerol/glucosa, régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	<b>103</b>
<b>Figura 3.23:</b> Productos de biotransformación anaerobia de metilglioxal/glucosa, régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	<b>105</b>
<b>Figura 3.24:</b> Co-inyección de muestra de biotransformación con estándares de concentración conocida. Estimación de la concentración de 1,2-propanodiol en muestra problema	<b>106</b>
<b>Figura 3.25:</b> Biotransformación de glicerol/glucosa con <i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4) Producción de 1,2-propanodiol vs diferentes relaciones buffer: biomasa	<b>107</b>
<b>Figura 3.26:</b> Biotransformación de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Concentración de 1,2-propanodiol (g/L) vs concentración aportada de metilglioxal (mM) en función del tiempo	<b>109</b>
<b>Figura 3.27:</b> Superficie de respuesta. Concentración de 1,2-propanodiol ( <b>2</b> ) (g/L) vs tiempo (hs) y concentración inicial de metilglioxal ( <b>3</b> ) (mM) adición en pulso	<b>110</b>
<b>Figura 3.28:</b> Estequiometría biotransformación de metilglioxal a 1,2-propanodiol	<b>111</b>
<b>Figura 3.29:</b> Rendimiento molar en biotransformación de metilglioxal (pulso inicial)	<b>112</b>
<b>Figura 3.30:</b> Rendimiento molar en biotransformación de metilglioxal (segundo pulso)	<b>112</b>
<b>Figura 3.31:</b> Concentración de Glucosa (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal/glucosa/glicerol. Régimen de células en reposo evaluación en función del tiempo y concentración acumulada pulso inicial y pulso a las 48 hs de metilglioxal	<b>113</b>
<b>Figura 3.32:</b> Concentración de 1,2-propanodiol (g/L) en función del tiempo. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Biotransformación de glucosa	<b>114</b>
<b>Figura 3.33:</b> Concentración de lactaldehído (Área HPLC) en biotransformaciones de metilglioxal/glucosa/glicerol. Régimen de células en reposo evaluación en función del tiempo y concentración inicial de metilglioxal	<b>116</b>
<b>Figura 3.34:</b> Concentración de lactaldehído (Área HPLC) y 1,2-propanodiol (g/L) en	

biotransformación de metilglioxal/glucosa/glicerol. Régimen de células en reposo evaluación en función de concentración de metilglioxal (mM) a 96 hs	117
<b>Figura 3.35:</b> Concentración de ácido láctico (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa en función de concentración de metilglioxal.	
Régimen de células en reposo en anaerobiosis- evaluación a 96 horas	118
<b>Figura 3.36:</b> Estereoisomería del ácido láctico (% Área) obtenido en biotransformaciones de metilglioxal en presencia de glucosa/glicerol. Derivatizado a metilésteres	119
<b>Figura 3.37:</b> Balance de Carbono y balance de equivalentes de reducción. Biotransformación de metilglioxal en presencia de glucosa/glicerol en anaerobiosis, células en reposo, adición en pulso de metilglioxal, tiempo 96 hs	121
<b>Figura 3.38:</b> Concentración relativa de productos (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa. Células en reposo en anaerobiosis en función de la concentración inicial de metilglioxal aportada en modalidad de pulso	122
<b>Figura 3.39:</b> Concentración de 1,2-propanodiol (g/L) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (mM) aditivadas en forma fraccionada. Régimen de células en reposo en biotransformación de metilglioxal en presencia de glucosa/glicerol	123
<b>Figura 3.40:</b> Superficie de respuesta. Concentración de 1,2-propanodiol (g/L) vs tiempo (hs) y concentración de metilglioxal en agregados (mM) adiciones sucesivas	124
<b>Figura 3.41:</b> Biotransformación de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Rendimientos molares en función de concentración de metilglioxal en adiciones (mM) y tiempo (hs)	124
<b>Figura 3.42:</b> Concentración de glucosa (g/L) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (mM) aditivadas. Biotransformación de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo en anaerobiosis	125
<b>Figura 3.43:</b> Concentración de lactaldehído (Área HPLC) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (mM) aditivada. Biotransformación de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo en anaerobiosis	126
<b>Figura 3.44:</b> Biotransformación de metilglioxal/glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo. Concentración de lactaldehído (Área HPLC) y 1,2-propanodiol (g/L) a 96 hs. Evaluación a distintas concentraciones de metilglioxal (mM) aditivadas en forma fraccionada.	127
<b>Figura 3.45:</b> Concentración de ácido láctico (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal en presencia de glicerol/glucosa en función de metilglioxal adicionado. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Evaluación a 96 horas (5 agregados)	128
<b>Figura 3.46:</b> Concentración relativa de productos (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal (adiciones sucesivas) en presencia de glicerol/glucosa a 96 hs	129
<b>Figura 3.47:</b> Balance de Carbono y Balance de equivalentes de reducción. Biotransformación de metilglioxal/glicerol/glucosa en anaerobiosis, células en reposo, adición fraccionada de metilglioxal	130
<b>Figura 3.48:</b> Comparación de rendimientos molares en la producción de 1,2-propanodiol a partir de metilglioxal en función de la relación de glucosa/glicerol y el tiempo de reacción	132
<b>Figura 3.49:</b> Biotransformación de metilglioxal 4 mM. Concentración de glucosa en función de la relación de concentración inicial glucosa/glicerol y el tiempo de reacción	133
<b>Figura 3.50:</b> Biotransformación de lactaldehído en presencia de glucosa/glicerol. Régimen de células en reposo anaerobias con biocatalizadores derivados de <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT	134
<b>Figura 3.51:</b> Vector de expresión pWS5 para metilglioxal sintasa a partir de vector pRSFDuet-1	136
<b>Figura 3.52:</b> Biotransformación de glicerol/glucosa. Régimen de células en reposo en anaerobiosis con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5)	137
<b>Figura 3.53:</b> Biotransformación de glicerol/glucosa. Régimen de células en crecimiento en anaerobiosis con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5)	137

<b>Figura 3.54:</b> Biotransformación de glicerol/glucosa. Régimen de células en crecimiento en aerobiosis con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5)	<b>138</b>
<b>Figura 3.55:</b> Estimación de efectos para cada parámetro evaluado	<b>142</b>
<b>Figura 3.56:</b> Diagrama de Pareto. Peso relativo de los diferentes parámetros	<b>144</b>
<b>Figura 3.57:</b> Interacciones entre parámetros: pH y co-sustrato	<b>145</b>
<b>Figura 3.58:</b> Interacción entre parámetros	<b>145</b>
<b>Figura 3.59:</b> Representación gráfica de un diseño factorial 2 <sup>3</sup> modelo de Box y Wilson	<b>146</b>
<b>Figura 3.60:</b> Superficie de respuesta Relación glucosa:glicerol y temperatura en inducción	<b>148</b>
<b>Figura 3.61:</b> Superficie de respuesta Relación glucosa:glicerol y pH	<b>149</b>
<b>Figura 3.62:</b> Superficie de respuesta Relación Temperatura en inducción y pH	<b>149</b>
<b>Figura 3.63:</b> Espectrometría de Masas – Inyección Directa para producto obtenido de biotransformación y estándar de 1,2-propanodiol comercial	<b>151</b>
<b>Figura 3.64:</b> GC-quiral-inyección del producto de biotransformación con estándares comerciales ( <i>R</i> )-1,2-propanodiol y ( <i>S</i> )-1,2-propanodiol	<b>152</b>
<b>Figura 3.65:</b> Biotransformación de glicerina cruda y splitting/glucosa respecto a glicerol PPA/ glucosa. Régimen de células en reposo con <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4	<b>153</b>
<b>Figura 3.66:</b> GC-quiral - Estándar comercial de propilencarbonato racémico, ( <i>R</i> )-propilencarbonato síntesis química y ( <i>R</i> )-propilencarbonato obtenido enzimáticamente	<b>160</b>
<b>Figura 3.67:</b> Productos de biorreducciones de metilglioxal 1,1-dimetil acetal y de metilglioxal con <i>S. cerevisiae</i> y <i>Daucus carota</i>	<b>161</b>
<b>Figura 3.68:</b> Síntesis de DL-lactaldehído	<b>161</b>
<b>Figura 3.69:</b> Valorización obtenida en el marco del presente trabajo	<b>162</b>
<b>Figura 5.1:</b> Ciclo de PCR utilizado en amplificación de ADN genómico de <i>E. coli</i>	<b>181</b>
<b>Figura 5.2:</b> Fracciones colectadas para identificación por MS-ID	<b>196</b>
<b>Figura 5.3:</b> Especificación glicerina de splitting ALUR	<b>197</b>
<b>Figura 5.4:</b> Especificación glicerina cruda ALUR	<b>198</b>
<b>Figura AI.1:</b> Curva de calibración de 1,2-propanodiol para cuantificación en HPLC	<b>223</b>
<b>Figura AI.2:</b> Curva de calibración de glicerol para cuantificación en HPLC	<b>224</b>
<b>Figura AI.3:</b> Curva de calibración de glucosa para cuantificación en HPLC	<b>224</b>
<b>Figura AI.4:</b> Curva de calibración de metilglioxal para cuantificación en HPLC	<b>225</b>
<b>Figura AI.5:</b> Curva de calibración de ácido láctico para cuantificación en HPLC	<b>225</b>
<b>Figura AI.6:</b> Curva de calibración de ácido fórmico para cuantificación en HPLC	<b>226</b>
<b>Figura AI.7:</b> Curva de calibración de acetato para cuantificación en HPLC	<b>226</b>
<b>Figura AI.8:</b> Curva de calibración de etanol para cuantificación en HPLC	<b>227</b>
<b>Figura AII.1:</b> CG-Quiral de lactaldehído estándar y muestras de biotransformación de metilglioxal/glicerol/glucosa	<b>231</b>
<b>Figura AII.2:</b> RMN 1H de lactaldehído	<b>231</b>
<b>Figura AIII.1:</b> RNM 13C de producto de reacción y blanco (sin lipasa)	<b>235</b>
<b>Figura AIII.2:</b> RNM 1H de producto de reacción y blanco (sin lipasa)	<b>235</b>
<b>Figura AIV.1:</b> Cromatograma en HPLC típico en fase móvil H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>240</b>
<b>Figura AIV.2:</b> Concentraciones medias y rangos valor máximo, valor mínimo (g/L) para sustratos y productos en repeticiones	<b>241</b>
<b>Figura AIV.3:</b> Concentraciones medias (g/L) y rangos $\pm 3 \times$ Desviación Estándar/(16 <sup>1/2</sup> ) para sustratos y productos en repeticiones	<b>241</b>
<b>Figura AIV.4:</b> Determinación de 1,2-propanodiol. Estimación de incertidumbres en réplicas en 3 ensayos diferentes realizados por triplicado, 24 y 48 hs, media $\pm 2 \times$ desv.est	<b>242</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1:</b> Purificación de glicerol	<b>17</b>
<b>Tabla 1.2:</b> Balance redox de la conversión de glicerol a biomasa y productos de fermentación	<b>50</b>
<b>Tabla 1.3:</b> Resumen del desempeño de diferentes microorganismos en la producción de 1,2-propanodiol (adaptada de Bennet 2001)	<b>55</b>
<b>Tabla 3.1:</b> Digestión de pWS2 (pCR™2.1- Topo®TA conteniendo GRE2) - elucidación de la orientación de la inserción del gen	<b>80</b>
<b>Tabla 3.2:</b> Digestión de pWS1 (pGEM-T-Easy conteniendo YPR1) – elucidación de la orientación en la inserción del gen	<b>81</b>
<b>Tabla 3.3:</b> Rendimientos de transformación (n° de unidades formadoras de colonia/μg ADN)	<b>81</b>
<b>Tabla 3.4:</b> Biotransformaciones desarrolladas con biocatalizadores de la Estrategia 1	<b>92</b>
<b>Tabla 3.5:</b> Biotransformación de glicerol/glucosa con biocatalizadores construidos a partir de <i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT, células en recimiento	<b>100</b>
<b>Tabla 3.6:</b> Concentraciones de 1,2-propanodiol obtenidas en biotransformaciones con células en reposo	<b>135</b>
<b>Tabla 3.7:</b> Diseño de ensayo según Plackett-Burman de 32 entradas	<b>141</b>
<b>Tabla 3.8:</b> Análisis de diferencia entre poblaciones en los dos niveles ( $\alpha < 0,05$ )	<b>143</b>
<b>Tabla 3.9:</b> Peso relativo de los estimados de cada parámetro	<b>144</b>
<b>Tabla 3.10:</b> Diseño factorial $2^3$ – modelo de Box y Wilson	<b>147</b>
<b>Tabla 3.11:</b> Niveles definidos para cada parámetro	<b>147</b>
<b>Tabla 3.12:</b> Ajuste del modelo a los datos experimentales en optimización	<b>148</b>
<b>Tabla 3.13:</b> Resultados obtenidos en síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol	<b>156</b>
<b>Tabla 3.14:</b> Resultados obtenidos en síntesis de ( <i>R</i> )-2-metoximetoxi-1-propanol	<b>157</b>
<b>Tabla 3.15:</b> Resultados obtenidos en síntesis de propilencarbonato	<b>158</b>
<b>Tabla 3.16:</b> Costos unitarios glicerina splitting y productos obtenidos	<b>162</b>
<b>Tabla 4.1:</b> Comparativo de resultados de biotransformaciones a ( <i>R</i> )-1,2-propanodiol	<b>166</b>
<b>Tabla 4.2:</b> Comparativo de resultados de biotransformaciones de glicerol a 1,2-propanodiol	<b>167</b>
<b>Tabla 5.1:</b> Vectores utilizados	<b>173</b>
<b>Tabla 5.2:</b> Vectores construidos	<b>173</b>
<b>Tabla 5.3:</b> Primers utilizados	<b>174</b>
<b>Tabla 5.4:</b> Cepas utilizadas	<b>175</b>
<b>Tabla 5.5:</b> Cepas construidas	<b>176</b>
<b>Tabla 5.6:</b> Enzimas de restricción utilizadas	<b>178</b>
<b>Tabla 5.7:</b> Medio cultivo aerobiosis/anaerobiosis	<b>179</b>

<b>Tabla 5.8:</b> Buffer MOPS/Bicarbonato	<b>179</b>
<b>Tabla 5.9:</b> Medio símil M9 con Acetato	<b>179</b>
<b>Tabla 5.10:</b> Medio símil M9 para biotransformación de glicerol	<b>180</b>
<b>Tabla 5.11:</b> Dosificación de antibióticos en medios de cultivo	<b>180</b>
<b>Tabla 5.12:</b> Sustratos y reactivos utilizados en Biotransformaciones	<b>182</b>
<b>Tabla 5.13:</b> Condiciones utilizadas en ensayos por Cromatografía Gaseosa	<b>191</b>
<b>Tabla 5.14:</b> Tiempos de retención asignados para compuestos relevantes en Biotransformaciones de glicerol/glucosa en las condiciones de ensayo descritas	<b>194</b>
<b>Tabla 5.15:</b> Tiempos de retención asignados para $\beta$ -Etil Acetoacetato de Etilo y los posibles alcoholes productos de biorreducción en las condiciones de ensayo descritas	<b>195</b>
<b>Tabla AIV.1:</b> Concentración obtenida para cada reactivo y producto de reacción en cada repetición de medida, Valores máximo, mínimo, media y desviación estándar	<b>240</b>
<b>Tabla AIV.2:</b> Desviación estándar en triplicados de réplicas–Muestras a 24 hs y 48 hs	<b>242</b>

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 3.1:</b> Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol - protección del alcohol primario	<b>154</b>
<b>Esquema 3.2:</b> Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol - método de protección alternativo	<b>154</b>
<b>Esquema 3.3:</b> Reacción de 1-(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxy)propan-2-ol con cloro-metil-metil éter	<b>155</b>
<b>Esquema 3.4:</b> Reacción de desprotección de <i>tert</i> -butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetilsilano y obtención de 2-metoximetoxi-1-propanol	<b>155</b>
<b>Esquema 3.5:</b> Desprotección de <i>tert</i> -butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetilsilano y obtención alternativa de 2-metoximetoxi-1-propanol	<b>155</b>
<b>Esquema 3.6:</b> Síntesis de ( <i>R</i> )-2-metoximetoxi-1-propanol, protección del alcohol primario.	<b>156</b>
<b>Esquema 3.7:</b> Reacción de ( <i>R</i> )-1-(( <i>tert</i> -butil dimetil silil)oxy)propan-2-ol con cloro-metil-metil éter	<b>156</b>
<b>Esquema 3.8:</b> Desprotección de ( <i>R</i> )- <i>tert</i> -butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetil silano y obtención de ( <i>R</i> )-2-metoximetoxi-1-ropanol	<b>156</b>
<b>Esquema 3.9:</b> Síntesis de propilencarbonato	<b>157</b>
<b>Esquema 3.10:</b> Síntesis de ( <i>R</i> )-propilencarbonato	<b>158</b>
<b>Esquema 3.11:</b> Síntesis enzimática de ( <i>R</i> )-propilencarbonato – reacción con dimetilcarbonato	<b>159</b>
<b>Esquema 3.12:</b> Síntesis enzimática de ( <i>R</i> )-propilencarbonato – reacción con dietilcarbonato	<b>159</b>

Página intencionalmente dejada en blanco

## Lista de abreviaturas

<b>1,2-PDO</b>	1,2-propanodiol.	<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Protón.	<b>4-DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina.
<b>ABE</b>	Acetona, Butanol y Etanol.	<b>Acac</b>	Acetilacetato.
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo.	<b>AcOH</b>	Ácido acético.
<b><math>\alpha_D^{20}</math></b>	Rotación óptica a 20 °C.	<b>AKR</b>	Aldo ceto reductasas.
<b>ALUR SA</b>	Alcoholes del Uruguay S.A.	<b>Amp</b>	Ampicilina.
<b>BEN</b>	Balance Energético Nacional.	<b>BtL</b>	Biomass to Liquid.
<b>Bu<sub>3</sub>Sn</b>	Tributiltin hidruro.	<b>CAL B</b>	<i>Candida antarctica</i> lipasa B.
<b>Cm</b>	Cloramfenicol.	<b>CNCM</b>	National Collection of Microorganisms Cultures.
<b>COP</b>	Conferencia de las Partes (Cambio climático).	<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy.
<b>csp</b>	Cantidad suficiente para.	<b>d</b>	Doblete.
<b><math>\delta</math></b>	Desplazamiento químico.	<b>DAP</b>	Ácido diamino pimérico.
<b>dd</b>	Doblete doblete.	<b>Desv. Est.</b>	Desviación estándar.
<b>DHA</b>	Dihidroxiacetona.	<b>DIAD</b>	Diisopropil azodicarboxilato.
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> ,Diisopropiletilamina.	<b>DME</b>	Dimetiléter.
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> ,-Dimetilformamida.	<b>DMPM</b>	Bis(dimetilfosfino)metano.
<b>DNE-MIEM</b>	Dirección Nacional de Energía - Ministerio de Industria, Energía y Minería.	<b>DO<sub>600 nm</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm.
<b>DoE</b>	Departamento de Estado (Estados Unidos de Norteamérica).	<b>DTBG</b>	di- <i>tert</i> -Butilglicerol.
<b>e.e.</b>	Exceso enantiomérico.	<b>EDCI</b>	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
<b>EP</b>	Éter de petróleo.	<b>Et<sub>3</sub>N</b>	<i>N,N,N</i> , trietilamina.
<b>ETBE</b>	Etil tert butil éter.	<b>EtOH</b>	Etanol.
<b>FCC</b>	Food Chemical Codex.	<b>FID</b>	Detector de ionización de llama.
<b>FT</b>	Fischer Tropsch.	<b>GC</b>	Cromatografía gaseosa.
<b>GC-MS</b>	Cromatografía gaseosa- Espectrometría de masas.	<b>GC-quiral</b>	Cromatografía gaseosa quiral.
<b>GEI</b>	Gases de Efecto Inveradero.	<b>Gg</b>	Glucosa/glicerol.
<b>GK</b>	Glicerol kinasa.	<b>GLP</b>	Gas licuado de petróleo.
<b>Gm</b>	Gentamicina.	<b>GSR</b>	Global Status Report.
<b><math>\eta</math></b>	Eficiencia.	<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana.
<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple bond correlation.	<b>HMPD</b>	Hidroxi metil fenil dioxolano.
<b>HOAc</b>	Ácido acético.	<b>HOBt</b>	1-Hidroxibenzotriazol.
<b>HOG</b>	High osmolarity glicerol.	<b>HPA</b>	Hidroxi propionaldehído.

<b>HPD</b>	Hidroxi fenil dioxolano.	<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta precisión.
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Spectroscopy.	<b>I+D+i</b>	Investigación, desarrollo e innovación.
<b>IEA</b>	Agencia Internacional de Energía.	<b>IPCC</b>	Panel intergubernamental para el cambio climático.
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.	<b>IR</b>	Índice de refracción.
<b>IRENA</b>	International Renewable Energy Agency.	$J_{ab}$	Constante de acoplamiento.
<b>Kn ó Kan</b>	Kanamicina.	<b>LB</b>	Luria Bertani.
<b>LC</b>	Límite de cuantificación.	<b>Leu</b>	Leucina.
<b>m</b>	Multiplete.	<b>MeO</b>	Metoxi.
<b>MeOH</b>	Metanol.	<b>MM</b>	Millones.
<b>MOM</b>	Metoximetil acetal.	<b>MOMCI</b>	Metilclorometiléter.
<b>MOPS</b>	3-Morfolin propano-1-ácido sulfónico.	<b>MS-ID</b>	Espectroscopía de masas - Inyección Directa.
<b>MTBE</b>	Meti tert butil éter.	<b>N</b>	Número de repeticiones en un ensayo.
<b>OCDE</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.	<b>P</b>	Presión.
<b>P(HB-co-HV)</b>	Polihidroxitirato-co-hidrovalerato.	<b>PAGE</b>	Electroforesis de proteínas en gel de agarosa.
<b>pb</b>	Pares de bases.	<b>PCI</b>	Poder Calorífico Inferior.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.	<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano.
<b>PEP</b>	Fosfoenol piruvato.	<b>PET</b>	Poli Etilentereftalato.
<b>PHAs</b>	Polihidroxialcanoatos.	<b>PHB</b>	Polihidroxitirato.
<b>PIR</b>	Piruvato.	<b>PMF</b>	Fuerza protón motriz.
<b>PMPA</b>	(R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina].	<b>PPA</b>	Puro para análisis.
<b>PPh<sub>3</sub></b>	Trifenilfosfina.	<b>PS</b>	Poliestireno.
<b>PTT</b>	Politrimetilentereftalato.	<b>REN21</b>	Renewable Energy Policy Network for the 21 <sup>st</sup> Century.
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear.	<b>Rs</b>	Resolución cromatográfica.
<b>s</b>	Singulete.	<b>SCWG</b>	Gasificación en agua supercrítica.
<b>S-Moc</b>	S-metolaclor.	<b>SPME</b>	Micro extracción en fase sólida.
<b>Syngas</b>	Gas de síntesis.	<b>T</b>	Temperatura.
<b>t</b>	Tiempo.	<b>ta</b>	Temperatura ambiente.
<b>TBAF</b>	Fluoruro de Tetrabutilamonio.	<b>TBDMSi</b>	<i>Tert</i> -Butildimetilsilil.
<b>TBDMSiCl</b>	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsilil.	<b>TBDPS</b>	<i>tert</i> -Butildifenilsililo.
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA.	<b>TDB</b>	Triazabicyclodeceno.
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano.	<b>TLC</b>	Cromatografía en Capa Fina.
<b>TMHD</b>	2,2,6,6-Tetrametil-3,5-heptadiona.	<b>TMSBr</b>	Bromotrimetilsilano.
<b>TPD</b>	Tosiloxi propanodiol.	<b><i>tpi1</i></b>	Triosa fosfato isomerasa.

<b>T<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención.	<b>TTBG</b>	Tri- <i>tert</i> -butilglicerol.
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia.	<b>Ura</b>	Uracilo.
<b>USP</b>	Farmacopea de Estados Unidos de Norteamérica.	<b>UV<sub>254nm</sub></b>	Ultra violeta, longitud de onda 254 nm.
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.		

Página intencionalmente dejada en blanco

## ***Resumen***

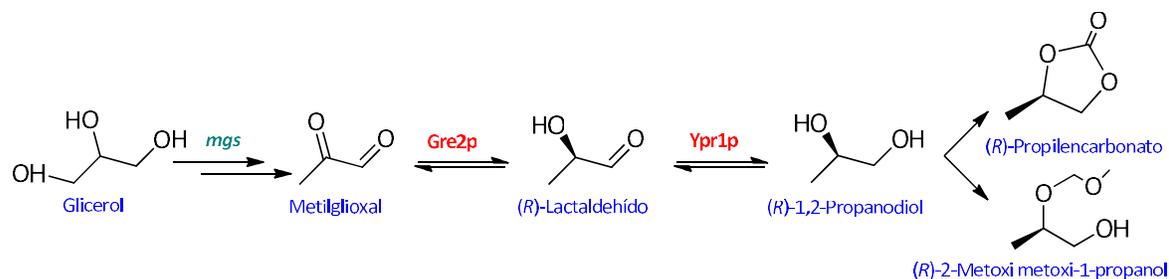
Página intencionalmente dejada en blanco

## Resumen

La producción de biodiésel mediante la reacción de transesterificación (único proceso tecnológicamente maduro a la fecha para ese propósito) genera simultáneamente como subproducto glicerol en relación aproximadamente 9:1 en masa. La evolución positiva que en los últimos años ha presentado la producción de este biocombustible a nivel global ha desencadenado la introducción de volúmenes inmanejables para el mercado del glicerol, presionando fuertemente a la baja su precio. Este hecho -de no encontrarse una solución- amenaza impactar en la sustentabilidad ambiental y económica del biodiésel.

La búsqueda de alternativas a esta sobreproducción de glicerol ha sido un desafío atendido por la comunidad científica internacional desarrollándose múltiples estrategias (desde la búsqueda de nuevas aplicaciones que permitan su uso directo, el uso en productos masivos que lo demanden como insumo, así como la búsqueda de síntesis de productos que impliquen agregado de valor a este co-producto). El presente trabajo se inscribe dentro de esta última alternativa proponiendo la **valorización del glicerol a través de su biotransformación en 1,2-propanodiol enantioméricamente puro y su posterior derivatización obteniéndose sintones quirales con aplicación en química fina.**

Recurriendo a ingeniería metabólica en *E. coli* se diseñó, construido y evaluado un conjunto de biocatalizadores con ese objetivo. A partir de la expresión de la metilglioxal sintasa (*mgs*) de *E. coli*, una metilglioxal reductasa (*Gre2p*) y una aldehído reductasa (*Ypr1p*) ambas de *S. cerevisiae*, se ha logrado obtener **(R)-1,2-propanodiol enantioméricamente puro** (con un e.e. > 99 %, en concentración de **0,45 g/L**) a partir de glicerol.



Este producto, además de constituir una alternativa de valorización en sí mismo es punto de partida para otros compuestos de elevado valor agregado, entre ellos, en el presente trabajo se ha logrado la síntesis química del **(R)-2-metoxi metoxi-1-propanol** y del **(R)-propilencarbonato**.

Adicionalmente para el **(R)-propilencarbonato** se ha completado su síntesis a partir de glicerol recurriendo exclusivamente a métodos biocatalíticos con lo que se logra mejorar notoriamente el desempeño ambiental de esta síntesis.

La relación de precios existente entre los productos obtenidos enzimáticamente y quimio-enzimáticamente, respecto al costo del material de partida (glicerol crudo o de splitting obtenido del proceso industrial de biodiésel) se ubica en el orden de  $1E+5$ , hecho este que permite considerar cumplido el objetivo planteado de aportar alternativas a la valorización de este subproducto, recurriendo a herramientas biocatalíticas.

Simultáneamente se ha aportado al desarrollo del conocimiento del sistema estudiado y se han obtenido los que, hasta donde se tiene conocimiento, son los primeros microorganismos desarrollados por Ingeniería Metabólica en nuestra institución, en colaboración entre el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones y el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la UdelaR.

Todo lo anterior sienta las bases para profundizar el estudio en fases posteriores apuntando a su escalado y posible desarrollo comercial.

# **Capítulo 1**

## ***Antecedentes***

Página intencionalmente dejada en blanco

## 1. INTRODUCCION

Pocos temas han marcado tan fuertemente la agenda al inicio del Siglo XXI como la preocupación ambiental y el abastecimiento de energía. En la intersección de ambos temas se ubica la inquietud por la sustentabilidad del modelo de desarrollo que como especie hemos logrado acuñar y dentro de ella, como uno de los desafíos a atender urgentemente las acciones que se deben adoptar para lograr -en el mediano plazo- una significativa reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI).

A efectos de mostrar el grado de interrelación entre estas temáticas en la actualidad se puede recurrir, entre otros, a las más recientes publicaciones del Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC)<sup>1,2</sup>ó analizar el documento que resume los acuerdos alcanzados a nivel internacional en la 21ª sesión de la Conferencia de las Partes (COP) desarrollada en París en diciembre de 2015.<sup>3</sup>

En ambos documentos queda expresado una vez más (ya en carácter de hecho indiscutidamente demostrado), la existencia del cambio climático de origen antrópico y en particular el impacto que el abastecimiento energético ha tenido en la acumulación de los GEI, así como las medidas que se requerirán adoptar tanto a efectos de alcanzar la mitigación de esas emisiones como para alcanzar una adaptación a un escenario cambiante en materia climática.

No obstante, dado que incluso hasta el día de hoy el debate sobre el Cambio Climático está teñido de acusaciones sobre implicancias en las más diversas direcciones, lo más ilustrativo es quizá recurrir a una fuente que lejos de estar sospechada como activista ambiental, si está comprometida con el abastecimiento energético en los países centrales, tal el caso de la Agencia Internacional de la Energía (IEA) institución que asesora a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para los temas energéticos. Esta agencia internacional publica periódicamente su visión en relación al sector en la serie World Energy Outlook y en el volumen correspondiente al año 2012 expresa que: ***“Si el mundo pretende cumplir el objetivo de limitación del aumento de la temperatura mundial a 2 °C, hasta 2050 no se podrá consumir más de un tercio de las reservas probadas de combustibles fósiles, a menos que se generalice el uso de la tecnología de captura y almacenamiento de carbono...”***<sup>4</sup>

Este convencimiento creciente de que el Cambio Climático es una realidad del presente y que acompañará el desarrollo de la humanidad por al menos algunos siglos ha generado un ambiente propicio para la búsqueda de alternativas en aquellos sectores considerados

claves para su resiliencia, a saber la agricultura, la forestación, la eficiencia energética y las energías renovables.<sup>5-8</sup>

## 1.1 Las energías renovables, el transporte y los biocombustibles en el contexto internacional

La participación de las Energías Renovables en el abastecimiento energético global continúa siendo minoritaria (19,3 % del total) según puede observarse en el gráfico adaptado a partir de la información obtenida en el Global Status Report (GSR) 2016 publicado por el instituto Renewable Energy Policy Network for the 21<sup>st</sup> Century (REN 21). No obstante lo anterior, al observarlo en perspectiva en general es posible encontrar una evolución positiva en las tendencias de incorporación anual de cada fuente. Adicionalmente se observa que el mayor dinamismo lo presenta el sector eléctrico, en el que la madurez tecnológica y la consecuente reducción de costos de varias alternativas con destino a la generación eléctrica favorece su adopción por parte de los diferentes sistemas eléctricos (tal el caso de la energía eólica, generación a partir de biomasa y más recientemente la energía solar fotovoltaica, entre otras).<sup>9</sup>

Participación de Energías Renovables en el Consumo Total Final de Energía, 2015.

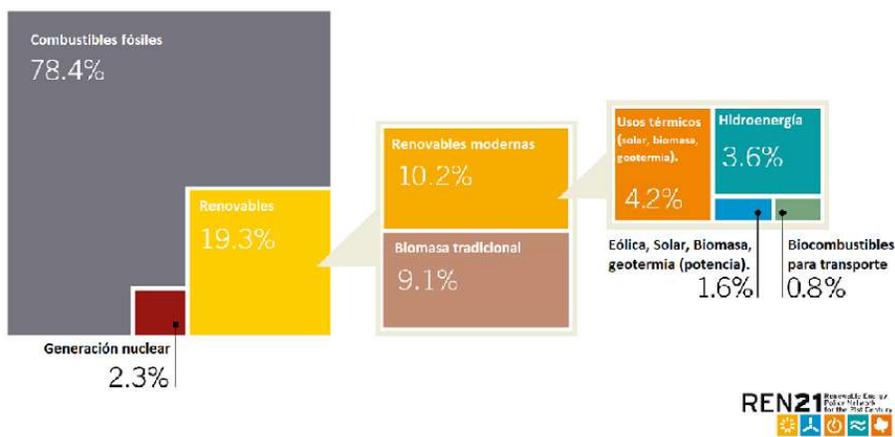
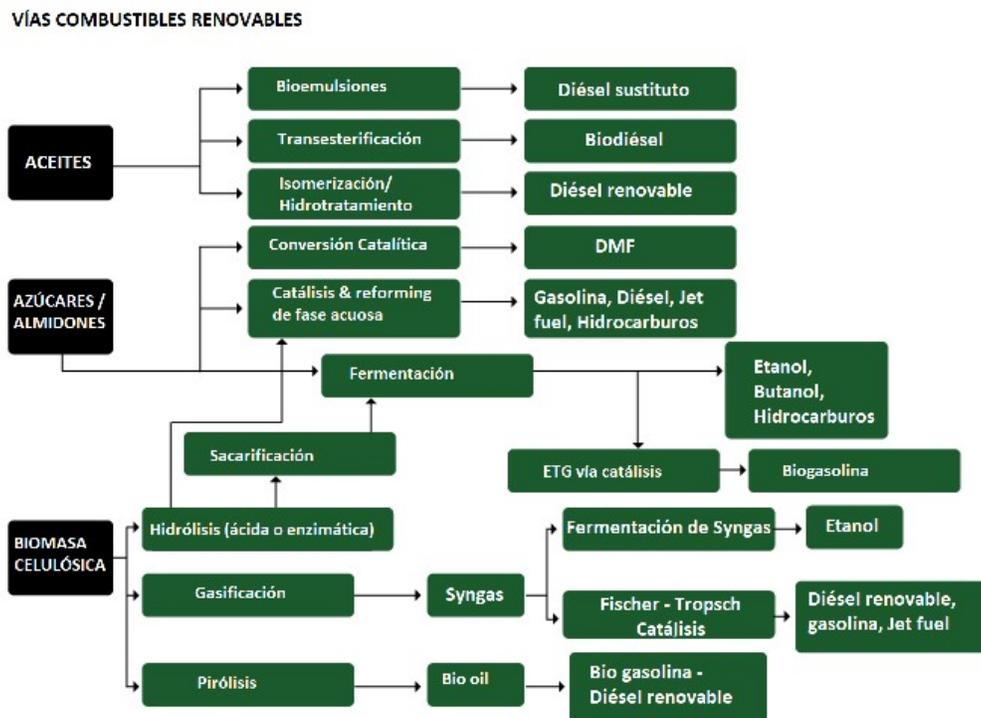


Figura 1.1: Participación de Energías Renovables (adaptada de GSR-REN21).

Como contracara del escenario auspicioso anteriormente señalado la Agencia Internacional de Energías Renovables (IRENA), ha concluido que de todos los sectores de actividad, el que menor participación de energías renovables presenta es el sector transporte.<sup>10</sup> El sector transporte es responsable de aproximadamente el 26 % de las emisiones de GEI, siendo adicionalmente uno de las pocas áreas de demanda de energía en las que se verifica un incremento de emisiones en el período reciente.<sup>11</sup>

Lo anterior evidencia la necesidad de buscar alternativas que posibiliten la introducción de nuevas fuentes energéticas asociadas a este uso. El menú de opciones por el que se pueden

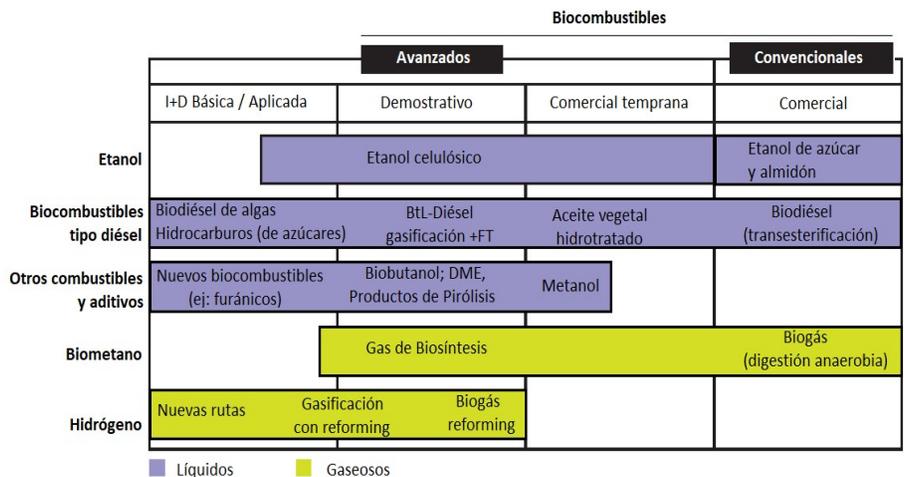
aportar alternativas para abastecer la demanda del sector transporte más eficientemente y reduciendo el impacto ambiental es muy variado e incluye, entre otras, por ejemplo el uso de combustibles fósiles no tradicionalmente asociados a este uso (gas natural), el desarrollo de vehículos y acumuladores (baterías) que permitan aprovechar picos de generación a partir de fuertes intermitentes (tal el caso de la energía eólica o solar), el desarrollo de vectores como el Hidrógeno o la profundización de las alternativas de producción de biocombustibles con destino automotor.<sup>12</sup>



**Figura 1.2: Biocombustibles líquidos, Materias primas y Tecnologías asociadas (imagen adaptada de Advanced Biofuels Association).**

Bajo la denominación de biocombustibles se engloba un conjunto variado de productos, que llevan a su vez asociadas diversas tecnologías.<sup>13,14</sup> En la Figura 1.2 se representan abreviadamente los diferentes tipos de biocombustibles líquidos obtenibles a partir de biomasa de diferentes orígenes, así como los procesos de transformación involucrados.<sup>15</sup>

Para el caso de los combustibles utilizables en motores diésel, la producción de biodiésel mediante el proceso de transesterificación, resulta a la fecha ser una de las pocas, sino prácticamente la única alternativa renovable de aplicación suficientemente madura para su aplicación comercial.<sup>16</sup> Si bien se cuenta en fase de investigación y desarrollo o en fase de demostración con otras opciones, la introducción de las mismas en fase comercial madura demandará al menos algunos lustros más (Figura 1.3).



**Figura 1.3: Biocombustibles líquidos y gaseosos, madurez de la tecnología.**

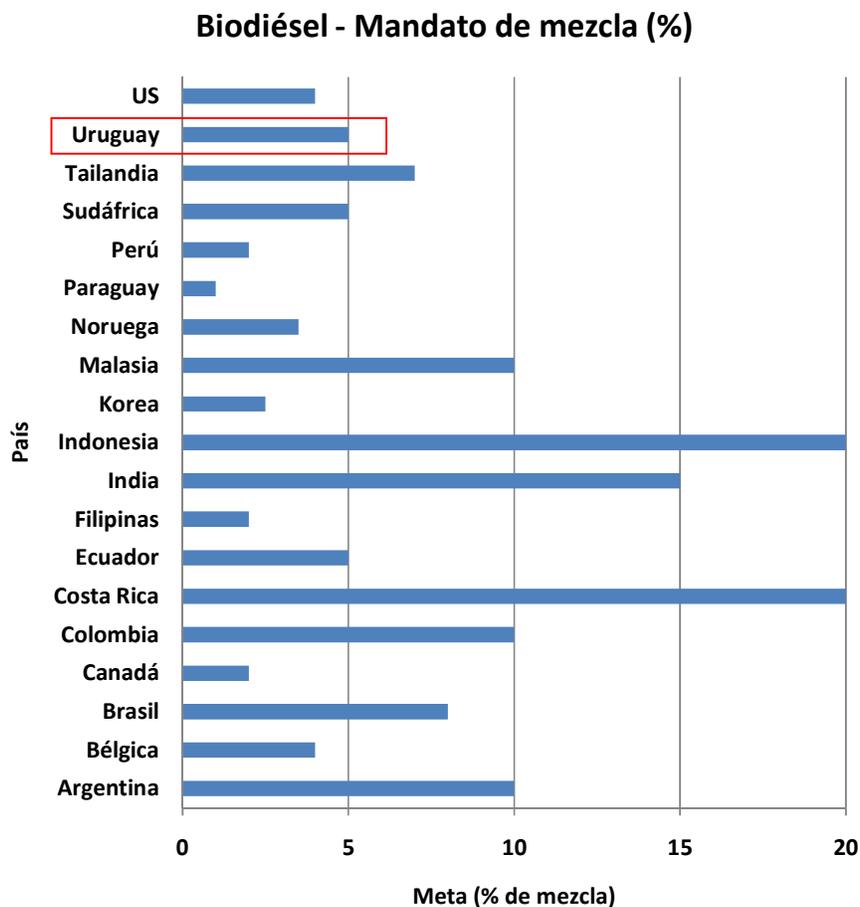
## 1.2 Producción de biocombustibles – tendencia global

La producción mundial de biocombustibles se ha multiplicado por siete desde el año 2000, sin embargo, a la fecha representa aproximadamente el 4 % de la demanda final de combustibles líquidos e involucra a 1,7 MM de puestos de trabajo.

Para el biodiésel en 2016, el último año con estadísticas globales procesadas, se observó un 2,1 % de crecimiento en la producción respecto al año anterior, alcanzando la cifra de 30.8 billones de litros. El ranking de países productores de biodiésel está encabezado (medido en volumen) por Estados Unidos, Brasil, Alemania, Argentina, e Indonesia.<sup>17</sup>

A nivel global menos de 20 países han fijado metas de % de mezcla de biodiésel en combustible diésel de origen fósil. Los compromisos oscilan entre el 1 y el 20 % (Figura 1.4).

Al igual que ocurre en todo el sistema energético la tendencia de las inversiones del presente de alguna manera pautan la evolución futura del sector. El análisis de la tendencia mundial en materia de inversiones asociadas a biodiésel, alcanza su máximo en el año 2007 declinando continuamente a partir de ese momento, lo que resulta un claro indicador de las dificultades que esta alternativa tecnológica continua presentando, incluso hoy, para su desarrollo. Consecuentemente se encuentra en revisión la proyección de mezcla a futuro.<sup>18</sup>



**Figura 1.4: Meta de mezcla (%) de biodiésel por país.**

### 1.3 Producción de biocombustibles – contexto local

Lejos de resultar ajeno al proceso de incorporación de fuentes renovables Uruguay tiene un rol muy activo en la incorporación de estos recursos, teniendo metas para el corto plazo que pueden calificarse como muy ambiciosas en general y en particular en el área de los biocombustibles.<sup>19,20</sup>

La meta insignia de la Política Energética vigente, establece alcanzar una participación de al menos el 50% de energías renovables en su matriz primaria de abastecimiento de energía a partir de, entre otras, las siguientes medidas:

- i) inclusión de al menos 25 % de fuentes renovables no convencionales en la matriz eléctrica de generación (eólica, solar fotovoltaica, generación a partir de biomasa, etc.).
- ii) reducción en al menos un 15 % de la dependencia de combustibles fósiles en el sector transporte a partir de sustitución de fuentes y medidas de eficiencia energética en el

sector. En particular, para los biocombustibles se ha establecido con la aprobación de la Ley N° 18.195 en el año 2007 metas para el corto plazo fijando un mínimo de incorporación de 5 % de Etanol en las gasolinas y un mínimo de 5% de biodiésel en el combustible diésel a ser alcanzados en el año 2015.<sup>21</sup>

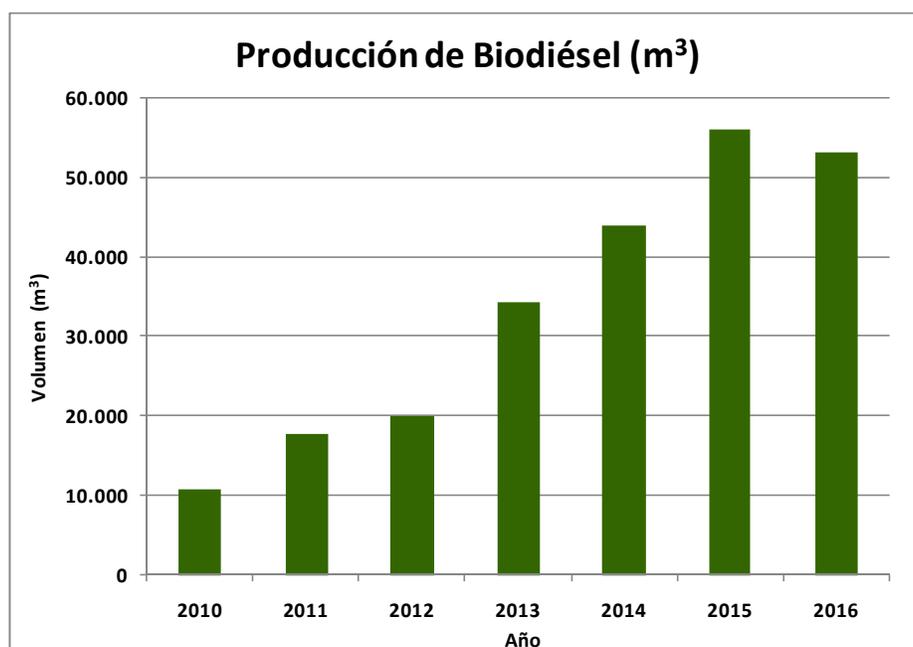


Figura 1.5: Producción de biodiésel en Uruguay (a partir del BEN 2010-2017).

#### 1.4 Desafíos aún existentes asociados a la producción de biodiésel en Uruguay

Asumiendo por tanto, que el biodiésel es y seguramente será en el corto plazo una de las pocas alternativas para la incorporación de energías renovables en el sector transporte, en aquellos dispositivos que basan su funcionamiento en un ciclo diésel, corresponde observar que, la introducción de este biocombustible continúa presentando importantes desafíos por resolver, tanto a nivel global como local, entre los que se pueden mencionar:

- i) **la preocupación por el impacto que en la seguridad alimentaria a nivel global pueda representar la expansión de su producción.**<sup>22-24</sup>

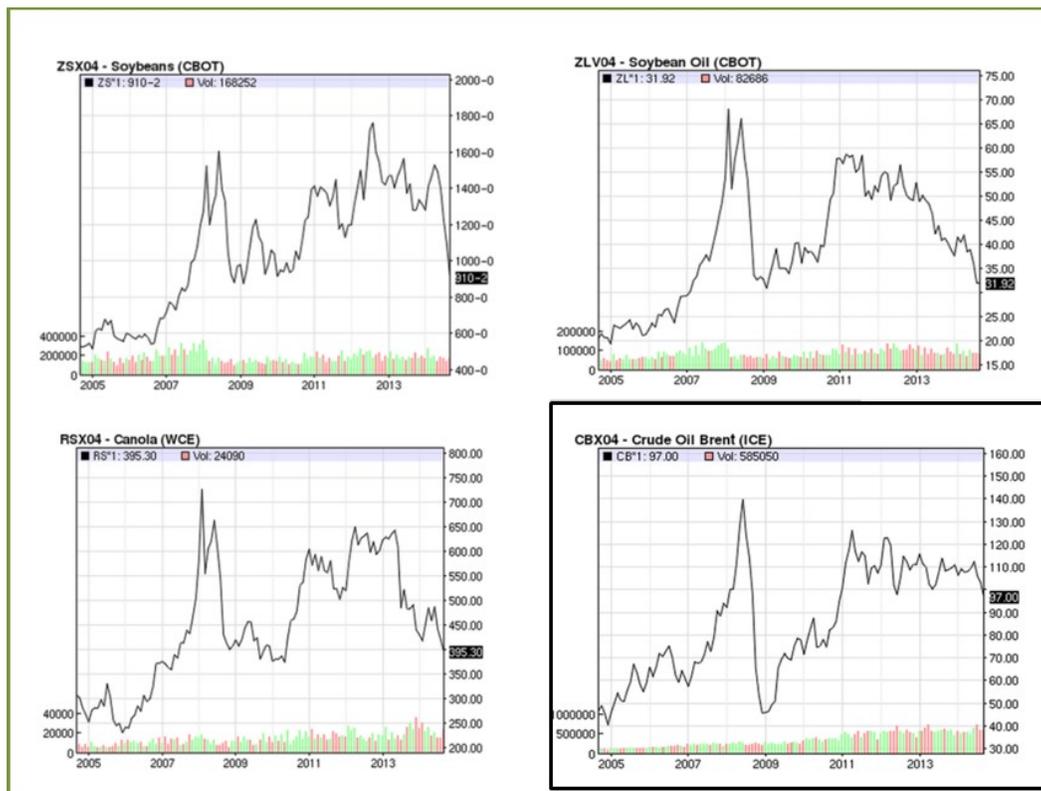
Este aspecto ha tomado relevancia a partir de mediados del lustro pasado en que el incipiente desarrollo del mercado de los biocombustibles evidenció el inicio de competencia por recursos tradicionalmente utilizados en la producción de alimentos, pudiéndose citar dentro de estos recursos tanto a las materias primas

directas, tal el caso de los granos oleaginosos, así como, en forma indirecta, el uso de la tierra necesaria para su producción.

En ese sentido, se pueden mencionar como reacción de la industria a esos cuestionamientos el desarrollo de nuevas alternativas tecnológicas para la producción de biocombustibles a partir de materias primas diferentes a las utilizadas en la manufactura de alimentos (también llamados biocombustibles de segunda y tercera generación) así como la valoración de indicadores de sustentabilidad en los que se incluyen estos aspectos.<sup>25,26</sup>

ii) **el escaso nivel de desacople a la evolución de precios de los “comodities energéticos” (en particular del petróleo).**

En las gráficas siguientes se muestra la evolución que han verificado las transacciones de materias primas más estrechamente vinculadas a la producción de biodiésel (Soja-grano, aceite de soja y canola).<sup>27-30</sup>



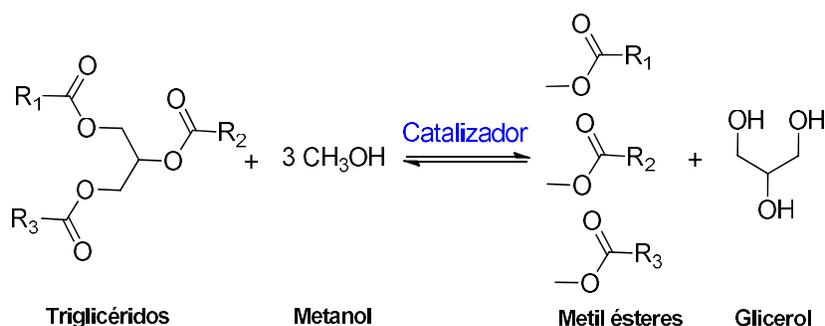
**Figura 1.6: Evolución internacional de precios materias primas biodiésel y Petróleo Brent.**

Si se compara la referida evolución con la verificada en el producto que, a partir de su manufactura se pretende desplazar (petróleo y derivados), se puede observar una clara correlación entre ambos. Lo anterior, quedó en evidencia a mediados del año 2008, ocasión en la que se verificó el pico histórico del precio del petróleo superando los 140 USD/barril. El paradigma imperante hasta ese

momento señalaba que éste era precisamente el escenario más favorable para lograr la penetración del biodiésel. No obstante, el arrastre de precios verificados en toda la cadena productiva, y especialmente en el precio de los insumos para la producción (en el caso Uruguay mayormente soja y sebo vacuno) llevó no solo a que no se concretara el esperado incremento de la participación de dichos combustibles, sino que incluso se cristalizó un retroceso en la misma. Esta “paradoja de los biocombustibles”, condujo en el ámbito local a que de la totalidad de las plantas de producción privada que se encontraban operativas a inicio de 2008 sólo una mantuviera actividad a finales de ese año.

iii) **la saturación del mercado de la glicerina principal subproducto obtenible en la reacción de transesterificación**<sup>31-35</sup>

La estequiometría de la reacción de transesterificación, representada en la Figura 1.7 permite calcular que en masa la producción del glicerol corresponde a aproximadamente un décimo de la producción del producto objetivo, el valor exacto queda definido por la composición del aceite de partida, descrito en la ecuación donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan cadenas hidrocarbonadas entre 15 y 21 unidades de Carbono.



**Figura 1.7: Reacción de transesterificación. Producción de biodiésel y glicerol.**

Si bien desde su descubrimiento en 1783 el glicerol es ampliamente utilizado (fundamentalmente por parte de la industria cosmética, alimentaria, del tabaco, química y farmacéutica entre otras) es un hecho asumido por los principales actores del sector que estas industrias no están en condiciones de absorber la creciente sobreproducción de este producto como subproducto de la industria de biodiésel.<sup>36,37</sup>

Se ha descrito que, en el año 2013 el 66,2 % de la glicerina producida a nivel global se ha obtenido como subproducto de este proceso.<sup>38</sup> Resulta por tanto fácilmente comprensible que en el período 2000 – 2012, al tiempo que la producción global de biodiésel se multiplicó por 29, el precio del subproducto se haya desplomado alcanzando valores históricamente no pensables.<sup>39,40</sup>

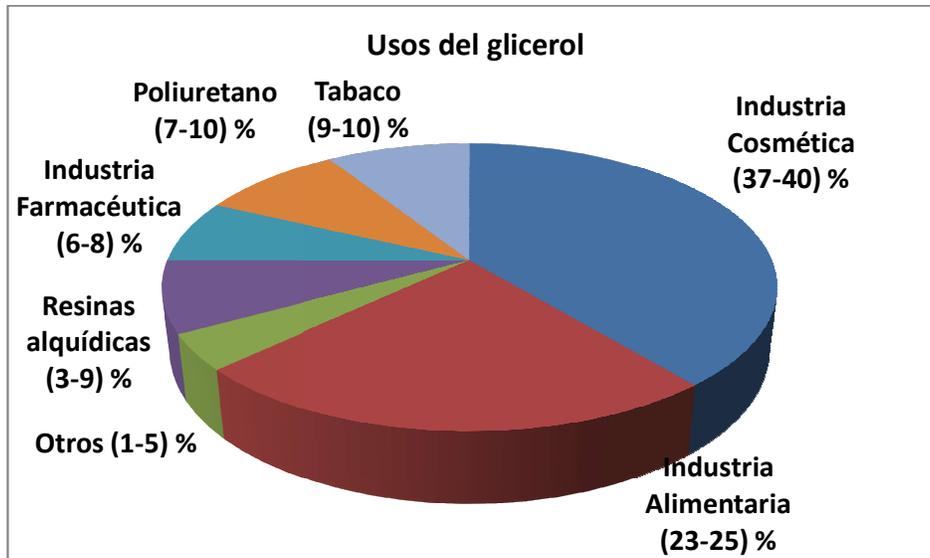


Figura 1.8: Usos tradicionales del glicerol.

Paralelamente, según se muestra en la Figura 1.9 se ha verificado una reducción a la mitad del precio del producto glicerol refinado y al quinto para el producto crudo.<sup>41,42</sup> Johnson y colaboradores ya en 2007 advertían sobre la sobreproducción de glicerina y las escasas opciones con que contaban en ese momento los productores de biodiésel para evitar que el principal co-producto en vez de transformarse en fuente de ingreso demandara recursos adicionales para ser tratado como efluente.<sup>32</sup>

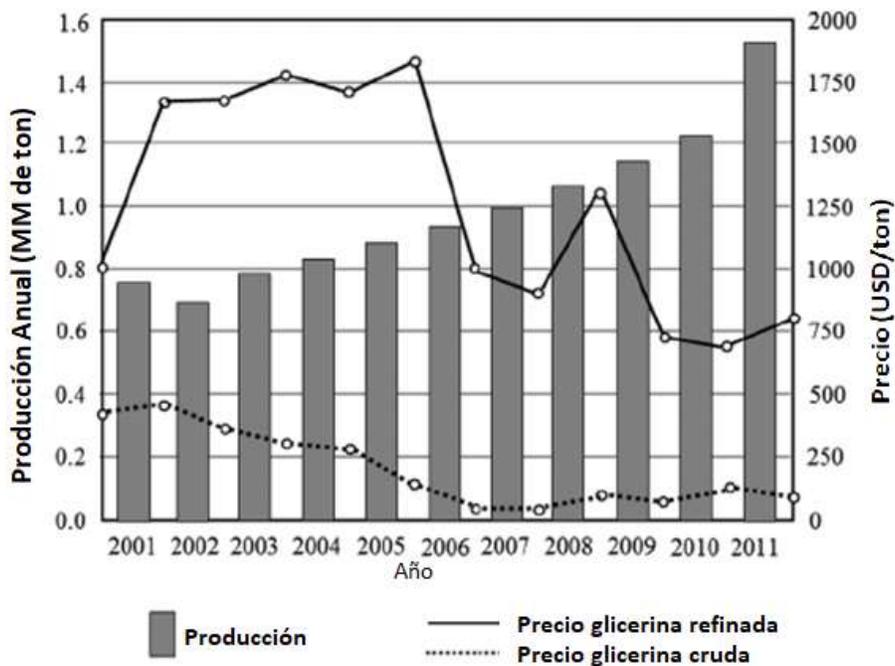


Figura 1.9: Producción (total) y precios de glicerina refinada y cruda.

## 1.5 La valorización del glicerol como una oportunidad

El glicerol, a partir de las alternativas de derivatización hacia productos de elevado valor agregado ha sido incluido, en el año 2004 por el Departamento de Estado (DoE) de Estados Unidos en la lista *“Top Value Added Chemicals from Biomass”*.<sup>43</sup>

Es así que, el producto al que se aspira valorizar en el presente trabajo junto con los 1,4-diácidos (succínico, fumárico y málico), el ácido 2,5-furan dicarboxílico, el ácido 3-hidroxi propiónico, el ácido aspártico, el ácido glucárico, el ácido glutámico, el ácido itacónico, el ácido levulínico, la 3-hidroxibutirolactona, el sorbitol y el xilitol/arabinitol, han sido identificados como los bloques de construcción más prometedores en síntesis, obtenibles a partir de recursos renovables. A su vez, en la revisión de compuestos realizadas en 2010 se ratifica la inclusión del glicerol en la lista de los 10 compuestos que reúnen los siguientes criterios: es un producto de interés para la bibliografía científica reciente, presenta aplicabilidad multi-producto, el producto presenta posibilidad de sustitución directa de productos similares de origen fósil, existe disponibilidad de tecnología para procesar elevados volúmenes del producto, el compuesto presenta importante potencial como plataforma para ulteriores derivatizaciones, es posible concebir la existencia de infraestructura destinada al escalado de desarrollos, existe mercado para su comercialización, los compuestos pueden actuar como bloques de síntesis en biorrefinerías y la producción comercial de este producto a partir de recursos renovables se encuentra desarrollada.<sup>44</sup>

Múltiples acciones se vienen desarrollando desde la comunidad científica a nivel internacional, tratando de dar respuesta a las problemáticas descritas, y en particular para el caso del glicerol. Estas actividades se encuentran alineadas e impulsadas por el concepto de economía circular acuñado a fines del siglo pasado y que ha comenzado a emerger recientemente a nivel internacional. Este modelo que refiere a aquella *“economía industrial que es restaurativa o regenerativa por intención y diseño”* incluye como uno de sus principios el minimizar la demanda de nuevos materiales, promoviendo que el residuo de un proceso pueda constituirse en insumos de nuevos procesos.<sup>45-48</sup>

## 1.6 Antecedentes relacionados a la valorización de glicerol

En una primera instancia se describen en forma muy abreviada aquellas alternativas que, por la tecnología utilizada o el destino final del producto, se encuentran más alejadas del alcance del presente trabajo, posteriormente se abordan aquellos antecedentes que presentan vinculación (ya sea porque se recurre a técnicas análogas o porque se obtienen productos con similares características) y finalmente se profundiza en el análisis de aquellos trabajos identificados como antecedentes directos para esta tesis.

**Tabla 1.1: Purificación de glicerol.**

Impureza	Tratamiento	Referencias
<b>MeOH y otros Alcoholes</b>	Autoclavado T > 65 °C Evaporación a vacío T > 65 °C	49,50
<b>Jabones</b>	Precipitación de Ácidos Grasos Libres (por ajuste de pH) Dilución para ajustar viscosidad. Centrifugación	51
<b>Sólidos</b>	Centrifugación	49
<b>Sodio</b>	Cristalización. Precipitación de Hidroxiapatita con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Hidróxido/Óxido de Ca	52

Se entiende necesario aclarar que, el procesamiento orientado a la separación y purificación<sup>53</sup> del glicerol a partir de la glicerina no se analiza, por considerarse parte del escenario de partida. Dentro de este apartado, se incluyen las actividades destinadas a remover el metanol u otros alcoholes, jabones y Sodio que constituyen las prácticas de purificación habituales con las que se alcanza pureza en el rango 80 a 88 % (ver Tabla 1.1).<sup>54</sup> Adicionalmente, recurriendo a operaciones más complejas se alcanzan purezas superiores a 99.5 % (USP y USP/FCC-Kosher).<sup>55</sup>

### 1.6.1 Uso directo como forma de valorización

El uso de glicerol como aditivo en productos de construcción y su acondicionamiento como combustible quizá constituyan dos de los destinos más representativos de este segmento. En estos casos el volumen demandado de alguna manera compensa el menor valor agregado al producto a comercializar. A lo anterior se puede agregar el uso de glicerol crudo como solvente en síntesis química y su aplicación como suplemento en la alimentación animal.

#### Uso en la industria alimentaria – Uso en Ración animal

El uso de glicerol en la dieta de no rumiantes ha sido evaluado a partir de que presenta alta tasa de absorción y su condición de buena fuente energética. Una vez absorbido puede ser convertido en glucosa a nivel hepático por acción de la enzima glicerol kinasa. La suplementación de glicerol crudo en alimentación de pollos parrilleros, gallinas ponedoras o cerdos ha sido descrito con resultados satisfactorios en aportes de hasta el 10 % (en peso seco del total del alimento). Sin embargo, el aporte en exceso de este producto en la dieta puede afectar el normal metabolismo de estos animales afectando la ganancia de peso de los mismos. En cualquier caso no se ha identificado afectación en la calidad de carnes o

huevos. Por su parte en alimentación de rumiantes, el glicerol purificado adicionado hasta el 15 % de materia seca en la dieta de corderos y vacas estabuladas presenta buenos resultados. En el caso de alimentación de ganado caprino este nivel se ubica en hasta un 5 % de glicerol. Al recurrirse a glicerol crudo estos niveles de ingesta segura se reducen a aproximadamente 8 %, sin observar deterioro en el rendimiento o en la calidad de carne o leche. En cualquier caso en el uso de glicerol crudo se debe ser cuidadoso atendiendo a la presencia de potenciales impurezas (restos de catalizador o presencia de metanol).<sup>56,57</sup>

### Utilización en la industria de construcción

En la industria de la construcción el uso de polioles en general y del glicerol en particular se encuentra descrita como agentes auxiliares en molienda lo que permite una sustancial reducción del consumo energético del proceso, tiene descrito efecto positivo en la reducción de grietas, como mejorador de la resistencia a la compresión del cemento, como impermeabilizante así como lubricante y anticorrosivo.<sup>58-61</sup>

### Uso como combustible en motores de ignición

El uso de la glicerina como combustible en motores de ignición por compresión no ha estado libre de polémica, mientras que algunos autores establecen la imposibilidad de destinar este producto a ese uso, otros autores defienden esta posibilidad. Se ha evaluado por parte de las condiciones en las que sería posible desarrollar la combustión en este tipo de motores, dando lugar a registro de invenciones en el área y a la identificación de este producto como “el combustible diésel ideal”. Más allá de lo anterior la preocupación ambiental, fundamentalmente asociada a la producción de acroleína como producto de la descomposición térmica del glicerol a baja temperatura permanece presente, sumada a la emisión de material particulado (debida principalmente a la presencia de restos de catalizador) y de volátiles orgánicos.<sup>62-66</sup>

### Aplicación como solvente

El uso de agua como solvente en síntesis orgánica buscando por un lado aportar soluciones ambientalmente amigables y por otro recurriendo a su capacidad de aumentar la velocidad de reacción es un tema relativamente reciente (1980 en adelante). Una variada gama de reacciones que incluye entre otras a Diels–Alder, hetero-Diels–Alder, cicloadiciones, rearrreglos de Claisen, aldolizaciones y oxidaciones se han desarrollado en medio acuoso sin adición de catalizador. En la mayoría de los casos exhibiendo eficiencias y selectividades similares o incluso mayores a las alcanzadas en solventes convencionales. Como contracara se ha descrito la limitación que presenta el agua cuando se enfrenta a sustratos altamente hidrofóbicos. La búsqueda de alternativas que permita mantener las ventajas minimizando las restricciones ha conducido a la búsqueda de solventes alternativos entre los que el glicerol, aún crudo, presenta interesantes características.<sup>67-69</sup>

## Uso en celdas de combustibles

El glicerol presenta características que lo convierten como candidato atractivo para su uso en celdas de combustible (abundante, no tóxico, no volátil, no inflamable, elevada densidad energética). No obstante lo anterior, no resulta ser un efectivo combustible para su uso en celdas catalizadas por metales preciosos, atendiendo a que, en este tipo de dispositivos solo se logra oxidar 4 de los 14 potenciales electrones, con la consecuente disminución de la densidad energética neta.<sup>70</sup>

Diferente resulta, el desempeño que se obtiene en celdas de combustibles enzimáticas, que basan su funcionamiento en enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa a nivel del bio-ánodo. El uso de glicerol presentaría mejoras en la densidad energética, cuando se compara su desempeño con etanol a partir de la posibilidad de oxidar más completamente el combustible.<sup>71</sup>

### 1.6.2 Valorización orientada a la obtención de nuevos productos

En este apartado se ubica el mayor número de iniciativas desarrolladas, las que resultan inabarcables en su totalidad (hecho entendible si se considera que solo en el último año se registran más de 2.500 publicaciones en esta temática, según las búsquedas realizadas en base de datos a las que se ha tenido acceso).<sup>72</sup>

A efectos de organizar la presente sesión se divide el análisis en dos áreas, atendiendo al tipo de tecnología utilizada para lograr el objetivo: i) síntesis química, ii) biotecnología.

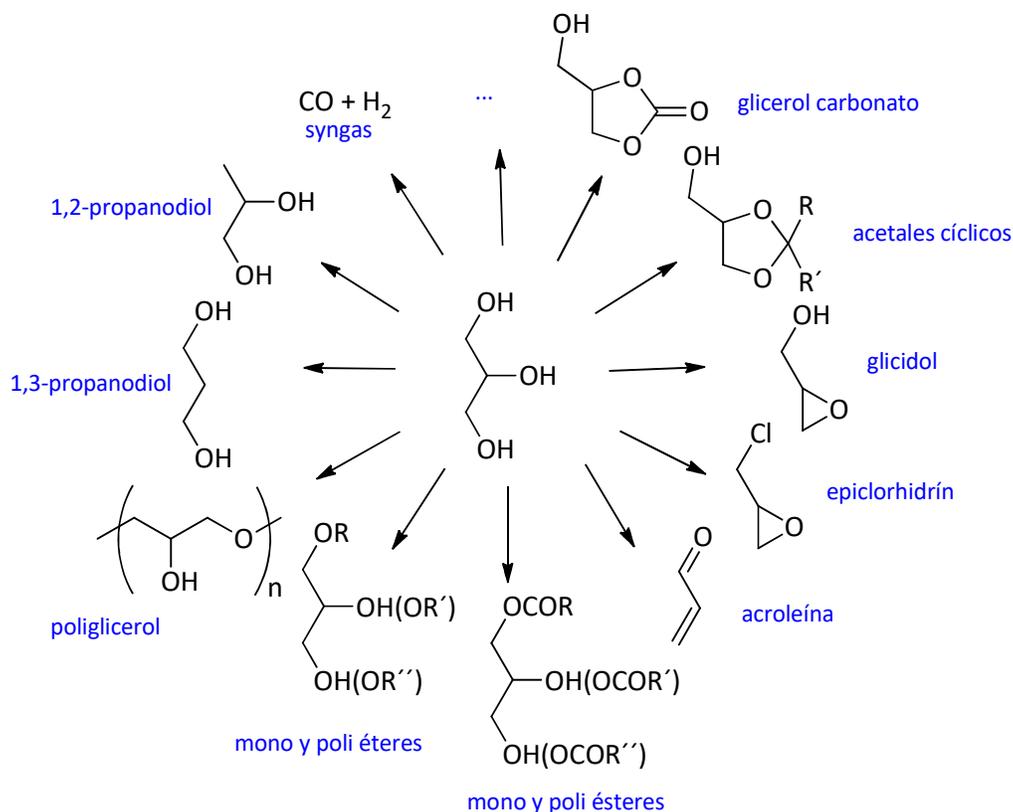
#### 1.6.2.1 Productos obtenidos por síntesis química

Se ha descrito para los bloques de construcción derivados de fuentes renovables que, mientras su obtención corresponde mayoritariamente a procesos biológicos, en la transformación posterior o derivatizaciones la conversión química resulta predominante.<sup>43</sup>

La Figura 1.10 contiene un esquema general que representa algunas de las reacciones que utilizan glicerol como insumo y algunos de los productos obtenibles a partir del mismo.

No se incluye en esta descripción por razones de espacio y extensión productos que clásicamente han tenido su origen en el glicerol, tal el caso de:

- i) la nitroglicerina, el glicidil nitrato y el poliglicidil nitrato.<sup>62,73-75</sup>
- ii) los ácidos glicérico, tartrónico, mesoxálico e hidroxipirúvico.<sup>76-80</sup>



**Figura 1.10: Productos obtenibles a partir de glicerol por síntesis química.**

Igual criterio se adopta para productos que si bien pueden resultar más novedosos, no resulta clara su identificación aún como productos que permitan valorizar el glicerol, o la forma en que aporta a la valorización se encuentra más distante al alcance del presente trabajo tal el caso de:

- i) los productos de telomerización de glicerol.<sup>81,82</sup>
- ii) los productos de dimerización y polimerización del glicerol.<sup>83-87</sup>
- iii) los productos de polimerización obtenidos a partir de ácidos derivados del glicerol (tartrónico, mesoxálico, etc.).<sup>88</sup>
- iv) productos de oxidación como 1,3-dihidroxiacetona o 2,3-dihidroxiopropanal (gliceraldehído).<sup>89,90</sup>

### Producción de acroleína, acrilonitrilo y ácido acrílico

La acroleína es un intermediario de interés para la obtención de un conjunto interesante de productos (entre los que se pueden mencionar el ácido acrílico, el glutaraldehído,

lametionina, quinolina, poliuretano, poliésteres, etc.). Históricamente su síntesis se ha basado en reacciones de condensación aldólica y en la oxidación de propileno.

Recientemente, se ha incursionado como método sintético alternativo la deshidratación del glicerol. Los métodos disponibles para su síntesis incluyen entre otros la reacción iónica (medio ácido) y la reacción radicalaria, en fase gaseosa, sobre catalizadores (zeolitas, bentonitas, carbón activado así como sobre óxidos mixtos metálicos).<sup>91</sup>

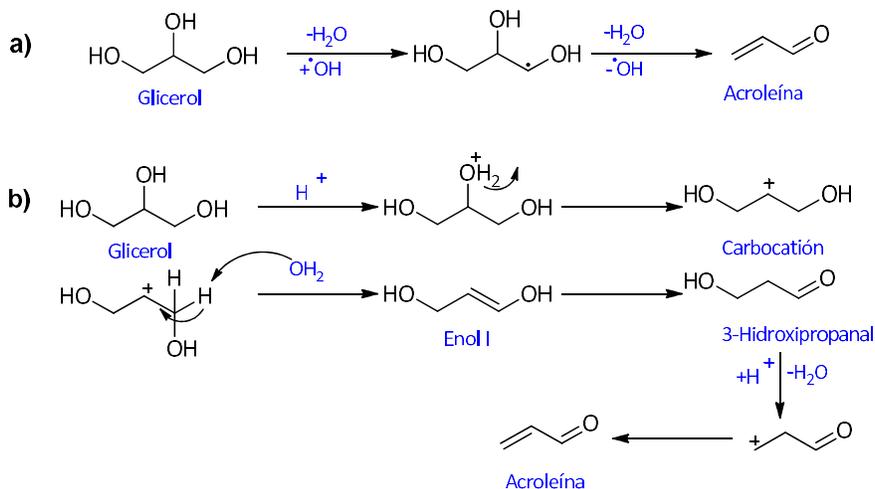


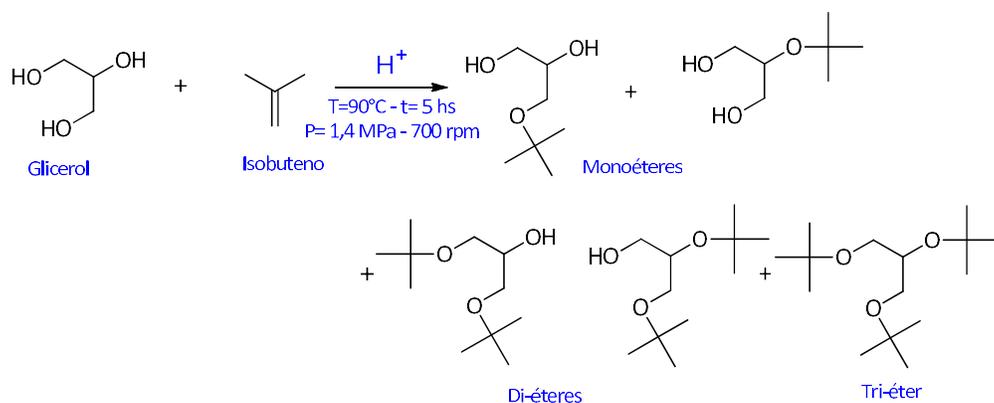
Figura 1.11: a) Producción radicalaria de acroleína, b) Producción iónica de acroleína.

El acrilonitrilo es el nitrilo con mayor nivel de producción a nivel global siendo utilizado como monómero en la producción de poliacrilonitrilo con destino a su aplicación en fibras acrílicas. Su fabricación tradicional recurre a la amoxidación de propileno, reacción en la que la acroleína es un intermediario. La adición de amonio en la reacción en la que el glicerol se convierte a acroleína aporta a orientar los productos hacia nitrilos, minimizando reacciones laterales.<sup>69,92</sup>

Para la obtención de ácido acrílico se recurre a una reacción tándem térmicamente balanceada de oxi-deshidratación (endotérmica) en presencia de Oxígeno molecular, seguida de una oxidación aeróbica (exotérmica) de la acroleína obtenida.<sup>93</sup>

### Formación de éteres, ésteres y carbonatos a partir de glicerol

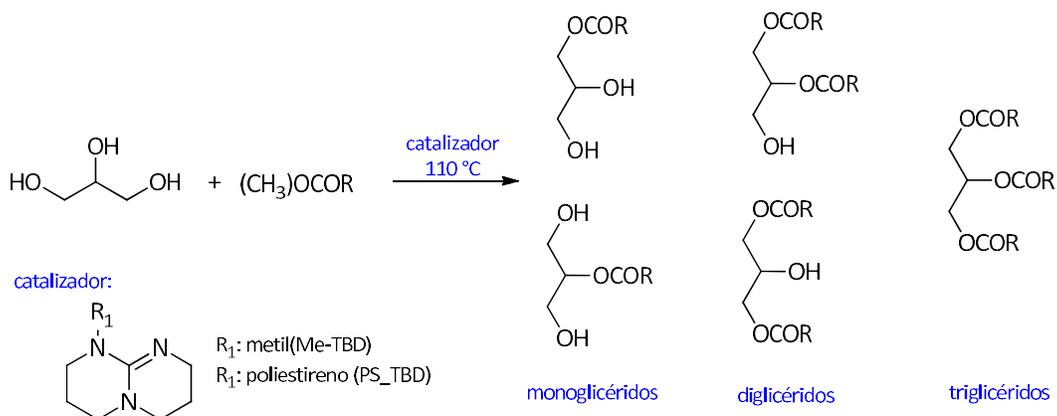
La formación de éteres alquílicos de glicerol puede lograrse a partir de la reacción de glicerol y alquenos (el que presenta un uso más expandido es el isobutileno) en presencia de catalizador ácido a relativamente bajas temperaturas.<sup>94,95</sup>



**Figura 1.12: Productos de tert-butilación de glicerol.**

Los productos superiores di-*tert*-butilglicerol (DTBG) y tri-*tert*-butilglicerol (TTBG) obtenidos en estas reacciones presentan potencial aplicación como aditivo oxigenado en combustibles diésel en la búsqueda de reducir la contaminación de aire, (desempeñando un papel similar al que el MTBE y el ETBE juegan como aditivo en gasolinas) y mejorando el desempeño en frío de los metil ésteres en su utilización como combustible.<sup>96</sup>

El uso de DTBG y TTBG si bien presenta muchas ventajas, está limitado por la disponibilidad de isobuteno. En la búsqueda de alternativas que permitan lograr productos con las mismas prestaciones pero removiendo esta restricción es que se ha recurrido a esterificar el glicerol con ácido acético o a su transesterificación con metil acetato para rendir triacetín. Este producto, utilizado como aditivo del biodiésel mejora su viscosidad y desempeño en frío. Adicionalmente el triacetín es utilizado como antidetonante en gasolinas.<sup>97</sup>



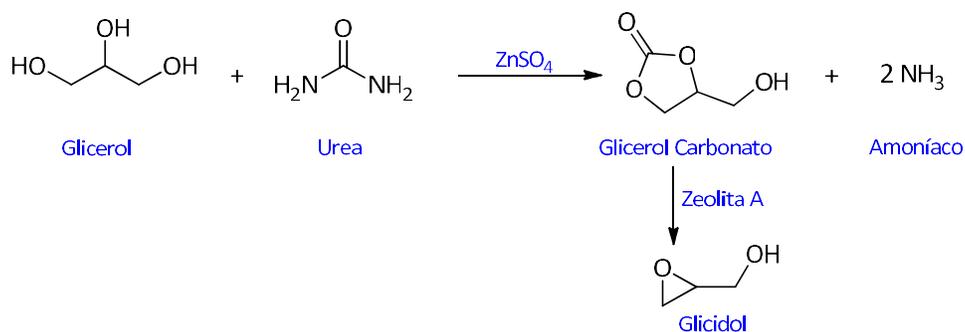
**Figura 1.13: Productos de esterificación del glicerol.**

La obtención de ésteres puede realizarse, por esterificación de ácidos carboxílicos con alcoholes en presencia de catalizadores o bien recurriendo a catalizadores heterogéneos ácidos tales como Amberlyst-15, zeolitas y heteropoliácidos soportados en sílica.<sup>98</sup>

Otro producto que se ha derivado del glicerol es el glicerol carbonato, es un líquido incoloro polar, no tóxico, con alto punto de ebullición, características estas que lo convierten en un

solvente útil para plásticos y resinas tales como el acetato de celulosa, nylon, nitrocelulosa y poli-acrilonitrilo. Simultáneamente, su adhesión a superficies metálicas y resistencia a la oxidación, hidrólisis y presión lo convierte en un buen candidato como lubricante.<sup>62</sup>

Su obtención puede realizarse haciendo reaccionar cantidades equi-moleculares de urea y glicerol usando como catalizador  $ZnSO_4$ , alternativamente, más recientemente se ha descrito un nuevo método el que partiendo del alcohol y dimetilcarbonato recurre al uso de tamices moleculares sin necesidad de adición de solvente.<sup>99-101</sup>



**Figura 1.14: Síntesis de glicerol carbonato y de glicidol a partir de glicerol.**

El glicerol carbonato es, adicionalmente un intermediario de interés hacia otros productos. Reacciona rápidamente con fenoles, alcoholes, amidas, y ácidos carboxílicos para formar éteres o ésteres de glicerol, incluyendo polímeros tales como poliésteres, policarbonatos, poliamidas y poliuretanos.<sup>62</sup>

La reacción por la cual se contrae el anillo de 5 miembros para dar un anillo de 3 unidades con una unidad epoxi conduce a la obtención de glicidol (compuesto líquido, levemente viscoso) que presenta múltiples aplicaciones en revestimiento de superficies, agente de gelación, propelente, estabilizante de aceites naturales y polímeros y como agente demulsificante). Este producto a su vez puede ser derivado a glicidil carbamato componente de utilidad en resinas epoxi y poliuretanos o polimerizado a poliglicerol.<sup>87,102</sup>

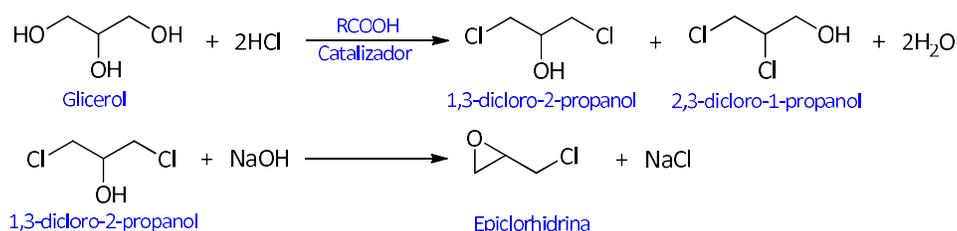
### Producción de epiclorhidrina

La epiclorhidrina es un producto altamente demandado a partir de su uso en las denominadas resinas epoxi.<sup>103</sup> Tradicionalmente este producto requiere de una ruta sintética que involucra múltiples pasos de reacción (reacción de propileno con Cloro para obtener el cloruro, seguido de una nueva instancia de clorinación (hipoclorinación) para obtener una mezcla 3:1 de 1,3-diclorohidrina y 2,3-diclorohidrina la que es posteriormente tratada con una base para finalmente obtener epiclorhidrina). Si bien se trata de un proceso maduro e instalado en escala comercial, desde el punto de la Química Verde presenta como principales falencias por un lado una bajísima eficiencia atómica para el Cloro (solo  $\frac{1}{4}$  de los átomos de Cloro aportados como sustrato termina finalmente en el producto de síntesis) y por otro el requerimiento de esfuerzo adicional para disponer los productos no deseados en que terminan los restantes  $\frac{3}{4}$  átomos de Cloro aportados. Los

métodos de síntesis alternativos describen la obtención de epiclorhidrina a partir de glicerol en una reacción de dos pasos, (hidroclorinación de glicerol con HCl, seguida de reacción con una base) según se muestra en la Figura 1.15, y comienzan a ser rentables a partir de la reducción del costo verificado para el glicerol.

Debe señalarse que la relación de productos intermedios se da en una proporción 40:1 para el compuesto clorado en posición 1,3 frente al producto diclorado en posiciones 1,2. Adicionalmente la reacción se desarrolla a partir de un insumo renovable y con una eficiencia atómica para los átomos de Cloro que duplica la de la síntesis de referencia.<sup>62,104-</sup>

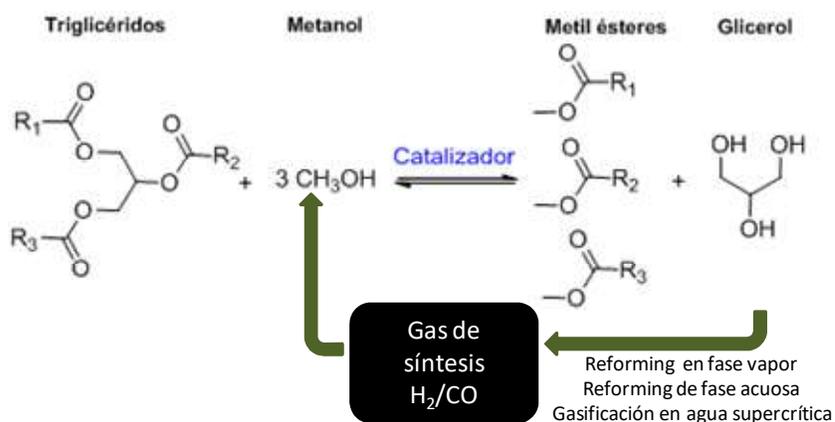
106



**Figura 1.15: Síntesis de epiclorhidrina a partir de glicerol.**

### Producción de gas de síntesis y metanol renovable

Una interesante aplicación para el glicerol es su conversión a gas de síntesis permitiendo, a partir de ese punto, la producción de una variada gama de productos químicos. Quizá una de las alternativas más atractivas para la industria de biodiésel lo constituye la producción de metanol (producto tradicionalmente obtenido a partir de fuentes fósiles), generando la posibilidad de la obtención de biodiésel exclusivamente a partir de insumos renovables en línea con lo postulado en la denominada “economía del metanol”.<sup>107,108</sup>

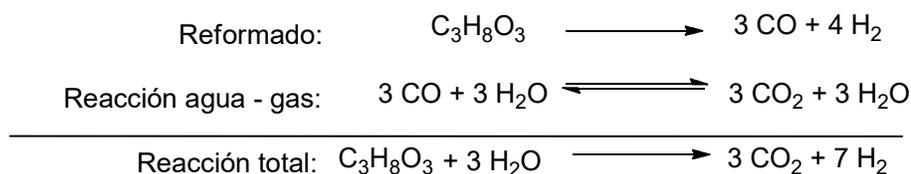


**Figura 1.16: Producción de gas de síntesis y metanol renovable.**

El gas de síntesis puede orientarse hacia reacciones Fischer-Tropsch con la ventaja de que la mezcla CO/H<sub>2</sub> se encuentra libre de impurezas de oxígeno tornando la ecuación más fácilmente manejable.<sup>109</sup>

Para la preparación de gas de síntesis a partir de glicerol se puede recurrir al reformado en vapor, reformado en fase acuosa y a la gasificación en agua supercrítica.

El reformado con vapor de glicerol produce CO e H<sub>2</sub> según se describe en la siguiente ecuación. La proporción H<sub>2</sub>/CO puede aumentarse al reaccionar el CO con agua, obteniéndose como producto total una relación 7:3 de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>. Las condiciones de reacción son presión atmosférica y temperaturas superiores a 400 °C sobre catalizadores de Platino, Rutenio y Renio aplicado sobre carbono u Óxido de Ytrio.<sup>110</sup>



**Figura 1.17: Reformado del glicerol.**

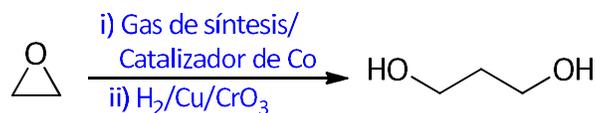
Como variante del proceso descrito se recurre al reformado en fase acuosa (APR), reacción que sigue la misma ecuación pero en condiciones que aseguren la permanencia del glicerol en fase líquida, lo que requiere presiones mayores (23-35 bar), por su parte la temperatura es inferior (125 °C). Los catalizadores utilizados son Platino, Paladio, o aleaciones de Níquel-Estaño.<sup>111</sup>

Finalmente, la gasificación en agua supercrítica (SCWG) permite la conversión de glicerol a CO e H<sub>2</sub> aún en ausencia de catalizador si bien la presencia de metales de transición redundaría en mejora de rendimiento (Rutenio u Óxido de Titanio). Las condiciones de reacción varían entre 450 °C y 700 °C (a mayor temperatura mayor conversión y mayor concentración de H<sub>2</sub> en la mezcla de reacción).<sup>112</sup>

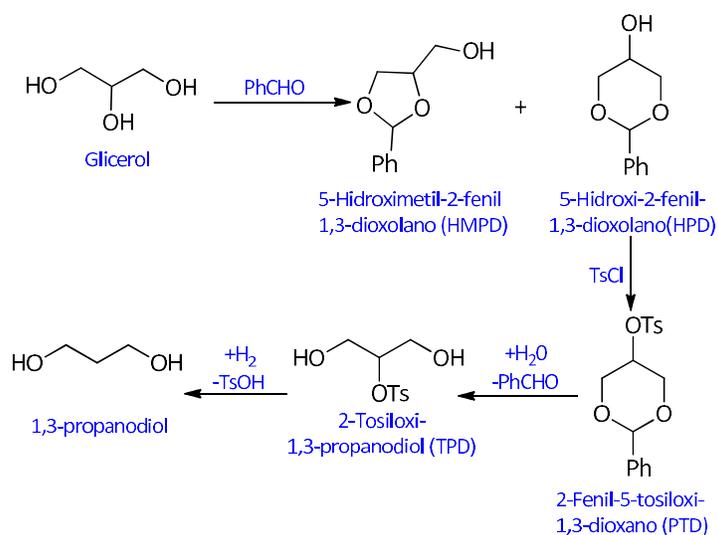
### Producción de 1,3-propanodiol

El 1,3-propanodiol se obtiene tradicionalmente a partir de fuentes fósiles (óxido de etileno), mediante la ruta conocida como Ruta Shell por utilizarse el catalizador desarrollado por esta firma.<sup>113</sup>

La hidroformilación del óxido de etileno involucra las siguientes 2 etapas, en una primera instancia el óxido de etileno reacciona con CO y en presencia de un catalizador organometálico de Cobalto produce el hidroxialdehído, intermediario que en una segunda etapa es reducido para formar el diol mediante hidrogenación con Cu/CrO<sub>3</sub>.<sup>114</sup>



**Figura 1.18: Síntesis clásica de 1,3-propanodiol a partir de óxido de etileno.**



**Figura 1.19: Síntesis de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.**

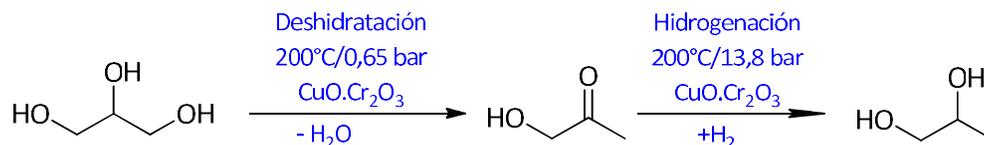
En 2003 se propone una nueva vía sintética que recurre a glicerol como material de partida y consta de 3 etapas. En la primer etapa se acetila el glicerol con benzaldehído con el propósito de proteger a los hidroxilos ubicados en C1 y C3. El siguiente paso de la conversión consiste en la tosilación del hidroxilo desprotegido para transformarlo en un buen grupo saliente. El paso final consiste en la remoción del grupo protector de los hidroxilos 1 y 3 y en la detosilación, ocasión en que se remueve el grupo tosilato del Carbono y, reacción que se desarrolla con H<sub>2</sub> molecular en presencia de un metal de transición.<sup>115</sup>

### Producción de propilenglicol (1,2-propanodiol racémico)

El 1,2-propanodiol o propilenglicol es el diol preferido para la manufactura de las resinas poliéster insaturadas, sistemas de espumas de poliuretanos así como productos sustitutos del etilenglicol en sus usos como anticongelante y como descongelante en aeronaves.

Considerando la relación de precios entre el propilenglicol obtenido por métodos clásicos a partir de óxido de propileno y del obtenido a partir de la hidrogenación selectiva de glicerol queda claramente establecida la causalidad por la cual hoy este último proceso resulte el comercialmente adoptado para la obtención tanto del propilenglicol industrial como el de

grado farmacéutico. La reacción transcurre vía acetol (hidroxiacetona) por medio de 2 pasos en condiciones relativamente suaves de reacción.<sup>116,117</sup>



**Figura 1.20: Síntesis de propilenglicol a partir de glicerol.**

Adicionalmente al método de producción descrito, se han desarrollado otros alternativos, entre los que se pueden mencionar el proceso de hidrogenación de glicerol en fase vapor sobre catalizador heterogéneo de Cobre (o método Davy), la conversión de glicerol a 1,2-propanodiol bajo hidrogenólisis de solución acuosa de glicerol bajo 300 bar a partir de syngas a 200 °C en condiciones de catálisis homogénea con complejo de Rhodio [Rh(CO)<sub>2</sub>(acac)] y ácido tungsténico, produciendo 1,3-propanodiol y 1,2-propanodiol en rendimientos de 20 % y 23 % respectivamente.<sup>118–121</sup>

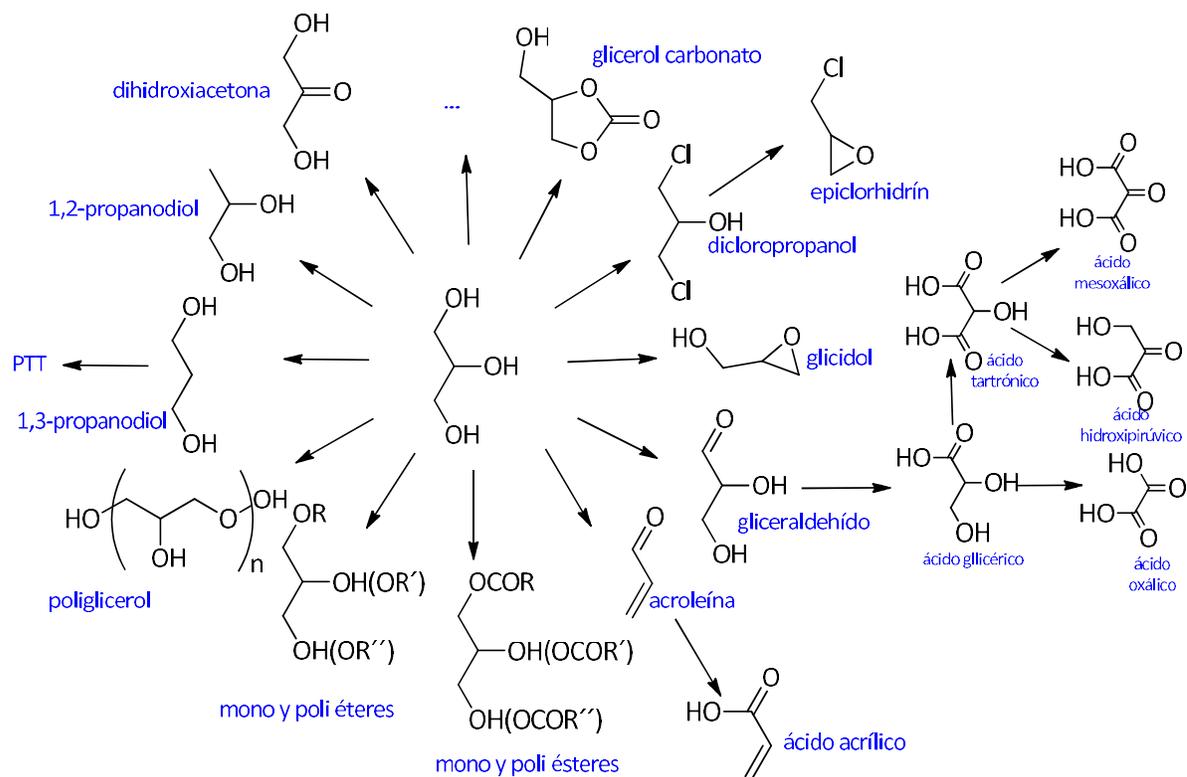
Más recientemente se han descrito trabajos que refieren a la hidrogenólisis usando Ru-C y Rd-SiO<sub>2</sub> complementado con resina de intercambio iónico (Amberlyst) a 120 °C en atmósfera de H<sub>2</sub> a 80 bar. Estos procesos presentan aún cuellos de botella (baja selectividad, escasa eficiencia energética y necesidad de aporte de sustrato diluido), para avanzar a procesos comerciales.<sup>122,123</sup>

### 1.6.2.2 Productos obtenidos biotecnológicamente

En el caso del glicerol la gama de productos obtenidos enzimáticamente es igualmente vasta a la previamente descrita, con la dificultad adicional, al momento de sistematizar su descripción que múltiples microorganismos pueden presentar interés en la obtención de un mismo producto. Señalada esta doble dificultad a continuación se describirá abreviadamente el conjunto de productos y microorganismos que mayormente atraen la atención de la comunidad científica del área en el intento de buscar alternativas a la valorización del glicerol.

En la Figura 1.21 se representa un esquema general de posibles productos obtenibles a partir de glicerol recurriendo a la síntesis con microorganismos enteros y/o enzimas aisladas.<sup>124</sup>

En la descripción que sigue, inicialmente se presentan productos obtenidos biotecnológicamente que presentan mayor distancia respecto a actividades desarrolladas en el presente trabajo, a continuación se desarrollan productos obtenidos en fermentaciones microbianas y finalmente se abordan las fermentaciones que conducen a 1,2-propanodiol.



**Figura 1.21: Algunos de los productos obtenibles biológicamente a partir de glicerol.**

### 1.6.2.2.1 Productos biotecnológicos varios

Bajo esta denominación es posible identificar aplicaciones tan diversas como la producción a partir de glicerol de pigmentos,<sup>125-130</sup> la obtención de glucósidos,<sup>131-133</sup> así como también la utilización de glicerol en celdas de combustible enzimática.<sup>62,134,135</sup> Como casos más representativos se desarrollan abreviadamente la obtención de lípidos, de proteína unicelular y de polímeros.

#### Producción de lípidos

El glicerol ha sido descrito como fuente de Carbono en la producción de lípidos, productos que pueden ser empleados en la elaboración de biodiésel, retornando así al proceso que lo origina. Entre otros microorganismos que puede desarrollar este proceso se encuentran *Schizochytrium limacinum* SR21 and *Cryptococcus curvatus*.<sup>42,136</sup>

En el caso de la microalga *S. limacinum* en proceso batch el mejor desempeño se verifica a partir de soluciones conteniendo 35 g/L de glicerol, condición en la que se logra acumulación lipídica celular del 73.3%. Es de señalar que en estas condiciones se ha reportado inhibición del crecimiento celular.<sup>137</sup>

Por otra parte con la levadura *C. curvatus*, el proceso que mejor resultado presenta es fed-batch. El contenido máximo de lípidos alcanza el 52 % de conversión (en el caso del proceso en dos etapas). En estas condiciones se verifica que el metanol remanente no genera efecto inhibitorio alguno sobre el crecimiento celular.<sup>138</sup>

Paralelamente se ha descrito el uso de la levadura *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, para producir lípidos y carotenoides a partir de medio conteniendo glicerol crudo. En fermentaciones desarrolladas en proceso fed-batch se obtiene la concentración máxima de contenido lipídico de 10 g/L, que se corresponden con una bioconversión del 60.7 % y de carotenoides de 6 g/L. Adicionalmente se ha descrito que *Chlorella protothecoides* convierte glicerol crudo en lípidos con un rendimiento de 0.31 g lípidos/g sustrato. De igual manera, con *C. protothecoides* y glicerol crudo (62 % de pureza), se ha descrito que la máxima productividad de lípidos verificada asciende a 3 g/L por día en un proceso de operación fed-batch.<sup>139,140</sup>

De los resultados obtenidos con microorganismos eucariotas se concluye que la acumulación en levaduras de lípidos es limitada (alcanzando niveles de bioconversión de hasta aproximadamente 22 %, en el caso de *Rhodotorula sp.*), por el contrario, en el caso de los hongos se obtienen mayores niveles de acumulación de lípidos en el micelio ubicándose los resultados en el rango comprendido por 18 % y 43 %, % en base biomasa seca). A estos efectos, las levaduras, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia membranifaciens* así como el hongo filamentoso *Thamnidium elegans* resultan ser los microorganismos más prometedores.<sup>141,142</sup>

### Producción de proteína celular

Con esta denominación se conoce a la biomasa obtenida a partir de microorganismos cultivados utilizando residuos industriales o agrícolas. La producción de biomasa microbiana puede lograrse ya sea a través de procesos de fermentación en estado sólido o líquido, procediéndose luego de la fermentación a su cosecha y eventualmente procesos de lavado, extracción y purificación.<sup>143</sup> Esta práctica lejos de resultar novedosa ha sido desarrollada por culturas ancestrales, tal el caso de la cosecha de *Spirulina* por parte de la cultura azteca, que aprovechando condiciones de alcalinidad y temperatura de determinados lagos se abastecían de ese cultivo.<sup>144</sup>

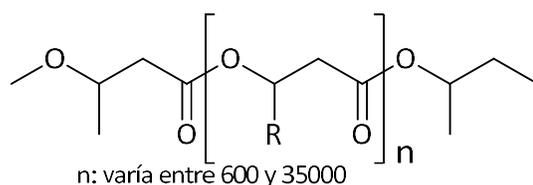
Algas, hongos y bacterias pueden utilizarse con este propósito, siendo las levaduras y dentro de ellas *Saccharomyces* y *Candida* las más promisorias atendiendo a su naturaleza no tóxica y elevada productividad.<sup>145</sup>

Una multiplicidad de sustratos ha sido empleada a este fin entre los que se pueden mencionar: maíz (grano y mazorca), tallos de algodón, hidrolizado de sorgo, hidrolizado de almidón, residuos de celulosa, lignina, melaza, almidón, bagazo de caña, papel, suero de leche, metanol, etc..<sup>143</sup>

La utilización de glicerol obtenido como subproducto en la industria de biodiésel ha sido ensayada obteniéndose composiciones de aminoácidos esenciales con un perfil similar o comparable en términos generales a los obtenidos a partir de harina de soja o harina de pescado.<sup>145,146</sup>

### Producción de polímeros: Polihidroxialcanoatos (PHAs)

El primer reporte respecto a este producto data de comienzos del siglo XX y refiere a la observación de una inclusión con aspecto aceitoso y soluble en cloroformo en *Azotobacter chroococcum*. La composición de inclusiones similares en *Bacillus megaterium* fue posteriormente confirmada como poli (3-hidroxi butirato).<sup>147</sup>



R= H	Poli(3-hidroxi propionato)	R= Propil	Poli(3-hidroxi hexanoato)
R= Metil	Poli(3-hidroxi butirato)	R= Pentil	Poli(3-hidroxi octanoato)
R= Etil	Poli(3-hidroxi valerato)	R= Nonil	Poli(3-hidroxi dodecanoato)

**Figura 1.22: PHAs estructura y denominación.**

Hoy los polihidroxialcanoatos han sido identificados en más de 300 especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como en un amplio rango de archeas.<sup>148</sup>

Avanzada la segunda mitad del siglo pasado ya existía suficiente evidencia para caracterizar a los polihidroxialcanoatos (PHAs) como poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por numerosas bacterias como reserva intracelular (a nivel citoplasmático) de Carbono y energía.<sup>147,149</sup>

La denominación de PHAs engloba no un producto único sino una gama de productos según puede observarse en la Figura 1.22.<sup>150,151</sup>

Una variada gama de bacterias incluyendo *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *E. coli* recombinante y bacterias metilótrofas han sido descritas como productoras de estos compuestos. Adicionalmente la búsqueda de reducir el costo de obtención del producto ha permitido que más recientemente haya sido demostrada la factibilidad técnica de obtener PHA en plantas transgénicas.<sup>147</sup>

Una de las principales apuestas asociada al desarrollo de microorganismos productores de PHA es la búsqueda de alternativas biodegradables a los plásticos de origen fósil.<sup>152</sup>

Comparativamente, con los polímeros biodegradables químicamente sintetizados (derivados de los ácidos glicólico, láctico, ó del polivinil alcohol, o del óxido de etileno) y los plásticos biodegradables basados en almidón (por ejemplo almidón-polietileno), los PHAs

presentan ventajas tanto en las propiedades mecánicas de los compuestos como en la ausencia de componentes recalcitrantes en sus residuos.<sup>149</sup>

Adicionalmente, el uso en materiales de aplicación terapéutica ha sido propuesto para PHAs hidrosolubles, entre ellos el desarrollo de materiales para tejidos y sistema de liberación controlada de drogas se han descrito como las más promisorias.<sup>148,153</sup>

Las materias primas descritas como fuente de Carbono en los ensayos de producción de PHAs son variadas e incluyen entre otras a: glucosa, fructosa, melaza, ácido oléico, ácido mirístico, ácido láurico, octanoato, gluconato, propionato, aceite de castor, aceite palma, metanol, pentanol, ácido 4-hidroxibutírico,  $\gamma$ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol.<sup>147,154</sup>

No obstante los esfuerzos y desarrollos realizados el reemplazo de los plásticos fósiles se ha visto ralentizado a partir de los mayores costos de las alternativas. En años recientes la investigación ha focalizado en el desarrollo de procesos alternativos para la obtención de PHAs, incluyendo el uso de residuos y cultivos microbianos mixtos con ese propósito.<sup>155</sup>

En ese contexto se ha descrito el uso de glicerol crudo como sustrato llegando incluso a ser catalogado como el sustrato más apropiado para este propósito.<sup>156,15754</sup>

Con cultivo microbiano mixto, en condiciones aerobias se ha utilizado glicerol crudo acumulando poli-3-hidroxibutirato (PHB) a razón de 47 % en peso seco celular y una productividad de 0.27 g/L.d. El hecho de poder utilizar este sustrato sin procesamiento previo habilita a ser relativamente optimista en relación a la posibilidad de alcanzar una reducción de costos significativa.<sup>158</sup>

Paralelamente, con *Bacillus megaterium* aislado de lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas municipales se observó la biosíntesis del polímero polihidroxibutirato (PHB) y del copolímero polihidroxibutirato-co-hidrovalerato P(HB-co-HV) sin adición de precursor en el medio de fermentación. El rendimiento reportado asciende a 62.43 % en peso seco celular cuando se recurre a un medio de cultivo conteniendo glicerol como fuente de Carbono.<sup>157</sup>

En una línea de trabajo diferente el uso de Tereftalato de Sodio obtenido a partir de la pirólisis de PET y glicerol obtenido de la industria de biodiésel han sido utilizados como insumos para un reactor fed-batch en el que se hace crecer *Pseudomonas putida*. Utilizando tereftalato de sodio solamente se alcanza una concentración de 2.61 g/L la que se incrementa hasta aproximadamente 5.7 g/L al aportar al medio glicerol. El PHA obtenido está formado mayormente por monómeros de ácido 3-hidroxidecanóico.<sup>159</sup>

Los poli hidroxialcanoatos constituyen el caso icónico de síntesis *in vivo* de biopolímeros. Este hecho ha atraído la atención de la ingeniería metabólica en la búsqueda, tanto de mejorar las condiciones de producción de los monómeros como en la producción de los

biopolímeros en microorganismos descritos como naturalmente productores de PHA como sobre *E. coli*.<sup>160-162</sup>

#### 1.6.2.2.2 Productos obtenidos en fermentaciones microbianas

A partir de fermentaciones microbianas es posible obtener una vasta gama de productos que incluyen compuestos tan variados como ácido glicérico,<sup>163,164</sup> ácido propiónico<sup>165-167</sup>, ácido docosahexaenóico<sup>51,57,136,137,168-171</sup> y ácido kójico.<sup>172-177</sup> Como casos más representativos dentro de este subgrupo de aplicaciones se describe la obtención de etanol, butanol, ácidos succínico, cítrico y láctico, dihidroxiacetona, 3-hidroxi propionaldehído y 1,3-propanodiol.

##### Producción de etanol

La producción de etanol a partir de glicerol presenta interés por varias razones, por un lado su utilización como biocombustible, en línea con el uso más extendido de este compuesto.<sup>33,178</sup>

Adicionalmente, la obtención de este producto presenta la posibilidad de reinserción del alcohol en el mismo proceso productivo que origina el desecho a valorizar (si bien no se trata del alcohol más extendido en su uso en la reacción de transesterificación).<sup>179</sup>

Finalmente, la posibilidad de obtención de polímeros particularmente polietileno a partir de bioetanol constituye una de las apuestas importantes en los mercados en que este biocombustible ha logrado penetración.<sup>180</sup>

Una variada gama de microorganismos ha sido evaluada a este fin incluyendo tanto microorganismos procariontes como eucariotes con variados resultados, entre ellos se destacan los que se describen a continuación.

La producción de etanol y ácido fórmico se ha descrito a partir de glicerol, así como en la co-fermentación de glucosa/glicerol recurriendo a cultivos mixtos.<sup>181</sup>

La síntesis de etanol y 1,2-propanodiol a partir de glicerol ha sido también descrita utilizando *Paenibacillus macerans*, en concentraciones de 3 y 0.8 g/L, respectivamente al desarrollar fermentación anaerobia de glicerol puro con concentración de partida de 10 g/L.<sup>182</sup>

Varios intentos de producir etanol con *Enterobacter aerogenes* a partir de glicerol se han desarrollado. Resulta de particular interés los resultados verificados a partir de una cepa aislada de lodos metanogénicos capaz de convertir anaeróticamente glicerol crudo a Hidrógeno y etanol con un rendimiento de 0.85 mol/mol glicerol.<sup>183</sup>

Por otra parte, el uso de *E. aerogenes* en la producción conjunta de etanol e Hidrógeno en reactor bio-electroquímico con tionina como mediador exógeno de electrones en

condiciones anaeróbicas ha sido descrita. En este sistema la tionina se reduce por parte de *E. aerogenes*, y es posteriormente re-oxidada por aplicación de +0.2 V en electrodo de referencia Ag/AgCl con un potencióstato.<sup>184</sup>

La inmovilización de *Enterobacter aerogenes* en alginato y su aplicación a la conversión de glicerol a etanol en un reactor continuo agitado ha sido reportada. En esas condiciones se ha optimizado la producción de etanol alcanzando los 5.38 g/L y 0.96 mol-etanol/mol-glicerol con glicerol puro y en 5.29 g/L y 0.91 mol-etanol/mol glicerol con glicerol crudo.<sup>185</sup>

En otro orden la cepa *Kluyvera cryocrescens* produce 27 g/L de etanol a partir de glicerol crudo con un rendimiento molar del 80 % y una productividad de 0.61 g/L/h, cuando la fermentación es realizada en condiciones de microaerobiosis.<sup>186</sup>

La producción equimolecular de etanol y formiato se ha observado en la fermentación de glicerol con *Klebsiella planticola*, con una cepa aislada de rumen de ciervo rojo. Las concentraciones de producto obtenidas ascienden a los 2 g/L, estando descrita la necesidad de tiempos muy prolongados para alcanzar fermentación significativa del glicerol.<sup>187</sup>

Finalmente, mediante irradiación con rayos  $\gamma$  se ha logrado obtener una cepa de *Klebsiella pneumoniae*, que a la vez que ha visto afectada la capacidad de producción aquellos metabolitos obtenidos en las vías reductivas se logra incrementar el nivel de los metabolitos obtenidos en vías oxidativas. Consecuentemente mientras la producción de 1,3-propanediol y ácido 3-hidroxi propiónico decaen fuertemente en comparación con el nivel obtenido con la cepa control, la producción de 2,3-butanodiol, etanol, lactato y succinato se incrementan.

La producción de etanol con este mutante alcanza una producción máxima de 21.5 g/L, con una productividad de 0.93 g/L/h. Al utilizar glicerol obtenido de proceso productivo de biodiésel los valores se ubican mayormente en el mismo orden (20.5 g/l and 19.9 g/l, para glicerol crudo y glicerol de splitting respectivamente). En la búsqueda de incrementar los niveles de producción de etanol se recurre a la sobreexpresión en este mutante de genes de *Zymomonas mobilis* que codifican una piruvato decarboxilasa y una aldehído deshidrogenasa con lo que se alcanza la producción de 25 g/L de etanol con una productividad de 0.78 g/L/h.<sup>188</sup>

Pese a que el resultado descrito a partir de *K. pneumoniae* resulta en principio interesante desde el punto de vista de su productividad y capacidad de acumulación de etanol se ha señalado por parte de otros autores la dificultad de su utilización a nivel industrial a partir del hecho de que esta bioconversión demanda atmósfera controlada de Nitrógeno.<sup>189</sup>

En la búsqueda de minimizar la síntesis de subproductos y de incrementar la eficiencia de la conversión de glicerol a etanol en fermentación anaerobia se recurre más recientemente a ingeniería metabólica en *E. coli*, describiéndose la obtención de 21 g/L de etanol a partir de 60 g/L de glicerol puro con una productividad volumétrica de 0.216 g/L/h en condición de microaerobiosis.<sup>190-192</sup>

En otra línea de trabajo persiguiendo el mismo objetivo (producción eficiente de etanol), se ha modificado una cepa de *E. coli*, reduciendo el espacio del metabolismo central, en la búsqueda de mantener aquellas vías que sostienen la función celular y permiten la utilización de glicerol, con un rendimiento teórico de 0.50 g etanol/g glicerol. En estas condiciones se ha descrito la importancia de la disponibilidad de Oxígeno en la regulación de las dos vías competitivas, la que conduce a la producción de biomasa y a la producción de etanol. Mediante el desarrollo de evolución metabólica se obtienen cepas con rendimientos y productividades mejoradas, alcanzándose conversiones en el rango del 90 % del rendimiento teórico. Simultáneamente el efecto de los aceptores de electrones fumarato, nitrato, 1,3-propanodiol y 1,2-propanodiol es evaluada.<sup>193</sup>

En otra aproximación el análisis de la fisiología y el metabolismo de mutantes de *E. coli* que expresan una alcohol-acetaldehído deshidrogenasa bifuncional de *Leuconostoc mesenteroides* creciendo en glicerol en condiciones de restricción de Oxígeno ha conducido a cuadruplicar el nivel de producción de etanol. La observación de la acumulación de importantes niveles de lactato en condiciones micro-óxicas conduce en una segunda etapa a introducir la delección de la lactato deshidrogenasa *ldhA* y consecuentemente mejorar la producción etanol (6.5 g/L). Paralelamente se describe la obtención mediante evolución metabólica de una cepa que presenta resistencia a concentración de etanol de 25 g/L. La evaluación de la adición de piruvato y acetaldehído, así como extracto de levadura conducen a producción de 16 g/L con una productividad de 0.34 g/L/h en reactores de dos estados (óxico/fermentativo).<sup>194</sup>

La producción conjuntade etanol con Hidrógeno y de etanol con ácido fórmico ha sido también descrita recurriendo a ingeniería metabólica en *E. coli*. Análogamente a como se ha descrito con anterioridad se procede para maximizar la producción de los compuestos de interés a minimizar la producción de co-productos no deseados a través de mutaciones que inactivan la fumarato reductasa ( $\Delta frdA$ ) y la fosfato acetil transferasa ( $\Delta pta$ ). Adicionalmente, en el caso de la cepa que produce etanol y formiato se inactiva la formiato-hidrógeno liasa ( $\Delta fdhF$ ) a efectos de evitar la conversión de formiato a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Por otra parte a efectos de promover la conversión de glicerol al intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato se sobreexpresan los genes que codifican para la glicerol deshidrogenasa (*gldA*) y para la dihidroxiacetona kinasa (*dhaKLM*). Como consecuencia de estas modificaciones se logra la producción de etanol- Hidrógeno ó etanol-formiato a partir de glicerol crudo con rendimientos superiores al 95 % del máximo teórico y con velocidades específicas que se ubican en el rango de los 15-30 mmol/gcel/h.<sup>195</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido modificada recurriendo a ingeniería metabólica para incrementar la producción de etanol a partir de glicerol. A partir de la sobreexpresión simultánea de genes que codifican para glicerol deshidrogenasa, dihidroxiacetona kinasa y la proteína asociada al transporte de glicerol, se verifica un incremento de 3.4 veces el nivel de producción de etanol, observándose una producción de 2.4 g/L.<sup>196</sup>

Considerando que en la producción industrial de etanol usando levaduras las células son expuestas a stress afectando el crecimiento y la productividad es que trabajos tendientes a desarrollar cepas resistentes a las condiciones de stress se han descrito. Como resultados de estos trabajos el aumento en 1,8 veces el nivel de producción ha sido descrito, alcanzando 8.1 g/L de etanol.<sup>197</sup>

Por su parte la producción de etanol a partir de glicerol ha sido descrita con la levadura *Pachysolen tannophilus* alcanzando una concentración de 17.5 g/L de etanol en una solución 5% (v/v) de glicerol crudo (correspondiente al 56% del rendimiento teórico). Por su parte en un ensayo batch con adición escalonada de sustrato se alcanzó una concentración de 28.1 g/L de etanol, el valor máximo descrito para esta bioconversión.<sup>189</sup>

### Producción de butanol

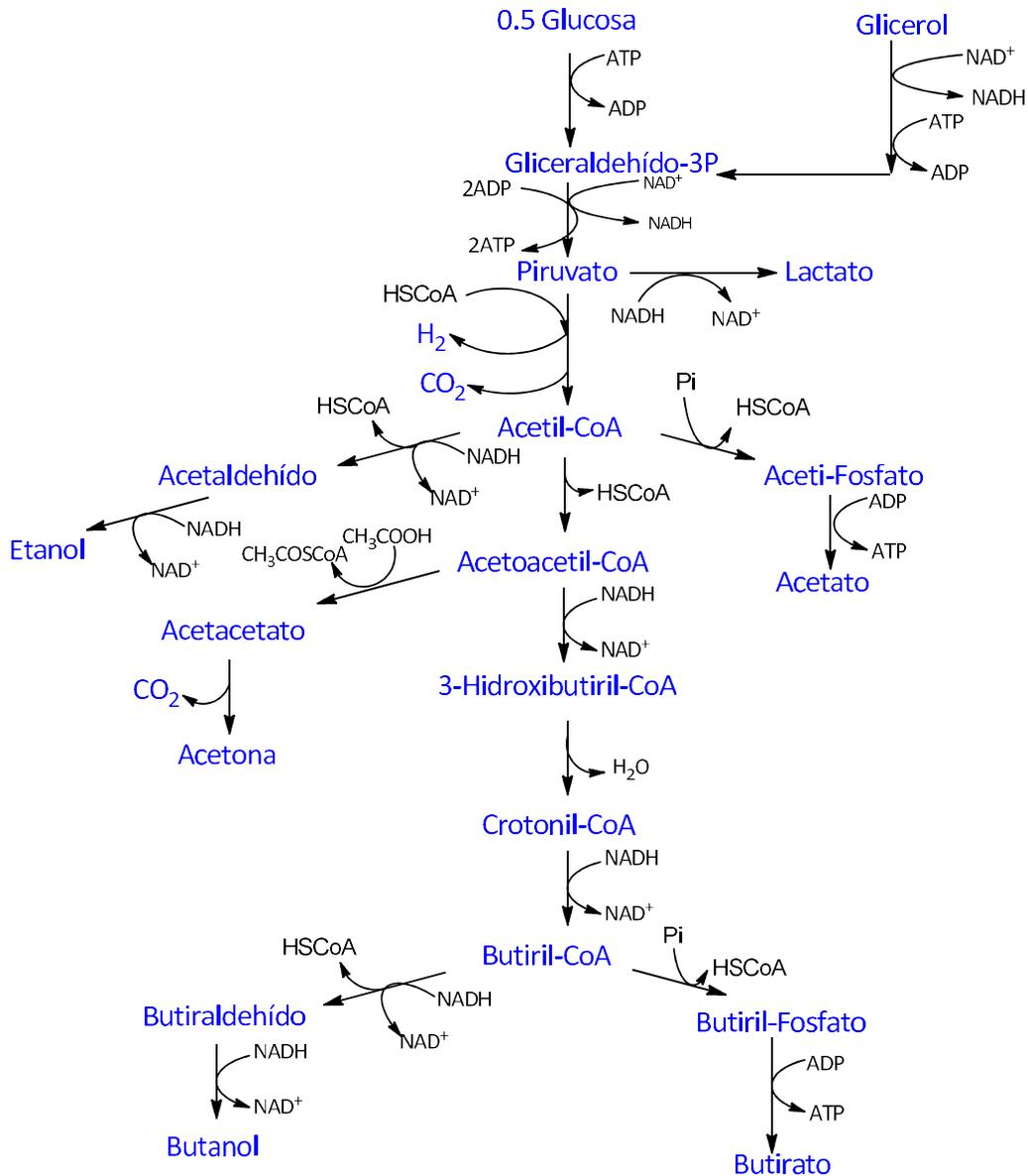
El butanol ha sido identificado como producto de interés a partir de su potencial uso como bloque de síntesis para la obtención de nuevos productos ó en síntesis de biomateriales alternativos a muchos productos derivados de recursos fósiles.<sup>198</sup>

Paralelamente el butanol puede ser usado como combustible alternativo, presentando mejores propiedades físicas cuando se lo compara con el biocombustible de uso más extendido: el etanol.<sup>199</sup>

Tal como ocurriera con otros procesos fermentativos, a inicios del Siglo XX la fermentación de azúcares con *Clostridium acetobutylicum* fue utilizada extensamente para la producción industrial de una mezcla de Acetona, Butanol y Etanol, lo que se ha dado en llamar fermentación ABE (que típica produce en relación 3:6:1). Sin embargo los elevados costos de las materias primas y los bajos rendimientos de los procesos fermentativos verificados en la época condujeron al abandono de esta práctica y a su reemplazo por productos obtenidos en la industria petroquímica. Recientemente la investigación en la producción fermentativa de butanol ha estado centrada en las especies *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*, habiéndose establecido la vía metabólica para la obtención de butanol a partir de glucosa.<sup>199</sup>

Esta vía presenta similitudes con la ruta metabólica empleada por *C. pasteurianum* en la producción de butanol a partir de glicerol. Sin embargo, mientras que *C. pasteurianum* puede utilizar glicerol como única fuente de Carbono, *C. acetobutylicum* solo es capaz de metabolizar glicerol en presencia de glucosa.<sup>200</sup> Otra diferencia descrita en el comportamiento de estos dos microorganismos refiere al perfil de productos de fermentación obtenido, mientras *C. pasteurianum* produce 1,3-propanodiol, butanol, etanol y lactato con cantidades traza de acetato y butirato, *C. acetobutylicum* produce una mezcla de fermentación compuesta mayormente por butanol, acetona, etanol, acetato y butirato no observándose producción de 1,3-propanodiol. Los rendimientos obtenidos en la producción

de butanol por fermentación de glicerol se ubican en el rango de 24–31 %, valores que son sustancialmente mayores a los 15–20 %, observados a partir de mezclas de azúcares.<sup>201,202</sup>



**Figura 1.23: Vía metabólica para la obtención de butanol a partir glicerol**

La concentración máxima de butanol obtenida estaría acotada por la toxicidad del producto.<sup>33</sup>

Más recientemente se han desarrollado estudios tendientes a producir butanol con *E.coli*, (microorganismo que naturalmente no lo produce). En esa dirección se ha descrito el desarrollo de cepas recombinantes de *E. coli* productoras de butanol recurriendo a la

transformación de *E. coli* con genes de *C. acetobutylicum* que codifican enzimas responsables de pasos claves de la vía metabólica a la vez que introduciendo deleciones en los genes que compiten con la producción de este solvente.<sup>203</sup>

La construcción de una vía no fermentativa para la síntesis de butanol en *E. coli* que incluye la conversión de los 2-ceto ácidos intermediarios en alcoholes superiores en lugar de aminoácidos se ha descrito. El uso de glicerol como suplemento del medio de cultivo redundante en un aumento en la producción de butanol.<sup>204</sup>

Si bien los niveles de producción obtenidos por esta vía se consideran bajos resultan prometedores para futuros desarrollos.

### Producción de ácido succínico

El ácido succínico es un producto con un mercado establecido en el que los sectores agrícola, alimentario y farmacéutico aparecen como los más demandantes. A la fecha este producto es mayormente producido químicamente a partir de del gas licuado de petróleo (GLP).<sup>205</sup>

La producción de este compuesto clave para la bio-industria está descrita para múltiples cepas bacterianas (mayormente aisladas de rumen en condiciones anaerobias), entre ellas se destacan: *Actinobacillus succigogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Mannheimia succiniciproducens*. La producción en eucariotas si bien existe es menos frecuente, existiendo antecedentes de combinación de fermentaciones, inicialmente fúngica (en la que se produce fumarato), seguida de una etapa bacteriana (que realiza la conversión de fumarato a succinato).<sup>205,206</sup>

Variadas fuentes de Carbono han sido utilizadas en la producción de ácido succínico, las más comunes glucosa y glicerol, aunque se ha reportado la dependencia que las mayorías de las cepas presentan de CO<sub>2</sub> para su crecimiento. En el caso del glicerol se ha descrito por primera vez en 2001 su utilización como reemplazo parcial de la glucosa con *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. El uso de este sustrato si bien resulta atractivo desde el punto de vista económico presenta dificultades técnicas en su utilización, asociados fundamentalmente a una baja selectividad hacia el succínico como producto y la estabilidad en su producción. Se ha descrito adicionalmente la influencia que la fuente de Nitrógeno presenta no solo sobre el rendimiento sino también sobre la selectividad del proceso.<sup>206,207</sup>

La producción en régimen continuo de ácido succínico con *Basfia succiniciproducens* utilizando glicerol crudo y NH<sub>4</sub>OH (como fuente de Nitrógeno y regulador de pH) ha sido posteriormente descrita obteniéndose una concentración de 5.2 g/L, con una productividad de 0.09 g/L.h y un rendimiento de 1.02 g/g de glicerol.<sup>209</sup>

Con la finalidad de acoplar el crecimiento celular a partir de glicerol con la producción de ácido succínico y el balance redox se ha recurrido a ingeniería metabólica en *E. coli*. Para ello

se han bloqueado las vías metabólicas que conducen a productos competitivos como lactato, etanol o acetato- dejando la síntesis de succinato como la vía primaria de regeneración de NAD<sup>+</sup>. Adicionalmente se ha expresado la piruvato carboxilasa de *Lactococcus lactis* permitiendo la obtención de succinato a partir de piruvato (en oposición a la obtención a partir de fosfoenolpiruvato). En estas condiciones se ha alcanzado un rendimiento de 0.69 g/g glicerol y una productividad específica de 400 mg de succinato/g célula/h a partir de solución de sustrato de 20 g/L.<sup>210</sup>

En otra línea mediante ingeniería metabólica se han desarrollado mejoras al sistema de producción de ácido succínico, apuntando fundamentalmente a la reducción de co-productos. En particular se deletaron la piruvato formiato liasa (*pfl*) y la lactato deshidrogenasa (*ldh*).<sup>206,208</sup>

Variantes en los procesos han sido evaluadas en la búsqueda de incrementar el rendimiento y la productividad de succinato. Se han ensayado diferentes concentraciones de sustrato, la adición de co-sustratos (urea, extracto de levadura) y diferentes condiciones de reacción (aerobiosis, anaerobiosis, microaerobiosis, pH, etc.).<sup>206,211-214</sup>

Con *Actinobacillus succinogenes* en condiciones anaerobias, en cultivo fed-batch se ha reportado la máxima concentración obtenida de 49.6 g/L con un rendimiento de 0.87 g/g de glicerol y una productividad de 2.3 g/L.h.<sup>212</sup>

Paralelamente, el desempeño de varias levaduras al ser enfrentadas a glicerol ha sido evaluado. Entre ellas las más destacadas han sido *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.<sup>206</sup>

Con *Y. lipolytica* inmovilizada sobre fibras de algodón en un reactor batch operado en régimen fed-batch se ha descrito la obtención de una concentración de 198.2 g/L de ácido succínico con una productividad de 1.46 g/L.h.<sup>215</sup>

### Producción de ácido cítrico

El ácido cítrico (ácido 3-hidroxicarboxi pentanodíico) es un compuesto altamente demandado por la industria alimentaria y farmacéutica a partir de su muy baja toxicidad y características sensoriales. Caracterizado por ser un producto con un mercado altamente competitivo, la aparición de materias primas económicas como el glicerol obtenido como subproducto de la producción de biodiésel así como a partir de otros residuos industriales y agrícolas ha llamado la atención del sector.<sup>216</sup>

Existen, sin embargo escasas referencias a microorganismos que presenten la capacidad de producción de ácido cítrico usando glicerol como materia prima. La levadura *Yarrowia lipolytica* es la especie más destacada en esta aplicación.<sup>217-219</sup>

La relación entre la disponibilidad de Nitrógeno y la producción de ácido cítrico se encuentra descrita para *Y. lipolytica* estableciéndose que, con glicerol como fuente de Carbono, en

condiciones en las que el pH se encuentra ajustado a valores entre 5,0 y 6,2 y se encuentra asegurada la disponibilidad de Nitrógeno (aportado como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y extracto de levadura) no se verifica *fase lag* y prácticamente todo el glicerol consumido tiene como destino la producción de biomasa, condiciones en las que no se observa producción significativa de ácido cítrico (las concentraciones se ubican en el rango 0,5 a 1,0 g/L). En cambio, al tornarse como limitante la disponibilidad de Nitrógeno una importante acumulación de ácido cítrico tiene lugar, efecto que se acentúa en ensayos con concentración inicial de glicerol crudo elevada (condición en la que simultáneamente se observa una leve inhibición del crecimiento celular).<sup>220</sup>

Se ha descrito la producción de 124.5 g/L de ácido cítrico, con un rendimiento de 0.62 g/g glicerol y una productividad de 0.88 g/(L.h) a partir de una concentración inicial de 200g/L de glicerol por parte de *Y. lipolytica* en condiciones de fermentación sumergida en batch, por su parte se encuentran patentados procesos semicontinuos y continuos en los que se alcanzan concentraciones de hasta 250 g/L.<sup>221-223</sup>

Por otra parte se ha evaluado la utilización de glicerol crudo obtenido de la producción de biodiésel, alcanzándose como resultado de la ejecución de una optimización multivariable una producción máxima de ácido cítrico de aproximadamente 77.5 g/L.<sup>224</sup>

### Producción de ácido láctico

En varios microorganismos se ha descrito desde hace tiempo la capacidad de biotransformar glicerol en ácido láctico, entre ellos se incluyen *Klebsiella*, *Clostridium*, y *Lactobacillus*.<sup>202,225,226</sup>

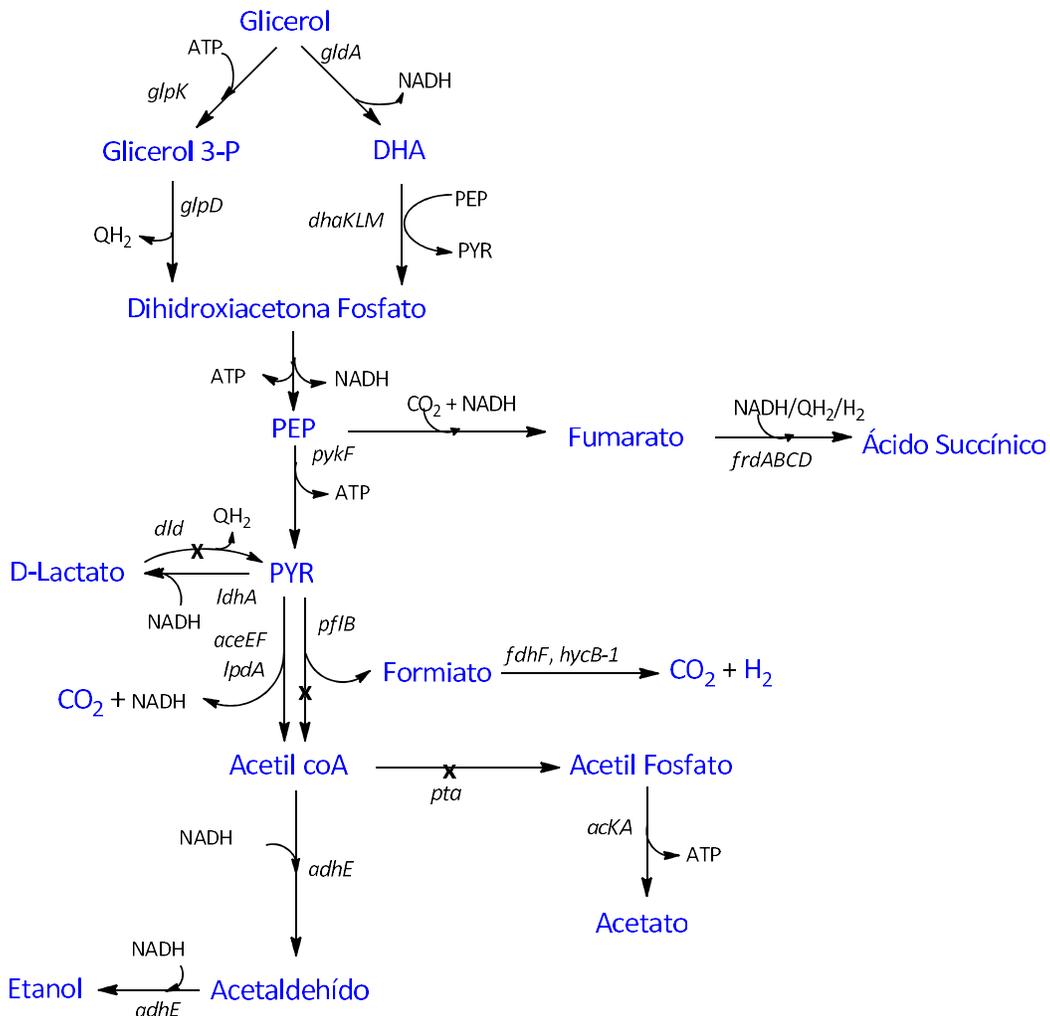
Más recientemente la producción de ácido láctico a partir de glicerol utilizando *Achromobacter denitrificans* ha sido objeto de protección de propiedad intelectual.<sup>227,228</sup>

En el caso de *E. coli* se ha descrito, en cepas nativas para el metabolismo de glicerol la existencia de un comportamiento heterofermentativo (tanto en condiciones de anaerobiosis como en microaerobiosis) denominación que refiere a la producción de etanol como producto mayoritario con obtención marginal de ácido láctico y acetato, succinato, formiato como co-productos.<sup>191,229,230</sup>

No obstante la regla general anteriormente descrita, se ha aislado de suelo una cepa que ha sido identificada como *E. coli* AC-521, capaz de producir 56.8 g/L y 85.8 g/L de ácido láctico en presencia de muy pocos co-productos de fermentación en procesos batch y fed-batch respectivamente.<sup>227</sup>

La aplicación de *E. coli* genéticamente modificada con la finalidad de producir ácido láctico ha sido investigada, orientada mayormente a la obtención de productos enantioméricamente puros. En ese sentido se ha descrito la construcción de una ruta homofermentativa tendiente a obtener D-lactato sobreexpresando las vías que conducen a

su síntesis e interrumpiendo las vías que conducen a los co-productos competitivos. La delección de los genes que codifican para piruvato-formiato liasa (*pf1B*), fosfotransacetilasa (*pta*), fumarato reductasa (*frdA*), alcohol/acetaldehído deshidrogenasa (*adhE*) y D-lactato deshidrogenasa aeróbica (*dld*). Utilizando esta cepa ha sido posible acumular 32 g/L de D-ácido láctico a partir de 40 g/L de glicerol en fermentación en batch en medio mínimo. La pureza óptica del D-ácido láctico supera el 99.9 %.<sup>229,231</sup>



**Figura 1.24:** Vía metabólica para la obtención de D-lactato a partir glicerol en *E. coli*.<sup>231</sup>

Análogamente, un diseño racional de un biocatalizador capaz de producir homofermentativamente L-lactato, producto que normalmente no es obtenido con *E. coli* se ha desarrollado recurriendo al reemplazo de la D-lactato deshidrogenasa nativa de *E. coli* con la L-lactato deshidrogenasa de *Streptococcus bovis* (L-LDH), para posteriormente proceder al bloqueo del denominado bypass del Metilglioxal con la finalidad de evitar la síntesis racémica de producto, evitando adicionalmente la acumulación del intermediario

que presenta toxicidad. Esta cepa produce 50 g/L de L-lactato a partir de 56 g/L de glicerol crudo con purea óptica del 99.9 %.<sup>232</sup>

### Producción de dihidroxiacetona

La fermentación de glicerol para producir dihidroxiacetona ha sido aplicada desde las primeras décadas del siglo XX. La dihidroxiacetona es el principal ingrediente en la formulación de bronceadores artificiales teniendo su origen mayormente en la bioconversión de glicerol obtenido en la producción de aceite de colza o de palma.<sup>233-235</sup>

Un amplio rango de microorganismos y enzimas pueden ser empleadas con este propósito, entre ellos se destacan bacterias del género *Acetobacter*, *Gluconobacter* y levaduras de los géneros *Candida valida* y *Neurospora crassa*.<sup>163,236-238</sup>

La producción en batch de dihidroxiacetona por parte de *G. oxydans* o *A. suboxydans* ha sido ampliamente utilizada, reportándose su obtención hasta en concentraciones de 80 kg/m<sup>3</sup>, no obstante lo anterior la búsqueda de mejorar el proceso productivo ha conducido a adoptar proceso semi-continuos (básicamente con la intención de evitar la inoculación en cada ciclo y buscar condiciones que permitan remover el efecto inhibitorio que el producto de reacción presenta sobre los microorganismos utilizados en la síntesis).<sup>239</sup>

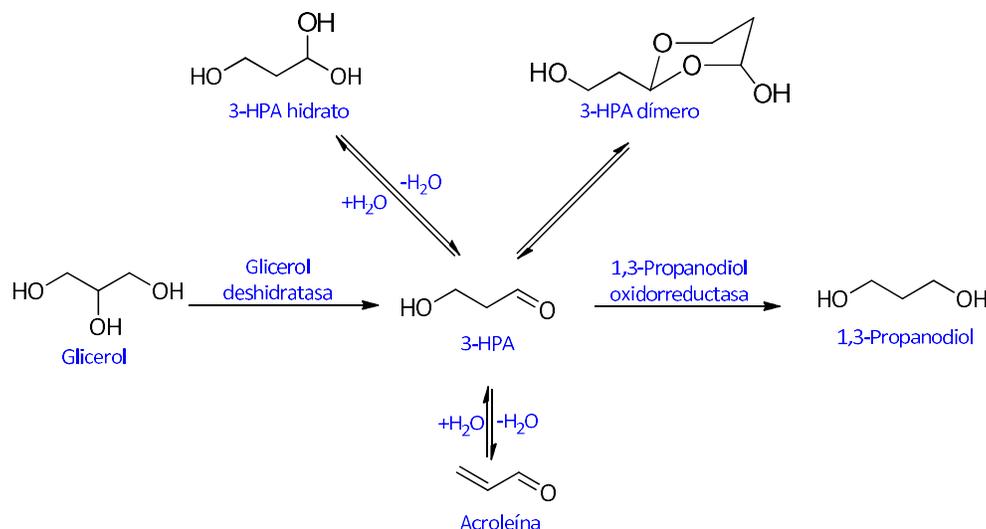
Recurriendo a un proceso semi-continuo en dos etapas con *G. oxidans* se ha alcanzado una concentración máxima de dihidroxiacetona de 220 kg/m<sup>3</sup>.<sup>240</sup>

Paralelamente incrementos en la productividad de dihidroxiacetona han sido alcanzados inmovilizando *G. oxidans* en polivinil alcohol, condiciones en las que ha sido posible observar luego de cinco ciclos una actividad residual del biocatalizador del 90 % y una conversión promedio de 86 %.<sup>241</sup>

### Producción de 3-hidroxi propionaldehído

El 3-hidroxi propionaldehído es un precursor de muchos productos con importancia comercial (acroleína, ácido acrílico, 1,3-propanodiol) y empleado adicionalmente en la producción de polímeros. Su síntesis puede lograrse tanto por métodos químicos como biotecnológicos a partir de glicerol pudiendo señalarse como las principales ventajas de esta segunda alternativa que adicionalmente a trabajar a bajas temperaturas y presión atmosférica, el proceso biotecnológico presente rendimientos superiores, alcanzando valores del entorno del 85 %.<sup>62</sup>

Los microorganismos mayormente involucrados en esta reacción son bacterias y pertenecen mayormente a los géneros *Klebsiella* (*Aerobacter*), *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium* y *Lactobacillus*.<sup>242-245</sup>



**Figura 1.25: Síntesis de 3-hidroxi-propanal a partir de glicerol.**

### Producción de 1,3-Propanodiol

La producción de 1,3-propanodiol por fermentación de glicerol ha sido reportada para varios géneros incluyendo *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Clostridium*. Esta reacción se da en estos organismos como una forma de generar equivalentes de reducción en anaerobiosis. El glicerol es así utilizado como aceptor de electrones reduciéndose a 1,3-propanodiol en dos pasos enzimáticos que involucran una glicerol deshidratasa y luego una reductasa.<sup>245-247</sup>

Las enzimas participantes en la conversión de glicerol a 1,3-propanodiol han sido identificadas y ampliamente estudiadas en *Klebsiella pneumoniae*. Las enzimas glicerol deshidratasa son enzimas multicomponentes que requieren coenzima B12 como cofactor. Se ha caracterizado el operón que codifica para esta ruta metabólica y se ha demostrado que el mismo está compuesto de cuatro genes que codifican para la enzima glicerol deshidratasa (*dhaB3*, *dhaB3a*, *dhaB4*, *dhaB4a*) y una 1,3-propanodiol oxido-reductasa codificada por el gen *dhaT*.<sup>248,249</sup>

La bioconversión de glicerol a 1,3-propanodiol ha sido explorada en un estudio comparativo que ha incluido las cepas de *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, y *Clostridium butyricum*. El proceso implica el crecimiento del microorganismo en anaerobiosis en un medio rico suplementado con glicerol. Se ha descrito la presencia de otras rutas metabólicas que generan productos secundarios como acetato, lactato y etanol, lo cual disminuye el rendimiento global del proceso. Los mejores resultados han sido reportados para *C. butyricum*, lográndose una productividad de 1.32 g/L-h, en presencia de 70 g/L de glicerol, y obteniéndose una conversión de 0.64 mol/mol. La cepa de *E. agglomerans* CNCM 1210 tolera altas concentraciones de glicerol, metabolizándolo más rápidamente que las otras cepas en estudio, sin embargo la

biotransformación se detiene a las 20 hs por acumulación del 3-hidroxi propion-aldehído que inhibe el proceso y resulta tóxico a la célula.<sup>250</sup>

Más recientemente se han descrito que en fermentación anaerobia a 25 °C con *S. cerevisiae* se ha logrado obtener rendimientos en la biotransformación hacia 1,3-propanodiol de 42.3 % en peso, con una bioconversión de 93.6 % del glicerol adicionado como sustrato.<sup>251</sup>

El desarrollo de cepas de *E. coli* recombinantes capaces de producir 1,3-propanodiol a partir de azúcares se ha basado en la expresión en este microorganismo de las enzimas glicerol deshidratasa (*dhaB*) y 1,3-propanodiol oxidoreductasa (*dhaT*) de *K.pneumoniae*. La glicerol deshidratasa es una enzima compleja con múltiples subunidades y codificada por cuatro genes, lo que implicó la construcción de un operón sintético para su expresión en *E. coli*.<sup>202,252-255</sup>

La producción de dioles en *S. cerevisiae* por métodos de ingeniería genética también se han dirigido hacia la producción de 1,3-propanodiol. La estrategia utilizada se ha basado al igual que en *E. coli*, en la sobreexpresión de *dhaB* y *dhaT* de *K. pneumoniae*(hecho éste que se considera un desafío mayor atendiendo a la distancia entre *S. cerevisiae* y *K. pneumoniae*). Se han reportado buenos niveles de producción de enzimas, pero falta de actividad, lo que se ha atribuido a la incapacidad de *S. cerevisiae* para sintetizar o importar vitamina B12, un cofactor esencial de la glicerol deshidratasa.<sup>256,257</sup>

### 1.6.2.3 Obtención biotecnológica de 1,2-propanodiol

A diferencia de lo descrito hasta este punto, en que solo se refirieron antecedentes directos de conversión química o biológica de glicerol, este apartado contiene antecedentes no solo relacionados a la conversión de glicerol sino también a partir de otras fuentes de Carbono.

Relativamente pocos reportes se encuentran disponibles para el caso de la producción de 1,2-propanodiol, hecho este que resulta llamativo si se considera que se trata de un compuesto altamente demandado para la fabricación de polímeros por la industria química así como por la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Adicionalmente, el hecho de que el 1,2-propanodiol cuente con un centro estereogénico le abre muchas otras posibilidades como sintónquiral en química fina.<sup>246,258</sup>

La bibliografía reciente señala en forma casi sistemática que la producción microbiológica de 1,2-propanodiol está descrita desde el año 1954, momento en que se reporta esta capacidad en la bacteria *C. thermobutyricum* en el marco de un estudio de descomposición de celulosa por acción de bacteria termófilas en condiciones anaerobias. De igual manera se describe 1968 como la fecha del primer reportede esta actividad en levaduras.<sup>246,259-262</sup> Sin embargo, en la presente búsqueda de antecedentes se han identificado publicaciones que refieren a reportes previos que datan de 1920 y 1937 a partir de los cuales se evidenciaría que incluso la observación de producción de 1,2-propanodiol ocurrió inicialmente en

levaduras (como producto de reducción de acetol, lactaldehído o metilglioxal) y luego en la fermentación bacteriana de ramnosa.<sup>263–267</sup>

La producción de 1,2-propanodiol en microorganismos puede verificarse o bien en forma natural o recurriendo a microorganismos modificados genéticamente a tal fin, a continuación se detallan los antecedentes más relevantes en cada área.

### Producción natural de 1,2-propanodiol en bacterias

En bacterias se han identificado tres vías principales asociadas a la biosíntesis en forma natural de 1,2-propanodiol, a saber:

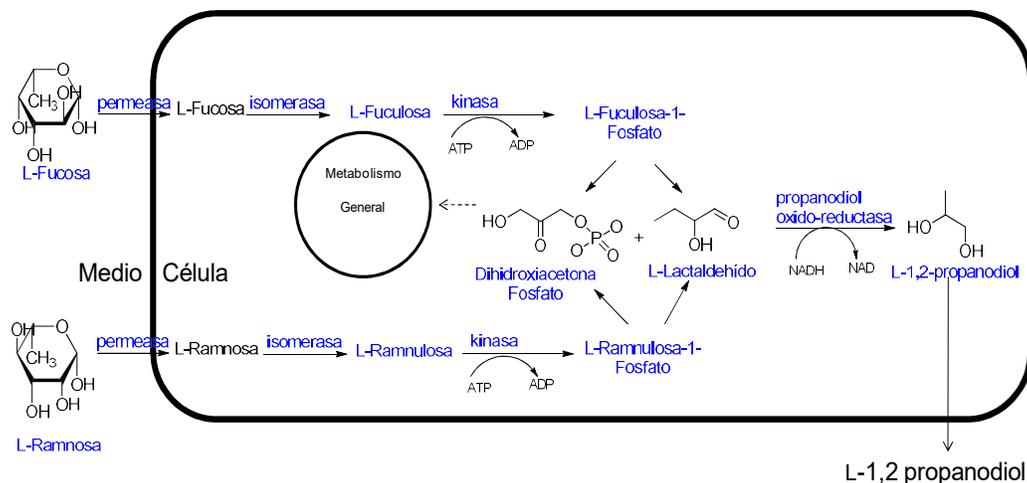
#### i) Metabolismo de metilpentosas

Bajo esta denominación se incluye el metabolismo de deoxy-hexosas o metil pentosas, como ramnosa y fucosa, vía que está presente en muchas bacterias.<sup>268,269</sup> Principalmente ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *K. pneumoniae*.<sup>261,262</sup>

En *E. coli* se ha descrito que en el metabolismo de la L-fucosa están involucradas las siguientes enzimas: la L-fucosa permeasa, la L-fucosa isomerasa, la L-fuculosa kinasa, la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa. Siendo esta última enzima la responsable del paso catalítico en el que se forma dihidroxiacetona fosfato y el L-lactaldehído. El lactaldehído en condiciones aerobias se convierte en lactato y piruvato mediado por dos oxidaciones catalizadas enzimáticamente. Por su parte en condiciones anaerobias el lactaldehído es reducido a L-1,2-propanodiol por una oxido-reductasa regenerando NAD y permitiendo que la fermentación de fucosa avance. Análogamente, L-ramnosa es utilizada recurriendo a un conjunto similar de enzimas, rindiendo igualmente dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehído como intermediarios. Es de resaltar, sin embargo, que los genes involucrados en la utilización de la fucosa y la ramnosa se ubican en dos clusters separados en el cromosoma de *E. coli*.<sup>270</sup>

Las enzimas involucradas han sido posteriormente identificadas como RhaD la aldolasa con actividad sobre la ramnulosa-1-fosfato y FucA como la aldolasa con actividad sobre la fuculosa-1-fosfato, siendo en ambos casos FucO la oxidoreductasa NAD dependiente responsable del pasaje lactaldehído a 1,2-propanodiol.<sup>271</sup>

En relación a estas enzimas se ha descrito adicionalmente que mientras *fucO*, el gen que codifica para la oxidoreductasa puede ser inducido bajo condiciones aerobias y anaerobias, solo se encuentra normalmente activo en anaerobiosis. Mutantes de *E. coli* que expresan en forma constitutiva *fucO* han sido aisladas. Algunos mutantes que han sido aislados presentan la capacidad de utilizar 1,2-propanodiol como fuente de Carbono.<sup>272–278</sup>



**Figura 1.26: Producción de 1,2-propanodiol mediante metabolismo de metilpentosas.**

En otro orden, respecto al sistema de transporte requerido para sobreponerse a la pobre permeabilidad de la célula al propanodiol se ha postulado la salida a través de difusión facilitada.<sup>278,279</sup>

*S. typhimurium* y *K. pneumoniae* son bacterias en las que su capacidad de crecer aeróbicamente en L-fucosa o L-ramnosa como única fuente de carbono y energía está descrita.<sup>280-282</sup> Si bien no está identificada la vía asociada a la fucosa en *S. typhimurium*, la descripción de la ruta para ramnosa ha sido publicada aportando evidencia en la dirección descrita para *E. coli*.<sup>283,284</sup> En cualquier caso, para ambas especies se ha verificado experimentalmente la excreción de 1,2-propanodiol creciendo anaeróbicamente a partir de fucosa o ramnosa en forma consistente con la reducción de lactaldehído a propanodiol tal como se encuentra descrito para otras bacterias.<sup>284</sup>

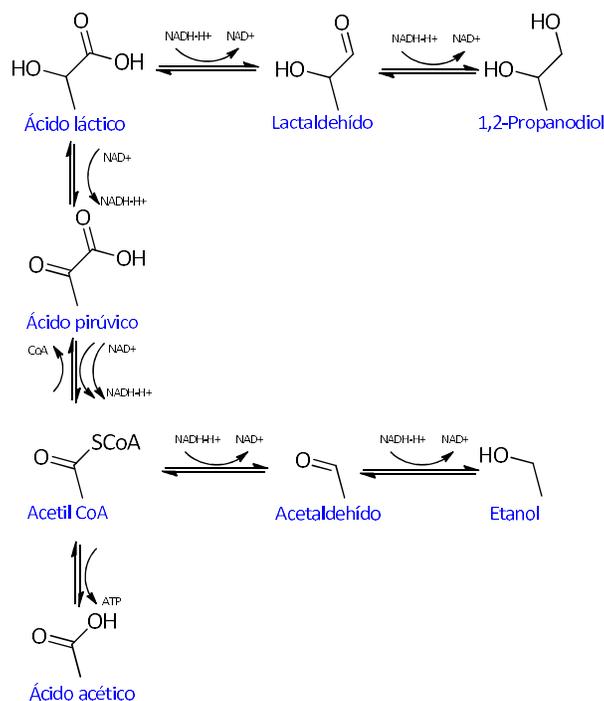
Finalmente la síntesis de 1,2-propanodiol (conjuntamente con ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y n-propanol) ha sido observada a partir de ramnosa en varios microorganismos pertenecientes al género *Clostridium* sp.<sup>247</sup>

El elevado costo de las metil pentosas, material de partida para recorrer la vía metabólica hace imposible considerar esta alternativa con fines de síntesis del 1,2-propanodiol.<sup>262</sup>

## ii) Degradación acética del ácido láctico

La degradación anóxica del ácido láctico por parte de diversos lactobacilos entre los que se encuentra *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. kefir* y el *L. hilgardii* sin ha sido descrita. Entre ellos, *L. buchneri* y *L. parabuchneri* logran sin requerir aceptor externo de electrones. En este proceso la conversión de ácido láctico permite la obtención equimolecular de ácido acético y de 1,2-propanodiol y presencia de trazas de etanol. Sobre la base de la estequiometría de la reacción y los elevados niveles de una enzima 1,2-propanodiol oxidoreductasa-NAD dependiente, se ha postulado una nueva vía para la degradación anaeróbica del ácido

láctico. Esta vía no soporta el crecimiento celular y es dependiente del pH requiriéndose condiciones ácidas para inducir la degradación y mantener la actividad (a pH superior a 5.8 no se observa degradación alguna). Si bien la función exacta de la degradación anaerobia no está totalmente clara se ha postulado que podría jugar un rol importante en el mantenimiento de la viabilidad celular.<sup>285,286</sup>



**Figura 1.27: Producción de 1,2-propanodiol mediante degradación acética de ácido láctico.**

Si bien se han identificado relativamente pocas publicaciones que refieran a esta vía, se ha descrito su identificación en condiciones de ensilado de maíz inoculado con *Lactobacillus buchneri*, observando la producción de 1,2-propanodiol conjuntamente con la inhibición de crecimiento de levaduras atribuida al aumento en la concentración de ácido acético. Paralelamente se ha descrito la posibilidad de una ulterior degradación del 1,2-propanodiol obtenido, dismutándose en estas condiciones a ácido propiónico y 1-propanol.<sup>287,288</sup>

### iii) Producción mediada por metilglioxal

La tercera ruta de producción natural de 1,2-propanodiol es la que más vínculo presenta con el presente trabajo.

La obtención del producto de interés a partir de glucosa ha sido inicialmente encontrada en *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (microorganismo clasificado anteriormente como *Clostridium thermosaccharolyticum*) y en *Clostridium sphenoides* a través de la vía del metilglioxal.<sup>261</sup>

Adicionalmente y más cercana en el tiempo ha sido reportada la fermentación anaerobia de glicerol por parte de *E. coli* así como la vía involucrada en esta novedosa capacidad.<sup>230</sup>

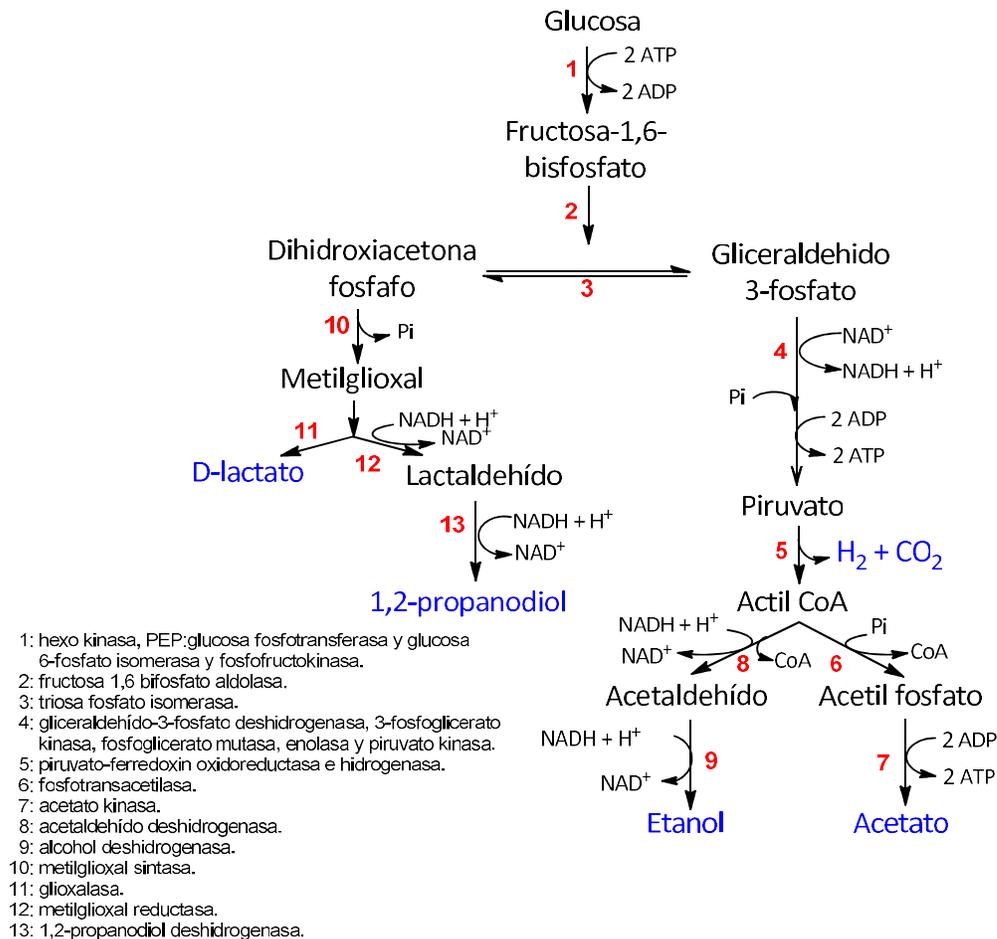
En el caso de *T. thermosaccharolyticum* se ha reportado la obtención enantioméricamente pura de *R*-(-)-1,2-propanodiol a partir de una importante gama de carbohidratos que incluyen D-glucosa, D-xilosa, D-manosa y celobiosa. Por su parte, con sacarosa se observa la formación solamente de trazas de 1,2-propanodiol y en cultivos con maltosa no se observa formación de este producto. Finalmente, con D-fructosa, D-galactosa y lactosa no solo no se verifica formación de 1,2-propanodiol sino que tampoco se observa crecimiento del cultivo. La glucosa es el sustrato que mejor desempeño muestra con este propósito. Al ensayarse la fermentación en condición fed-batch (para dosificación de glucosa) se observa crecimiento con apariencia diaúxico. En esas condiciones se logra una acumulación de 7,9 g/L del producto (*R*)-1,2-propanodiol, simultáneamente con la obtención de lactato (producto mayoritario en la reacción), etanol y acetato. En estas condiciones la producción del diol no resulta asociada a la limitación de fosfato, tal como se ha descrito en otros microorganismos.<sup>246</sup>

Paralelamente se ha descrito brevemente la producción en pequeñas concentraciones de 1,2-propanodiol en fermentación de xilosa por parte de *Thermoanaerobacter ethanolicus* (previamente conocido como *Clostridium thermohydrosulfuricum*).<sup>256,289</sup>

El análisis de la co-fermentación de azúcares así como de la fermentación de suero de leche (permeado, hidrolizado y suplementado con extracto de levadura) se ha descrito también para el microorganismo *T. thermosaccharolyticum* en la búsqueda de fuentes de Carbono más económicas y de explorar aplicaciones ambientales para la producción del 1,2-propanodiol.<sup>290</sup>

La producción de (*R*)-1,2-propanodiol ha sido descrita en cultivos de *Clostridium sphenoides* en glucosa en medios con limitación de fosfato. Se ha observado en concentraciones inferiores a 80  $\mu$ M de fosfato la acumulación de D(-)-1,2-propanediol y D(-)-lactato adicionalmente a etanol, acetato, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Se ha propuesto que la producción de estos compuestos transcurre a través de la vía denominada como “bypass del metilglioxal” mecanismo que permite la ruptura de fructosa-1,6-bifosfato en condiciones de escasez de fosfato. Posteriormente la dihidroxiacetona fosfato es convertida a metilglioxal aportando fosfato inorgánico requerido para la reacción de la gliceraldehído deshidrogenasa. El paso dihidroxiacetona fosfato a metilglioxal es catalizado por la metilglioxal sintasa (enzima que tiene reportada elevada inhibición en presencia de fosfato), posteriormente el metilglioxal formado (que regularmente es metabolizado a D(-)-lactato bajo el funcionamiento clásico del bypass) por acción de una metilglioxal reductasa y una 1,2-propanodiol deshidrogenasa (enzimas sobre las que el nivel de fosfato no actúa como restricción) es reducido a *R*-(-)-1,2-propanodiol. La reducción de metilglioxal a 1,2-propanodiol puede transcurrir o bien a través del hidroxialdehído como a través de la hidroxiacetona como intermediario, estando

descrita que, en el caso de *C. sphenoides* la obtención de 1,2-propanodiol está mediada por el lactaldehído, al igual que ocurriría en la obtención a partir de las metil pentosas. En ensayos similares con *Clostridium glycolicum*, *C. nexile*, *C. cellobioparum*, *C. oroticum* y *C. indolisno* se ha observado la formación de 1,2-propanodiol.<sup>291,292</sup>

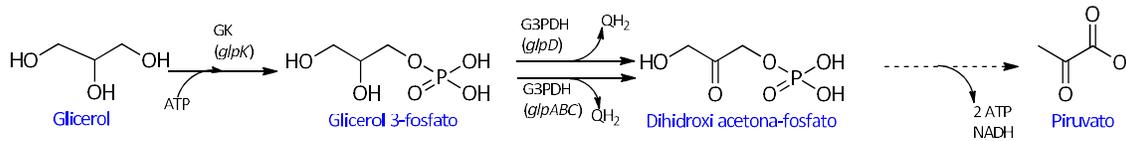


**Figura 1.28: Producción de 1,2-propanodiol a partir de glucosa.**

En el caso de *E. colidurante* casi un siglo se ha difundido que el hecho de no presentar este microorganismo la capacidad de producir 1,3-propanodiol, -tal cual ocurre en otras enterobacterias- determina su incapacidad de fermentar anaeróbicamente el glicerol requiriendo el metabolismo de este producto la existencia de un aceptor de externo de electrones.<sup>279,293-297</sup>

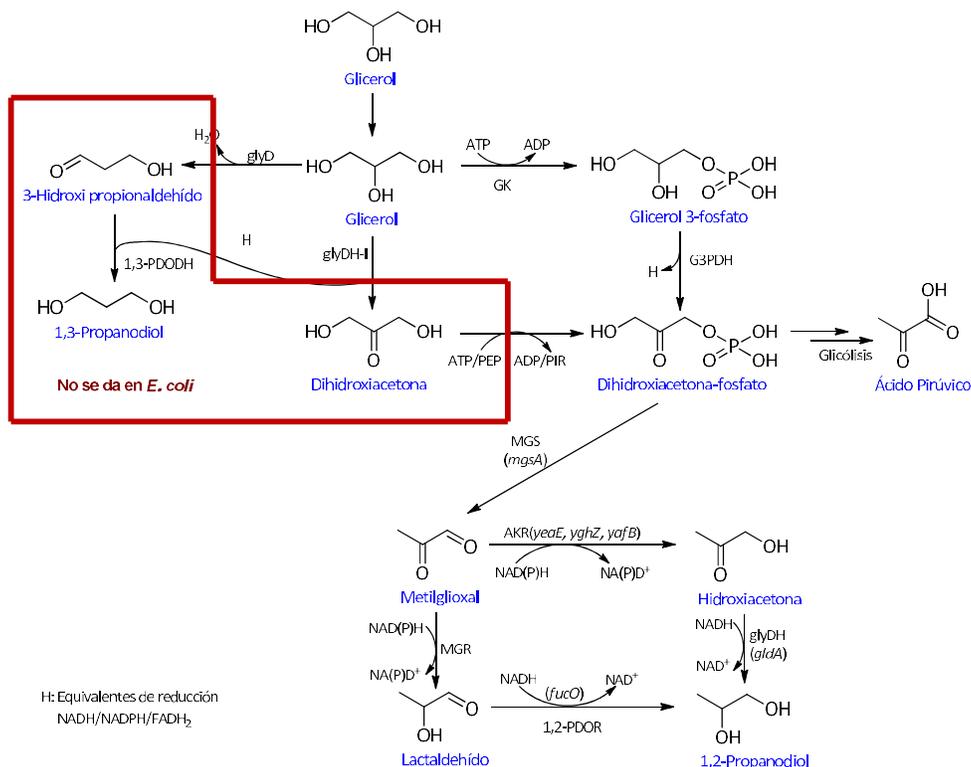
De esta forma se ha planteado clásicamente que la respiración de glicerol involucra un transportador de glicerol, una glicerol kinasa y dos glicerol-3-P deshidrogenasas. En condiciones aerobias se ha descrito el rol central de una glicerol-3-P deshidrogenasa codificada por el gen *glpD*, mientras que en ausencia de oxígeno y en presencia de otro aceptor de electrones como el fumarato una enzima codificada por el operón *glpABC* convierte glicerol 3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato.<sup>191</sup>

La pérdida de la actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa en ausencia de aceptores de electrones conduciría a la acumulación de glicerol 3-fosfato a niveles que inhibirían el crecimiento celular. Consecuentemente la incapacidad de metabolizar glicerol 3-fosfato en estas condiciones ha sido sugerida como la razón por la cual *E. coli* no puede fermentar glicerol.<sup>190</sup>



**Figura 1.29: Respiración de glicerol en *E. coli*.**

Sin embargo, recientemente ha sido postulada una nueva vía fermentativa para el glicerol, en la que, a diferencia de lo observado para otros integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* (en las que el producto de fermentación es el 1,3-propanodiol) se obtiene como producto de fermentación el 1,2-propanodiol.<sup>190</sup>



**Figura 1.30: Producción natural de 1,2-propanodiol en *E. coli*.**

La vía propuesta involucra, en su tramo central, dos enzimas para convertir el glicerol en intermediarios de la glicólisis (una glicerol deshidrogenasa tipo II y una dihidroxiacetonaquinasa), a partir de la dihidroxiacetona-fosfato –en la vía auxiliar– por

acción de la metilglicoxal sintasa se obtiene metilglicoxal el que posteriormente es reducido a 1,2-propanodiol, recurriendo a hidroxiacetona (acetol) como intermediario (se ha verificado la no participación de lactaldehído en la misma).

Esta vía auxiliar juega un rol en la regeneración de equivalentes de reducción producidos en otras etapas del metabolismo y en la síntesis de biomasa.<sup>230,246</sup> En la siguiente tabla se analiza el balance redox asociado a la conversión de glicerol en biomasa y diferentes productos de fermentación.

**Tabla 1.2: Balance redox: Conversión glicerol a biomasa y productos de fermentación.**<sup>230</sup>

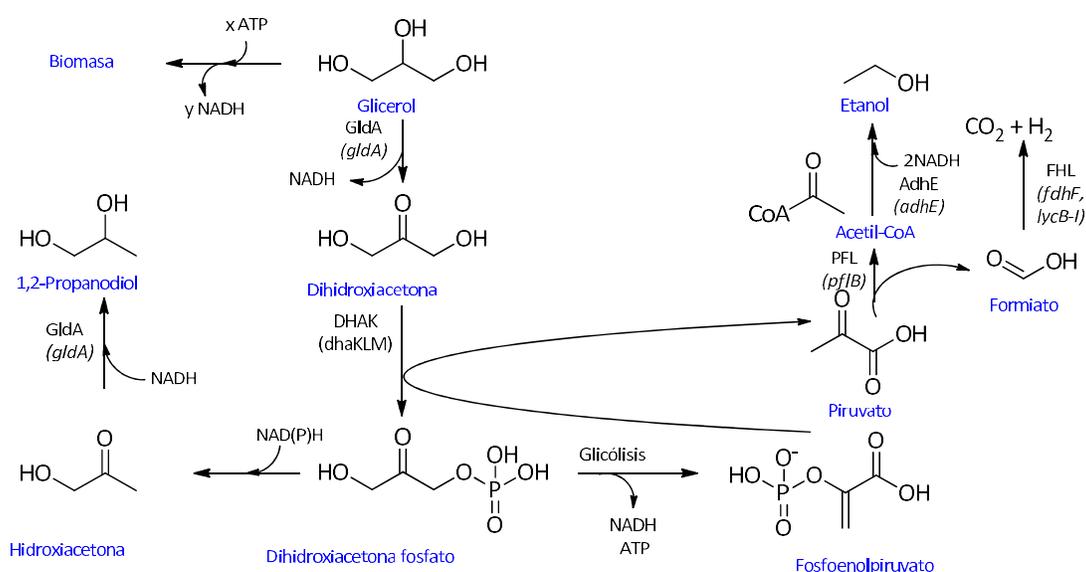
Vía	Estequiometría (x)	$\Delta K$ (H)
Glicerol $\rightarrow$ Biomasa	$C_3H_8O_3$ (14/3) $\rightarrow$ $3CH_{1,9}O_{0,5}N_{0,2}$ (4,3)	1,1 (0,55 H)
Glicerol $\rightarrow$ Etanol + Formiato	$C_3H_8O_3$ (14/3) $\rightarrow$ $C_2H_6O$ (6) + $CH_2O_2$ (2)	0 (0 H)
Glicerol $\rightarrow$ Succinato	$C_3H_8O_3$ (14/3) + $CO_2$ $\rightarrow$ $C_4H_6O_4$ (14/4)	0 (0 H)
Glicerol $\rightarrow$ 1,2/1,3-Propanodiol	$C_3H_8O_3$ (14/3) $\rightarrow$ $C_3H_8O_2$ (16/3)	-2 (-1H)

Estequiometría calculada solo para balance en Carbono entre reactivos y productos.

El grado de reducción por Carbono  $\chi$  estimado según descrito por Nielsen y colaboradores.

El grado de reducción ( $\Delta K$ ) estimado según:  $\sum_{react} v_c x - \sum_{prod} v_c x$  donde  $v, c$  son coeficiente estequiométrico y el número de átomos de Carbono para cada compuesto respectivamente.

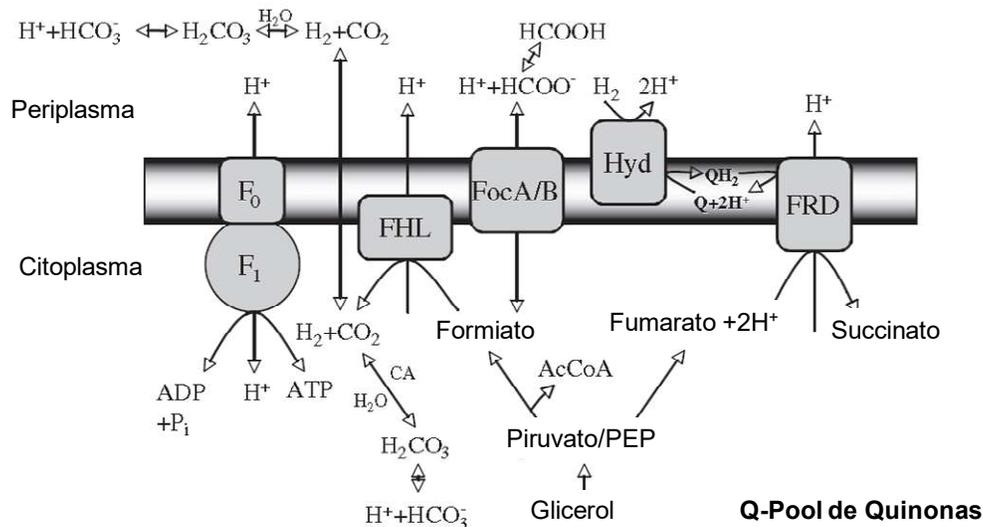
H, unidades redox netas son expresadas por mol de glicerol (H=NAD(P)H=FADH<sub>2</sub>=H<sub>2</sub>).



**Figura 1.31: Fermentación de glicerol en *E. coli* vías centrales y vías auxiliares.**

Este balance abona desde el punto de vista teórico la posibilidad de que un microorganismo pueda fermentar glicerol en forma independiente a la producción de 1,3-propanodiol, en la medida en que tenga activa una vía alternativa que pueda actuar como sumidero de electrones (tal el caso de la producción de 1,2-propanodiol).<sup>230</sup> Consecuentemente se ha propuesto para la fermentación anaerobia de glicerol en *E. coli* la existencia de una vía

central (aquellas que producen intermediarios de la glicólisis) y vías auxiliares (aquellas que posibilitan la fermentación de glicerol facilitando el balance redox, la síntesis de ATP, síntesis de CO<sub>2</sub>, generación de fuerza motriz, etc.) presentes tanto en el citoplasma como a nivel de membrana.



**Figura 1.32: Sistemas auxiliares utilizados en la fermentación anaerobia de glicerol con formación de 1,2-propanodiol en *E. coli*.**

La producción de 1,2-propanodiol regenerando equivalentes de reducción y la síntesis de etanol proveyendo ATP son vías que responden a esta descripción.

Adicionalmente a lo descrito la existencia de una vía auxiliar incluye la conversión de ácido fórmico a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> mediada por una formiato hidrógeno liasa (FHL) y el sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasa que aporta fuerza protón-motriz (PMF) indispensable para la generación de energía, transporte de metabolitos, etc. y que resulta dependiente de condiciones ambientales (composición de la atmósfera anaerobia, pH del medio entre otros).<sup>190,191,230</sup>

### Producción natural de 1,2-propanodiol en eucariotas

Se ha reportado la producción de 1,2-propanodiol en fermentaciones realizadas con *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en bajas concentraciones.

En estos estudios no se pudo identificar la ruta metabólica responsable de la producción de este compuesto por tratarse de cultivos en medios complejos, no habiéndose podido concluir si se trataba de la fermentación de un azúcar o la biotransformación de un intermediario.

En cualquier caso, estas observaciones sugieren que *S. cerevisiae* cuenta con la dotación enzimática necesaria para procesar parte de una vía metabólica que conduzca a este

producto (a modo de ejemplo, se encuentra descrito el aislamiento de enzimas reductoras de metilglioxal en levaduras).<sup>261,298,299</sup>

En base a lo anterior, *S. cerevisiae* se presenta como potencial plataforma para futuras modificaciones genéticas con este propósito.

### Ingeniería metabólica de *E. coli* orientada a la producción de 1,2-propanodiol

Los esfuerzos en el área de ingeniería genética se han centrado en la producción de 1,2-propanodiol a partir de azúcares comunes que pueden ser obtenidos de diversos cultivares, y en mucho menor medida en la biotransformación de glicerol. Es así que, varios de los antecedentes consultados se han dirigido a combinar en un único microorganismo la capacidad de producir glicerol a partir de azúcares, con la posibilidad de metabolizar el glicerol al producto de interés.<sup>256</sup>

El desarrollo de cepas de *E. coli* expresando genes que codifican para una glicerol deshidrogenasa NADH dependiente (*gldA* de *E. coli* o *dhaD* de *K. pneumonia*) en combinación con la sobreexpresión del gen que codifica para la metilglioxal sintasa (*mgs*) ha permitido la producción anaerobia de (*R*)-1,2-propanodiol enantioméricamente puro a partir de glucosa. La expresión de cada uno de los genes por separado resulta en la producción de aproximadamente 0.25 g/L de producto objetivo. Por su parte la expresión conjunta de ambos genes eleva dicha producción a 0.7 g/L. La vía metabólica implantada involucra la producción de metilglioxal por acción de la metilglioxal sintasa, su reducción a (*R*)-lactaldehído -por acción de la glicerol deshidrogenasa- y su posterior reducción a (*R*)-1,2-propanodiol por acción de reductasas nativas de *E. coli*.<sup>300</sup>

La mejora de *E. coli* con este propósito ha sido evaluada, eliminando inicialmente la producción del co-producto lactato (a partir de mutaciones en genes que codifican para dos enzimas involucradas en la producción de lactato, a saber lactato deshidrogenasa y glioxalasa I). Como resultado llamativo se observa que, la introducción de estas mutaciones conduce (en algunos mutantes) directamente a la síntesis de pequeñas concentraciones de 1,2-propanodiol sin necesidad de otra modificación genética en esa dirección, hecho que puede estar vinculado a la capacidad recientemente reportada para *E. coli* de producir 1,2-propanodiol como producto de fermentación. Complementariamente se ha dotado al microorganismo de una vía metabólica que orienta la dihidroxiacetona fosfato a 1,2-propanodiol por acción secuencial de la metilglioxal sintasa (*mgs*), la glicerol deshidrogenasa (*gldA*) y o bien la alcohol deshidrogenasa de levadura (*adhI*) ó la 1,2-propanodiol oxidoreductasa (*fucO*) de *E. coli*. Las modificaciones anteriores combinadas con ajustes prácticos en el bioproceso (fermentación en condiciones de fed-batch) han permitido alcanzar una concentración final de producto de 4,5 g/L y un rendimiento de 0,19 g de 1,2-propanodiol por g de glucosa consumido.<sup>301</sup>

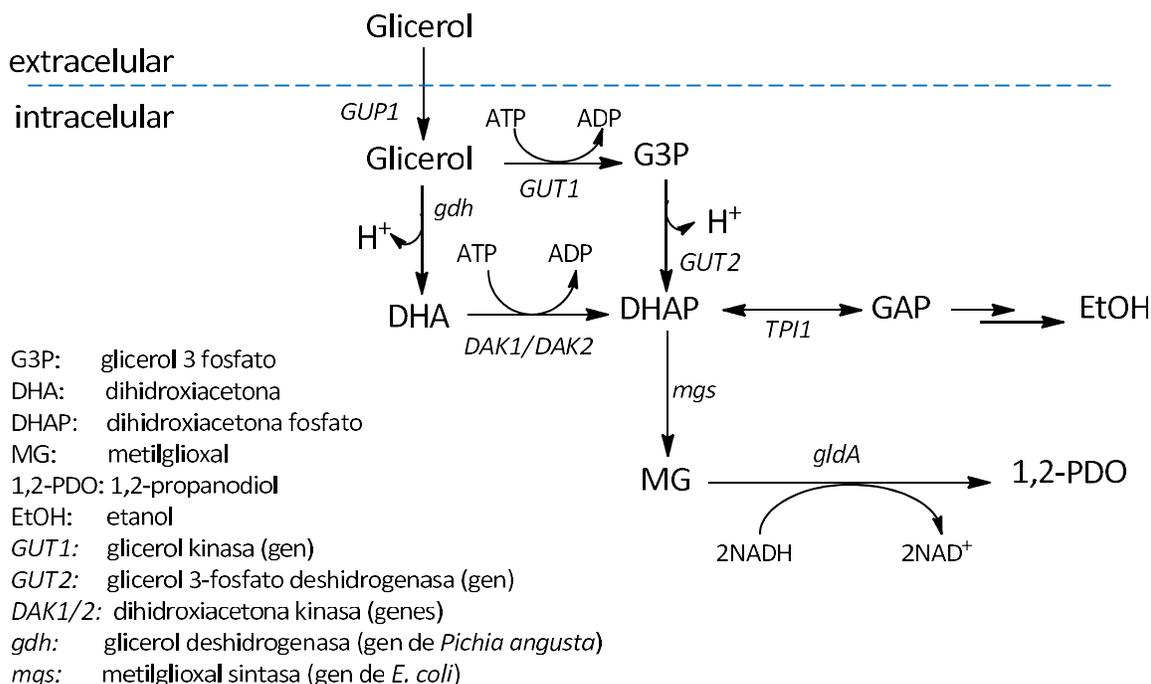
Una aproximación diferente enmarcada en la ingeniería metabólica ha sido descrita más recientemente con la finalidad de lograr maximizar la producción de 1,2-propanodiol. En la misma la manipulación de cofactores constituye el parámetro central a efectos de obtener la síntesis del producto de interés. En esta herramienta de ingeniería metabólica diferentes azúcares similares a la glucosa (pero con diferente estado de oxidación) que pueden recorrer la glicólisis y rendir piruvato son utilizados como sustratos. De esta manera sería posible obtener diferentes relaciones de NADH/NAD<sup>+</sup> o disponibilidad de NADH en el flujo metabólico anaerobio de *E. coli* y consecuentemente evaluar su impacto en la producción de 1,2-propanodiol. La producción del diol se logra sobreexpresando en una cepa de *E. coli* deficiente en su actividad lactato deshidrogenasa (*ldh*), la metilglioxal sintasa de *Clostridium acetobutylicum* y la glicerol deshidrogenasa de *E. coli*. Si bien el estado de oxidación del sustrato incide en el perfil de los metabolitos etanol, acetato y lactato, no se ha identificado -contrariamente a lo esperado- cambio sustancial en el nivel de producción de 1,2-propanodiol. Lo anterior, conjuntamente con el hecho de que el nivel de producción del diol se incrementa al utilizar la cepa deficiente en *ldh* estaría en línea con el hecho de que a los efectos del propósito buscado resulta más importante la funcionalidad de las vías de detoxificación del metilglioxal que la limitación de NADH.<sup>302</sup>

En otra aproximación, recurriendo a ingeniería metabólica en *E. coli*, una vía diferente ha sido construida para la producción de 1,2-propanodiol a partir de glicerol. Para ello se han sobreexpresado genes involucrados en la síntesis de un intermediario clave la dihidroxiacetona fosfato, la síntesis de metilglioxal (*mgsA*), la glicerol deshidrogenasa (*gldA*) y la aldehído oxidorreductasa (*yqhD*). Adicionalmente, se ha manipulado la utilización del glicerol reemplazando la dihidroxiacetona kinasa, dependiente de Fosfoenolpiruvato nativa de *E. coli* por una enzima de igual funcionalidad ATP dependiente originaria de *C. freundii*, logrando con ello un aumento en la disponibilidad de dihidroxiacetona fosfato, lo que impacta en mayores rendimientos en la producción de 1,2-propanodiol. Se ha descrito que la producción de etanol resulta en un co-producto requerido mientras que la interrupción de las vías para la producción de acetato y lactato ha conducido a aumentos en la concentración y en el rendimiento. La combinación de estos factores permite alcanzar una concentración de 5.6 g/L de 1,2-propanodiol con un rendimiento de 21.3 % (g/g). La utilización de esta cepa no se ha restringido al uso de glicerol PPA sino que ha sido ensayada con glicerol crudo obtenido como subproducto en la industria de biodiésel, describiéndose cualitativamente que los resultados no difieren sustancialmente de los verificados con glicerol puro.<sup>303</sup>

No se encuentra disponible información referente a la estereoquímica del producto obtenido.

## Ingeniería metabólica de *S. cerevisiae* orientada a la producción de 1,2-propanodiol

La producción de 1,2-propanodiol a partir de glicerol ha sido reportada por parte de cepas modificadas genéticamente de *S. cerevisiae*. Para ello se han expresado dos genes de *E. coli* (*mgs* y *gldA*), los mismos que han sido utilizados en los trabajos mencionados previamente, han sido integrados en forma independientes a los cromosomas.



**Figura 1.33: Producción de 1,2-propanodiol en *S. cerevisiae* modificada genéticamente.**

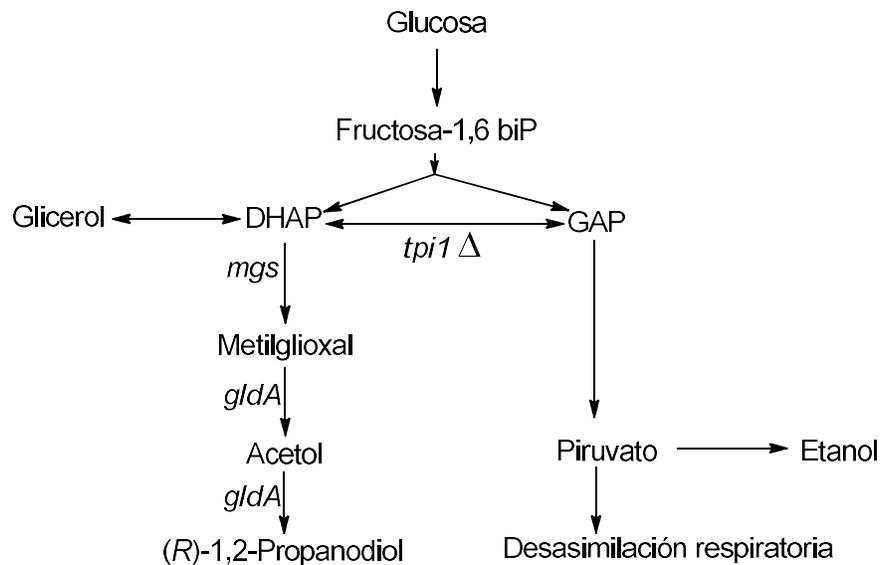
Se han desarrollado combinaciones de estas cepas encontrándose que en general la actividad enzimática correlaciona con el número de copias, no así la concentración de 1,2-propanodiol. La cepa conteniendo tres copias de *mgs* y de *gldA* ha sido identificada como la que mayor concentración de 1,2-propanodiol produce. La concentración del diol correlaciona con la actividad específica (calculada por copia de gen insertada) de la metilglioxal sintasa, sin embargo una actividad específica alta de glicerol deshidrogenasa ha sido descrita como inhibitoria. La concentración máxima obtenida con estas cepas asciende a 0.24 g/L.<sup>304</sup>

En línea con lo anterior, trabajos posteriores recurriendo a ingeniería metabólica han combinado la expresión en *S. cerevisiae* de la metilglioxal sintasa y la glicerol deshidrogenasa de *E. coli* (*gldA* y *mgs*) con la glicerol deshidrogenasa de *Pichia angusta* (*gdh*).

La producción de 1,2-propanodiol ha alcanzado en este microorganismo a los 2.19 g/L.<sup>305</sup>

En otra aproximación *S. cerevisiae* ha sido modificada con este propósito introduciendo una delección en el gen *tpi1* que codifica para la triosa fosfato isomerasa, incrementando el flujo

hacia la dihidroxiacetona fosfato en la glicólisis, lo que conduce a un incremento de glicerol. Esta modificación complementada a la previamente descrita que involucra los genes *mgs* y *gldA* ha conducido a una producción de 1,11 g/L de 1,2-propanodiol.<sup>306</sup>



**Figura 1.34: Modificaciones genéticas en *S. cerevisiae* con el propósito de obtener 1,2-propanodiol.**

### Ingeniería metabólica en otros microorganismos orientada a la producción de 1,2-propanodiol

Se ha descrito que *Corynebacterium glutamicum* produce en forma natural 1,2-propanodiol (aproximadamente 0,007 g/L) de después de 132 hs de incubación en condiciones aeróbicas. En el genoma de *C. glutamicum* no se ha identificado gen que codifique para la metilglioxal sintasa, simultáneamente múltiples genes asociados a actividad aldo-ceto reductasa se encuentran presentes. En base a lo anterior se ha desarrollado la expresión del gen *mgs* de *E. coli* en *C. glutamicum* obteniéndose como resultado un incremento de 100 veces en la producción de 1,2-propanodiol, hecho que adicionalmente ha conducido a pensar que la cepa silvestre cuenta con el resto de la actividad enzimática necesaria para esta síntesis. Paralelamente se ha sobreexpresado en forma simultánea la *mgs* de *E. coli* y el gen *cgR\_2242* de *C. glutamicum* (con actividad aldo-ceto reductasa) ha permitido alcanzar una producción de 1,8 g/L de 1,2-propanodiol.<sup>307</sup>

Más recientemente la producción de 1,2-propanodiol por parte de *C. glutamicum* se ha desarrollado expresando heterológamente los genes *gldA*, *mgsA* y *yqhD* de *E. coli* y logrando la delección de los genes *hdpA* y *ldh* que codifican actividades dihidroxiacetona fosfato fosfatasa y lactato deshidrogenasa, respectivamente con la finalidad de prevenir la formación de co-productos. El mencionado trabajo se ha desarrollado en un contexto en el

que se ha buscado la obtención de 1-propanol como biocombustible. En este marco, se ha obtenido una concentración de 4,5 g/L para 1,2-propanodiol.<sup>308</sup>

Una de las modificaciones genéticas más interesantes con este propósito se ha desarrollado sobre el cyanobacteria *Synechococcus elongatus*, microorganismo que ha sido modificado genéticamente a efectos de lograr la producción de 1,2-propanodiol a partir de CO<sub>2</sub>. En esta modificación la introducción de genes codificando la metilglioxal sintasa (*mgs*) y la glicerol deshidrogenasa (*gldA*) y una aldehído reductasa (*yqhD*) ha resultado en la producción de aproximadamente 22 mg/L de 1,2-propanodiol y un nivel comparable de acetol (fundamentalmente producido en la fase estacionaria). Recurriendo a una NADPH - alcohol secundario deshidrogenasa específica se ha logrado maximizar la producción de 1,2-propanodiol y reducir la producción de acetol a partir de CO<sub>2</sub>, alcanzándose una concentración de 150 mg/L.<sup>309</sup>

### Desempeño de los diferentes microorganismos en la síntesis de 1,2-propanodiol

Muchos microorganismos han sido reportados como productores de 1,2-propanodiol por alguna de las vías descritas, en la Tabla XX sin constituir una lista exhaustiva reúnen los desempeños más referidos en la bibliografía.

#### 1.6.2.4 Enzimas con potencial aplicación en la síntesis de 1,2-propanodiol a partir de glicerol

Se han reportado enzimas que reducen metilglioxal en diferentes organismos incluyendo *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas enzimas han sido caracterizadas por su participación en la detoxificación de metilglioxal. A continuación se describen los antecedentes de aquellas enzimas a las que se recurrió para el presente trabajo.<sup>313-315</sup>

##### Gre2p - EC 1.1.1.283 - metilglioxal reductasa (NAD(P)H) (*S. cerevisiae*)

Esta enzima ha sido descrita como 3-metilbutanal reductasa y como metilglioxal reductasa NADPH-dependiente inducida por estrés ya sea osmótico, iónico, oxidativo, por choque térmico y asociado a metales pesados. Hecho éste que le ha valido su denominación al gen en *S. cerevisiae* y en forma transitiva a la enzima (Genes de Respuesta a Estrés).<sup>316,317</sup>

Gre2p tiene descrita su regulación por la vía HOG- *High osmolarity glicerol* (por sus siglas en inglés) restaurando la resistencia al glicolaldehído mediante el acople de la reducción del glicolaldehído a etilenglicol y la oxidación simultánea del NADPH al NADP<sup>+</sup>. Se ha reportado que la abundancia de proteínas aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN. Esta metilglioxal reductasa (NADPH-dependiente) también tiene descrita actividad como D-lactaldehído deshidrogenasa.<sup>318</sup>

Tabla 1.3: Resumen del desempeño de diferentes microorganismos en la producción de 1,2-propanodiol (adaptada de Bennet 2001) <sup>246,256,291,303,310-312</sup>

Microorganismo	Sustrato	Producto	Concentración (g/L)	Observaciones
<i>Clostridium sphenoides</i>	Ramnosa	(S)-1,2-propanodiol	5,46	
	Fucosa	(S)-1,2-propanodiol	5,15	
	Glucosa	(S)-1,2-propanodiol	1,58	
	Fructosa	(S)-1,2-propanodiol	1,14	
	Manosa	(S)-1,2-propanodiol	0,15	
	Celobiosa	(S)-1,2-propanodiol	1,35	
<i>Thermoanaerobacterium thamosaccharolyticum</i>	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	7,90	
	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	9,00	
	Arabinosa	(R)-1,2-propanodiol	4,29	
	Galactosa	1,2-propanodiol	3,56	Limitación de Fosfato
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	1,2-propanodiol	0,10	Aldosa reductasa (lente-ratón)
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,15	Glicerol deshidrogenasa de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,34	<i>dhaD</i>
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,25	<i>dhaD</i>
<i>F. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,26	<i>mgs</i> de <i>F. coli</i>
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,49	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Fructosa	1,2 propanodiol	0,30	<i>mgs</i> de <i>Clostridium</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>F. coli</i> (Ingeniería metabólica)	Glicerol	1,2-propanodiol	5,60	<i>mgs</i> , <i>gldA</i> e <i>yqhD</i> de <i>F. coli</i> dihidroxiacetona kinasa de <i>C. freundii</i>
<i>S.cerevisiae</i>	Glucosa	(R) 1,2 propanodiol	0,24	<i>mgs</i> de <i>E. coli</i>
<i>S.cerevisiae</i>	Glucosa	(R)-1,2-propanodiol	0,52	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>S.cerevisiae</i>	Glicerol	1,2-propanodiol	2,19	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i> <i>gdh</i> de <i>Pichia angusta</i>

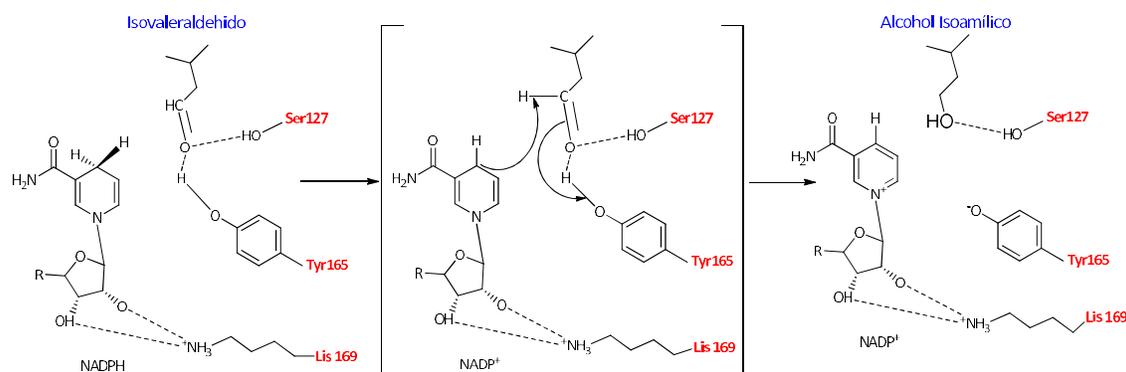
Esta enzima ha sido inicialmente caracterizada y clonada como  $\beta$ -ceto éster reductasa, posteriormente se demostró también su capacidad de reducir  $\alpha$ -ceto ésteres.<sup>319-321</sup>

Trabajos posteriores han identificado esta enzima como metilglioxal reductasa inducida por estrés osmótico, que participa en la detoxificación de metilglioxal en una vía paralela a la de la glioxilasa.<sup>313,314</sup>

Esta metilglioxal reductasa ha sido previamente caracterizada, pero sin establecerse que gen codificaba para esta actividad enzimática.<sup>322,323</sup> En dichos antecedentes se describía que cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresan esa enzima incrementan la tolerancia a elevadas concentraciones de metilglioxal (2,5 mM). Simultáneamente se ha reportado que la sobreexpresión de esta enzima correlaciona con una represión de la vía de la glioxilasa, lo que resultaría consistente con que el metilglioxal es metabolizado principalmente por la metilglioxal reductasa.<sup>323</sup>

En otro orden, se ha descrito que la expresión de esta enzima en *E. coli* se encuentra asociada a una mayor tolerancia al metilglioxal.<sup>322</sup>

El papel que la sobreexpresión de Gre2p juega en la tolerancia a glicolaldehídos (inhibidor en procesos de fermentación asociados a la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos) por parte de *S. cerevisiae* ha sido establecido.<sup>324</sup>



**Figura 1.35: Mecanismo de reacción propuesto para Gre2p.**

El mecanismo de las reacciones en que participa esta enzima ha sido recientemente postulado a partir de la resolución de la estructura mediante difracción de rayos X. Dicho mecanismo consta de 3 etapas, en la primera los grupos hidroxilos de los aminoácidos Ser127 y Tyr165 forman enlaces de Hidrógeno con el Oxígeno del grupo carbonilo del isovaleraldehído (usado como modelo para el análisis) estabilizando su posición. A continuación, el grupo hidroxilo del aminoácido Tyr165 se desprotona y dona un Hidrógeno al grupo carbonilo. Concomitantemente, NADPH cede un Hidruro desde la cara B del anillo de nicotinamida al grupo carbonilo. De esta forma el carbonilo es reducido a un grupo alcohol a la vez que el NADP<sup>+</sup> es obtenido. Una vez concluida la reducción del grupo carbonilo se produce la rotura del enlace de Hidrógeno existente entre la cadena lateral de

Tyr165 y el alcohol isoamílico. El cambio en el estado redox de NADP<sup>+</sup> es acompañado por cambios en la conformación de este compuesto lo que genera la apertura de la hendidura para la liberación del producto.<sup>325</sup>

#### Ypr1p-EC1.1.1.-aldehído óxidoreductasa, aldoceto reductasa (NAD(P)H)- (*S. cerevisiae*)

En términos comparativos, un volumen notoriamente menor de información existe respecto a la enzima codificada por el gen *YPR1*(Yeast Putative Reductase 1, por su sigla en inglés) de *S. cerevisiae*.

Esta enzima, ha sido inicialmente asignada como glicerol deshidrogenasa (a partir de la similitud que presentaba con la glicerol deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*). No obstante lo anterior, la evaluación de actividad *in vitro* no respaldó dicha asignación.<sup>326</sup>

Ypr1p ha sido, posteriormente caracterizada como aldo-ceto reductasa dependiente de NADPH.<sup>317,327</sup> Presenta actividad sobre múltiples sustratos y su expresión es inducida por estrés osmótico y oxidativo. Se ha observado que la abundancia de esta proteína se incrementa como respuesta al estrés ocasionado por la replicación de ADN.<sup>326</sup>

Esta enzima se ha descrito como funcionalmente redundante con otras aldo-ceto reductasas. *YPR1* presenta a *GCY1* identificado como gen parálogo, proveniente de la duplicación del genoma en *S. cerevisiae*.<sup>318</sup>

Ypr1p ha sido inicialmente identificada y clonada como β-ceto éster reductasa, demostrándose posteriormente su capacidad de reducir α-ceto ésteres.<sup>319-321</sup>

Se ha demostrado que esta aldo-ceto reductasa actúa sobre aldehídos como hexanal, 2-metil-butiraldehído, *D,L* gliceraldehído así como xilosa y arabinosa.<sup>328,329</sup> Dos isozimas de esta enzima, Gre3p y Gcy1p, han sido clonadas en *E. coli* y caracterizadas como β-ceto éster reductasas. Entre ellas resulta interesante Gre3p debido a que se ha vinculado con el metabolismo de metilglioal en la respuesta a estrés.<sup>313,330</sup>

Recientemente el papel que Ypr1p puede jugar en el metabolismo de glicerol en *S. cerevisiae* ha sido analizado, sin arribarse a una conclusión al respecto.<sup>331</sup>

No ha sido posible obtener información para esta enzima de la estructura cristalina y del mecanismo de reacción modelado. La información más reciente obtenida de consulta a los sitios web “Protein Data Bank” y “AKR Superfamily” permite establecer que en este momento se encuentra en proceso la resolución estructural de la isozima Gcy1p.<sup>332,333</sup>

#### MGS - P0A731 – metilglioal sintasa (*E. coli*)

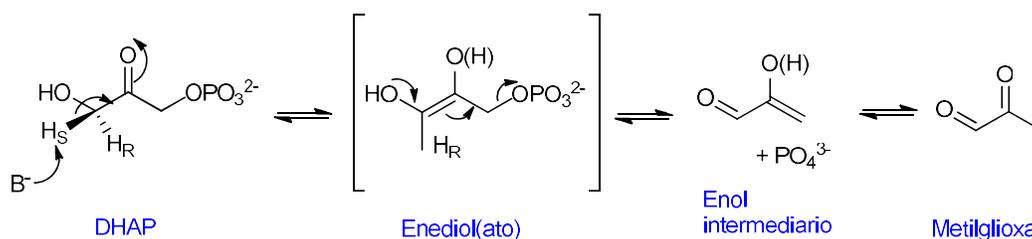
La metilglioal sintasa cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a metilglioal y ortofosfato, constituyendo el primer paso del denominado bypass del metilglioal en la vía de Embden-Myerhoff.<sup>334,335</sup>

El fosfato genera inhibición alostérica de la enzima, sugiriendo que el *bypass* de metilglioal puede estar activo en condiciones de limitación de fosfato.<sup>336</sup>

Se ha sugerido como rol de esta enzima en *E. coli* y otros microorganismos el actuar como facilitador entre condiciones de restricción y de abundancia de nutrientes.<sup>337</sup>

El metilglioal presenta elevada citotoxicidad a concentraciones muy pequeñas (del orden de 1 mM) estando demostrado que interfiere en el proceso de síntesis de ácidos nucleicos, siendo además reportado como agente mutagénico.<sup>338-342</sup>

La metilglioal sintasa es altamente específica para la dihidroxiacetona fosfato no presentando actividad incluso frente a sustratos con mayor reactividad y similitud funcional (tal el caso del D-gliceraldehído 3-fosfato).<sup>341</sup>



**Figura 1.36: Mecanismo de reacción propuesto para la metilglioal sintasa actuando sobre dihidroxiacetona fosfato.**

En la Figura 1.36 se representa el mecanismo de acción propuesto para esta enzima actuando sobre la dihidroxiacetona fosfato para la síntesis de metilglioal. En un primer paso, el protón pro-S en C3 de la hidroxiacetona es captado por una base dando paso a la obtención del intermediario enediolato – enzima. Una segunda base remueve el protón perteneciente al hidroxilo en C3 permitiendo la generación del enolato del metilglioal y fosfato inorgánico. Finalmente se produce la protonación del grupo metileno del enolato de metilglioal en un paso no estereoespecífico, siendo altamente probable que no involucre al catalizador y esta etapa se produzca espontáneamente en solución.<sup>341,343</sup>

En base a lo anterior resulta más preciso plantear que la metilglioal sintasa por tanto toma como sustrato a la dihidroxiacetona fosfato, y devuelve como producto el enol piruvaldehído, el que tautomeriza en solución a metilglioal.<sup>344,345</sup>

La metilglioal sintasa ha sido sobreexpresada en *E. coli*, purificada y caracterizada estructuralmente. El peso molecular del monómero se ha calculado en 17 kDa. Por su parte, la obtención de un peso molecular aparente de 76 kDa, ha llevado a proponer que se trate de un homotetrámero.<sup>337,346</sup> Posteriormente la resolución estructural de esta enzima ha permitido clarificar que se trata de un homohexámero.<sup>344,347,348</sup>

### 1.6.2.5 Síntesis de derivados de 1,2-propanodiol

El listado de potenciales productos obtenibles a partir del (*R*)-1,2-propanodiol y del (*S*)-1,2-propanodiol es sumamente vasto e inabarcable en totalidad para el presente trabajo. Por ese motivo se ha centrado la propuesta de síntesis en tres compuestos, (*R*)-propilencarbonato, y (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol y del (*S*)-1-metoxi-2-propanol.

#### (*R*)-Propilencarbonato (CAS N°: 16606-55-6)

El propilencarbonato pertenece a la familia de los alquil carbonatos, caracterizados por contar con un anillo de cinco miembros y el grupo carbonato. De este conjunto de productos el propilencarbonato (junto con el etilencarbonato) se comercializa desde mediados del siglo XX, estando descritas variadas rutas sintéticas a tal fin.<sup>101,349</sup>

En particular el propilencarbonato presenta utilidad y aplicación en la síntesis de materiales poliméricos, como solvente polar aprótico, como electrolito en baterías de ión Litio, como excipiente en aplicaciones médicas de uso tópico y solvente en la fabricación de cosméticos. Adicionalmente, cuando se trata de producto enantioméricamente puro se utiliza como sintón en la síntesis de fármacos y en química fina.<sup>350,351</sup>

En particular presenta interés como antecedente la utilización de este producto en la síntesis de (*R*)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina] oPMPA, producto con acción antiviral descrita contra el HIV y otros retrovirus.<sup>352,353</sup>

Existen diversas técnicas descritas para la síntesis del PMPA, entre las que dos de ellas aparecen como las extendidas en cuanto a su aplicación, ambas partiendo de D-(+)-isobutil lactato.<sup>354,355</sup>

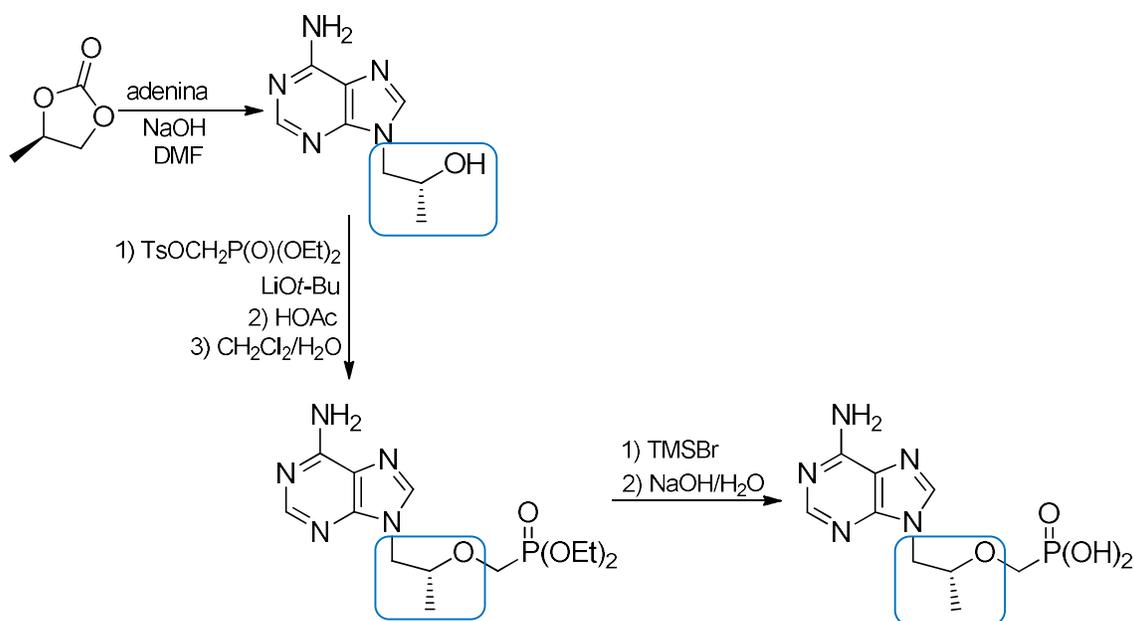


Figura 1.37: Síntesis de PMPA a partir de (*R*)-propilencarbonato.

En la búsqueda de alcanzar producción en escala de kilogramos de esta prodroga se ha ensayado una serie de variantes, entre ellas una que recurre a (*R*)-propilencarbonato según se presenta en la Figura 1.37.<sup>354</sup>

La introducción de (*R*)-propilencarbonato como sustrato permite reemplazar 7 pasos de reacción en una de las síntesis habituales, mientras que en la segunda 3 pasos de reacción son economizados.<sup>354</sup>

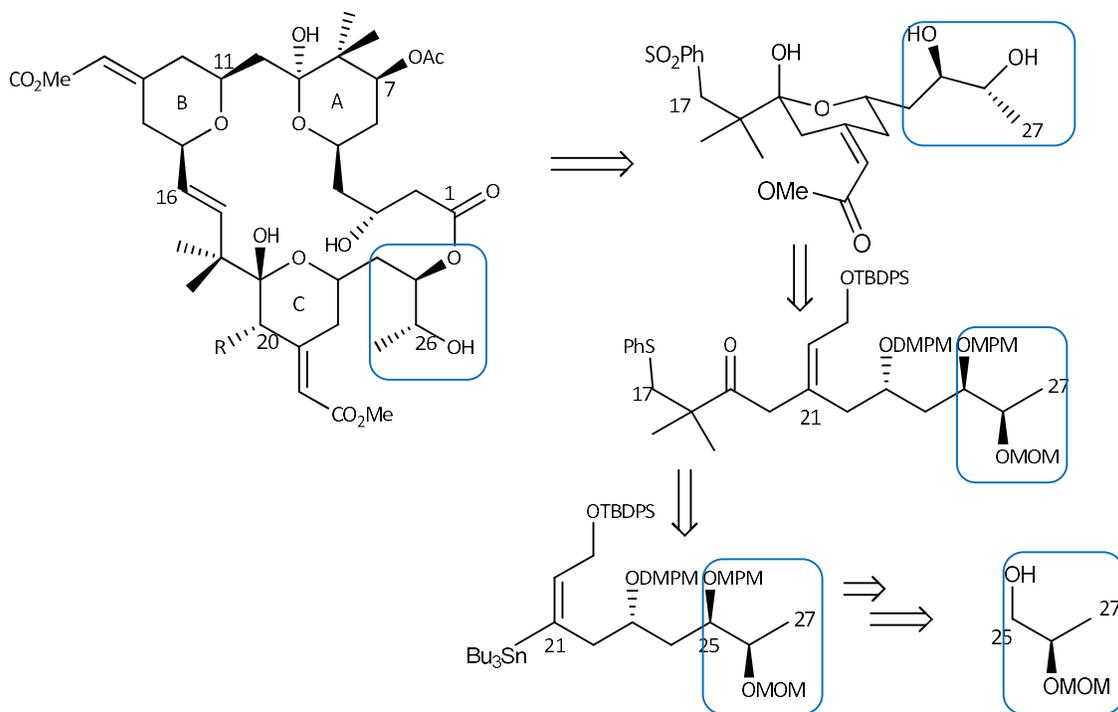
### (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol(CAS N°: 159350-97-7)

El producto (*R*)-(+)-2-(metoximetoxi)-1-propanol, también conocido como “(*R*)-1,2-propanodiol MOM protegido” es un reactivo para síntesis comercialmente disponible, con aproximadamente 15 proveedores registrados con cobertura global.<sup>356</sup>

La síntesis de este producto es posible realizando inicialmente la protección del grupo hidroxilo en la posición C<sub>1</sub> con *t*-Butil dimetil silano, la reacción del grupo hidroxilo en C<sub>2</sub> con clorometil-metil éter y posterior desprotección del alcohol primario.<sup>357,358</sup>

La utilización de este sintón quiral está descrita en la síntesis de una variada gama de productos entre los que se pueden mencionar:

- i) Synparvólidos:  $\alpha, \beta$ -insaturados  $\delta$ -lactonas conteniendo cadena polioxigenada con actividad antimicrobiana, antifúngica, o citotóxica contra células tumorales humanas.<sup>359,360</sup>
- ii) Síntesis de receptores cannabinoides, (componentes del sistema endocannabinoide, involucrado en regulación fisiológica del apetito, la digestión, el metabolismo y el balance energético, la termogénesis, la movilidad, el ciclo del sueño, la sensación del dolor, el humor y las emociones, la memoria, el aprendizaje y las adicciones). Este sistema ha sido identificado como objetivo para la acción de múltiples drogas y terapias.<sup>361,362</sup>
- iii) Síntesis enantioselectiva y diaesteroselectiva del fragmento C<sub>17</sub>-C<sub>27</sub> de la Briostatina, componente biocativo de la familia de lactonas macrocíclicas derivadas de estructuras de poliacetato, con aplicación descrita en tratamientos de leucemia linfática aguda y cáncer de ovario.<sup>363,364</sup>



**Figura 1.38: Retrosíntesis de briostatina (fragmento C17-C27).**

#### (S)-1-metoxi-2-propanol (CAS N°: 26550-55-0)

El producto (S)-(+)-1-metoxi-2-propanol, también conocido como “(S)-(+)-Propilenglicol 1-metiléter” es un reactivo para síntesis comercialmente disponible.<sup>365</sup>

La utilización de este sintón quiral está descrita en la síntesis de una variada gama de productos entre los que se pueden mencionar:

- i) Síntesis de metolaclor, un integrante de la familia de las cloroacetamidas (herbicida usado sobre un amplio rango de malezas). Esta molécula contiene un estereocentro y un eje quiral debido a la rotación impedida alrededor del enlace fenilo-N generando (atropisomerismo) generando así cuatro estereoisómeros. La actividad de metolaclor ha sido asignada al enantiómero 1'S (atropisómeros  $\alpha R$ , 1'S y  $\alpha S$ , 1'S). La mezcla comercial contiene normalmente 80 % del enantiómero 1'S denominándose corrientemente S-metolaclor (S-Moc).<sup>365,366</sup>
- ii) Síntesis de N-tiazol 2-il-benzamidas fusionadas a cicloalquilo, productos desarrollados para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 que presentan actividad como activador de glucocinasa, que no presenten riesgos de efectos secundarios de hipoglicemia y dislipemia.<sup>367</sup>

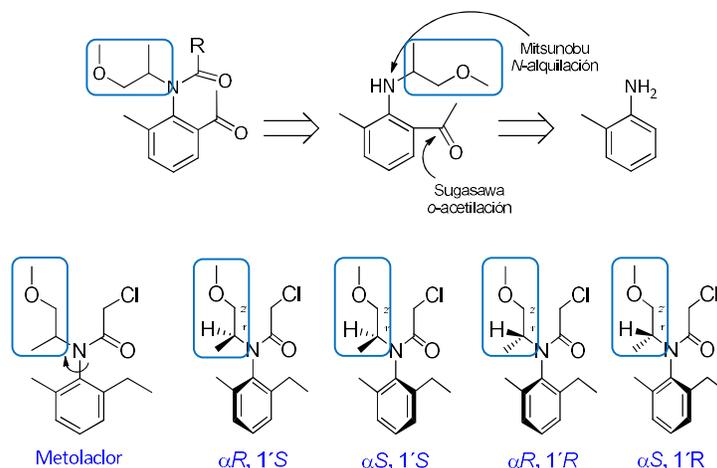


Figura 1.39: Retrosíntesis y esteroisómeros del metolactam.

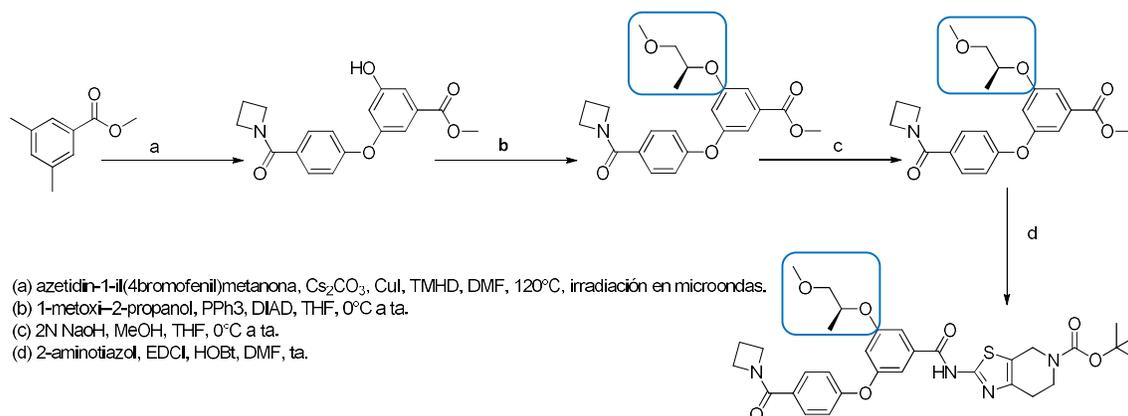


Figura 1.40: Síntesis de *N*-tiazol 2-il- benzamidas fusionadas a cicloalquilo.

## 1.7 Alcance del presente trabajo

En el contexto que se ha descrito se decide abordar la temática de la valorización de la glicerina obtenida como subproducto de la industria de biodiésel pretendiendo aportar a la sustentabilidad económica y ambiental de la producción de este biocombustible.

La propuesta busca contribuir generando soluciones que permitan el aporte de valorsignificativo al residuo a procesar, recurriendo a Ingeniería Metabólica en *E. coli* para la obtención de 1,2-propanodiol enantioméricamente, punto de partida para la obtención de sintones quirales con aplicación en química fina.

## **Capítulo 2**

### ***Objetivos y estrategia***

Página intencionalmente dejada en blanco

## 2.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo principal el diseño y construcción de nuevos biocatalizadores aplicables a la biotransformación de glicerol (1,2,3-propanotriol) **(1)** - obtenido como subproducto en la producción de biodiésel- a 1,2-propanodiol **(2)**.

En la construcción de estos biocatalizadores se recurre a la aplicación de ingeniería metabólica en *Escherichia coli*, proponiendo la construcción de una ruta metabólica “*de novo*” que involucra dos pasos biocatalíticos en cascada, que permiten en primera instancia la reducción de metilglioxal (2-oxopropanal) **(3)** a lactaldehído (2-hidroxiopropanal) **(4)**, intermediario que es nuevamente reducido para obtener el producto objetivo 1,2-propanodiol **(2)**.

Adicionalmente se plantea la síntesis química de productos de mayor valor agregado utilizando el 1,2-propanodiol **(2)** obtenido enzimáticamente.

## 2.2 Objetivos específicos

Para la concreción del objetivo general se propone:

- i) Obtener biocatalizadores recombinantes a partir de *E. coli*, de utilidad en la biotransformación de glicerol **(1)** a 1,2-propanodiol **(2)**.
- ii) Evaluar el desempeño de los biocatalizadores construidos en la biotransformación de glicerol **(1)** y posibles intermediarios de la vía metabólica propuesta.
- iii) Caracterizar la estereoquímica del 1,2-propanodiol **(2)** obtenido.
- iv) Evaluar las condiciones que permiten maximizar la obtención 1,2-propanodiol **(2)** enantioméricamente puro.
- v) Estudiar la biotransformación de glicerina obtenida como subproducto en el proceso productivo industrial de biodiésel.
- vi) Sintetizar derivados del 1,2-propanodiol **(2)** que presentan interés en química fina.

## 2.3 Estrategia - Biotransformaciones

El objetivo general propone la construcción de una vía metabólica “*de novo*” en *E. coli* involucrando dos reductasas de *Saccharomyces cerevisiae* (Gre2p e Ypr1p). Con ese fin se

construirán vectores de expresión basados en pACYCDuet-1 y en pETDuet-1 que permitan la expresión tanto en forma independiente como simultánea de ambas reductasas.

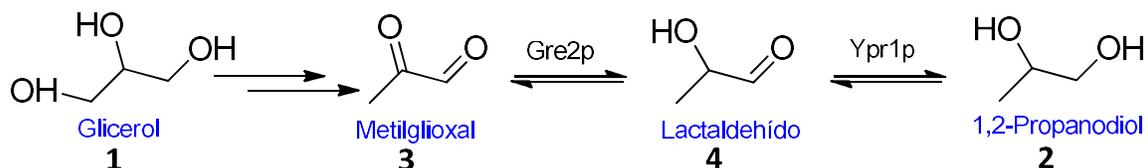
Con los vectores sintetizados *in vitro* se transformarán dos cepas diferentes de *E. coli* para su expresión dando lugar a dos estrategias diferentes.

En lo que se ha de identificar a futuro como Estrategia 1 se recurre a las cepas: *E. coli* BL21(DE3) (y como variante de esta cepa a *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE). Por otra parte, bajo la denominación de Estrategia 2 se refiere a los biocatalizadores que tienen como base a la cepa *E. coli*FMJ39.

A continuación se describen los fundamentos que conducen a esta selección y justifican los diseños desarrollados.

### 2.3.1 Vía metabólica propuesta

La vía metabólica propuesta con la que se propone sintetizar el 1,2-propanodiol (**2**) se detalla en la Figura 2.1. En ella se expresan en forma heteróloga, en cascada, los genes *GRE2* e *YPR1* de *S. cerevisiae* en *E. coli*.



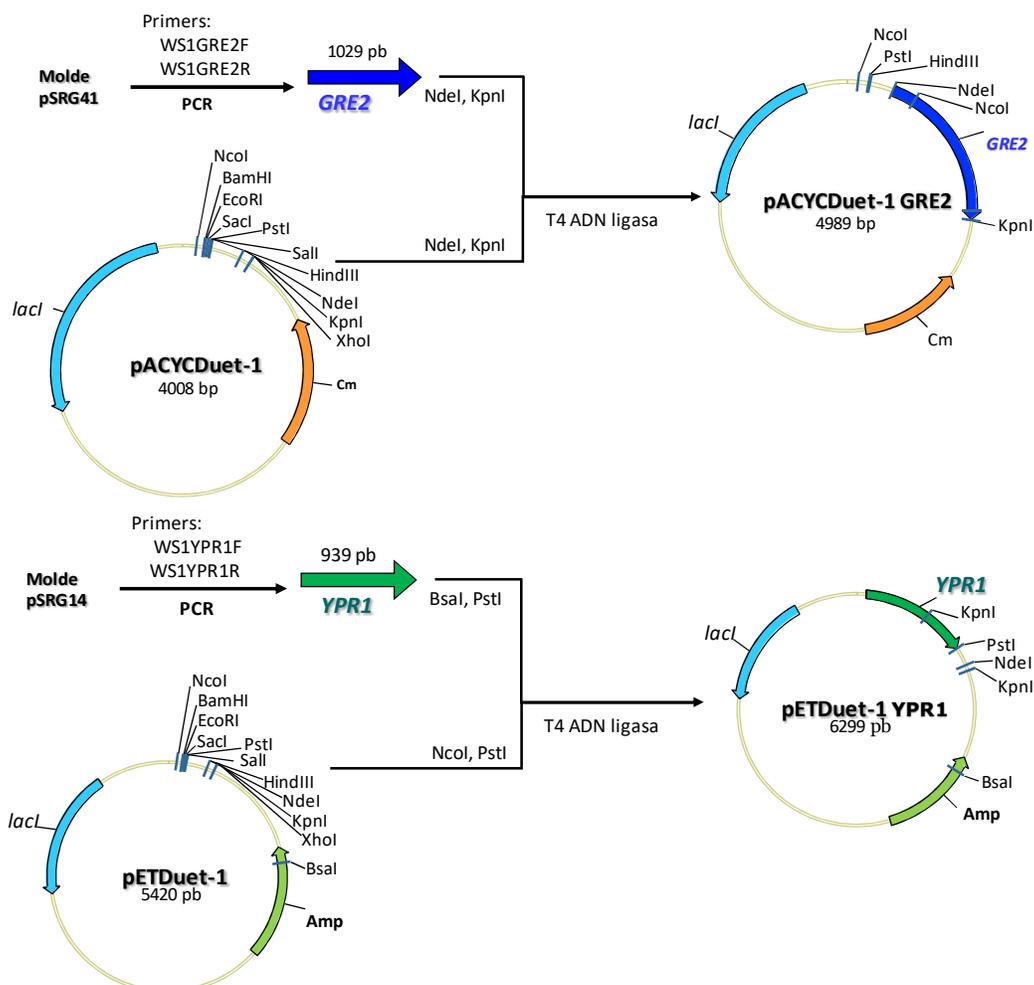
**Figura 2.1: Vía metabólica “de novo” propuesta.**

Como consecuencia de la presente vía metabólica el metilglioxal(**3**) (producto obtenido en forma natural por *E. coli* a partir del glicerol (**1**)) se somete a dos reacciones biocatalíticas de reducción, obteniéndose en el primer paso –por acción de la enzima Gre2p- lactaldehído (**4**), producto intermediario que, seguidamente se somete a una nueva etapa de reducción (mediada en esta ocasión por Ypr1p) obteniéndose el producto de interés 1,2-propanodiol (**2**).

Como criterio general de diseño se establece que la expresión de ambas enzimas se desarrolle en un único plásmido, recurriéndose para ello a los vectores de expresión pETDuet-1 y pACYCDuet-1 (ambos dependientes del promotor T7). Adicionalmente, considerando el hecho de que estos vectores presentan compatibilidad, sería posible eventualmente evaluar el desempeño de un biocatalizador en el que las reductasas se expresen en forma simultánea pero a partir de diferentes vectores.

## 2.3.2 Estrategia 1

La Estrategia 1 consiste en la construcción de biocatalizadores basados en *E. coli* BL21(DE3). Adicionalmente, con la finalidad de evitar posibles interferencias de la principal reductasa descrita para *E. coli* con Gre2p e Ypr1p se realizará la construcción de los biocatalizadores sobre la cepa *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$ .<sup>368</sup>

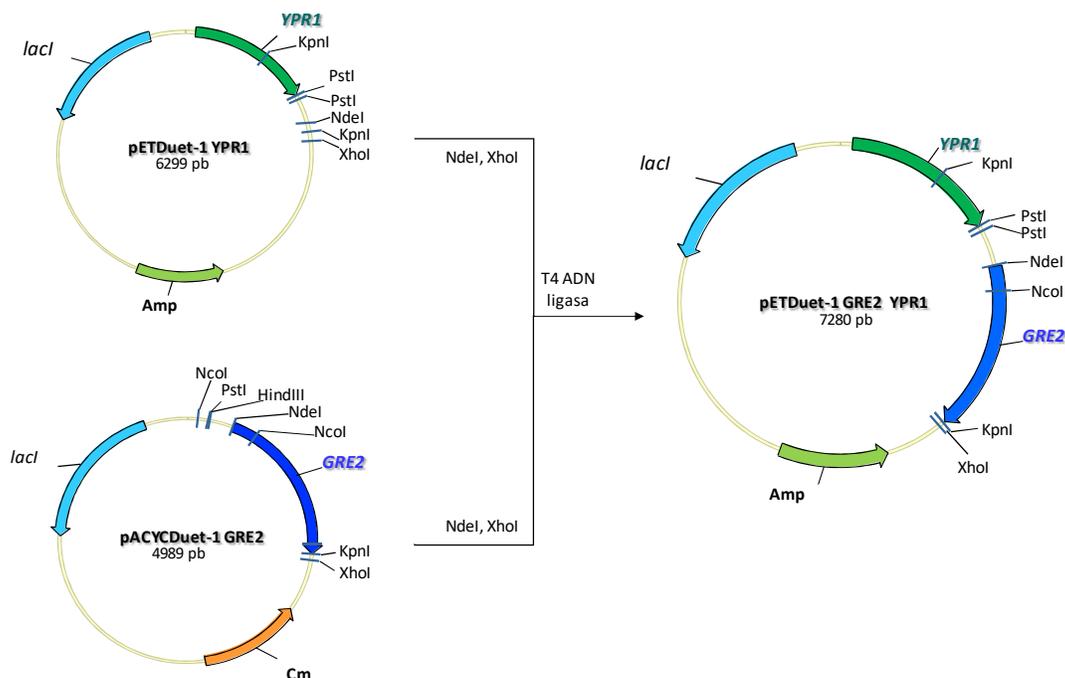


**Figura 2.2: Clonado de *GRE2* en pACYCDuet-1 y de *YPR1* en pETDuet-1.**

Para la construcción de los vectores de expresión con que se transformarán estas cepas se propone recurrir al clonado en forma independiente de los genes de interés en pETDuet-1 y en pACYCDuet-1, para posteriormente, -atendiendo a las enzimas de restricción a utilizar y la secuencia de cada gen- subclonar el gen *GRE2* en los vectores de expresión que incluyen a *YPR1* (ver Figuras 2.2 y 2.3).

En términos generales se obtendrán 3 biocatalizadores, por cepa: a saber el que expresa *GRE2*, el que expresa *YPR1* y el que permite la co-expresión, a estos se podrá incorporar eventualmente el biocatalizador que permite la co-expresión a partir de diferentes vectores.

Una vez transformada la cepa de *E. coli*, se propone realizar la verificación de los biocatalizadores construidos enfrentándolos a un sustrato modelo sobre el que se pueda confirmar la actividad esperada. En base a la actividad que se desea verificar y a la experiencia del grupo de trabajo se recurre al  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo(5) como sustrato modelo.<sup>369,370</sup>



**Figura 2.3: Subclonado de GRE2 en pETDuet-1 YPR1.**

Una vez confirmada la actividad biocatalítica se planea el desarrollo de biotransformaciones usando como sustratos al metilglioxal(3) (punto de partida de la vía construida), el lactaldehído (4) (intermediario de reacción), el glicerol(1) y finalmente el sustrato de interés: glicerina de proceso industrial. En todos los casos se evaluará el desempeño de los biocatalizadores en aerobiosis y anaerobiosis en régimen de células en crecimiento y en régimen de células en reposo frente a los sustratos descritos utilizando como fuente de Carbono y energía glicerol (1) y glicerol (1)/glucosa (6).

### 2.3.3 Estrategia 2

La segunda estrategia a seguir ha sido planteada con el objetivo de generar condiciones favorables para la producción de 1,2-propanodiol(2) a partir de glicerol (1) en anaerobiosis. Consiste en dotar con la vía metabólica descrita a la cepa *E. coli* FMJ39. Esta doble mutante (*ldh*: lactactodeshidrogenasa y *pfl*: piruvato formiato liasa) tiene descrita su imposibilidad de fermentar glucosa (6) debido a su incapacidad de regeneración de cofactores.<sup>371</sup> Atendiendo a que la vía metabólica a implantar permitiría la regeneración de equivalentes de reducción

sería de esperar que consecuentemente pudiera habilitar el crecimiento de esta cepa en condiciones de anaerobiosis.

Considerando que los vectores de expresión a utilizar (previamente referidos en el ítem 2.2 Estrategia 1) son dependientes del promotor T7, resultará necesario, modificar el genoma de *E. coli* FMJ39 aportando la secuencia del sistema de expresión T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. Para la concreción de esta actividad se plantea utilizar la estrategia desarrollada por Kang y colaboradores.<sup>372</sup>

La cepa resultante *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT, constituirá el punto de partida para su transformación con los vectores de expresión previamente descritos, dando lugar a los biocatalizadores *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS3), *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pPP8) y *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4).

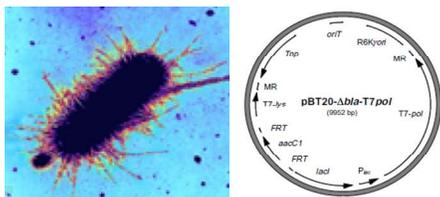
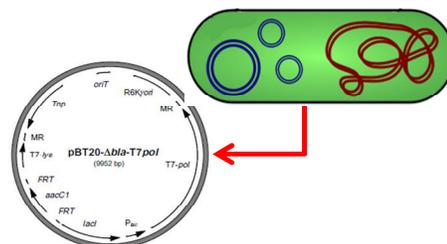
A las verificaciones detalladas en la descripción de la Estrategia 1 se agregará -en este caso- la verificación del mantenimiento de la condición de doble mutante (*ldh-pfl*) una vez introducida la modificación a nivel de cromosoma para lo cual se verificará la incapacidad de fermentar glucosa(6).

Se analizará el comportamiento de las cepas construidas en biotransformaciones en régimen de células en crecimiento tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, así como en régimen de células en reposo en anaerobiosis. Los ensayos involucrarán los mismos sustratos descritos en Estrategia 1, a saber: metilglioxal(3), lactaldehído (4), glicerol(1) y glicerina obtenida de la producción industrial de biodiésel.

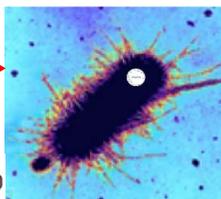
En la Figura 2.4 se representan esquemáticamente los pasos a seguir para la construcción de los biocatalizadores en el marco de la Estrategia 2.

Atendiendo a la posibilidad de que la conversión de glicerol (1) en metilglioxal(3) pueda transformarse en una restricción para el adecuado funcionamiento de la vía metabólica diseñada, se prevé la posibilidad de sobreexpresar adicionalmente la metilglioxal sintasa de *E. coli* recurriendo para ello a la introducción de una nueva modificación genética transformando la cepa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) con un vector de expresión derivado del plásmido pRSFDuet-1 que incluya el gen que codifica la metilglioxal sintasa (*mgsA*) de *E. coli*, vector a ser identificado como pWS5 (compatible con los vectores derivados de pETDuet-1 y pACYCDuet-1). Se obtendrá de esta manera un nuevo biocatalizador a ensayar, la cepa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4)(pWS5).

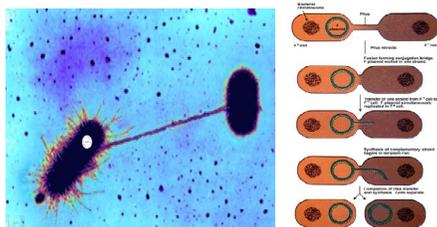
**1- Extracción:** A partir de *E. coli* (pBT20- $\Delta$ bla-T7pol) se extrae el plásmido pBT20- $\Delta$ bla-T7pol que contiene la secuencia completa del sistema de expresión T7 flanqueado por secuencia de transposones.



**2-Transformación :** de *E. coli* HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116 con el plásmido pBT20- $\Delta$ bla-T7pol, cepa que presenta auxotrofia al Ácido Diamino Pimélico (DAP) (16)



**Resultado:** Construcción de una cepa F+ conteniendo el plásmido pBT20- $\Delta$ bla-T7pol

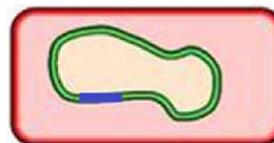


**3- Conjugación:** Donor *E. coli* HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116 y *E. coli* FMJ39

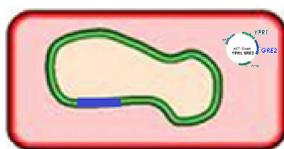
**4- Transposición** de secuencia de T7-pBT20- $\Delta$ bla-T7pol

**Resultado:** Secuencia del sistema de expresión T7 polimerasa (--) integrado al genoma de FMJ39.

*E. coli* FMJ39T7pol-Gm-FRT



**5-Transformación:** de *E. coli* FMJ39T7pol-Gm-FRT con los vectores derivados de pETDuet-1 que expresan GRE2 e YPR1 en forma separada y conjuntamente.



**Resultado:** Nueva serie de biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39T7pol-Gm-FRT construida.

**6-Verificaciones:**

**Verificación 1:** Mantenimiento de incapacidad de fermentar glucosa aún con agregado de acetato (10).

**Verificación 2:** Funcionamiento del sistema de expresión T7pol sobre vectores derivados de pETDuet-1.

**Verificación 3:** Actividad de los vectores con sustrato modelo:  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) según lo descrito en bibliografía.

**Resultado:**

Biocatalizadores verificados, prontos para evaluar su desempeño en Biotransformaciones.

Figura 2.4: Esquema Estrategia 2.

## 2.4 Estrategia de valorización del 1,2-propanodiol (2) obtenido

La estrategia planteada de valorización del glicerol (1) no acaba en la síntesis enzimática del producto 1,2-propanodiol (2) sino que avanza en la evaluación de la síntesis quimio-enzimática de derivados del glicerol (1) de mayor valor agregado. En esa dirección se plantea la síntesis a partir del 1,2-propanodiol (2) obtenido en la reacción de biotransformación de (*R*) ó (*S*)-4-metil-1,3-dioxolan-2-ona, también denominado (*R*) ó (*S*)-propilencarbonato (7a)(7b), (*R*) ó (*S*)-2-metoximetoxi-1-propanol (8a)(8b) y (*R*) ó (*S*)-2-metoxi-1-propanol (9a)(9b) según se describe en la Figura 2.5.

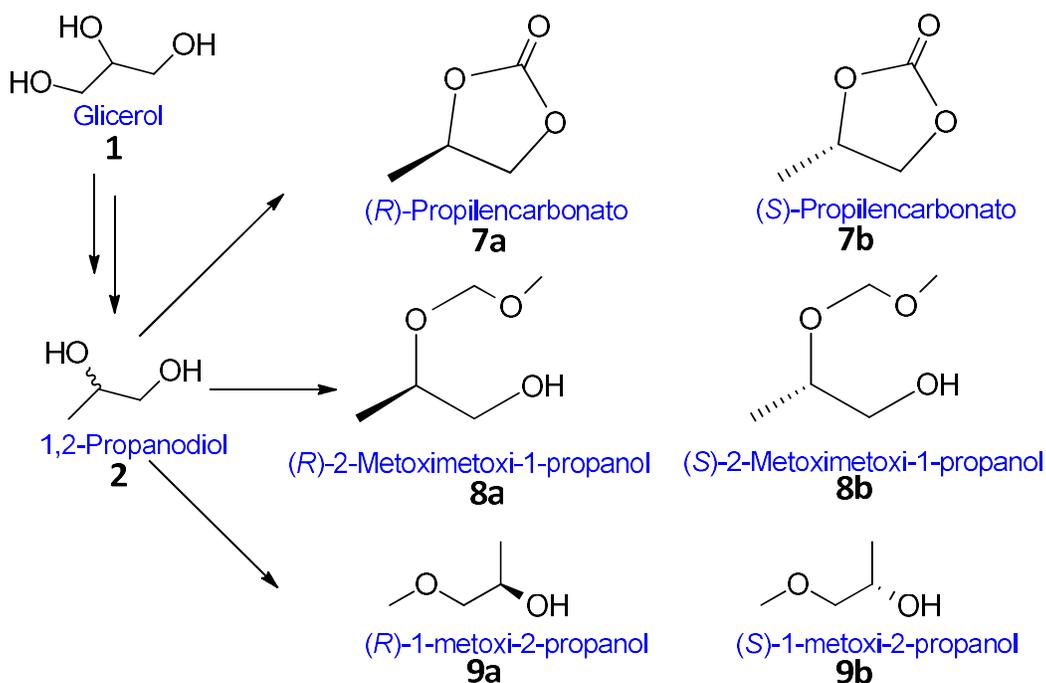


Figura 2.5: Esquema propuesto de valorización del glicerol (1).

Página intencionalmente dejada en blanco

## **Capítulo 3**

### ***Resultados y discusión***

## **Resultados obtenidos en la Estrategia 1**

### **3.1 Construcción de Biocatalizadores de la Estrategia 1**

#### **3.1.1 Desarrollo de sistemas que permitan la expresión simultánea de los genes *GRE2/YOL151W* e *YPR1/YDR368W***

De acuerdo a lo señalado en Objetivos y Estrategia (2.3.2) se procede al clonado de los genes *GRE2* (1029 pb) e *YPR1* (939 pb) que codifican para sendas reductasas en un mismo vector de la serie pETDuet-1 (5420 pb) y pACYCDuet-1 (4008 pb).

Como punto de partida se cuenta con los genes clonados en plásmidos derivados de pYES2 (plásmidos pSRG41 y pSRG14 respectivamente).

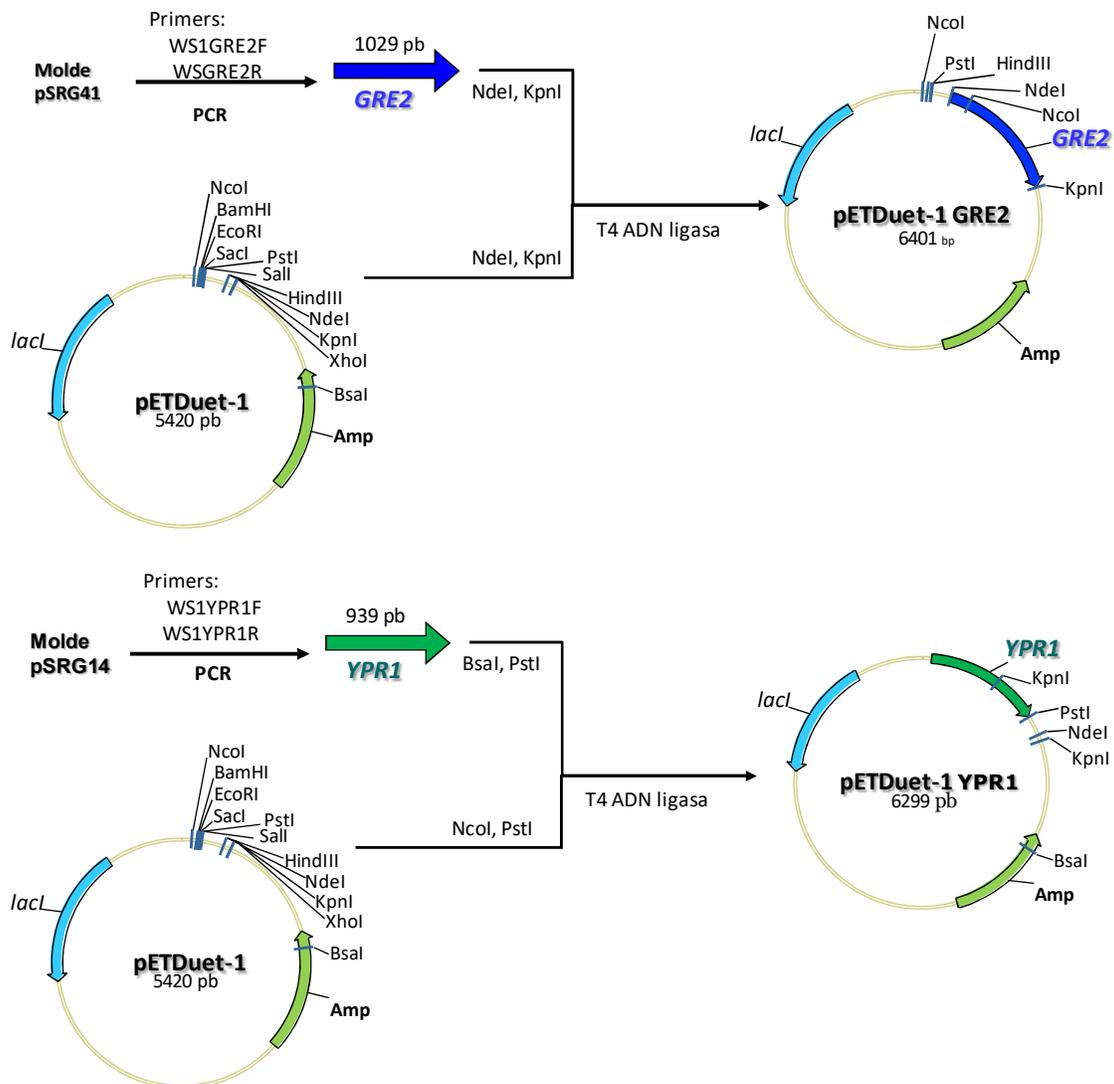
#### **3.1.2 Clonado directo de *GRE2* e *YPR1* en pACYCDuet-1 y en pETDuet-1**

Inicialmente se intenta el desarrollo del clonado en forma directa tanto en pACYCDuet-1 como en pETDuet-1 (según se representa gráficamente en la Figura 3.1).

En la amplificación mediante PCR del gen *GRE2* contenido en el plásmido pSRG41 se recurre a los oligonucleótidos ws1GRE2F y ws1GRE2R. Por su parte, para la amplificación mediante PCR del gen *YPR1* contenido en el plásmido pSRG14 se recurre a los oligonucleótidos ws1YPR1F y ws1YPR1R.

El amplicón de *GRE2*, así como el vector pETDuet-1 es digerido con las enzimas de restricción NdeI y KpnI. Los productos de digestión se ligan con T4 ADN ligasa y se transforma la cepa *E.coli* JM109.

Análogamente el amplicón de *YPR1* es digerido con las enzimas de restricción PstI y BsaI, mientras que pETDuet-1 es digerido con las enzimas de restricción PstI y NcoI. Los productos de digestión se ligan con T4 ADN ligasa y se transforman células competentes de *E. coli* JM109.



**Figura 3.1: Construcción de vectores de expresión – método directo a partir de pETDuet-1**

Si bien se logra la recuperación de transformantes, al avanzar en instancias de verificación posteriores no se logran resultados que permitan confirmar el éxito del procedimiento. Analizadas las posibles causas se concluye que estos resultados pueden atribuirse, entre otras a, una baja efectividad de las enzimas de restricción utilizadas, posible recirculación del plásmido en etapa inicial o a escaso volumen de material a ligar al arribar a las etapas finales. La reiteración de intentos con resultados similares -pese a ajustes implementados tendientes a corregir las causas identificadas- conduce a modificar la estrategia a seguir.

Se procede a ensayar otras alternativas de clonado, que si bien permiten eliminar algunas de las restricciones descritas resultan menos directas.

### 3.1.3 Desarrollo de sistemas de expresión de los genes *GRE2* e *YPR1*, a través de su clonado en plásmidos auxiliares

A partir de los plásmidos pSRG41 y pSRG14 se procede a la amplificación de los genes *GRE2* e *YPR1* respectivamente según se ha descrito anteriormente, los amplicones se purifican en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

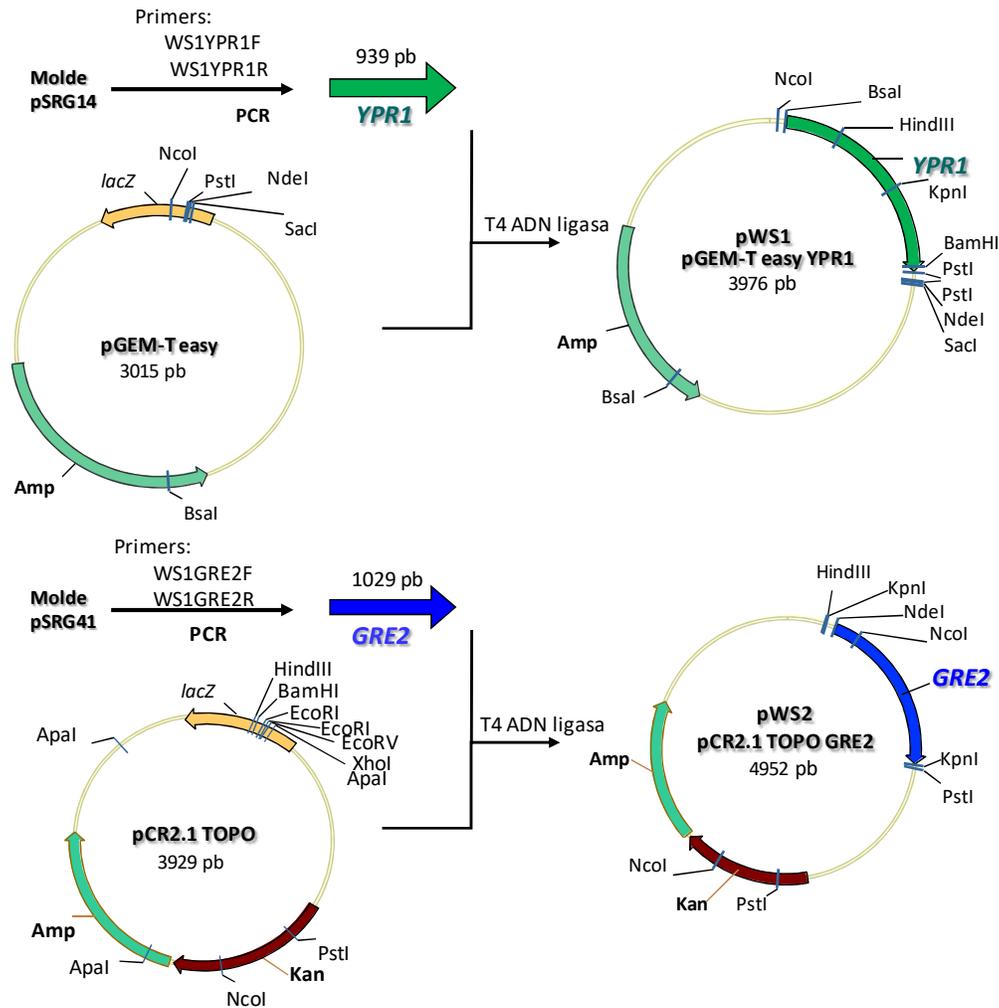


Figura 3.2: Construcción de vectores de expresión – clonado en plásmidos auxiliares.

El producto obtenido de la etapa de purificación se somete a ligación con el vector pTZ57R/T, por su parte el producto de ligación, una vez verificado en gel de agarosa es utilizado en la transformación por electroporación de *E. coli* JM109, recuperándose los transformantes con inserto mediante siembra en superficie en placas de petri con LB-Amp-X-Gal, en presencia de IPTG (20).

El uso de este sistema comercial no arrojó los resultados esperados por lo que se resuelve reiterar el procedimiento con otros productos similares variando el proveedor. Siguiendo un

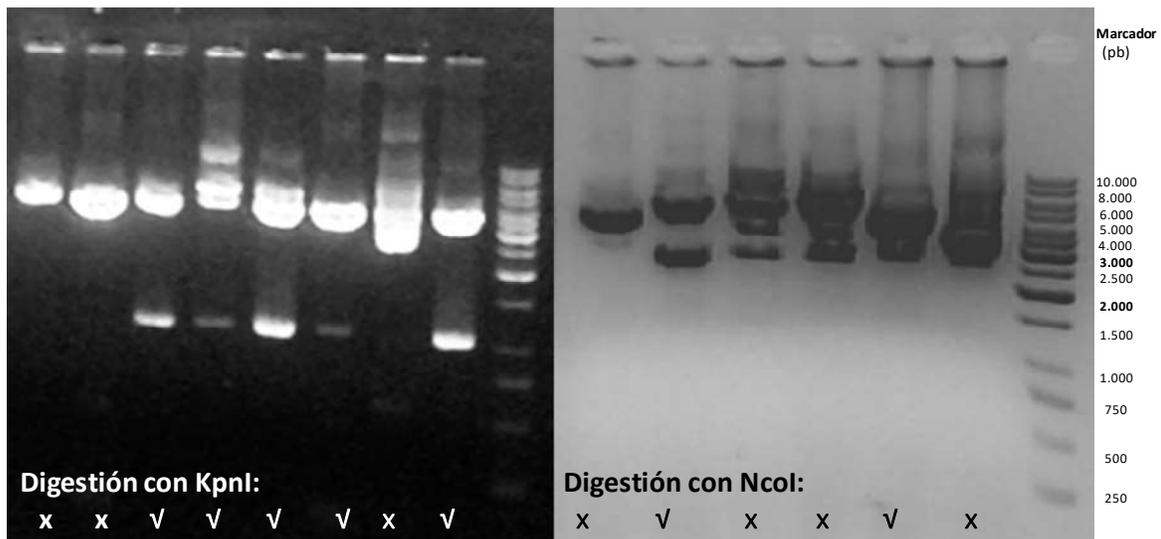
método similar al descrito se avanza en el clonado de ambos genes en pCR™ 2.1-TOPO® TA vector y en pGEMTeasy Vector System.

Al clonar en pCR™ 2.1-TOPO® TA vector se obtienen transformantes que presuntamente incluyen en el vector el inserto sobre los que se realiza verificación mediante ampliificaciones con oligonucleótidos apropiados y digestiones con enzimas de restricción.

Finalizada esta etapa se confirma que los resultados de las verificaciones no resultan concluyentes respecto a la presencia de insertos en el caso de *YPR1*, obteniéndose resultados consistentes con la clonación de *GRE2*.

En la Figura 3.3 se observan los resultados obtenidos en las verificaciones realizadas con presuntos clones conteniendo al gen *GRE2*. Estos resultados permiten concluir que se obtuvo el vector pWS2, y seleccionar un clon para continuar en etapas posteriores.

Al reiterar el procedimiento de clonado de *YPR1* en pGEM®-T Easy Vector Systems, se introducen variantes al momento de la transformación realizando en forma simultánea el proceso por electroporación sobre células electrocompetentes *E. coli*JM109 y por transformación térmica sobre células químicamente competentes *E. coli*XL1.



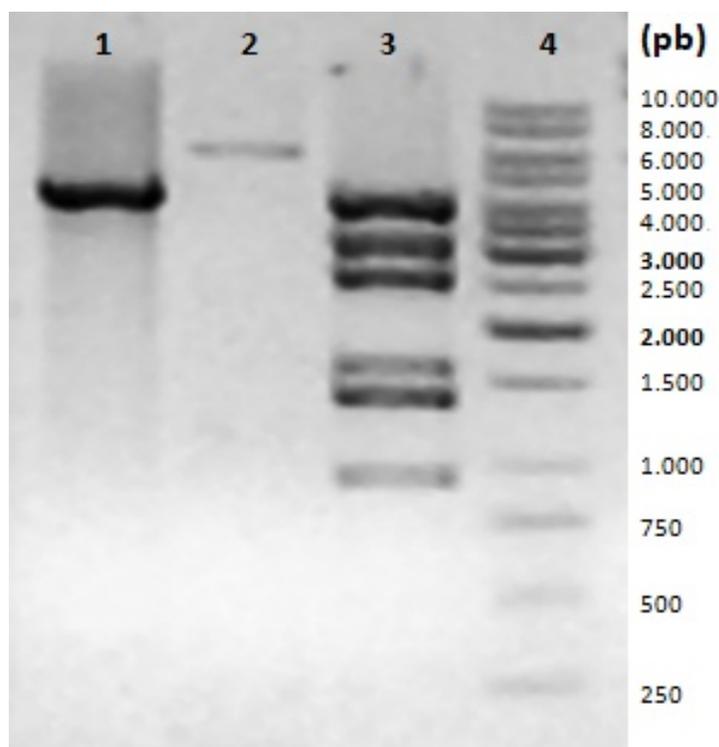
**Figura 3.3: Selección de transformantes en función de la orientación deseada del gen *GRE2*.**

Mediante transformación química se logra el clonado del gen *YPR1* obteniéndose como resultado intermedio el vector pWS1. Sobre los transformantes recuperados se realizan verificaciones aplicando los criterios previamente descritos, lo que permite identificar transformantes portadores de plásmido que contiene el gen de interés en la dirección deseada.

**Tabla 3.1: Digestión de pWS2 (pCR™2.1- Topo®TA conteniendo *GRE2*) - elucidación de la orientación de la inserción del gen.**

Enzima de restricción	Tamaño de Fragmentos obtenidos (pb)	
	Orientación 1 (deseada)	Orientación 2 (no deseada)
KpnI	aprox. 4000 y 1000	aprox. 4900
NcoI	banda doble en aprox. 2500	aprox. 3000 y 2000

Para esta verificación se recurre a las enzimas de restricción PstI, y Eco31I (BsaI), las que se aplican en forma secuencial (Ver resultado de digestiones en Figura 3.4), en la que se observan los fragmentos esperables a partir de las digestiones planteadas en la Tabla 3.2.



**Figura 3.4: Verificación de orientación del gen *YPR1* en pGem-T-Easy a partir de amplificación de ADN plasmídico extraído de cepas transformantes.**

**Carril 1: Digestión con PstI, Carril 2: pETDuet-1 (linealizado), Carril 3: Digestión con Eco31I (BsaI) y PstI, Carril 4: marcador.**

Sobre la base de las confirmaciones obtenidas a partir de los ensayos anteriores se procede al secuenciado de ambos genes. Se confirma la identidad de los genes *GRE2* e *YPR1*, por lo que se concluye están dadas las condiciones para su subclonado en los vectores de expresión correspondientes.

**Tabla 3.2: Digestión de pWS1 (pGEM-T-Easy conteniendo *YPR1*) – elucidación de la orientación en la inserción del gen.**

Enzima de restricción	Tamaño de Fragmentos obtenidos (pb)	
	Orientación 1 (deseada)	Orientación 2 (no deseada)
PstI	aprox. 4000	aprox. 1000 y 3000
Eco31I	aprox. 2300 y 1600	aprox. 2500 y 1400
PstI + Eco31I	aprox. 1600/1400/950 (cortes totales)	aprox. 1500/1020/950 (cortes totales)
	aprox. 4000/3000/2600/2400 (cortes parciales)	aprox. 4000/3100/2950/2600 (cortes parciales)

Alcanzado este hito intermedio se puede comentar que:

- i) Se ha logrado la construcción de los plásmidos pWS1 y pWS2 conteniendo los genes de interés de manera satisfactoria.
- ii) Se ha verificado la existencia de diferencias notorias en los rendimientos de transformación, en favor de la alternativa transformación térmica en células químicamente competentes frente a la transformación por electroporación (Ver Tabla 3.3). Los valores calculados de rendimientos en el caso de la transformación por choque térmico sobre células químicamente competentes se ubican para la transformación control dentro de lo descrito en la bibliografía para este proceso.<sup>373</sup> Por otra parte, resulta llamativa la imposibilidad de recuperar transformantes en el caso de electroporación, lo que conduce a la revisión del procedimiento de transformación.

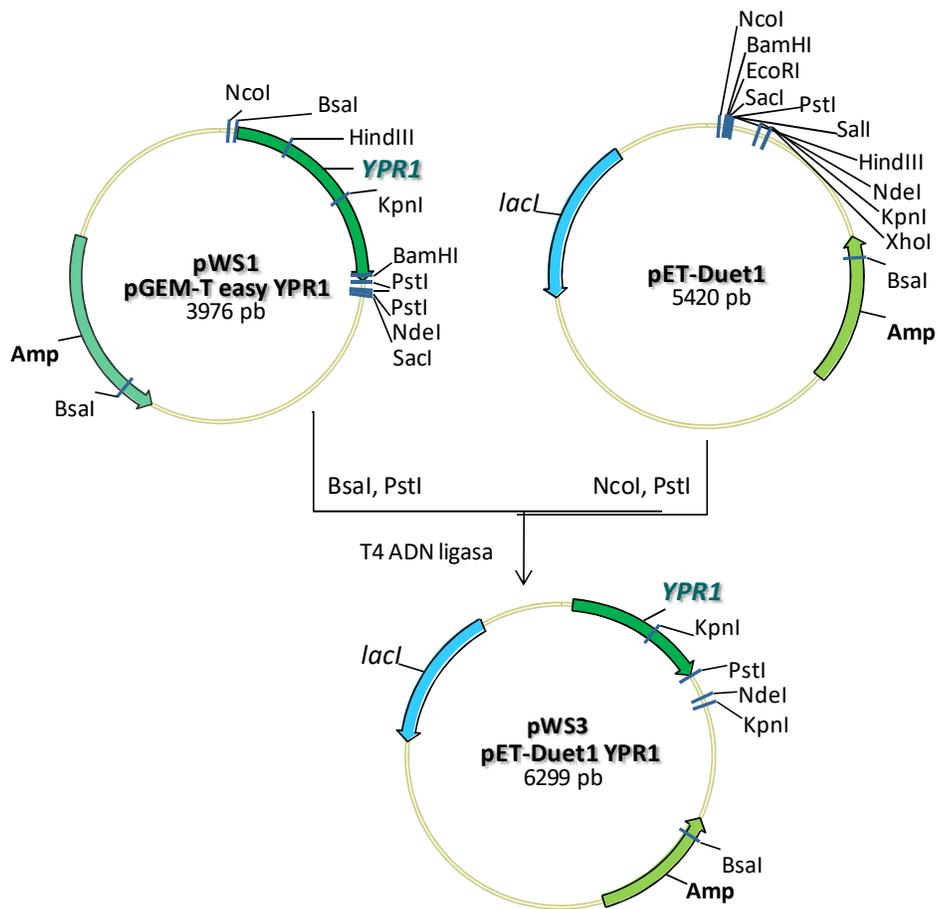
**Tabla 3.3: Rendimientos de transformación calculados como número de unidades formadoras de colonia/ $\mu$ g ADN.**

	Transformación por Electroporación	Transformación por choque térmico
Viabilidad de células competentes	✓	✓
$\eta_{GRE2}$	< 1	4 E+4 ufc/ $\mu$ g
$\eta_{YPR1}$	< 1	4 E+5 ufc/ $\mu$ g
$\eta_{control}$	< 1 E+5 ufc/ $\mu$ g	3 E+7 ufc/ $\mu$ g

### 3.1.4 Subclonado a vectores de expresión

El plásmido pWS1 es digerido con enzimas de restricción Eco31I (BsaI) y PstI (es de notar que en esta última digestión puede ocurrir que se digiera en cualquiera de los dos sitios

distante 40 pb, o en ambas, independientemente de lo anterior no se vería afectado el resultado final, pues ambos sitios se encuentran fuera de la secuencia codificante para la enzima Ypr1p). Por su parte el vector pETDuet-1 receptor del gen *YPR1* es digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *PstI*. Los productos de digestión son ligados con T4 ADN ligasa, obteniéndose el vector de expresión pWS3según se detalla en Figura 3.5).

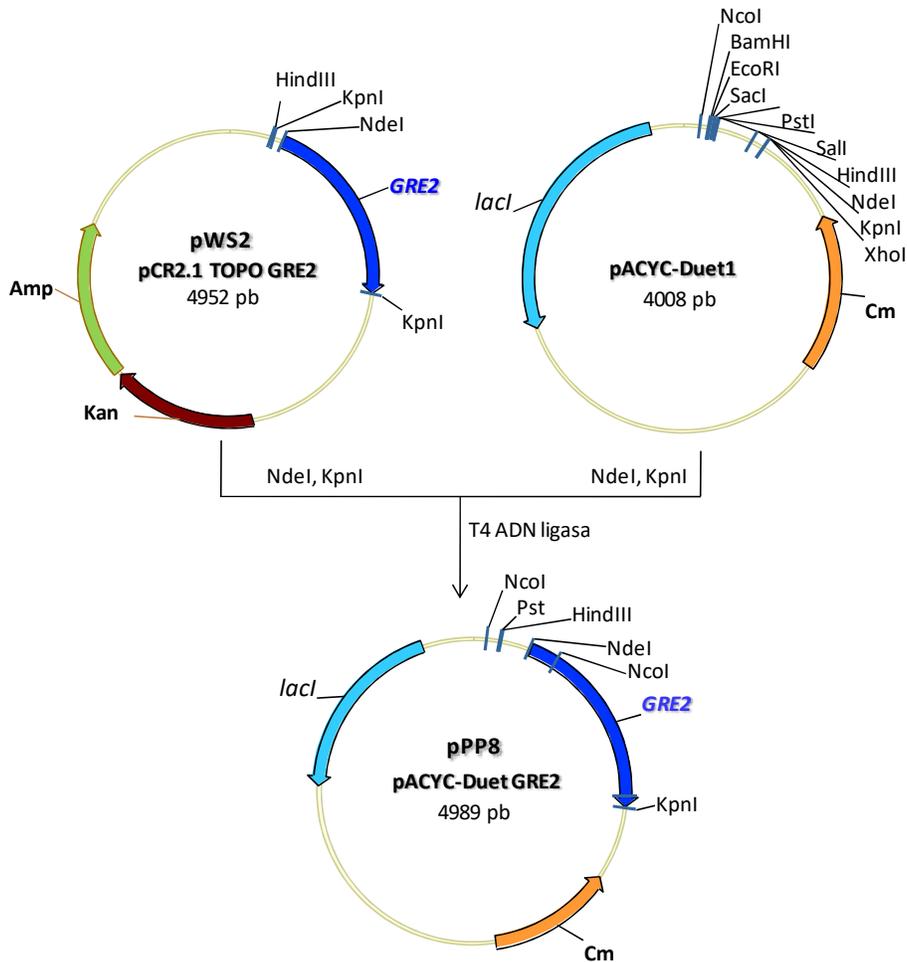


**Figura 3.5: Subclonado de *YPR1* en pET-Duet1.**

Análogamente los plásmidos pWS2 y pACYCDuet-1 son digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI*. Los productos de digestión son ligados con T4 ADN ligasa obteniéndose el vector de expresión pPP8 (Ver Figura 3.6).

Al igual que en instancias anteriores descritas de clonación, se ejecutan las verificaciones de rigor consistentes en la amplificación con primers específicos del gen y digestiones con enzimas de restricción, confirmándose que ambos subclonados se han logrado con éxito.

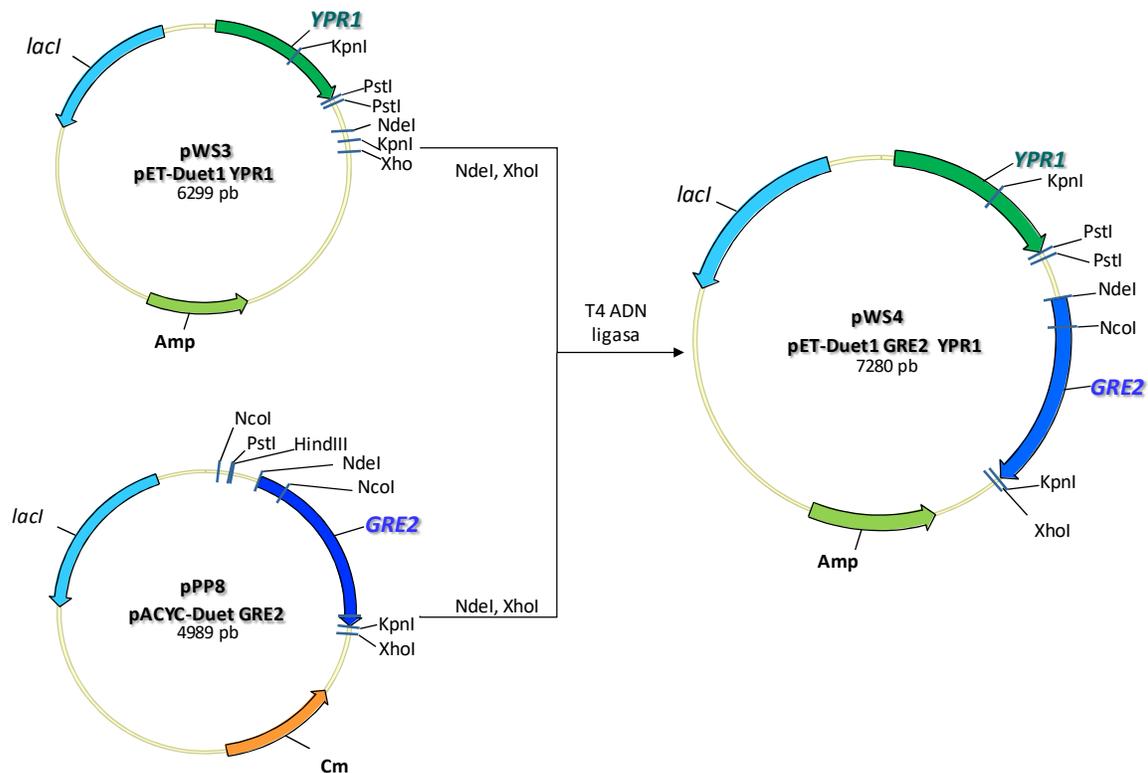
Por razones de espacio y priorización de otras informaciones solo se detalla este procedimiento en forma exhaustiva para la construcción del vector de expresión conteniendo ambos genes.



**Figura 3.6: Subclonado de *GRE2* en pACYC-Duet1**

La construcción del vector pETDuet-1 *GRE2 YPR1* se realiza a partir de pWS3 (que contiene *YPR1* en pETDuet-1) y pPP8 (que contiene a *GRE2* en pACYCDuet-1) según Figura 3.7. Ambos vectores son digeridos en forma sucesiva con NdeI y XhoI. El gen escindido de pWS3 (*GRE2*) es purificado en gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión y posterior electroelución. Este fragmento es ligado con el pWS3 ya digerido mediante T4 ADN ligasa.

Una vez concluida la construcción *in vitro* del vector pWS4 (que contiene simultáneamente *GRE2* e *YPR1* en pET-Duet1) se co-precipita con Yeast t-RNA y se recupera el precipitado en agua, realizando con este producto la transformación por electroporación de células electrocompetentes de *E.coli* DH10B.



**Figura 3.7: Subclonado de GRE2 en pWS3 (pETDuet-1YPR1).**

El uso de Yeast t-RNA como co-precipitante del producto de ligación, previo a la transformación según lo descrito por Zhu y colaboradores, permite verificar un cambio sustancial de los rendimientos en transformación por electroporación alcanzándose niveles cercanos de eficiencia a los descritos en bibliografía (aproximadamente  $1E+8$  ufc/ $\mu$ g).<sup>374</sup>

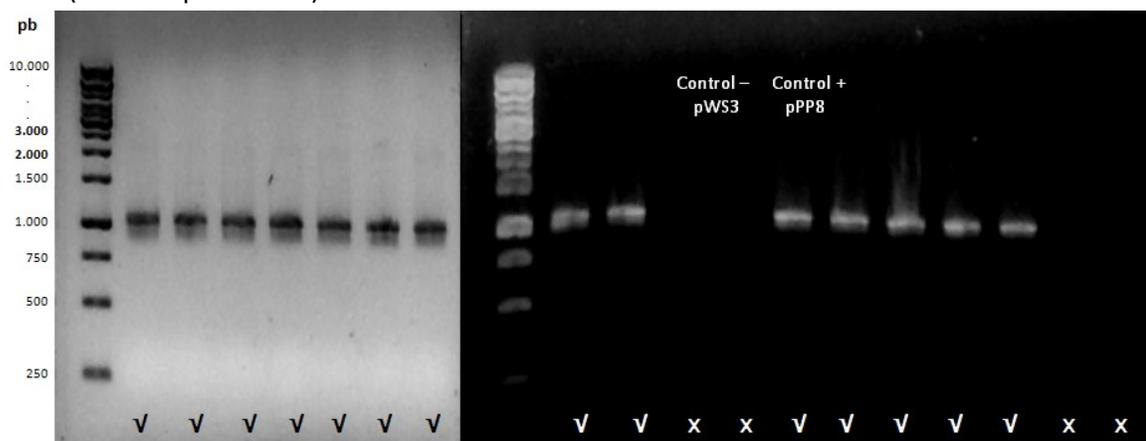
### 3.1.5- Verificaciones desarrolladas sobre pWS4 (GRE2 e YPR1 en pETDuet-1)

El conjunto de verificaciones desarrolladas sobre 20 colonias de la cepa *E. coli* DH10B transformadas con el vector pWS4 incluye:

- i) Amplificación de genes de interés mediante PCR recurriendo a oligonucleótidos diseñados para GRE2 e YPR1.
- ii) Amplificación de genes de interés mediante PCR recurriendo a oligonucleótidos que hibridan con el vector en zonas flanqueantes a insertos.
- iii) Digestión del vector pWS4 con enzimas de restricción apropiadas para escindir fragmentos de tamaño conocido.
- iv) Digestión del vector pWS4 con enzimas de restricción que permiten verificar escisiones de sitios objetivos de acción de dichas enzimas al insertarse el gen GRE2.

## Amplificaciones de genes de interés mediante PCR

Sobre lisado de un cultivo fresco se realiza PCR con oligonucleótidos ws1GRE2f y ws1GRE2r, utilizando como control positivo el lisado de cepas conteniendo el plásmido pPP8 (*GRE2* en pACYCDuet-1) y como control negativo al digerido celular de cepas conteniendo el vector pWS3 (*YPR1* en pETDuet-1).

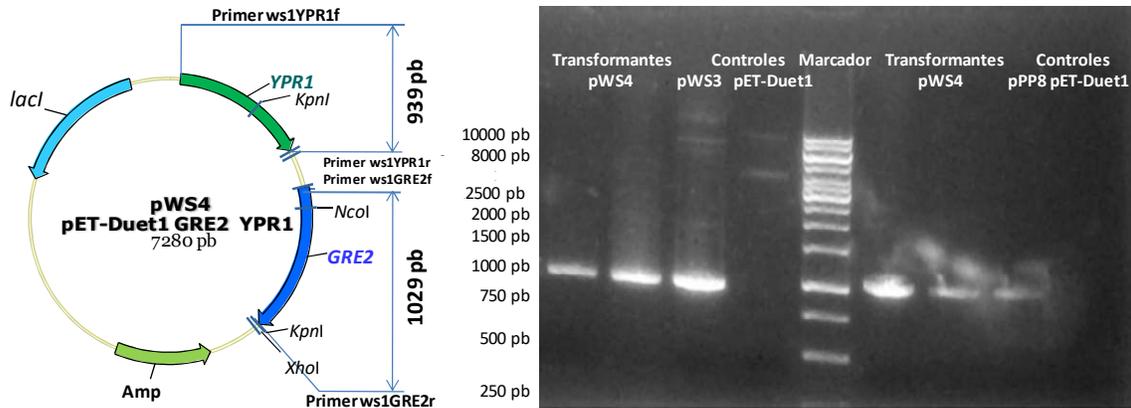


**Figura 3.8: Búsqueda de transformantes con potencial incorporación de *GRE2* en pWS3.**

En la Figura 3.8 se observa el gel de agarosa que reúne los resultados obtenidos en la reacción de PCR. Se observa una proporción importante de cepas que arrojan resultados consistentes con la inserción del gen.

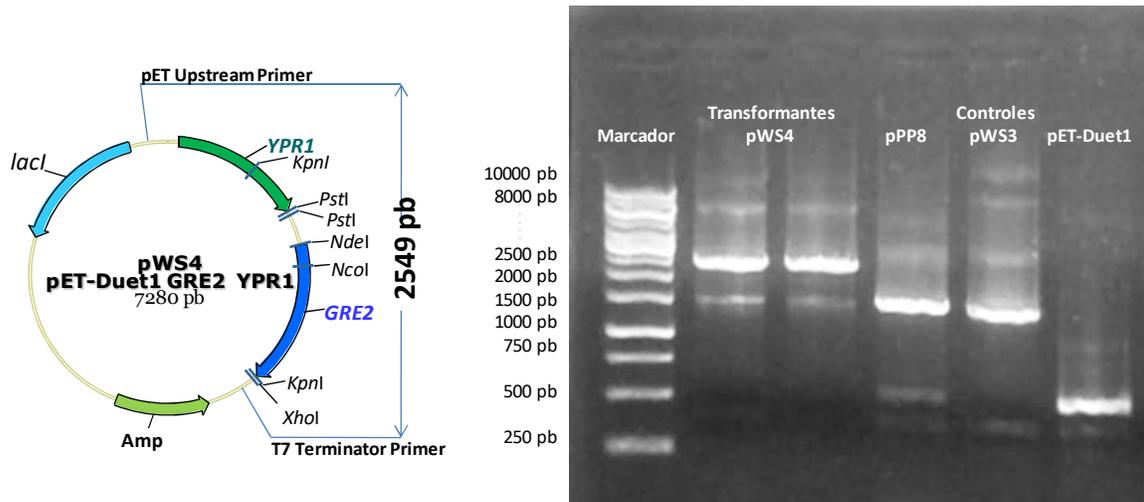
Sobre la base del resultado anterior, se seleccionan colonias que presentan resultados auspiciosos en relación a la inserción. A partir de esas colonias se realiza PCR con combinaciones de oligonucleótidos que permitan ya no solo aportar evidencia de la presencia de *GRE2* en pWS4 sino acerca de la presencia simultánea de *GRE2* e *YPR1* en el vector. Se recurre para ello a las siguientes combinaciones de oligonucleótidos:

- i) wsYPR1f y wsYPR1r utilizando como control positivo la cepa conteniendo el plásmido pWS3 y como controles negativos los lisados de cepas conteniendo el vector pETDuet-1 (Ver en Figura 3.9 carriles 1 a 4).
- ii) wsGRE2f y wsGRE2r utilizando como control positivo la cepa conteniendo el plásmido pPP8 y como controles negativos el lisado de cepas conteniendo el vector pETDuet-1 (Ver Figura 3.9 carriles 6 a 9).



**Figura 3.9: Amplificación con oligonucleótidos ws1YPR1f/ws1YPR1r y ws1GRE2f/ws1GRE2r.**

- iii) pETUpstream y T7terminator utilizando como control positivo las cepas conteniendo el plásmido pPP8 y como control negativo las cepas conteniendo el vector pWS3.

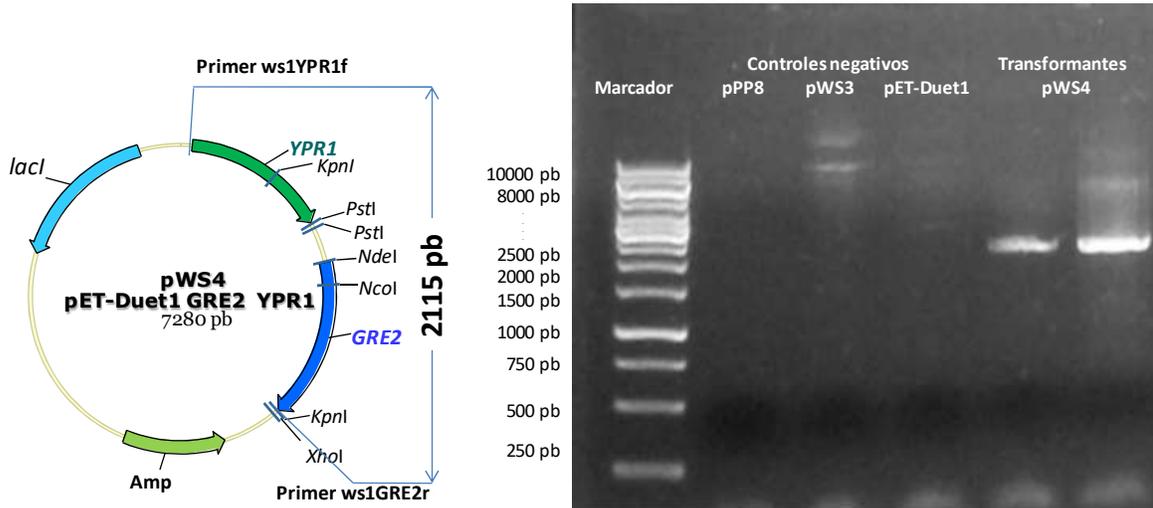


**Figura 3.10: Amplificación con pETUpstream primer y T7terminator primer.**

El amplicón obtenido en caso de presencia simultánea de *GRE2* e *YPR1* presentaría 2549 pb. Por su parte cuando presenta solamente a *YPR1* el amplicón presentaría 1574 pb (caso de pWS3), mientras que de estar presente solo *GRE2* presentaría 1676 pb (caso de pPP8). En ausencia de ambos genes el amplicón se corresponde a 569 pb (pETDuet-1).

En Figura 3.10 se representan los posibles amplicones obtenibles y el gel que evidencia la obtención de un amplicón consistente con la presencia simultánea de ambos genes así como los amplicones obtenidos en los controles utilizados.

- iv) wsYPR1f y wsGRE2r utilizando como controles negativos las cepas conteniendo el plásmido pPPP8, pWS3 y pETDuet-1. El amplicón obtenido en caso de presencia simultánea de *GRE2* e *YPR1* presentaría 2115 pb. Por su parte cuando presenta solamente uno de los genes no se produce amplificación (caso de pWS3 y de pPPP8) al igual que cuando ninguno de los genes ha sido insertado (caso de pEDuet-1). (Ver Figura 3.11)



**Figura 3.11: Amplificación con oligonucleótidos ws1YPR1f y primer ws1GRE2r.**

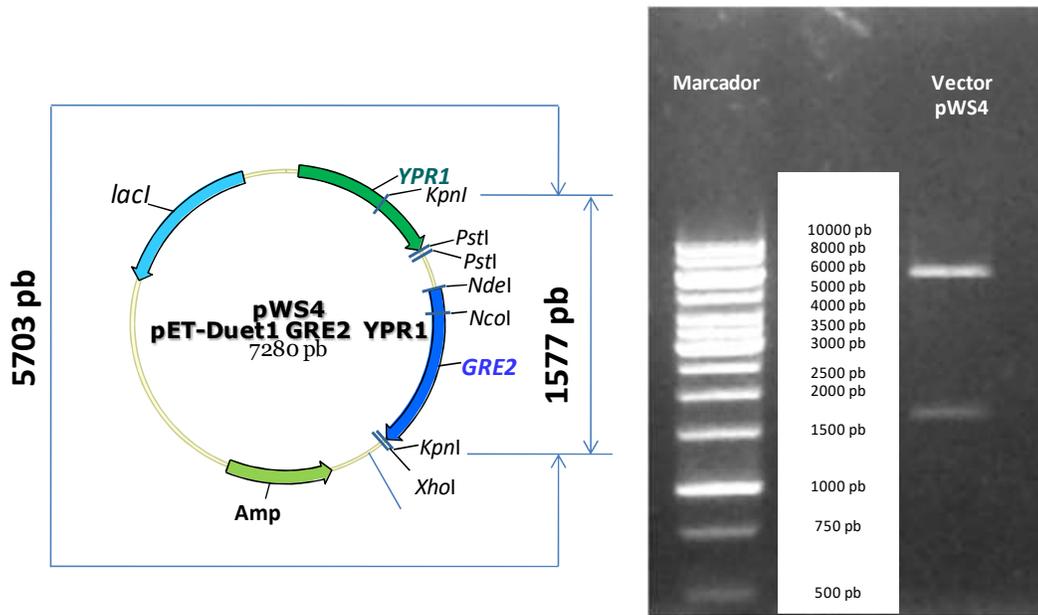
El análisis de los resultados obtenidos mediante PCR permite concluir que los mismos son consistentes con la estructura propuesta para el vector de expresión pWS4 (*YPR1* y *GRE2* en pETDuet-1).

### Verificación por digestión con enzima de restricción

A partir de plásmidos extraídos de cepas transformadas con el vector pWS4 se realiza digestión con enzima de restricción *KpnI*. Esta enzima de restricción presenta, en caso de que la construcción haya sido exitosa dos sitios de actuación distantes aproximadamente 1600 pb (uno presente en el “multiple cloning sites-2” del plásmido pETDuet-1 que ha sido mantenido al insertar el gen *GRE2* y otro incorporado al insertar el gen *YPR1*). Simultáneamente se obtiene una banda correspondiente al complemento del vector de 5680 pb.

Por otra parte, en caso de que no se hubiera insertado el gen *YPR1* solo existirá un sitio de acción obteniéndose en consecuencia solamente la linealización del plásmido observándose una única banda a aproximadamente 7000 pb. Por su parte en caso de que *YPR1* hubiera sido insertado, pero no *GRE2* se obtendrá la escisión de una banda de aproximadamente 500 pb y una banda correspondiente al complemento del vector que en dicho caso presenta 5700 pb.

En la Figura 3.12 se puede observar por un lado la total digestión del vector presentando dos bandas una ubicada levemente por debajo de 6000 pb y otra levemente superior a 1500 pb, resultados consistentes con la estructura que pretende verificarse.



**Figura 3.12: Digestión del vector pWS4 con KpnI.**

A partir de los anteriores resultados se puede afirmar que se ha logrado la construcción con éxito de la serie de vectores incluida en la Figura 3.13.

### 3.1.6 Construcción de los biocatalizadores asociados a la Estrategia 1

Los vectores construidos son utilizados para transformar mediante electroporación células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) obteniendo de esta forma la serie *E. coli* BL21(DE3)(pWS3), *E. coli* BL21(DE3)(pPP8) y *E. coli* BL21(DE3)(pWS4). Análogamente, a partir de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE se logran *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE(pWS3), *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE(pPP8) y *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE(pWS4).

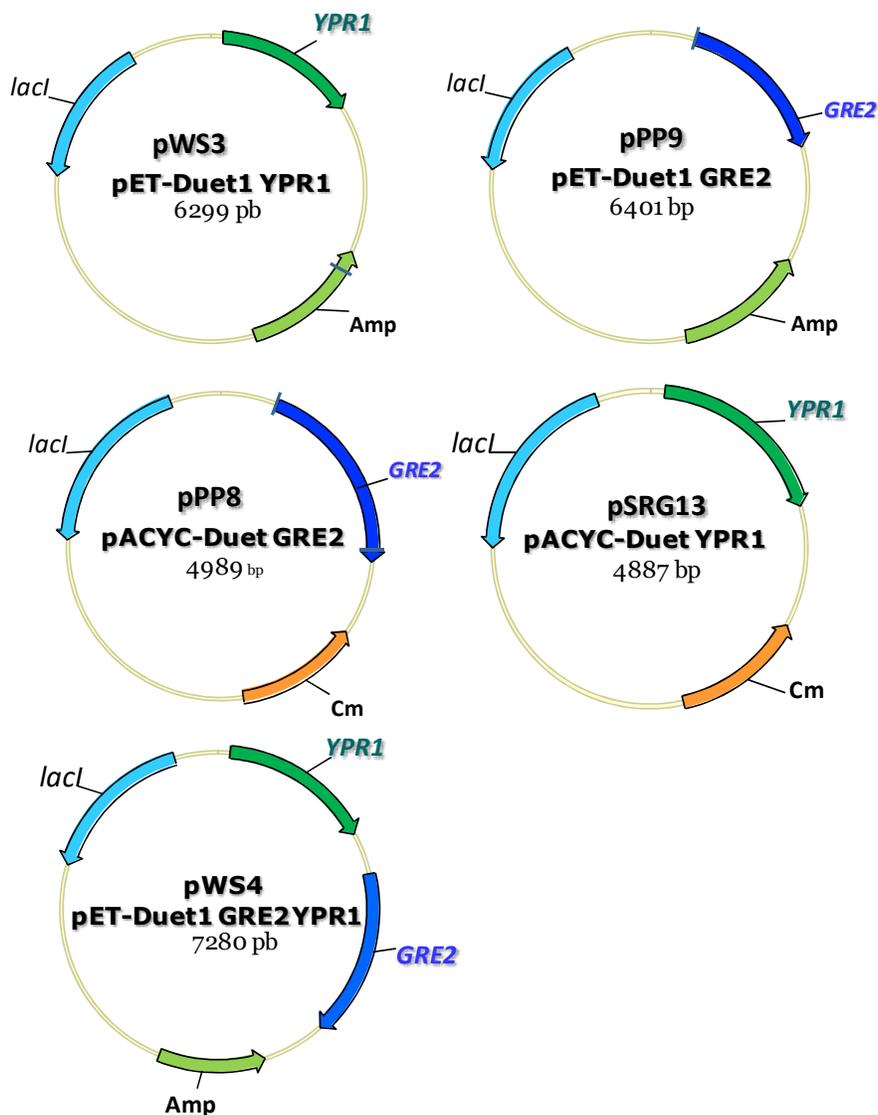
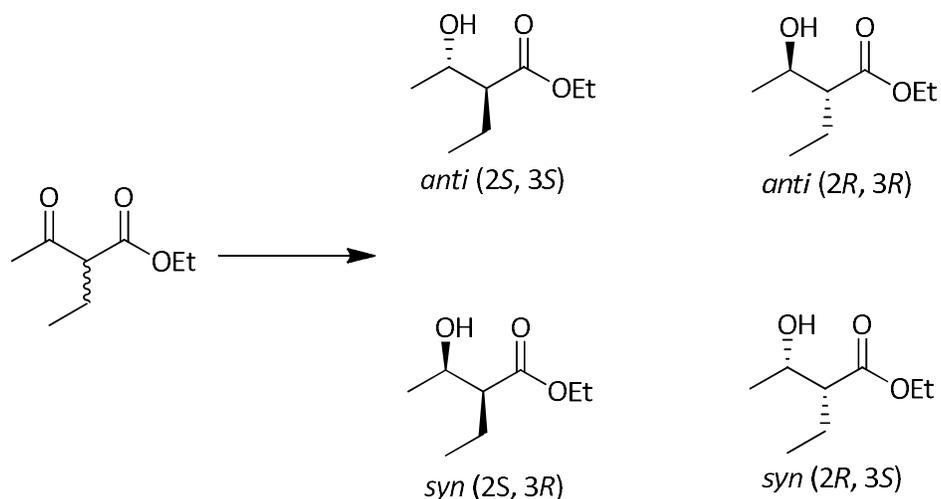


Figura 3.13: Conjunto de vectores construidos y verificados satisfactoriamente.

### 3.1.7 Verificación de actividad de los Biocatalizadores construidos

Los biocatalizadores obtenidos se utilizan en primera instancia para la verificación de actividad frente a un sustrato modelo con actividad descrita en la bibliografía, eligiéndose el  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5). Este sustrato presenta dos centros pro-quirales ubicados en los carbonos 2 y 3. Por lo tanto, como producto de la biotransformación posible obtener las siguientes cuatro configuraciones para los productos de biorreducción. A los efectos de caracterizar la funcionalidad del sistema basta en una primera etapa identificar si la cepa rinde el alcohol con configuración **anti** (2S,3S / 2R,3R) ó con configuración **syn** (2R,3S / 2S,3R) (Ver Figura 3.14).



**Figura 3.14:  $\alpha$ -Etil acetoacetato de etilo (5) y posibles productos de su biorreducción.**

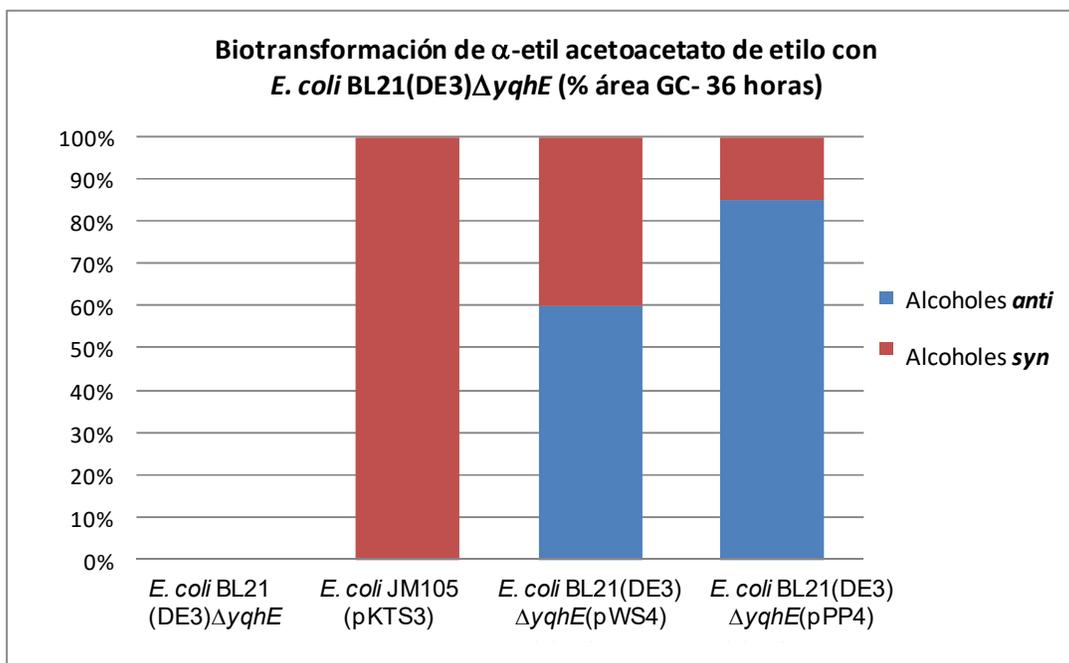
Según se ha descrito en la bibliografía, las cepas de *E. coli* que sobreexpresan Ypr1p presentan actividad **syn** y cepas que sobreexpresan Gre2p presentan actividad **anti**.<sup>319</sup> Por su parte la bacteria *E. coli* presenta actividad basal **syn**.<sup>320,330</sup>

### 3.1.8 Biotransformación de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) con los biocatalizadores construidos en el marco de la Estrategia 1

Se identifican los parámetros más relevantes a efectos de caracterizar la actividad de los diferentes biocatalizadores construidos a partir de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$  en los ensayos de biotransformación del sustrato modelo.

Los resultados son consistentes con la actividad descrita.

En la gráfica siguiente se puede observar que la actividad basal de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$  resulta despreciable en las condiciones ensayadas. Por otra parte, la actividad obtenida con la cepa *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$ (pWS4) puede describirse como híbrida **anti/syn**, consistente con la expresión simultánea de Gre2p e Ypr1p respectivamente (utilizando como controles de actividad a *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$ (pPP4) –con actividad **anti** descrita- y a la cepa *E. coli* JM105(pKTS3)-con actividad **syn** descrita).<sup>320,330,375,376</sup>



**Figura 3.15: Biotransformaciones de α-etil acetoacetato de etilo (5) con los diferentes biocatalizadores. Evaluación de actividad *syn/anti*.**

### 3.1.9 Discusión de resultados obtenidos asociados al desarrollo de biocatalizadores

Los resultados descritos anteriormente resultan consistentes con el comportamiento esperado para las construcciones evaluadas, en base a lo anterior se entiende están dadas las condiciones para:

- i) Dar por cumplido el objetivo relacionado a construcciones de la Estrategia 1, (serie de biocatalizadores: *E. coli* BL21(DE3)(pWS3), *E. coli* BL21(DE3)(pPP8), *E. coli*BL21(DE3)(pWS4), *E. coli* BL21(DE3)ΔyqhE(pWS3), *E. coli* BL21(DE3)ΔyqhE(pPP8) y *E. coli* BL21(DE3)ΔyqhE(pWS4)).
- ii) Avanzar en la evaluación del funcionamiento de la vía metabólica diseñada e implantada enfrentando al sustrato que ha motivado su construcción, el glicerol (1).

## 3.2 Biotransformaciones en el marco de la Estrategia 1

En Tabla 3.4 se describen las condiciones en las que se evalúa la producción de 1,2-propanodiol. Se ensayan condiciones de células en crecimiento y células en reposo. Por otra parte, biotransformaciones recurriendo tanto a condiciones aeróbicas como anaeróbicas son ensayadas.

**Tabla 3.4: Biotransformaciones desarrolladas con biocatalizadores de la Estrategia 1.**

Entrada	Sustrato	Biocatalizador	Condición	Resultado
1	Glicerol	<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS3)	Células en crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis	No se obtiene producción de 1,2-propanodiol
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pPP8)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS4)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS3)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pPP8)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS4)		
2	Glicerol/Glucosa	<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS3)	Células en crecimiento en anaerobiosis	No se obtiene producción de 1,2-propanodiol
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pPP8)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS4)		
3	Metilglioxal/Glucosa	<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS3)	Células en crecimiento en aerobiosis	Obtención de 1,2-propanodiol ( <b>trazas</b> )
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pPP8)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS4)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>yqhE</i> (pWS3)(pPP8)		
4	Metilglioxal/Glucosa	<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS3)	Células en reposo en anaerobiosis	Obtención de 1,2-propanodiol ( <b>trazas</b> )
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pPP8)		
		<i>E.coli</i> BL21(DE3)(pWS4)		

En varios ensayos se observa dificultad de crecimiento de alguna de las cepas ensayadas.

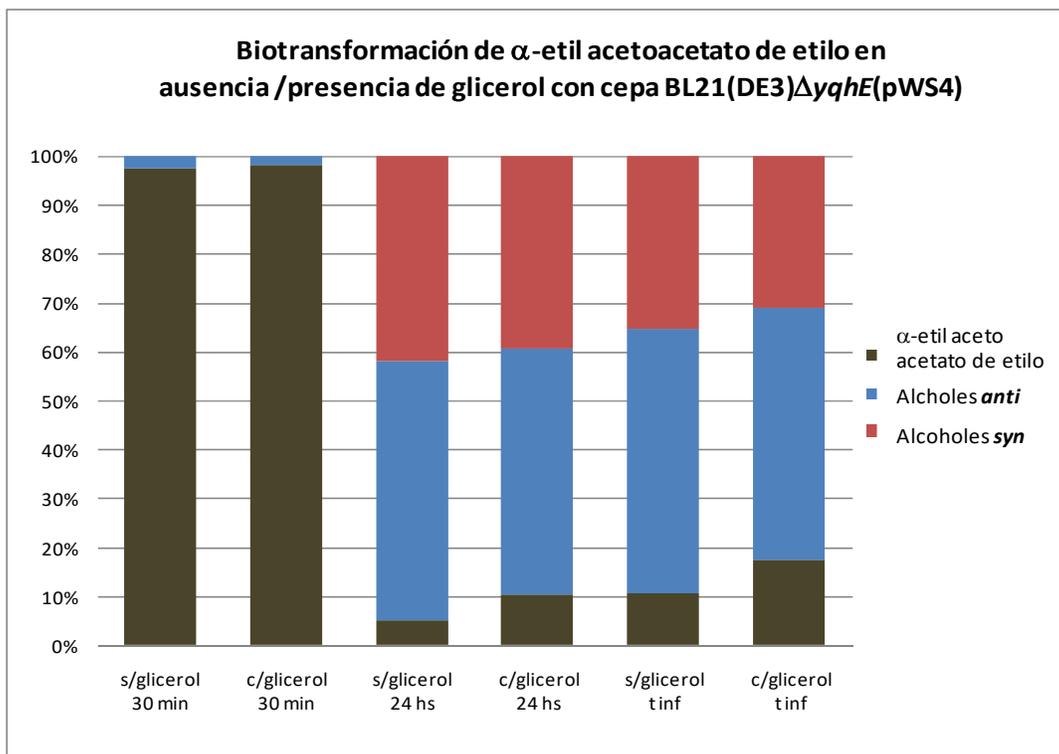
Acerca de los resultados obtenidos con esta serie de biocatalizadores se puede comentar que:

- i) No se obtiene en ningún caso el producto objetivo a partir de glicerol (**1**) (ya sea utilizado como único sustrato ó como co-sustrato conjuntamente con glucosa (**6**)).
- ii) Se identifica (a niveles no cuantificables en HPLC) la aparición de 1,2-propanodiol (**2**) en reacciones en las que se recurre a metilglioxal (**3**)/glucosa (**6**) como co-sustratos.
- iii) Se observa un perfil de productos en ocasiones diferentes a los obtenidos con las cepas control (*E.coli* BL21(DE3) ó *E.coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yqhE* según el caso). En relación a estos productos, atendiendo el magro resultado obtenido, de acuerdo al objetivo planteado, no se avanza mayormente en su caracterización.
- iv) Se identifica la necesidad de descartar que el glicerol (**1**) esté afectando el desempeño del sistema enzimático involucrado en la vía metabólica diseñada, por lo que se define una verificación adicional a las ya descritas (ver 3.2.1).

### 3.2.1 Verificación adicional sobre construcciones asociadas a la Estrategia 1.

Los resultados obtenidos en las biotransformaciones de glicerol (**1**) resultan, en principio, opuestos a los observados en la verificación de los biocatalizadores construidos en el marco

de la estrategia 1 frente al sustrato modelo (que confirman las actividades esperadas). Con la finalidad de verificar que el biocatalizador mantiene su actividad al enfrentarlo al sustrato de interés es que se ensaya la biotransformación de  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) en presencia de glicerol (1) usando como control las condiciones de verificación descritas en el apartado 3.1.8.



**Figura 3.16:** Distribución de productos en biotransformación de  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) con biocatalizador *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ yqhE(pWS4) en presencia/ausencia de glicerol (1).

Los resultados obtenidos permiten confirmar que la presencia de glicerol (1) no bloquea la capacidad de biotransformación del  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5). Por consiguiente, la ausencia de producción de 1,2-propanodiol (2) debe asignarse a otra causa y no a la inactivación del sistema enzimático diseñado por parte del sustrato.

Adicionalmente se puede afirmar que no se verifica cambio en el perfil de productos, aunque si se observan % de bioconversión levemente inferiores. En todos los casos la actividad predominante es la correspondiente a la producción de alcoholes con configuración *anti* (con independencia del agregado o no de glicerol (1) y del tiempo de ensayo).

### 3.3 Discusión de resultados obtenidos con la ejecución de la estrategia 1.

Los resultados obtenidos se consideran interesantes desde el punto de vista de su consistencia. Las nuevas verificaciones realizadas a las construcciones, previamente evaluadas, resultan satisfactorias en el sentido que mantienen la expectativa en relación a lograr la funcionalidad de la vía metabólica diseñada e implantada en *E. coli*.

Por otra parte, la no obtención de 1,2-propanodiol (2) en reacciones de biotransformación de glicerol (1) o de glicerol (1)/glucosa (6) indica la existencia de otras etapas del proceso pendientes de resolución.

En línea con lo anterior, la producción (marginal) de 1,2-propanodiol (2) cuando se recurre a metilglioxal (3)/glucosa (6) como co-sustratos de reacción, resulta *a priori*- consistente el hecho de que el aporte de metilglioxal (3) a la vía podría estar actuando como restricción.

La obtención de resultados desalentadores en los ensayos de biotransformaciones con la serie de biocatalizadores derivados de *E. coli* BL1(DE3) y *E. coli* BL1(DE3) $\Delta yqhE$ , aún luego de introducir diversas variantes en las condiciones de cultivo, **conduce finalmente al abandono de la estrategia 1.**

## Resultados obtenidos en la Estrategia 2

### 3.4 Construcción de biocatalizadores de la Estrategia 2

La construcción de vectores es común a ambas estrategias manteniendo validez lo expuesto en los apartados 3.1.1 a 3.1.4.

#### 3.4.1 Transformación de *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116) con vector pBT20- $\Delta$ bla-T7pol

Con el objetivo de obtener una cepa de *E. coli* FMJ39 que exprese la T7ARN polimerasa, se recurre al sistema descrito y gentilmente aportado por el Dr. Tung Hoang.<sup>372</sup> En primer término se transforma la cepa *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116) con el plásmido pBT20- $\Delta$ bla-T7pol.

La transformación se realiza por duplicado, utilizando a la cepa *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116) como control negativo sometida al proceso de electroporación sin plásmido y como control positivo a la cepa *E.coli*(pBT20- $\Delta$ bla-T7pol).

En la selección de transformantes, se recurre adicionalmente a la presión positiva ejercida por antibiótico, a la auxotrofia frente al DAP (**16**) de la cepa *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116). El crecimiento verificado de las cepas transformadas y del control positivo en medio LB-DAP (**16**)-Gm confirma la presencia del plásmido (pBT20- $\Delta$ bla T7pol) que codifica la resistencia a Gm. Por otra parte, la ausencia de crecimiento de todas las cepas a excepción del control positivo en medio LB, confirma la auxotrofia de las transformantes y del control negativo respecto al DAP (**16**), elemento al que se recurrirá para selección de conjugantes en la etapa siguiente.

#### 3.4.2 Conjugación de cepa *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116)(pBT20- $\Delta$ bla-T7pol) con *E. coli* FMJ39

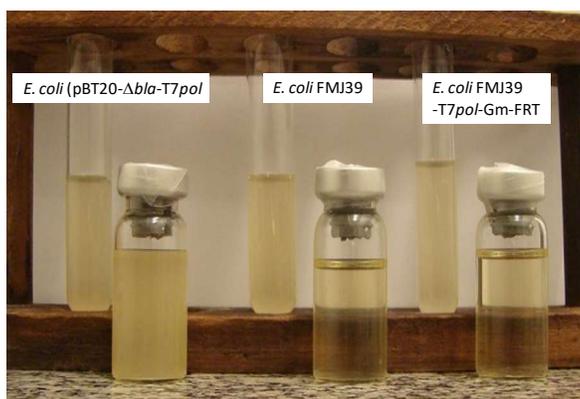
La conjugación se realiza siguiendo la técnica descrita en el apartado 5.1.12. A partir de cultivos con  $DO_{600nm} = 0,5$  de *E.coli*(HPS1-mob- $\Delta$ asd-pir116)(pBT20- $\Delta$ bla-T7pol) obtenidos en la etapa anterior en medio LB-DAP (**16**)-Gm y de *E.coli*FMJ39 en medio LB preparados por duplicado.

La recuperación de conjugantes y el aislamiento de cepas de *E.coli*FMJ39-T7pol-Gm-FRT se desarrolla sobre medio LB-Gm en ausencia de DAP(**16**) en la que las cepas con auxotrofia a ese compuesto (donantes) no crecen, y en las que la presión del antibiótico permite seleccionar a las células que han incorporado en su genoma la secuencia que codifica para resistencia a Gentamicina flanqueada por la secuencia que codifica los transposones. La característica de plásmido suicida (aportada por la secuencia R6K $\gamma$ ori a pBT20- $\Delta$ bla-T7pol)

adicionalmente garantiza que la resistencia a antibiótico demostrada por los conjugantes responde a la integración a nivel del cromosoma de la secuencia de la T7 ARN polimerasa.

### 3.4.3 Verificación de la condición de doble mutante de la cepa obtenida de la conjugación

A efectos de verificar que la cepa resultante de la conjugación *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT mantiene inalterada la condición de doble mutante (*ldh-pfl*)-con afectación de las capacidades lactato deshidrogenasa y piruvato formiato liasa- es que se ensaya su capacidad de fermentarglucosa (6) en medio mínimo M9 suplementado con acetato (10) (0,1 %). Se utiliza como control positivo a la cepa de partida *E.coli*FMJ39 y como control negativo a la cepa *E.coli*(pBT20- $\Delta$ *bla*-T7*pol*). Debe señalarse que en esta verificación la característica del control positivo implica ausencia de crecimiento y la del control negativo viabilidad en las condiciones ensayadas.



**Figura 3.17: Verificación de mantenimiento de condición doble mutante de cepas conjugadas.**

Con la finalidad de descartar posible incidencia del medio en las condiciones de crecimiento se realiza un ensayo secuencial en el que se utiliza el mismo medio de cultivo fraccionando, parte para su utilización en condiciones aerobias y parte para su uso anaerobio. Se inocula y se deja crecer aeróbicamente y del cultivo en crecimiento aerobio se extrae una alícuota para inocular el vial anaerobio dejando crecer en ambas condiciones.

A partir de la verificación de crecimiento aerobio y la ausencia de crecimiento anaerobio en medio M9 con glucosa (6) suplementado con acetato (10) se concluye que la cepa ha mantenido la condición de doble mutante lactato deshidrogenasa piruvato formiato liasa con posterioridad a incluir en su genoma la codificación completa del sistema de expresión T7.

### 3.4.4 Transformación de cepa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT con vectores pWS3, pPP8 y pWS4

Células electrocompetentes de la cepa obtenida anteriormente *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT son el punto de partida para la transformación con los plásmidos pWS3, pPP8 y pWS4 (cuya construcción se ha descrito en el marco de la Estrategia 1) de cara a la obtención de una nueva serie de biocatalizadores.

Se logran obtener de esta manera los biocatalizadores: *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS3); *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pPP8) y *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4).

### 3.4.5 Verificaciones sobre la serie de biocatalizadores construidos a partir de la cepa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT

Una vez obtenida la serie de biocatalizadores derivados de la cepa *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT, se procede a la verificación de que las construcciones logradas:

- i) mantienen las características esenciales de la cepa de partida con potencial utilidad en el trabajo futuro, a saber su condición de doble mutante (manteniendo afectadas las actividades lactatodeshidrogenasa y piruvato formiato liasa).
- ii) cuentan con sistemas de expresión controlables por el promotor T7 y que dichos sistemas son funcionales.
- iii) mantienen los perfiles de biotransformación descritos en bibliografía (los vectores de expresión con que se transformó a la cepa *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT presentan actividad en ese contexto).

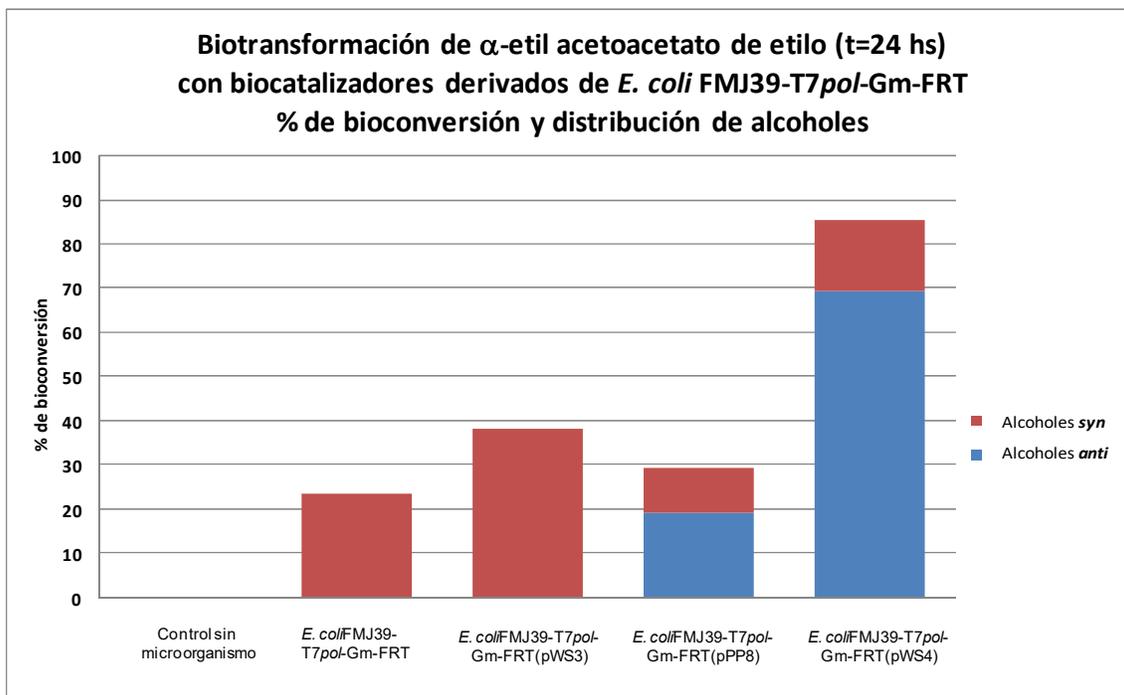
#### Verificación 1: Mantenimiento de la condición de doble mutante (*ldh-pfl*)

Esta verificación se realiza mediante confirmación del mantenimiento de la incapacidad de fermentar glucosa (6) aún con agregado de acetato (10) según fuera descrito en 3.4.4. Los resultados obtenidos son consistentes con el mantenimiento de la condición de doble mutante.

#### Verificación 2 y 3: Funcionamiento del sistema de expresión T7 polimerasa y mantenimiento del perfil de biotransformación original en este contexto

Ambas verificaciones se realizan en forma simultánea contrastando los resultados obtenidos en ensayos de biotransformación de  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) con *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pWS3), *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pPP8) y *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pWS4) con

los obtenidos a partir de la cepa *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT usada como control. Las actividades se contrastan con la obtenida por las cepas *E.coli*IJM105(pKTS3) y *E.coli*BL21(DE3) $\Delta$ *yqhE*(pPP4) según se discutiera en 3.1.8.



**Figura 3.18: Biotransformación de  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) con biocatalizadores construidos a partir de *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT.**

A partir de los resultados anteriores es posible caracterizar la actividad que estos biocatalizadores tendrán sobre el sustrato seleccionado y el alcohol que produzcan.

### 3.4.6 Discusión de los resultados parciales obtenidos

- Los resultados obtenidos permiten confirmar que las modificaciones genéticas introducidas en la cepa *E.coli*FMJ39 no han afectado las características principales que llevaron a seleccionarla como base para el desarrollo de la nueva serie de biocatalizadores, a saber mantiene afectada sus actividades lactato deshidrogenasa y piruvato-formiato liasa.
- Asimismo, los perfiles de los productos de biotransformación obtenidos confirman la existencia de actividad de las cepas construidas, acorde con la verificada en construcciones previas propias, o con el comportamiento descrito en bibliografía.
- Lo anterior constituye en forma indirecta una forma de verificación de que los sistemas de expresión controlados por el promotor T7 son funcionales en las cepas *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS3), *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pPP8) y *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4).

- En base a lo anterior se puede afirmar que se ha concluido con éxito la construcción del conjunto de biocatalizadores previsto en la Estrategia 2, estando en condiciones de proceder a enfrentar dichos catalizadores a los sustratos de interés para verificar si se recorre la ruta metabólica diseñada, en forma total, parcial, o si por el contrario las reacciones involucradas no son biocatalizadas por las construcciones diseñadas.

### **3.5 Biotransformaciones en el marco de la Estrategia 2**

#### **3.5.1 Biotransformación de glicerol (1) en régimen de células en crecimiento con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT**

En los ensayos de biotransformación de glicerol (1) en condiciones de células en crecimiento tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, recurriendo a los medio de cultivos M9, medio símil M9 para biotransformación de glicerol (1)(suplementado con extracto de levadura), no se observa la producción de 1,2-propanodiol (2).

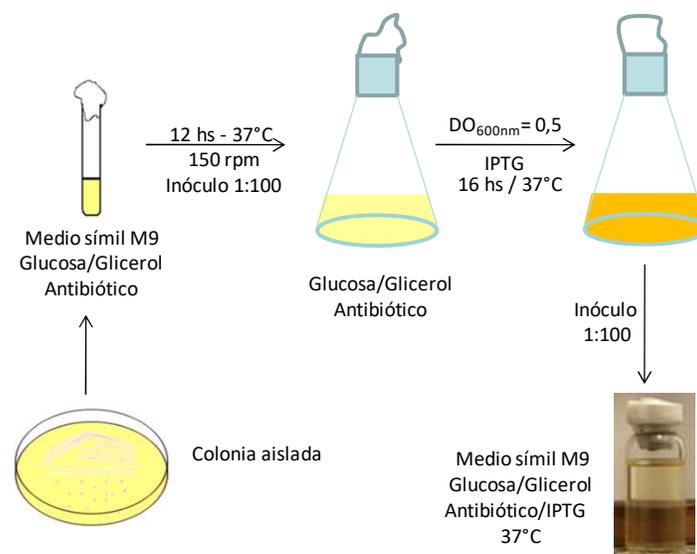
Adicionalmente, en estos ensayos se verifican dificultades en el crecimiento de las cepas cuando se recurre a glicerol (1) como única fuente de Carbono.

#### **3.5.2 Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6) en régimen de células en crecimiento con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT**

En la búsqueda de remover la dificultad de crecimiento de las cepas cuando se recurre a glicerol (1) exclusivamente se recurre a la utilización de glucosa (6) como co-sustrato. Los ensayos de biotransformación de glicerol (1) en presencia de glucosa (6) se realizan en forma secuencial, inicialmente en régimen de células en crecimiento en aerobiosis e inoculando a partir de allí el ensayo de células de crecimiento en condiciones anaerobias (Ver Figura 3.19).

Los resultados obtenidos en estos ensayos se resumen en la Tabla 3.5. En las biotransformaciones aerobias desarrolladas con el biocatalizador que co-expresa a Gre2p e Ypr1p se observa formación marginal de 1,2-propanodiol (2) (inferior al límite de cuantificación establecido por el rango de linealidad de la curva de calibración construida para este producto en HPLC) a partir de tiempo de reacción 6 hs. Para los restantes biocatalizadores no se observa formación de este producto.

En las biotransformaciones anaerobias se observa formación de producto en concentraciones inferiores al límite de cuantificación para todos los biocatalizadores construidos, no así para el ensayo desarrollado con la cepa control. Con la cepa que contiene el vector de expresión pWS4 se observa formación de producto a partir de las 2 horas.



**Figura 3.19: Esquema de biotransformaciones en secuencia aerobiosis - anaerobiosis.**

Si bien no es posible la conversión a g/L de producto, el área medida a tiempos 5 horas para la biotransformación con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pWS4) quintuplica a la obtenida para *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pWS3) y es 20 veces la alcanzada con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pPP8) (asignada arbitrariamente como uno a efectos de los cálculos de relación de áreas).

Estos hechos refuerzan los indicios anteriores respecto a la existencia de sinergia obtenida a partir de la co-expresión de ambos genes (Ver Figura 3.20).

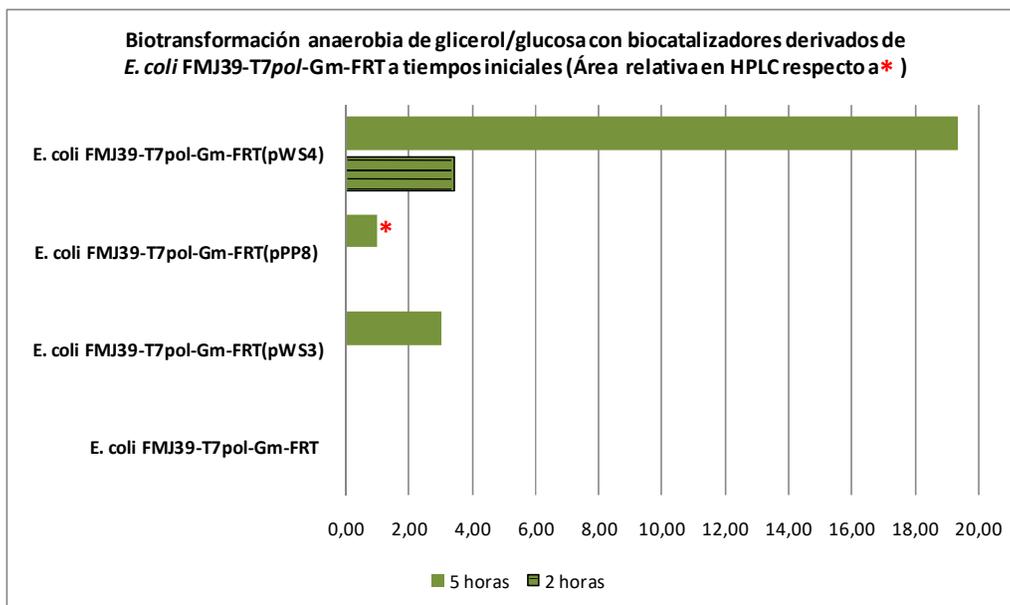
**Tabla 3.5: Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6) con biocatalizadores construidos a partir de *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT, células en crecimiento.**

Condición de ensayo		Producción de 1,2-propanodiol				OD <sub>600 nm</sub> (dil. 1/10)
		Tiempo en horas				
Entrada	Aerobiosis	2	6	24	72	
1	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	No	No	No	No	0,105
2	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS3)	No	No	No	No	--
3	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pPP8)	No	No	No	No	--
4	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS4)	No	Si (< LC)	Si (< LC)	Si (< LC)	0,339
Anaerobiosis						
5	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	No	No	No	No	0,040
6	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS3)	No	Si (< LC)	Si (< LC)	Si (< LC)	0,026
7	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pPP8)	No	Si (< LC)	Si (< LC)	Si (< LC)	0,280
8	<i>E. coli</i> FMJ39-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS4)	Si (< LC)	Si (< LC)	Si (< LC)	Si (< LC)	0,080

LC: Límite de cuantificación (cota inferior del rango lineal de la curva de calibración de 1,2-propanodiol).

Finalmente, la medida a las 72 hs de DO<sub>600nm</sub>, utilizada en este caso como una medida indirecta del crecimiento celular (pese a las limitaciones conocidas que el método presenta)

permite observar diferencias entre las cepas transformadas y el control en forma consistente con el papel asignado a la vía metabólica.



**Figura 3.20: Producción de 1,2-propanodiol (2) con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT en biotransformaciones anaerobias de glicerol (1)/glucosa (6) a tiempos iniciales.**

A partir de los resultados obtenidos en las biotransformaciones con células en régimen en crecimiento, que resultan por un lado alentadores por cuanto revelan la existencia de indicios confirmatorios respecto a la funcionalidad de la vía metabólica, pero muy modestos en materia de acumulación del producto objetivo, es que se resuelve avanzar en la búsqueda de condiciones para el desarrollo de estas biotransformaciones.

Distintos ajustes en las condiciones de ensayo son evaluados a efectos de lograr un incremento en el nivel de producción de 1,2-propanodiol (2) (variantes en la composición del medio de cultivo, formas de asegurar condición anaerobia, etc.). En ningún caso se logra un cambio sustancial en los resultados obtenidos.

### 3.5.3 Biotransformaciones iniciales con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT en régimen de células en reposo

Atendiendo a las características por las que se ha seleccionado la cepa de *E. coli* FMJ39 como base de las construcciones de los biocatalizadores se realizan, en principio, ensayos en régimen de células en reposo solo en anaerobiosis. A modo exploratorio se ensayan diferentes condiciones, optándose por el uso de buffer MOPS (15).

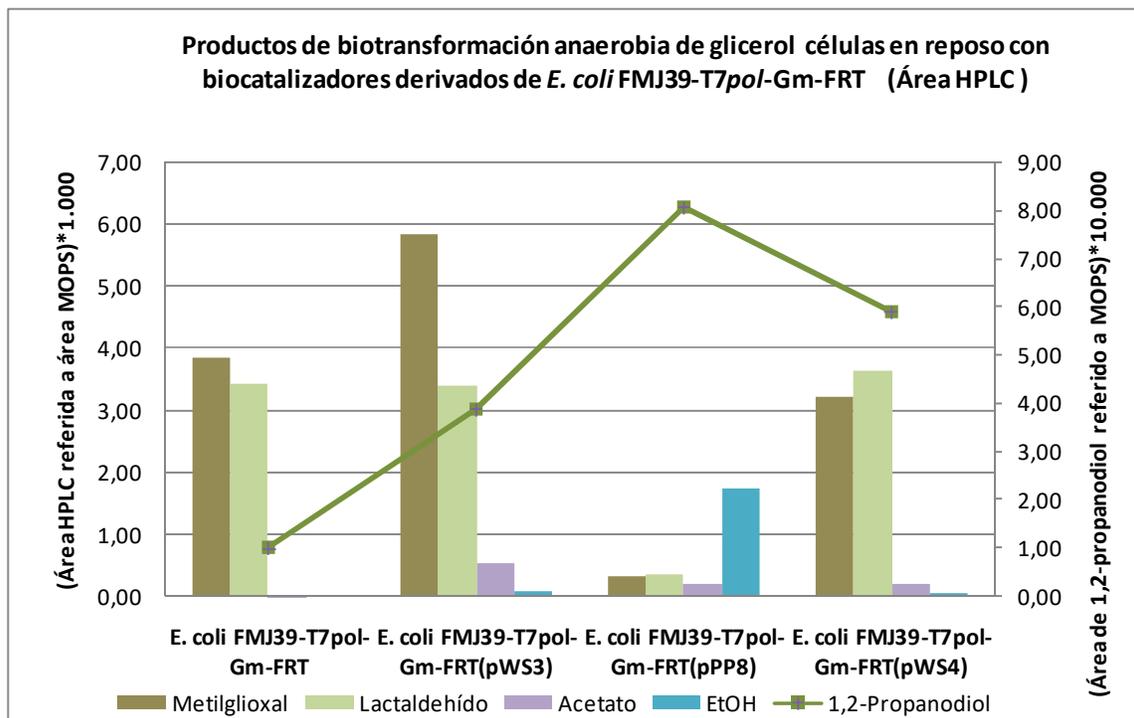
Al igual que en casos anteriores, se utilizan biotransformaciones de  $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5) para confirmar la funcionalidad de ambas enzimas con resultados satisfactorios.

### Biotransformación preliminar de glicerol (1)

En la gráfica siguiente se resumen los principales resultados obtenidos en las biotransformaciones de glicerol (1) (período 6 a 24 horas). Se observa que se logra producir en las condiciones ensayadas, aunque en proporciones muy reducidas, 1,2-propanodiol. Tal cual se ha señalado anteriormente, con el único fin de comparar niveles de producción a partir de cada biocatalizador es que se recurre al área obtenida en el cromatograma utilizando en este caso al buffer MOPS (15) como estándar interno.

Se debe alterar las condiciones de registro del cromatograma, ajustando a la baja el límite de integración en dos órdenes de magnitud.

Quizá el hecho más llamativo que surge del análisis de los resultados lo constituye el hallazgo de que se observa producción -aunque marginal- de 1,2-propanodiol (2) cuando el biocatalizador utilizado es la cepa control, consistente con los reportes más recientes referidos en el capítulo antecedentes.



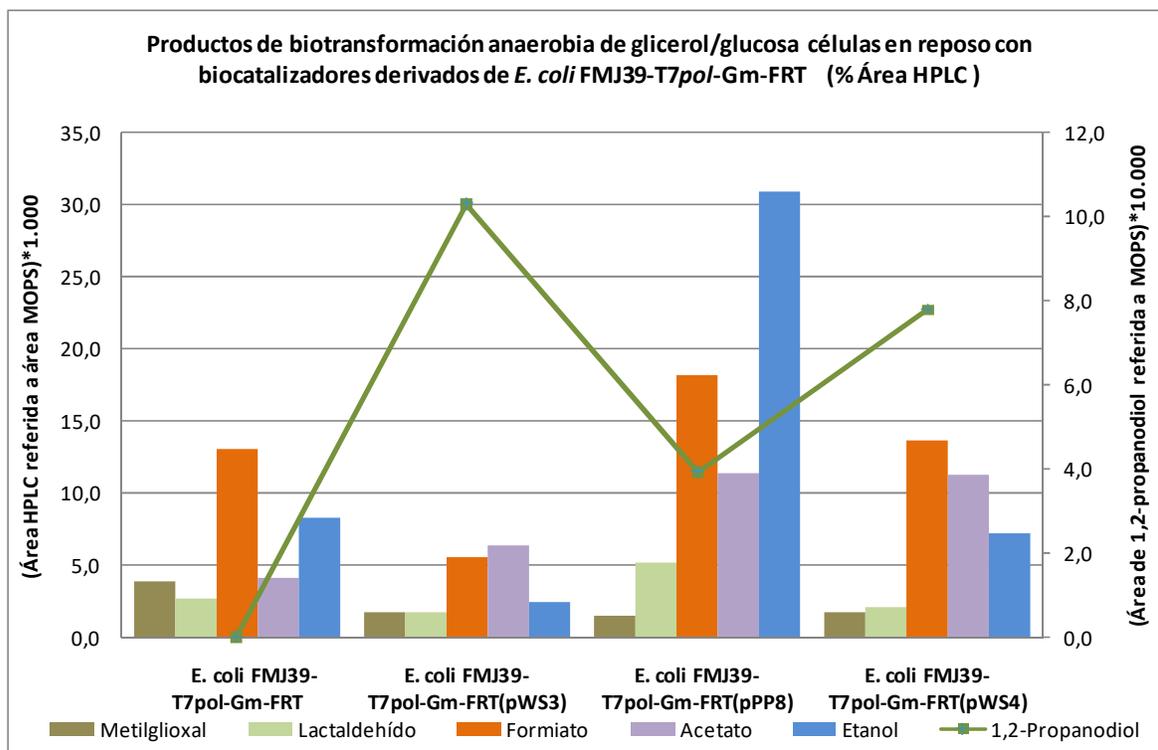
**Figura 3.21: Productos de biotransformación anaerobia de glicerol (1), régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT.**

Por otra parte las biotransformaciones realizadas con la serie de biocatalizadores construidos a partir de dicha cepa muestran, en todos los casos, un mayor nivel de producción del producto objetivo. El resultado más interesante lo constituye el obtenido con *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT (pPP8), en el que se observa la mayor producción de 1,2-propanodiol (2), la mínima producción de los restantes metabolitos. Adicionalmente con esta cepa se observa la producción de etanol (12) en concentración apreciable. (En la Figura 3.21 a efectos de poder apreciar los restantes metabolitos se representa la relación de áreas sobre 10 en el eje principal).

Finalmente, se debe señalar que se observa la presencia de los metabolitos intermedios de la vía metabólica implantada (metilglioxal (3) y lactaldehído (4)).

### Biotransformación preliminar de glicerol (1) y glucosa (6)

Los resultados obtenidos en las biotransformaciones de glicerol (1) utilizando glucosa (6) como co-sustrato en el período 6 a 24 horas se resumen en la Figura 3.22.



**Figura 3.22: Productos de biotransformación anaerobia de glicerol (1)/glucosa (6), régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT.**

La introducción de glucosa (6) como sustrato de biotransformación introduce cambios en el perfil de productos de biotransformación.

Sorprendentemente se observa, en estas condiciones la aparición de formiato como producto de reacción, producto no esperado considerando el genotipo de la cepa base de la construcción de los biocatalizadores.

Este hecho ha conducido a indagar acerca de las causas de la aparición de este producto, estando descrito que el gen *tdcE* que codifica para una  $\alpha$ -cetobutirato formiato-liasa presenta, durante crecimiento anaerobio a partir de glucosa (**6**) al 10 %, actividad piruvato formiato-liasa. El gen *tdcE* comparte el mismo operón con el gen *tdcD* que codifica para actividad acetato kinasa, típicamente producida durante la degradación de la treonina.<sup>377,378</sup>

Adicionalmente debe señalarse que si bien se ha descrito que la enzima TdcE acepta como sustrato al piruvato (**17**) con igual eficiencia que al  $\alpha$ -cetobutirato (**18**), la sobreexpresión de TdcE a niveles similares a los encontrados para Pfl en cepas aisladas de ambiente, no logra restaurar el crecimiento anaeróbico de mutantes *pfl*.<sup>379</sup> Hecho consistente con la verificación experimental descrita en 3.4.3.

El perfil de productos obtenidos resulta para todas las reacciones similar, si bien se observa nuevamente la diferencia respecto a la síntesis de etanol (**12**) por parte de *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pPPP8) probablemente vinculada a actividad de Gre2p sobre acetato (**10**) o acetaldehído (**28**). Otra diferencia, que podría señalarse es la reducción cualitativa en el nivel de metilglioxal (**3**) en las cepas transformadas frente al control. Lo anterior resultaría consistente con un buen desempeño del sistema de detoxificación implantado, y de la ruta propuesta.

Por otra parte, el desempeño relativo de los diferentes biocatalizadores presenta cambios respecto al observado cuando se biotransforma solamente glicerol (**1**), siendo en este caso el uso de la cepa que expresa a Ypr1p la que mayor concentración de 1,2-propanodiol (**2**) permite alcanzar. En cualquier caso, se reitera el resultado obtenido respecto a que todos los transformantes producen más diol que la cepa control, que en este caso se ubica por debajo del límite de integración (aunque cualitativamente se observa la existencia de señal).

Finalmente, las biotransformaciones realizadas con la combinación de sustratos muestran niveles de producción de 1,2-propanodiol (**2**) levemente superiores a los obtenidos cuando se biotransforma solamente glicerol (**1**). En cualquier caso, los niveles de producción continúan siendo muy bajos.

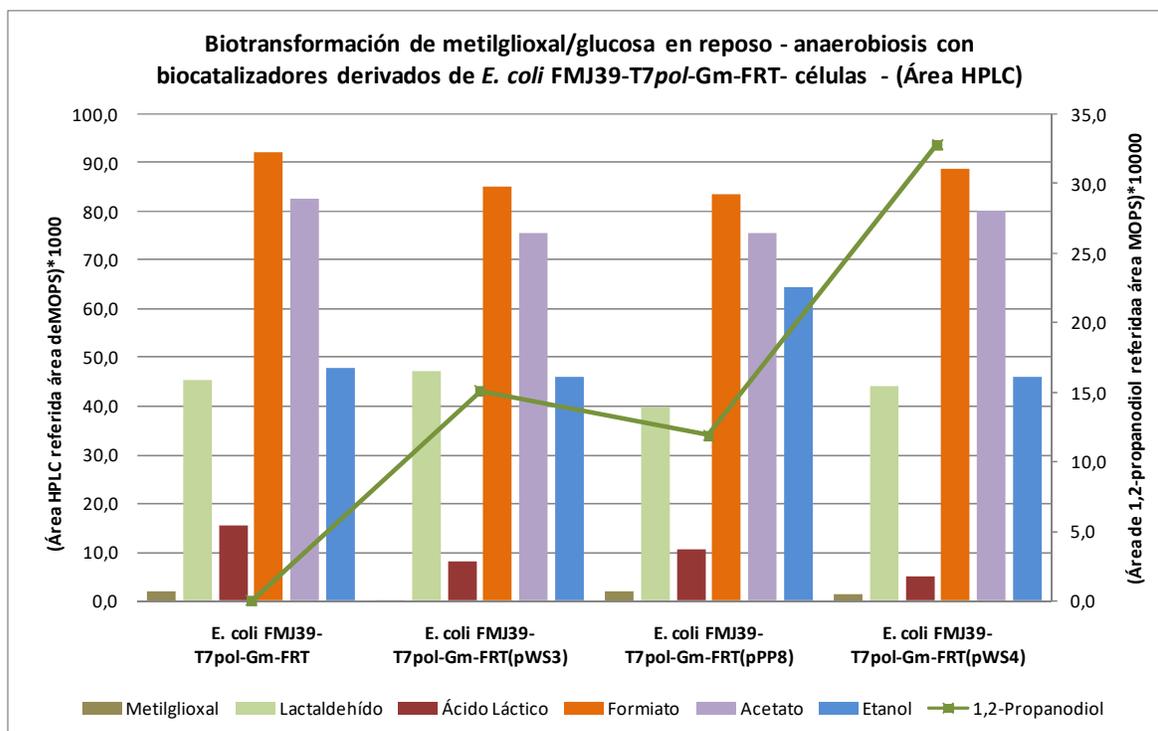
### Biotransformación preliminar de metilglioxal (3)

Siguiendo lo establecido en el capítulo estrategia se enfrenta a los biocatalizadores al intermediario clave de la vía metabólica diseñada, el metilglioxal (**3**). Los principales resultados obtenidos en estas biotransformaciones se discuten a partir de lo observado en la Figura 3.23.

Se observa formación de producto objetivo en todas las reacciones desarrolladas con las cepas transformadas, no registrándose formación con la cepa control (en los que se obtiene concentración por debajo del valor umbral de integración en los cromatogramas en HPLC). La mayor producción del diol corresponde a la cepa que expresa simultáneamente ambas enzimas.

Se verifica, en todos los ensayos la formación de ácido láctico (11) atribuible en principio a la existencia de vías alternativas de detoxificación del metilglioxal (3), siendo la más descrita el denominado by-pass del (R)-S-lactoilglutación.<sup>335,380</sup>

El ácido láctico (11) se acumula en mayor proporción en la biotransformación realizada con la cepa control y presenta una tendencia inversa a la verificada para la formación de 1,2-propanodiol (2) con los biocatalizadores construidos. Este hecho resulta simultáneamente consistente con el rol de regeneración de equivalentes de reducción asignado a la vía metabólica introducida (en las cepas transformadas) y a la necesidad de detoxificación que la cepa control presenta enfrentada a este compuesto altamente tóxico.

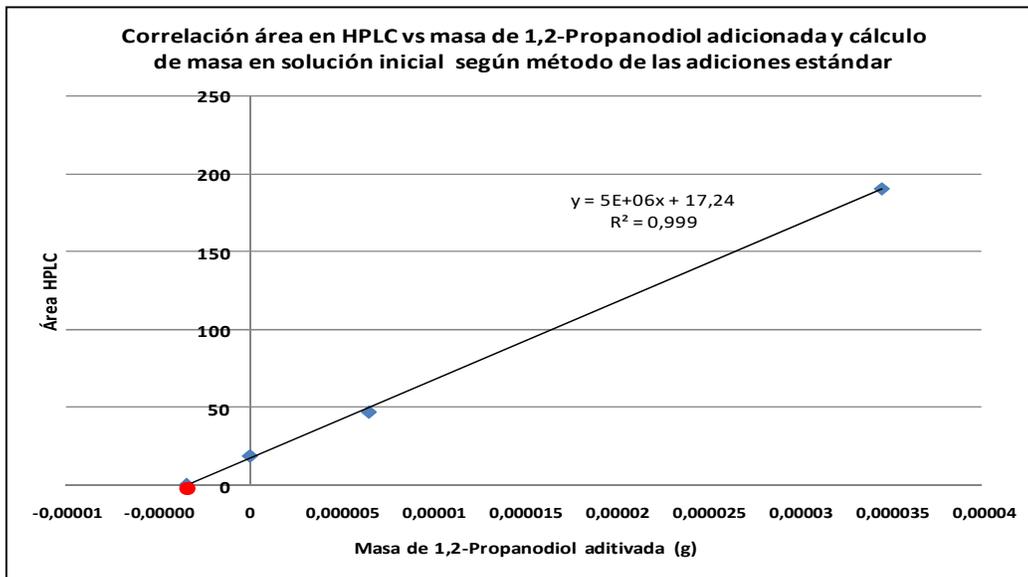


**Figura 3.23: Productos de biotransformación anaerobia de metilglioxal (3)/glucosa (6), régimen de células en reposo con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT.**

Si bien la concentración de 1,2-propanodiol (2) obtenida es notoriamente mayor a las verificadas anteriormente, aún permanece por debajo del rango de linealidad establecido

por la curva de calibración, razón por lo cual la estimación de la concentración de producto se realiza a través del método de adiciones estándar, co-inyectando con pequeños volúmenes de estándar comercial.

A efectos del cálculo se asume que el resto de los componentes se mantienen invariados por lo que se utilizan como referencia para el ajuste de los resultados de integración. Por este método se obtiene, en primer lugar, la confirmación de que el producto obtenido presenta un comportamiento consistente con el 1,2-propanodiol (2) (a cuenta de futuras acciones para la confirmación de identidad del producto según se describe en 3.6). Simultáneamente se obtiene una aproximación a la concentración alcanzada en la biotransformación con el biocatalizador que contiene el vector pWS4, la que se estima en los **0,09 g/L**.

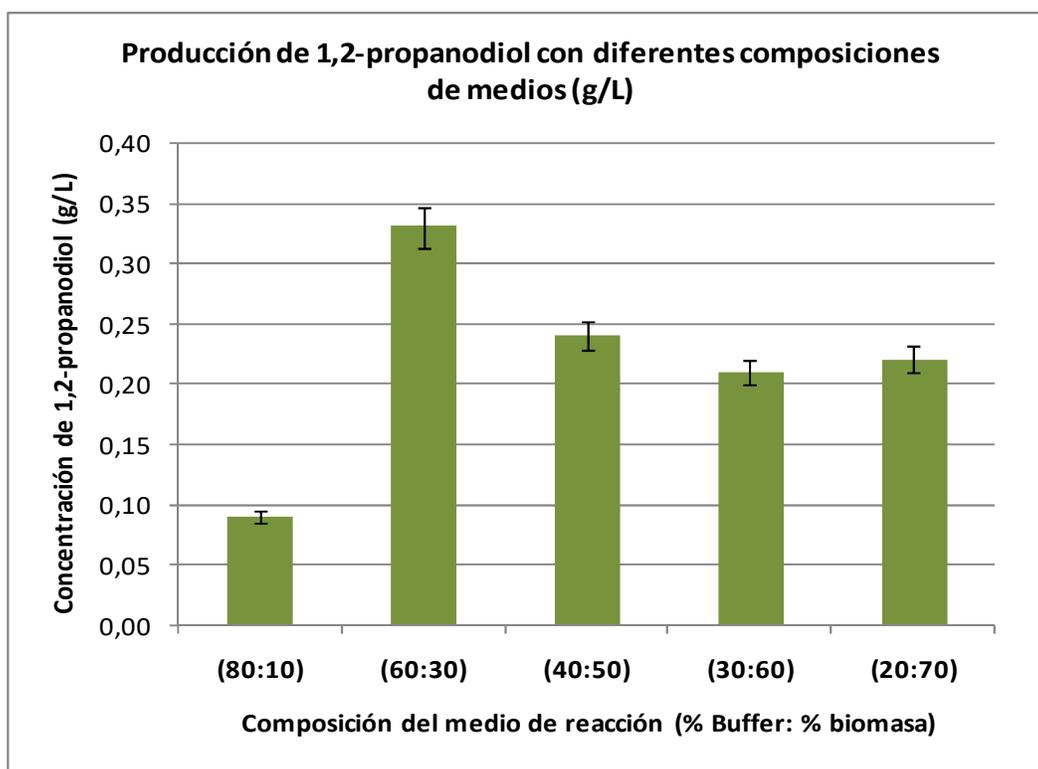


**Figura 3.24: Co-inyección de muestra de biotransformación con estándares de concentración conocida – Estimación de la concentración de 1,2-propanodiol (2) en muestra problema.**

### 3.5.4 Ajustes en condiciones de biotransformación anaerobia en régimen de células en reposo

Distintas condiciones en que se desarrollan las biotransformaciones, variando la relación buffer MOPS (15) y biomasa del biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) (elegido por ser el que permite obtener mayor concentración de producto) son evaluadas. La Figura 3.25 reúne los principales resultados obtenidos. Las condiciones ensayadas están expresadas como (% de buffer: % biomasa).

Se recurre al sustrato glucosa (6)/glicerol (1) por presentar mejores resultados que glicerol (1). La solución de partida presenta una concentración de 10 g/L de cada producto y su aporte se mantiene fijo en los ensayos en 10 % del volumen de reacción.



**Figura 3.25: Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6) con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) Producción de 1,2-propanodiol (2) vs diferentes relaciones buffer (15): biomasa.<sup>1</sup>**

Los resultados obtenidos permiten concluir que la composición que presenta mejor desempeño es (% buffer MOPS (15):% Biomasa) igual a 60:30. No resulta sorprendente que la producción de 1,2-propanodiol (2) presenta un máximo a niveles que “equilibran” la proporción de buffer y biomasa. Valores menores de biomasa podrían significar dilución del

<sup>1</sup> Valores de concentraciones y errores estimados para composiciones (80:10), (30:60) y (20:70)

sistema enzimático con la consecuente reducción en el rendimiento de reacción. Por otra parte, niveles superiores de biomasa en detrimento del volumen de buffer, podrían generar bien reducción de la capacidad de amortiguamiento del medio de reacción, que en consecuencia al avanzar la biotransformación no se mantenga el nivel de pH y se afecte la actividad del sistema enzimático (con efectos similares a los descritos en biotransformaciones en suero fisiológico) y/o un mayor reparto de los metabolitos entre el medio y la célula disminuyendo la concentración observada del producto.

La composición (% buffer MOPS (15): % Biomasa: % solución sustrato)= 60:30:10 se adopta salvo que se explicita lo contrario para la realización de los siguientes ensayos, hasta que el desarrollo de una optimización multivariable de producción de 1,2-propanodiol (2) permita encontrar condiciones diferentes que maximicen la producción.

### **3.5.5 Biotransformación de metilglioxal (3) con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) en presencia de glucosa (6)/glicerol (1) en diferentes concentraciones y modalidades de adición**

Las observaciones realizadas en las biotransformaciones anteriores aportan un primer resultado cualitativamente importante: las modificaciones genéticas introducidas a las cepas de partida modifican cualitativamente el desempeño de las mismas cuando se las enfrenta a los sustratos de interés.

Simultáneamente, generan inquietud respecto a conocer el origen de la o las restricciones que impiden alcanzar concentraciones mayores en las reacciones de biotransformación.

*A priori*, se identifican como potenciales causas o bien que la vía metabólica no sea funcional en forma completa o por el contrario que la restricción se ubique en el aporte de metilglioxal (3) a la misma.

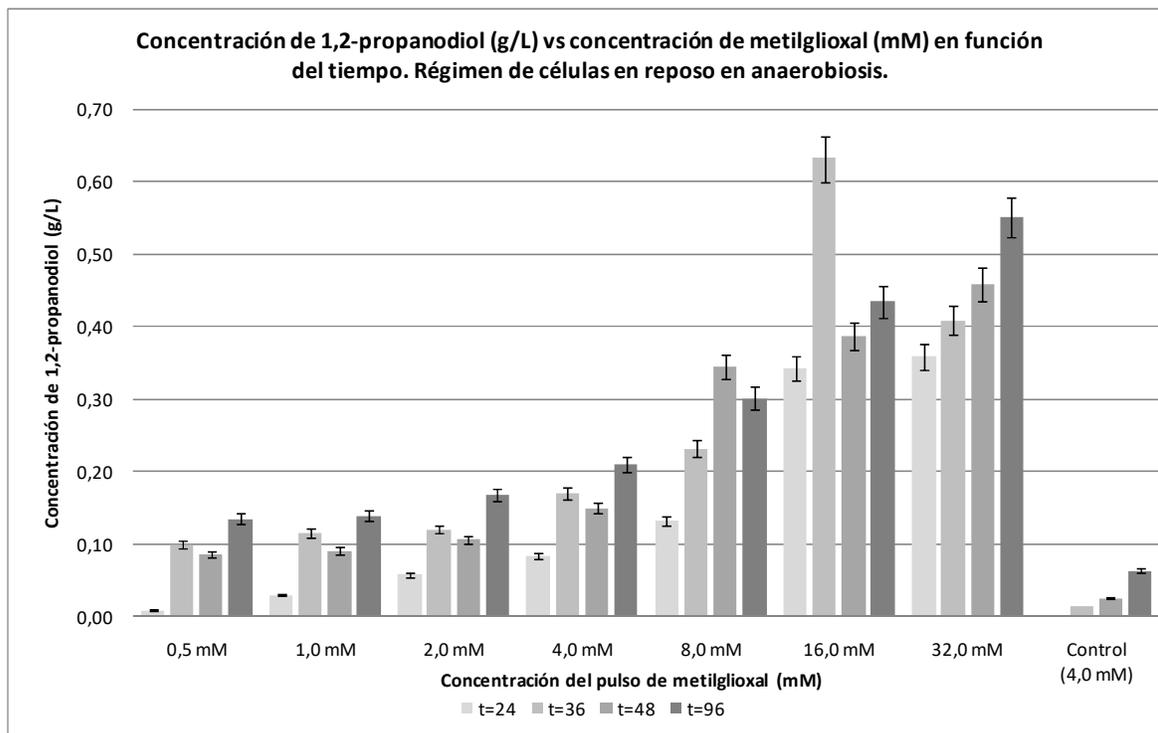
Atendiendo a estas observaciones se diseñan los siguientes ensayos, en los que se busca evaluar la obtención del producto objetivo a partir de distintas concentraciones de metilglioxal (3), glucosa (6) y glicerol (1), así como de diferentes condiciones de adición de los sustratos, en biotransformaciones en régimen de células en reposo en anaerobiosis, insumos necesarios para concluir respecto a la funcionalidad de la vía. Los ensayos se llevan a cabo con la cepa que tiene implantada la vía completa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4).

#### **3.5.5.1 Biotransformación de metilglioxal (3) agregado en forma de pulso en presencia de glicerol (1)/glucosa (6) con el biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo en anaerobiosis**

El ensayo se lleva a cabo con diferentes concentraciones de metilglioxal (3), en el rango 0.5 mM a 32 mM. Se utiliza como control la cepa *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT enfrentada a solución de metilglioxal (3) 4 mM. Se realizan muestreos a las 24 hs, 36 hs, 48 hs (previo a la

adición de un segundo aporte de sustrato en las mismas condiciones que el inicial) y a las 96 hs de reacción.

Los resultados de la producción de 1,2-propanodiol (**2**) expresado en g/L en los tiempos de muestreo para las distintas concentraciones de metilglioxal (**3**) (inicial) se resumen en la Figura 3.26.



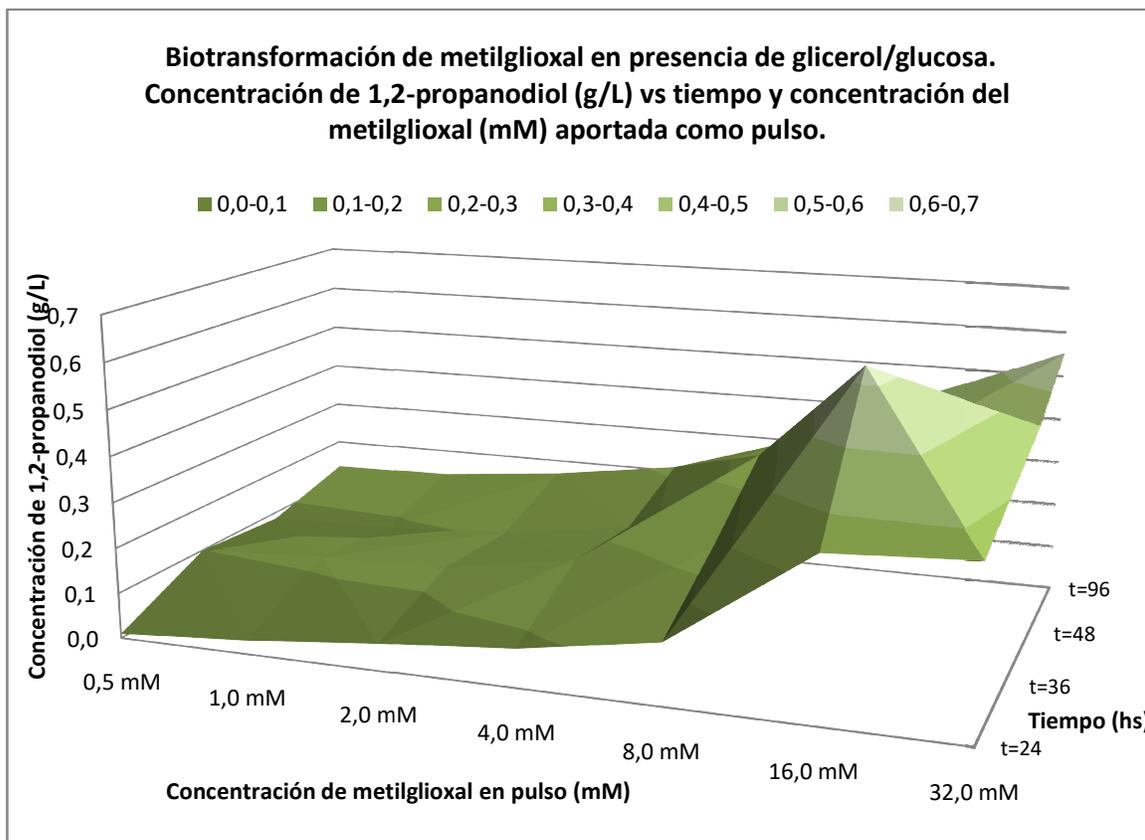
**Figura 3.26: Biotransformación de metilglioxal (**3**) en presencia de glicerol (**1**)/glucosa (**6**). Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Concentración de 1,2-propanodiol (**2**) (g/L) vs concentración aportada de metilglioxal (**3**) (mM) en función del tiempo.**

El análisis de los resultados permite visualizar que la producción de 1,2-propanodiol (**2**) se ve favorecida por la expresión conjunta de las enzimas Gre2p-Ypr1p. Cuando se compara el nivel de producción obtenido de 1,2-propanodiol (**2**) en cualquiera de las condiciones ensayadas se observan niveles de producción que varían -según las distintas concentraciones de sustrato utilizadas- entre 10 y 90 veces las obtenidas con la cepa control *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT.

Cuando la comparación de la producción de 1,2-propanodiol (**2**) se realiza para el mismo nivel de sustrato inicial (4 mM) el desempeño del biocatalizador diseñado resulta -según el tiempo de muestreo- entre 3 y más de 20 veces el observado para la cepa control como respuesta al pulso inicial. Mientras que, para el segundo pulso se observa un nivel de producción que aproximadamente cuadruplica el medido para la cepa control.

Lo anterior permitiría concluir que, en las condiciones ensayadas se verifica la expresión de las enzimas involucradas Gre2p e Ypr1p, lo que en principio resulta consistente con el hecho de que la vía metabólica insertada es funcional.

Por otra parte se observa que, en las condiciones ensayadas en general se obtiene mayor concentración de 1,2-propanodiol (2) a concentraciones de sustrato más elevadas.



**Figura 3.27: Superficie de respuesta. Concentración de 1,2-propanodiol (2) (g/L) vs tiempo (hs) y concentración inicial de metilglioxal (3) (mM) adición en pulso.**

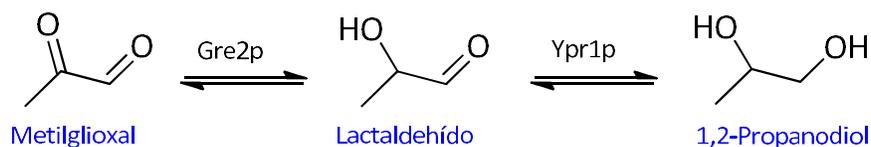
Finalmente, en cinco de las siete condiciones ensayadas la mayor concentración de producto se obtiene, a tiempo de reacción 36 horas (se excluye de la comparación el muestreo a 96 horas por presentar dos pulsos).

Integrando los resultados obtenidos para ambas variables (concentración de sustrato y tiempo de reacción) se puede construir la gráfica incluida en la Figura 3.27. En ella se representa la concentración en g/L de 1,2-propanodiol (2) como una superficie de respuesta dependiente de dos variables que se han ajustado en forma independiente, el tiempo de biotransformación y la concentración inicial de metilglioxal (3) en el o los pulsos de sustrato aportados.

La superficie obtenida presenta un máximo absoluto de 0,65 g/L de 1,2-propanodiol (2) ubicado en la zona de aporte del primer pulso para las siguientes condiciones de

biotransformación: concentración de metilglioxal (**3**) de 16 mM y tiempo de ensayo de 36 horas.

En la figura 3.28 se muestra la reacción que tiene lugar. Considerando la estequiometría de la misma es posible calcular para cada combinación tiempo y concentración el rendimiento molar ( $\eta_{m_t}$ ).



**Figura 3.28: Estequiometría biotransformación de metilglioxal (**3**) a 1,2-propanodiol.**

Se observa que en las condiciones de ensayo correspondientes a la menor concentración inicial de metilglioxal (**3**) se obtienen rendimientos molares superiores a 100 %. Este resultado, en principio llamativo, resulta consistente con la obtención de 1,2-propanodiol (**2**) a partir de metilglioxal (**3**) no solo adicionado externamente como sustrato de reacción, sino también sintetizado en rutas metabólicas existentes en el biocatalizador a partir de glicerol (**1**) presente en el medio. Si bien la misma situación podría estar ocurriendo a concentraciones adicionadas más altas es sensato considerar que resultaría enmascarada por el sustrato adicionado.

La tendencia de rendimientos molares resulta, en términos generales decreciente a medida que aumenta la concentración del metilglioxal (**3**) para un mismo tiempo de análisis.

A tiempo de reacción de 24 horas se observan los valores menores de rendimiento molar, siendo éste el tiempo en que la tendencia, adicionalmente, resulta más irregular. Por otra parte, a tiempo 36 horas (en concordancia con la mayor producción de 1,2-propanodiol (**2**)) se verifican los valores mayores de rendimientos molares ubicándose el máximo absoluto para la combinación de variables: concentración inicial de metilglioxal (**3**) de 0,5 mM a tiempo de reacción de 36 horas.

Por su parte, cuando se consideran los resultados obtenidos para rendimiento molar a las 96 horas de biotransformación, (las que se han calculado considerando no solo el aporte de sustrato en el pulso inicial sino también el pulso aportado a las 48 horas) se obtienen los resultados que se incluyen en la Figura 3.30, siendo posible observar una caída respecto a los rendimientos molares calculados para el tramo 0 a 48 horas.

Al igual que en el caso anterior se verifica en estas condiciones que los mayores rendimientos se obtienen a niveles de concentración de metilglioxal (**3**) menores. Para la concentración más baja adicionada se supera en el cálculo de  $\eta_{m_t}$  el 100 % lo que permite

concluir que por cada unidad de sustrato aportada y bioconvertida se biotransforman 0.8 unidades de metilgloxal (3) obtenidapor el biocatalizador a partir de glicerol (1) .

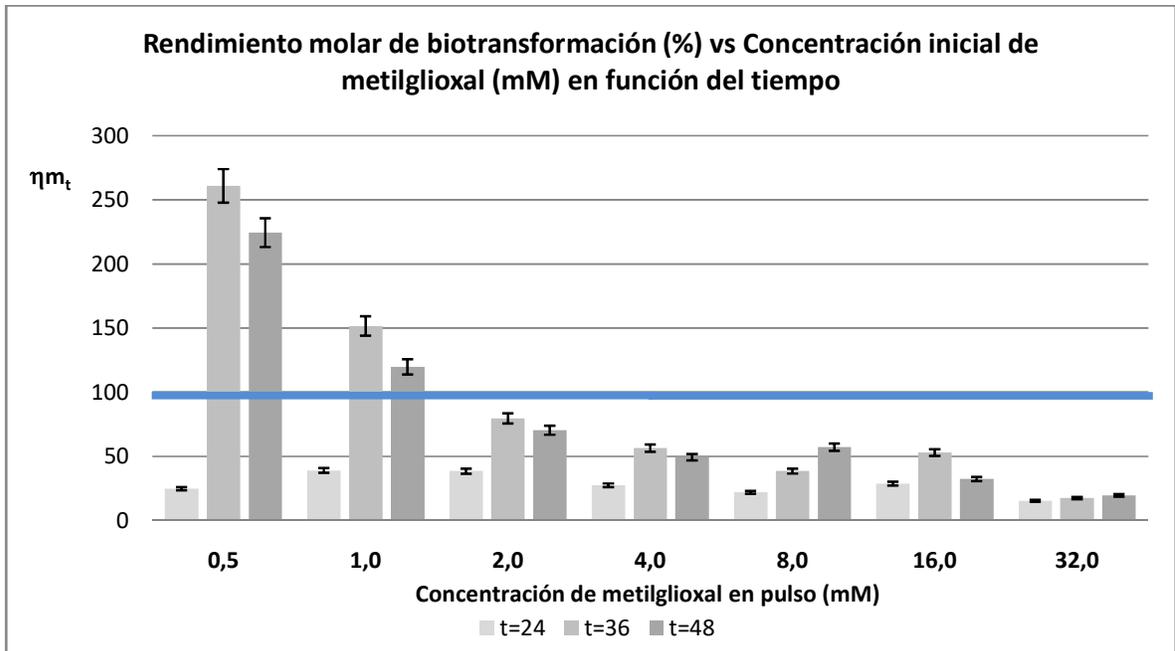


Figura 3.29:Rendimiento molar en biotransformación de metilgloxal (3) (pulso inicial).

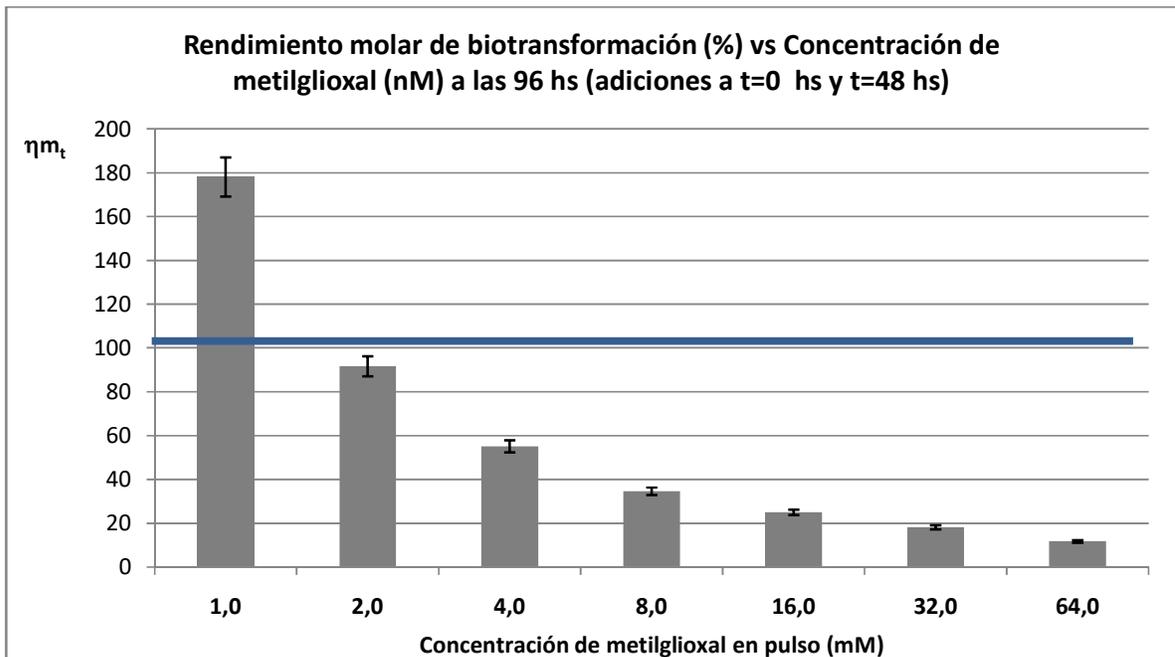
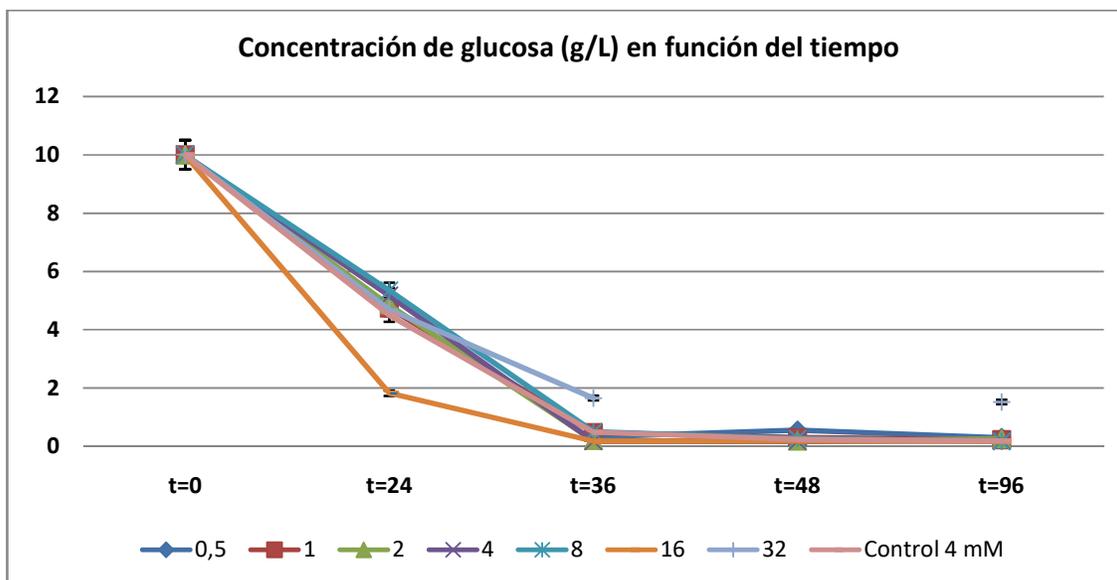


Figura 3.30: Rendimiento molar en biotransformación de metilgloxal (3) (segundo pulso).

## Evolución de glucosa (6) a lo largo de la biotransformación

En la Figura 3.31 se representa la evolución de la concentración de glucosa (6) a lo largo de estas biotransformaciones. A tiempo 36 horas en la mayoría de las condiciones ensayadas que se consideran, la glucosa (6) se consume prácticamente en forma total.



**Figura 3.31: Concentración de Glucosa (6) (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal (3)/ glucosa (6)/glicerol (1). Régimen de células en reposo evaluación en función del tiempo (hs) y concentración acumulada pulso inicial y pulso a las 48 hs de metilglioxal (3).**

Adicionalmente resulta interesante observar que, para las biotransformaciones realizadas con el biocatalizador *E. coli FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)* a tiempo 24 horas se obtiene la menor concentración de glucosa (6) para la concentración de metilglioxal (3) 16,0 mM, (condición en la que se logra el máximo absoluto de concentración de 1,2-propanodiol (2) a tiempo 36 hs).

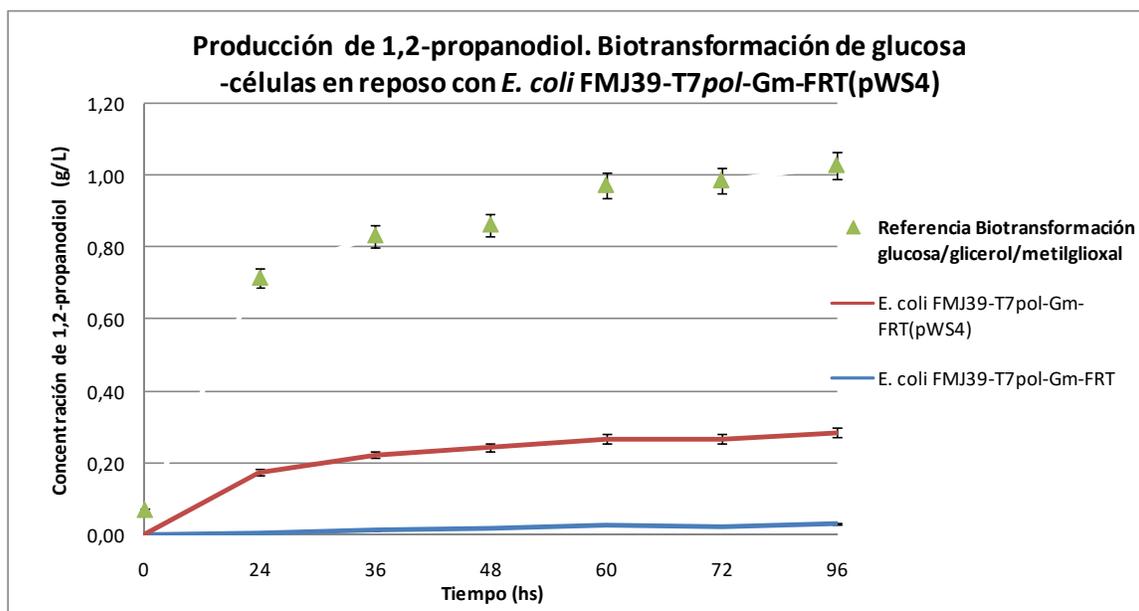
En otro orden, a partir de tiempo de reacción de 36 hs la concentración de glucosa (6) se reduce a niveles muy próximos a cero. Combinando esta observación, con la realizada al analizar la evolución de la concentración de 1,2-propanodiol (2) en función del tiempo y de la concentración inicial de sustrato, resulta razonable considerar la mayor conversión de metilglioxal (3) a 1,2-propanodiol (2) se produciría en presencia de glucosa (6), hecho que resultaría consistente con la reducción de producción de 1,2-propanodiol (2) verificada en la casi totalidad de los casos entre 36 y 48 hs.

El resultado anterior resulta consistente con la utilización de la glucosa (6) en la regeneración de equivalentes de reducción producidos en las reacciones involucradas -entre otras-, aquellas pertenecientes a la vía metabólica aportada por el plásmido pWS4 al biocatalizador utilizado en estas reacciones de biotransformación. Simultáneamente deja abierta la interrogante acerca del papel que la glucosa (6) está jugando en la reacción,

pudiendo interpretarse su rol en la regeneración de cofactores o directamente como sustrato en la producción de 1,2-propanodiol (**2**).

Con la finalidad de calibrar la importancia del co-sustrato en la reacción de biotransformación se desarrolla un nuevo ensayo, en el que se realiza la reposición de glucosa (**6**) a partir de las 24, 36, 48, 60 y 72 horas con el fin de evitar su agotamiento. La concentración de 1,2-propanodiol (**2**) resulta a las 96 horas de reacción un 35 % superior a la observada en el ensayo sin reposición de glucosa (**6**).

Por otra parte, se evalúa la producción de 1,2-propanodiol (**2**) en la biotransformación de glucosa (**6**) exclusivamente (Ver Figura 3.32).



**Figura 3.32: Concentración de 1,2-propanodiol (**2**) (g/L) en función del tiempo. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Biotransformación de glucosa (**6**).**

En esta biotransformación se observan importantes diferencias en los resultados obtenidos cuando se utiliza la cepa control y la cepa transformada. En el primer caso prácticamente no se obtiene producto a ningún tiempo de reacción, por su parte, con el biocatalizador que expresa la ruta Gre2p-Ypr1p la obtención de 1,2-propanodiol (**2**) a partir de glucosa (**6**) es notoriamente menor que la que se obtiene a partir de glicerol (**1**)/glucosa (**6**)/metilglioxal (**3**) (representada como referencia). La acumulación del producto objetivo se incrementa hasta tiempos próximos a 36 a 48 horas manteniéndose a partir de ese momento relativamente estable. Por su parte a las 96 horas se observa glucosa (**6**) remanente.

El conjunto de resultados obtenidos serían consistentes con el rol asignado con anterioridad a la glucosa (**6**) como aportante de cofactores reducidos a través de la glicólisis, hecho que

permite al ser utilizado conjuntamente con el glicerol **(1)** alcanzar el balance redox necesario para el funcionamiento del sistema.

No obstante lo anterior, los resultados permitirían afirmar que la glucosa **(6)** por si sola no es capaz de explicar la totalidad del 1,2-propanodiol **(2)** obtenido. Esta afirmación estaría respaldada por la información contenida en las Figuras 3.26 y Figura 3.31, donde es posible observar la respuesta del sistema a la adición de un nuevo pulso de metilglioxal **(3)** a las 48 horas y verificación a las 96 horas un incremento en la acumulación del diol (período en que no existe glucosa **(6)** en el medio). Este incremento estaría asociado a un aporte de NADH realizado probablemente a partir de la oxidación de glicerol **(1)**.

En la misma dirección, los resultados alcanzados en el ensayo de biotransformación de glucosa **(6)** como único sustrato permiten observar que, aún en presencia remanente del azúcar la producción del diol se detiene.

El metilglioxal **(3)** sería el sustrato predominante en esta reacción, y que tanto el glicerol **(1)** como la glucosa **(6)** aportarían como sustratos para la producción de 1,2-propanodiol **(2)** en menor medida.

### **Evolución de Glicerol (1)**

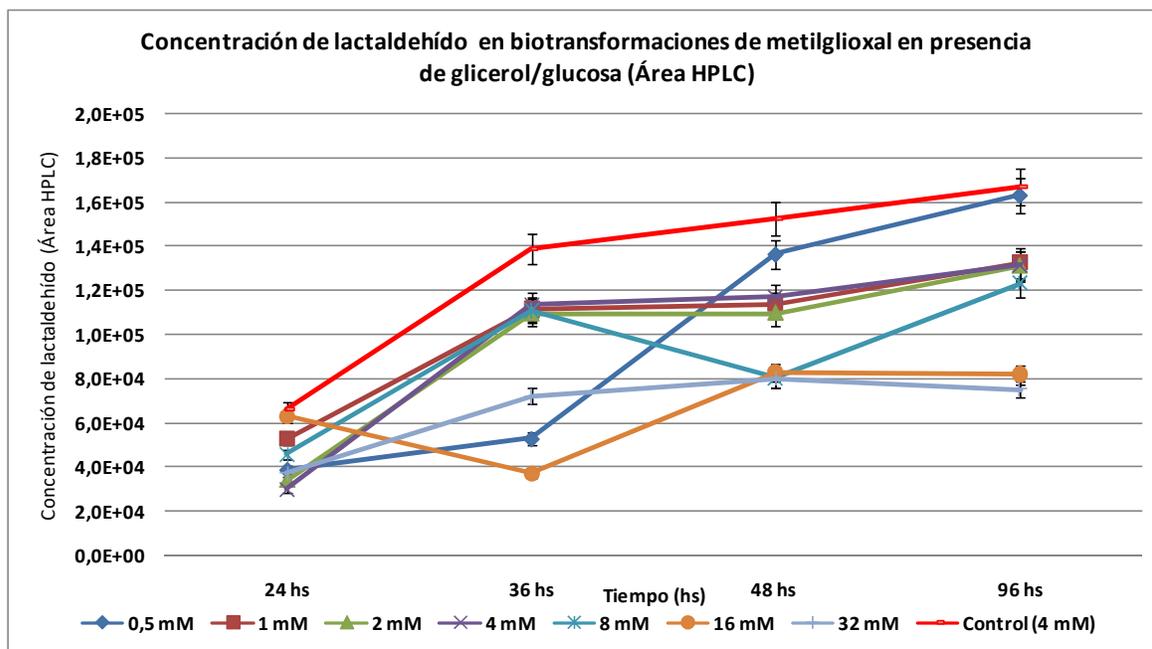
En el caso de la evolución de la concentración de Glicerol **(1)**, no es posible realizar su seguimiento por HPLC en las condiciones regulares de ensayo (fase móvil  $H_2SO_4$  0,005 N), considerando que a lo largo de la biotransformación, se acumula ácido láctico **(11)**, producto que no logra resolverse variando temperatura y presión en las distintas cromatografías ensayadas. La sustitución de la fase móvil por ácido fórmico **(13)** permite la cuantificación de este compuesto. No obstante lo anterior, la medida del glicerol **(1)** consumido (obtenido por diferencia de la concentración inicial y condición final) resulta menor a lo sumo del orden del error de dicha determinación, por lo que no reúne las condiciones para uso en el reporte de resultados ni en los cálculos de indicadores.

### **Evolución de lactaldehído (4)**

En la gráfica siguiente se muestran los resultados obtenidos para concentración relativa de lactaldehído **(4)** en función del tiempo para las distintas condiciones de ensayo en las que se realizó el agregado en forma de pulso inicial de metilglioxal **(3)**.

Respecto a este intermediario de reacción corresponde señalar que, al no disponerse de estándar comercial se desarrolló la síntesis quimio-enzimática (recurriendo a *S. cerevisiae* o *Daucus carota*) y química del producto, lográndose asignar el producto en los cromatogramas de HPLC (los resultados se presentan en el apartado 3.9). No obstante lo anterior, la pureza del producto obtenido no permitió su cuantificación. Este hecho conduce a que la evolución de la concentración de lactaldehído **(4)** sea expresada solamente en forma relativa (como área en cromatogramas de HPLC).

Es posible observar como tendencia general que, a medida que transcurre el tiempo, luego de un aumento inicial verificado en las primeras 36 horas de reacción, la concentración de este producto en el medio tiende a estabilizarse independientemente de la concentración de sustrato que se considere, para luego verificar un nuevo incremento como consecuencia del agregado de nuevo pulso de metilglioxal (3) (ver Figura 3.33).



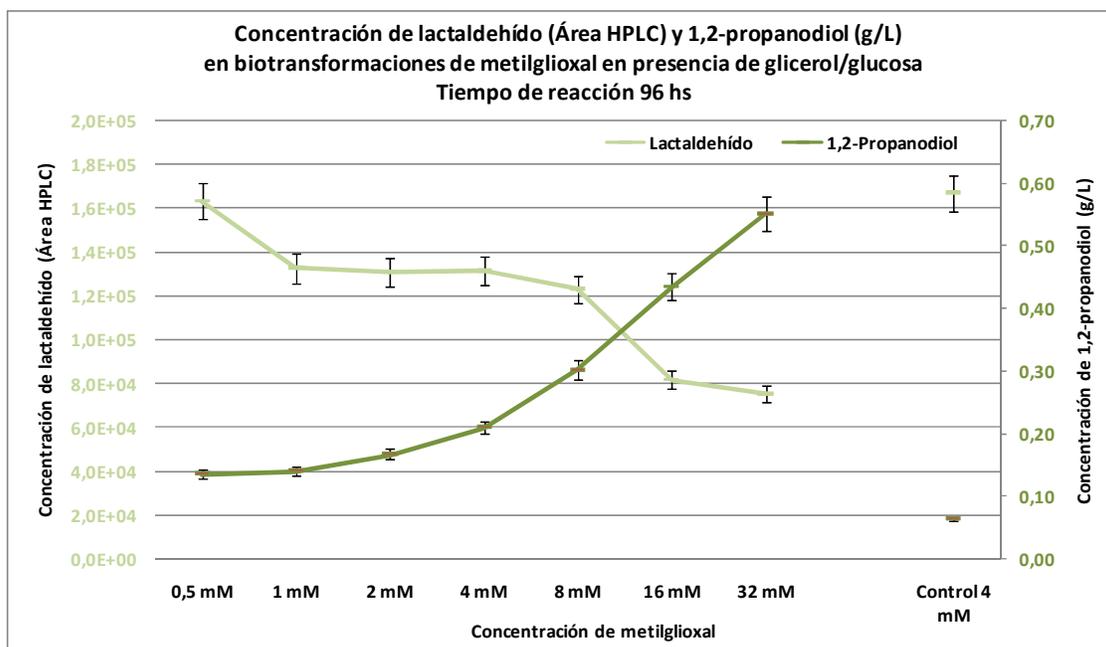
**Figura 3.33: Concentración de lactaldehído (4) (Área HPLC) en biotransformaciones de metilglioxal (3)/glucosa (6)/glicerol (1). Régimen de células en reposo evaluación en función del tiempo y concentración inicial de metilglioxal (3).**

Cabe destacar que la única excepción encontrada a la tendencia descrita corresponde a las condiciones de biotransformación donde se verifica el máximo de producción de 1,2-propanodiol (2) (Concentración de metilglioxal (3): 16 mM, Tiempo: 36 hs), en la que se observa disminución del referido intermediario a tiempo de reacción 36 horas. Lo anterior estaría reafirmando el rol del lactaldehído (4) como intermediario hacia la producción de 1,2-propanodiol (2).

Por otra parte se verifica que, a mayor concentración adicionada de metilglioxal (3), menor resulta ser la concentración (relativa) de lactaldehído (4) en el medio una vez concretado el agregado de los dos pulsos (a tiempo inicial y a tiempo 48 hs), alcanzándose a tiempo 96 hs un ordenamiento perfecto de Concentración de lactaldehído (4) vs Concentración de metilglioxal (3) inicial. La tendencia verificada a este tiempo de reacción resulta opuesta a la anteriormente descrita para el 1,2-propanodiol (2). (Ver gráfica 3.34).

Lo anteriormente descrito resulta consistente con el rol del lactaldehído (4) como intermediario hacia la producción de 1,2-propanodiol (2) confirmada a partir de ensayos de

GC-quiral y GC-MS (con SPME) en los que se logra la identificación del lactaldehído (4) como intermediario de reacción contra estándar verificado por RMN. (Información incluida en Anexo II).



**Figura 3.34: Concentración de lactaldehído (4) (Área HPLC) y 1,2-propanodiol (2) (g/L) en biotransformación de metilglioxal (3)/glucosa (6)/glicerol (1). Régimen de células en reposo evaluación en función de concentración de metilglioxal (3) (mM) a 96 hs.**

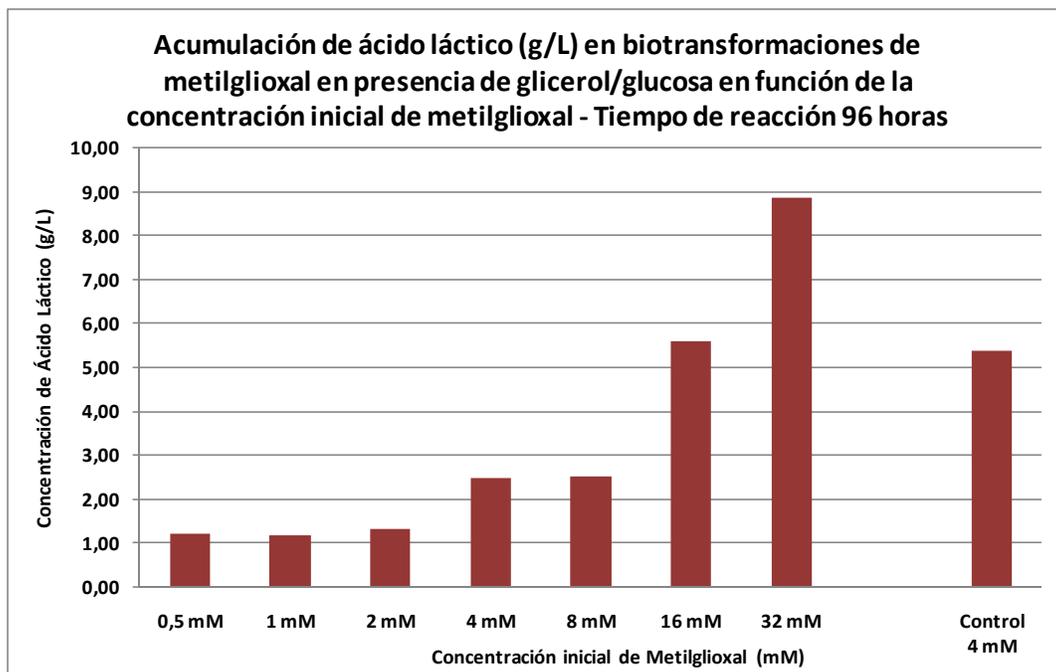
Finalmente, resulta llamativo que todas las curvas de los distintos ensayos quedan bajo una envolvente que puede construirse a partir de los resultados obtenidos para la producción de lactaldehído (4) por parte del biocatalizador *E. coli FMJ39-T7pol-Gm-FRT* sin transformar (utilizado como control negativo). Este comportamiento podría tener relación con el establecimiento de equilibrios en los que participan el metilglioxal (3), el ácido láctico (11) y el lactaldehído (4).

Los resultados anteriores mostrarían diferencias entre los dos pasos de biocatálisis involucrados en la biotransformación. Si bien ambos pasos resultan necesarios el paso catalizado por de Ypr1p resultaría ser el determinante, atendiendo al hecho de que en las condiciones con menores niveles de producción de 1,2-propanodiol (2) se verifica mayor nivel de acumulación de lactaldehído (4), intermediario de la reacción.

### Cuantificación de ácido láctico (11)

El producto acumulado a lo largo de la reacción de biotransformación a tiempo intermedio entre lactaldehído (4) y glicerol (1) ha sido caracterizado a través de: coinyección en HPLC y Espectroscopía de Masas por Inyección Directa (MS-ID), sobre eluido obtenido a partir de

HPLC semi-preparativo previamente liofilizada. Este producto ha sido identificado como ácido láctico (11).

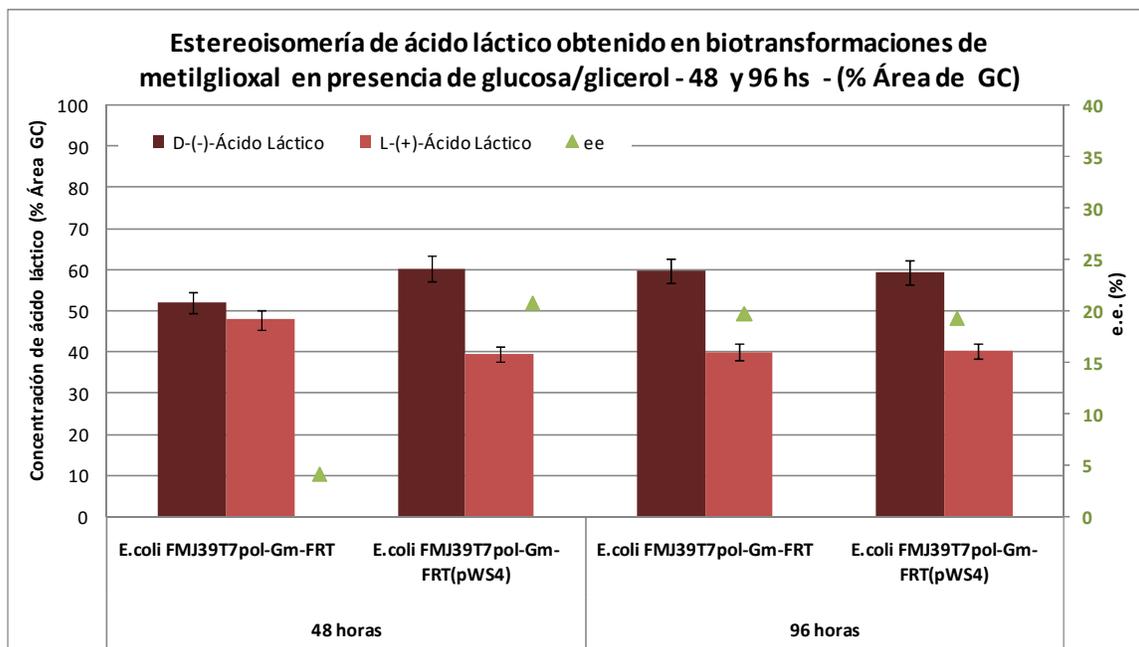


**Figura 3.35: Concentración de ácido láctico (11) (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1) /glucosa (6) en función de concentración de metilglioxal (3). Régimen de células en reposo en anaerobiosis- evaluación a 96 horas.**

Este producto de reacción en los cromatogramas obtenidos en HPLC en las condiciones estándar de seguimiento se observa inicialmente como hombro asociado al pico del glicerol (1). Se intentan-sin éxito- diversas variantes de resolución de estos picos, lográndose el objetivo al utilizar como fase móvil  $\text{CH}_2\text{O}_2$  en concentración 25 mM, manteniendo el resto de las condiciones de ensayo cromatográfico. Al reiterar los ensayos en las nuevas condiciones cromatográficas, se llega a los resultados que pueden observarse en la Figura 3.35.

La producción de ácido láctico (11) puede resultar inicialmente sorprendente, considerando que la selección de la *E. coli* FMJ39 como cepa de partida de todas estas construcciones reposa-entre otros-en el supuesto de que el hecho de presentar autada (anulada) la capacidad de producción de ácido láctico (11) a partir de piruvato (17), aportaría condiciones favorables para la obtención del producto objetivo, al aportar una vía alternativa a la regeneración de equivalentes de reducción obtenidos en etapas previas de la vía metabólica. No obstante lo anterior, al considerar las vías metabólicas presentes en *E. coli* es posible identificar rutas alternativas que conducirían a la aparición de este producto tanto a partir de la dismutación del lactaldehído (4) obtenido como intermediario de reacción así como a partir de metilglioxal (3) recorriendo el denominado by-pass del (R)-S-lactoilglutación.<sup>335</sup>

El ácido láctico (**11**) podría eventualmente convertirse en un camino para el agregado de valor inicialmente no previsto pero alineado con el objetivo del trabajo (basado en la incorporación de centros quirales como forma de valorización).



**Figura 3.36: Estereoisomería del ácido láctico (**11**) (% Área ) obtenido en biotransformaciones de metilglioxal (**3**) en presencia de glucosa (**6**)/glicerol (**1**). Derivatizado a metilésteres.**

La determinación de la estereoisomería del ácido láctico (**11**) obtenido en las biotransformaciones se intenta -sin éxito- a través de HPLC Quiral. La resolución de enantiómeros del ácido láctico (**11**) es alcanzada mediante Cromatografía Gaseosa quiral con Columna Mega-Dex Dac ensayando el producto de derivatización (metilésteres).

Los resultados, que se resumen en la Figura 3.36, que son consistentes con lo descrito en la bibliografía, permiten confirmar que el producto obtenido carece de interés para la estrategia de valorización definida por no tratarse de un producto ópticamente puro (e.e. ≈ 20 %).<sup>380</sup>

### Cuantificación de ácido fórmico (**13**) y etanol (**12**)

La realización de ensayos orientados a determinar la identidad del producto finalmente confirmado como ácido láctico (**11**) permite en forma casual la obtención de indicios para la asignación del producto ácido fórmico (**13**) (inicialmente no buscado). Es así que, al reiterar el análisis de las muestras previamente ensayadas en fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en fase móvil CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa un perfil de cromatograma idéntico, salvo por la resolución de los picos glicerol (**1**) -ácido láctico (**11**) y por la desaparición del pico sin asignar eluido a los 19 minutos

aproximadamente. Este comportamiento (atribuido a que el producto a determinar resulta indistinguible con la fase móvil) lleva a incluir al ácido fórmico (**13**) como posible producto. La confirmación de identidad de este producto se realiza finalmente co-inyectando estándar comercial con muestra de biotransformación en fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Paralelamente se observa la formación de etanol (**12**) a bajas concentraciones.

Los resultados obtenidos podrían responder, tal como se analizó en 3.5.3, a la acción de la enzima TdcE sobre piruvato (**17**), produciendo formiato (**13**) y acetato (**10**) en ausencia de Pfl.

### **Balance de Carbono y de Equivalentes de Reducción en ensayo adición de pulso**

Para las condiciones ensayadas se procede a realizar un balance de Carbono y balance de equivalentes de reducción siguiendo el Método del H disponible.<sup>381</sup> (Ver en Figura 3.37 un ejemplo a título demostrativo).

Asumiendo -aún en conocimiento de que se trata de una simplificación de una realidad más compleja- que los únicos productos obtenidos son exclusivamente los listados se obtiene un nivel de ajuste en el que la diferencia entre sustratos y productos se ubica en un 15 % en el balance de Carbono y en un 11 % en balance de equivalentes de reducción.

Finalmente, en la Figura 3.38 se ensambla para el tiempo 96 hs el conjunto de información que ha sido analizada previamente en forma parcial.

**Figura 3.37: Balance de Carbono y balance de equivalentes de reducción. Biotransformación de metilglioal (3) en presencia de glucosa (6)/glicerol (1) en anaerobiosis, células en reposo, adición en pulso de metilglioal (3), tiempo 96 hs.**

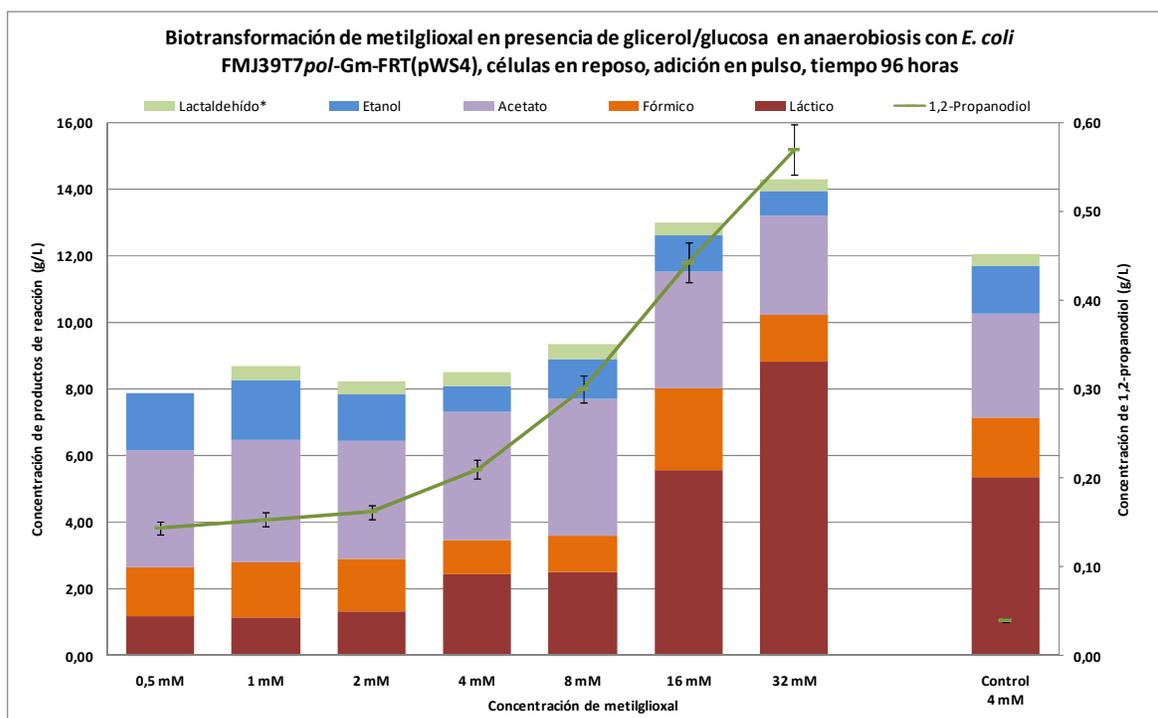
<b>BALANCE DE CARBONO</b>								
Sustrato	Concentración (g/L)	Voúmen (L)	masa (g)	PM	moles (g/PM)	n° mMoles	mMoles C	
Glicerol (*)	1,51	1,00E-02	1,51E-02	92,09	1,64E-04	0,16	0,5	
Glucosa	3,48	1,00E-02	3,48E-02	180,16	1,93E-04	0,19	1,2	
Metilglioal(**)				72,06		0,64	1,9	
* estimado pese a error en la medida, ** 2 pulsos de concentración 32 mM							<b>Total reactivos</b>	<b>3,6</b>
Producto	Concentración (g/L)	Voúmen (L)	masa (g)	PM	moles (g/PM)	n° mMoles	mMoles C	
Ácido Láctico	8,84	1,00E-02	8,84E-02	90,08	9,81E-04	0,98	2,9	
Ácido Acético	0,65	1,00E-02	6,50E-03	60,05	1,08E-04	0,11	0,2	
Lactaldehído (*)	0,33	1,00E-02	3,30E-03	74,08	4,45E-05	0,04	0,1	
Ácido Fórmico	1,41	1,00E-02	1,41E-02	46,03	3,06E-04	0,31	0,3	
1,2-Propanodiol	0,53	1,00E-02	5,30E-03	76,09	6,97E-05	0,07	0,2	
Etanol	0,76	1,00E-02	7,60E-03	46,07	1,65E-04	0,16	0,3	
* Estimado igual que 1,2-propanodiol							<b>Total productos</b>	<b>4,1</b>
							<b>Diferencia (%)</b>	<b>14</b>

<b>BALANCE DE EQUIVALENTES DE REDUCCIÓN</b>			
Consumido	n° mMoles	H disponible/mol	H disponible
Glicerol	0,16	14	2,3
Glucosa	0,19	24	4,6
Metilglioal	0,64	12	7,7
<b>Total reactivos</b>			<b>14,6</b>

Producido	n° mMoles	H disponible/mol	H disponible
Ácido Láctico	0,98	12	11,8
Ácido Acético	0,11	8	0,9
Lactaldehído (*)	0,04	14	0,6
Ácido Fórmico	0,31	2	0,6
1,2-Propanodiol	0,07	16	1,1
Etanol	0,16	12	2,0
<b>Total productos</b>			<b>17,0</b>
<b>Diferencia (%)</b>			<b>14</b>



(\*) Estimado por no contar con estándar que permita su cuantificación.

**Figura 3.38: Concentración relativa de productos (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1)/glucosa (6). Células en reposo en anaerobiosis en función de la concentración inicial de metilglioxal (3) aportada en modalidad de pulso.**

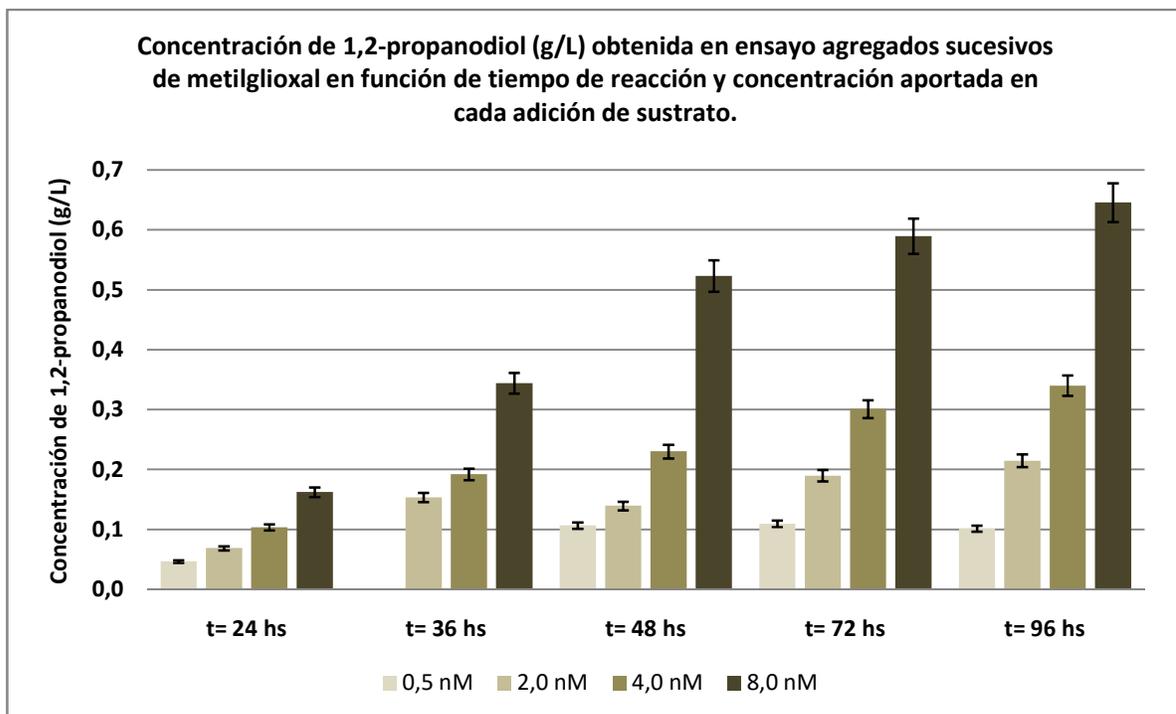
### 3.5.5.2 Biotransformación de metilglioxal (3) agregado fraccionadamente en presencia de glicerol (1) y glucosa (6) con el biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo

Se evalúa la producción de 1,2-propanodiol (2) por parte del biocatalizador frente a la adición reiterada de pequeños aportes de metilglioxal (3) en condiciones de células en reposo.

Las concentraciones de aditivado en cada instancia de metilglioxal (3) corresponden a 0,5 mM; 2,0 mM; 4,0 mM y 8,0 mM manteniendo constantes las concentraciones iniciales de glucosa (6) y glicerol (1). Los muestreos se realizan a las 24 hs, 36 hs, 48 hs, 72 hs y 96 hs, previo al nuevo agregado de sustrato correspondiente a ese tiempo de reacción.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 3.39. De su análisis surge que, en general se logran mayores niveles de acumulación del producto objetivo en las muestras correspondientes a tiempos más prolongados de avance de reacción (con mayor aporte de sustrato).

Por otra parte se observa que una mayor concentración de sustrato agregado conlleva un mayor nivel de acumulación de 1,2-propanodiol (2) sin lograr maximizar la función producción (las concentraciones de producto son siempre crecientes lo que abre la posibilidad de que ante nuevos agregados pudiera incluso obtenerse mayor acumulación de producto).



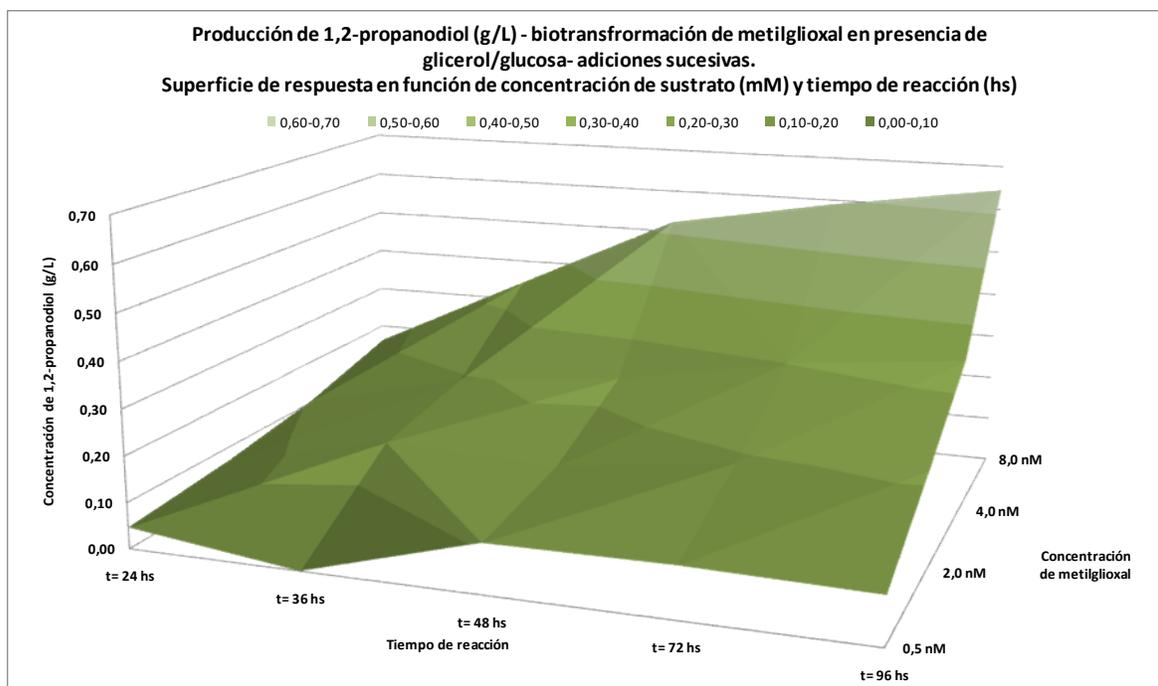
**Figura 3.39: Concentración de 1,2-propanodiol (2) (g/L) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (3) (mM) aditivadas en forma fraccionada. Células en reposo en biotransformación de metilglioxal (3) en presencia de glucosa (6)/glicerol (1).**

En forma análoga a lo planteado para la adición de metilglioxal (3) en pulso se representa la superficie de respuesta en función de las variables concentración de metilglioxal (3) en adición y el tiempo de reacción. (Ver Figura 3.40)

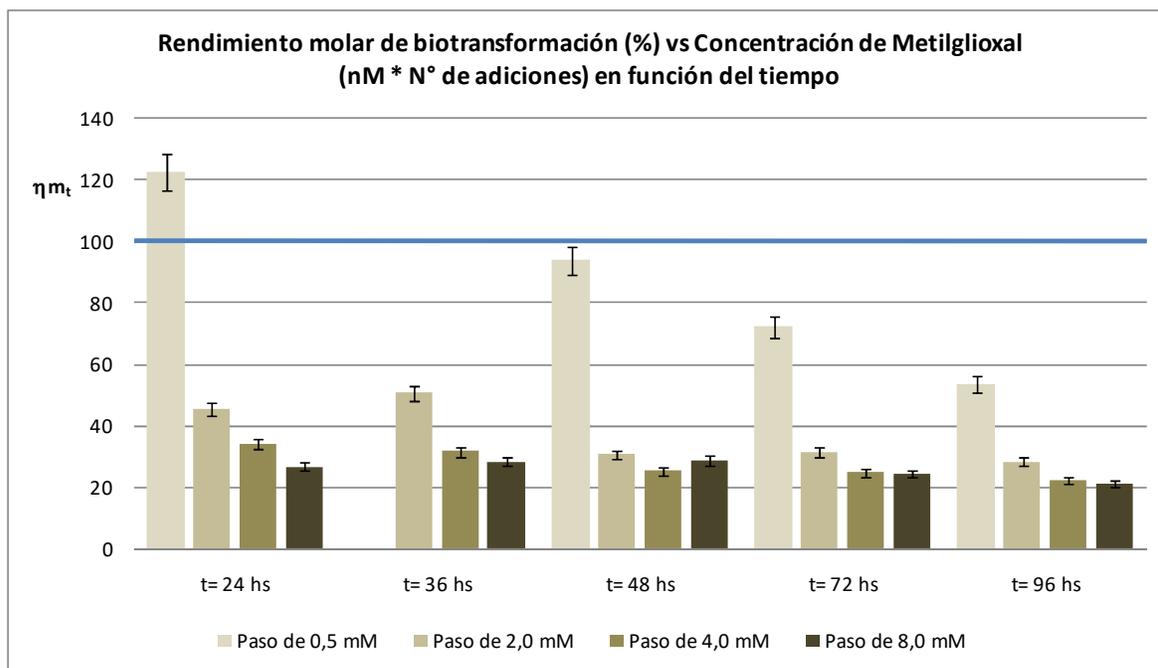
Paralelamente se calcula el rendimiento molar para cada una de las condiciones tiempo y concentración a partir de la siguiente ecuación:

$$\eta_{m_t} = \frac{1314,23 * C(\text{g/L})_{1,2\text{-Propanodiol},t}}{\sum_1^n (\text{mM Metilglioxal},o)}$$

Donde **n** es el número de la adición sucesiva de metilglioxal (3) al vial del ensayo (resto de la ecuación idéntico a la descripción realizada para adición de sustrato por pulso).



**Figura 3.40: Superficie de respuesta. Concentración de 1,2-propanodiol (2) (g/L) vs tiempo (hs) y concentración de metilglicoxal (3) en agregados (mM) adiciones sucesivas.**



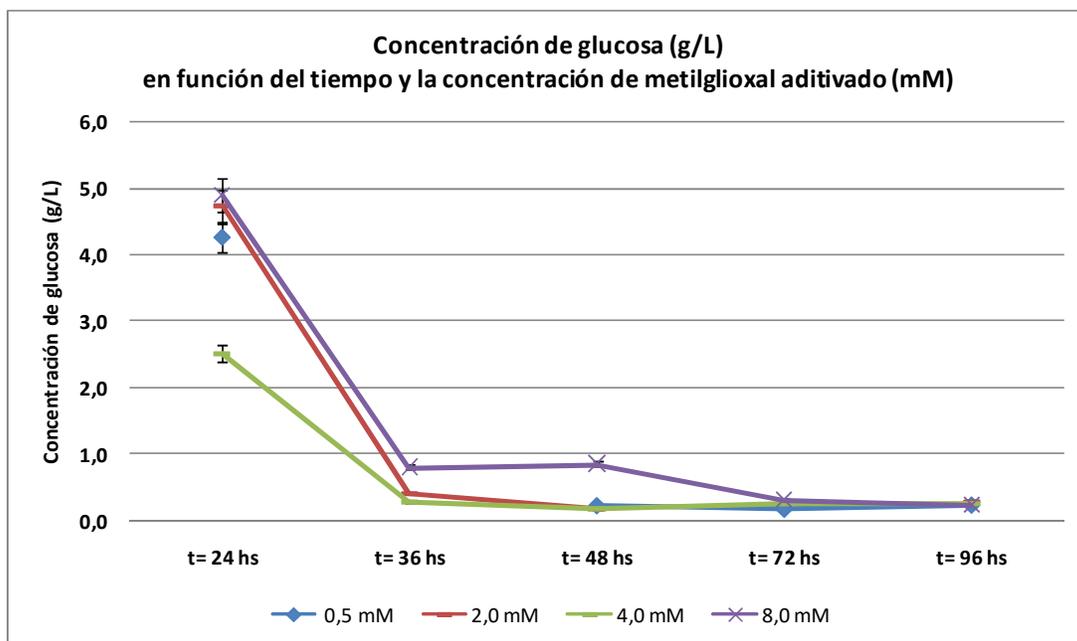
**Figura 3.41: Biotransformación de metilglicoxal (3) en presencia de glicerol (1)/glucosa (6). Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Rendimientos molares en función de concentración de metilglicoxal (3) en adiciones (mM) y tiempo (hs).**

La observación de estas gráficas permite, por un lado concluir que el mayor rendimiento molar en la producción de 1,2-propanodiol (2), se verifica a concentraciones de adición de

metilglioxal (3) menores y tiempos cortos. El máximo valor obtenido para 24 horas y concentración de la adición 0,5 mM, resulta en 122 %. Nuevamente la obtención de un rendimiento molar superior al 100 % resultaría consistente con la utilización de metilglioxal (3) de origen metabólico para su biotransformación.

### Evolución de glucosa (6) a lo largo de la biotransformación

El análisis de la evolución a lo largo de estas biotransformaciones de la concentración de glucosa (6), permite observar la siguiente tendencia:



**Figura 3.42 Concentración de glucosa (6) (g/L) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (3) (mM) aditivadas. Biotransformación de metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1)/glucosa (6). Régimen de células en reposo en anaerobiosis.**

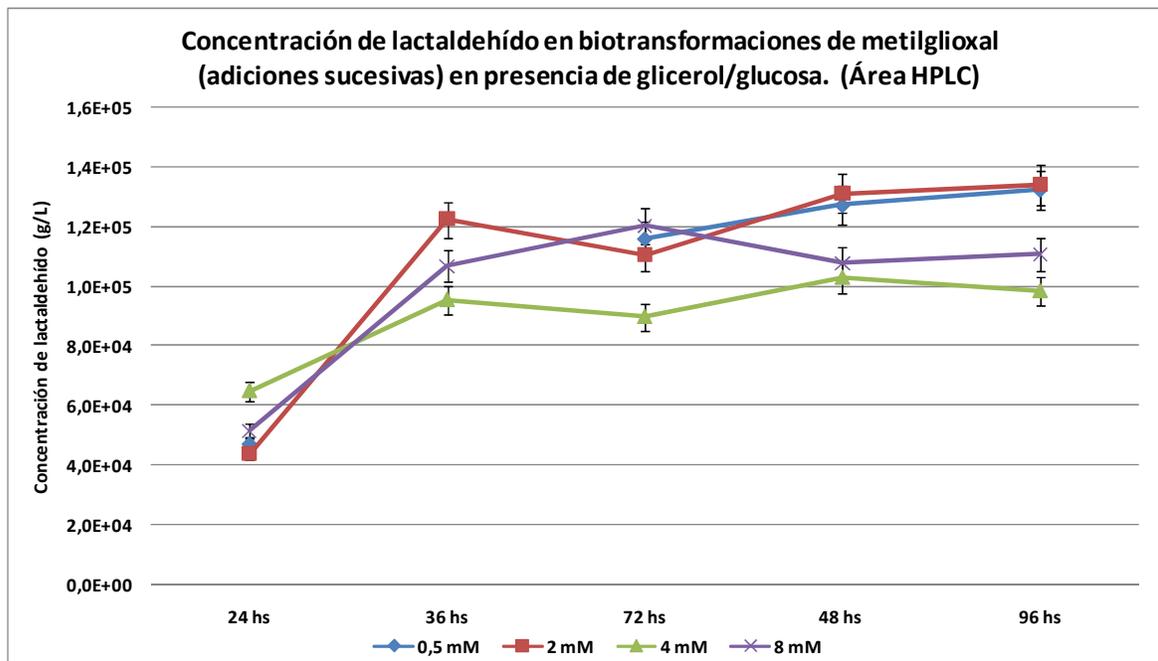
Se observa que a las 36 horas en la mayoría de las condiciones ensayadas la concentración de glucosa (6) presente en el medio es marginal. Un comportamiento atípico se observa para el caso de paso de adición de metilglioxal (3) 8 mM, en el que a 48 horas se observa la existencia de un resto de glucosa (6) (aproximadamente 15 % de la adición inicial).

Combinando el resultado anterior con los obtenidos para productos de biotransformación, se observa que, a concentraciones bajas (0,5 mM, 2,0 mM y 4,0 mM) la concentración obtenida a 36 horas difiere escasamente de la lograda a tiempos superiores, mientras que en el ensayo con concentración 8,0 mM se observa un comportamiento similar pero diferido a tiempos mayores (tiempos en el rango 48 hs a 72 hs).

Los resultados anteriores son consistentes con lo planteado en el caso de adición en pulso respecto a la existencia de cierto correlato entre la presencia de glucosa (6) y el avance de la reacción de biotransformación.

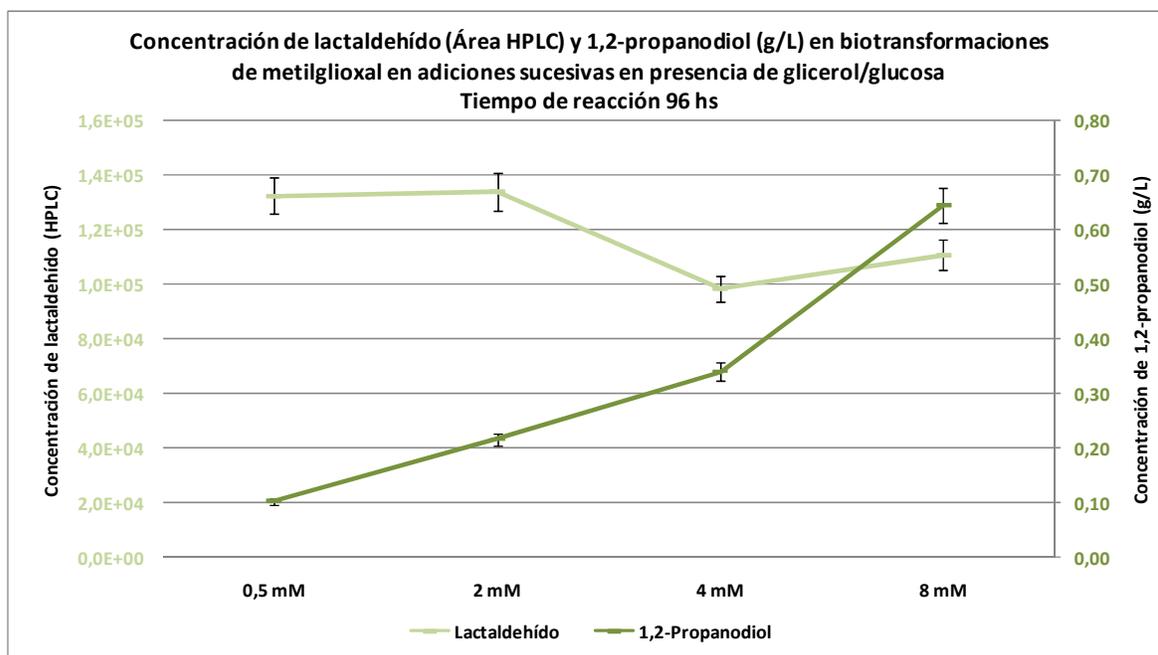
### Evolución de lactaldehído (4)

Al analizarla presencia de lactaldehído (4) en ensayos en los que la adición de metilglioxal (3) se realiza en forma fraccionada a lo largo del tiempo se obtienen los resultados que se resumen en la Figura 3.43.



**Figura 3.43: Concentración de lactaldehído (4) (Área HPLC) vs tiempo de reacción evaluada para distintas concentraciones de metilglioxal (3) (mM) aditivada. Biotransformación de metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1)/glucosa (6). Células en reposo en anaerobiosis.**

Se puede observar, tanto la estabilidad de los niveles de lactaldehído (4) pasadas las 36 horas, así como la existencia de una tendencia por la que niveles mayores de concentración de metilglioxal (3) adicionado como sustrato (4 mM y 8 mM) se corresponden con niveles de lactaldehído (4) menores y a niveles de producto objetivo mayores concordantemente con lo descrito para la adición en pulso de metilglioxal (3) (Figura 3.44).



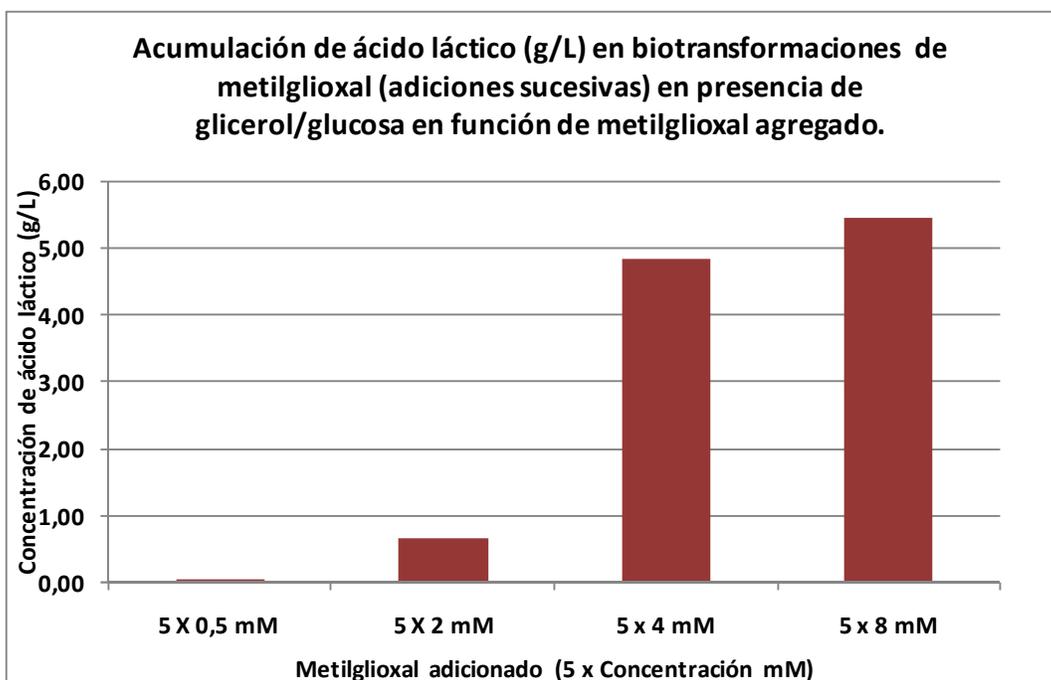
**Figura 3.44: Biotransformación de metilglioxal (3)/glicerol (1) /glucosa (6). Régimen de células en reposo. Concentración de lactaldehído (4) (Área HPLC) y 1,2-propanodiol (2) (g/L) a 96 hs. Evaluaciónadistintas concentraciones de metilglioxal (3)aditivadasenforma fraccionada.**

Como puede observarse en el conjunto de gráficos siguiente el nivel de metilglioxal (3), se mantiene relativamente estable y en bajo nivel a partir de las 24 horas de biotransformación. El hecho de que éste sería el producto que actuaría como repositorio del lactaldehído (4) biotransformado, las tendencias observadas resultarían consistentes con el hecho de que un mayor nivel de producción de 1,2-propanodiol (2) se logra a expensas del lactaldehído (4) presente en el medio.

### Cuantificación de ácido láctico (11)

En términos generales se observa para niveles similares de metilglioxal (3) adicionado menor formación de ácido láctico (11) (del orden del 50 %), cuando se compara con la adición de igual masa de sustratoen forma de pulso inicial.

El producto obtenido presenta un exceso enantiomérico (e.e.) del 10 % para las muestras en las que se realiza mayor adición de metilglioxal (3). Un hecho interesante se encuentra al evaluar la estereoquímica del producto con menor adición de metilglioxal (3) que presenta un e.e. de 60% aproximadamente. No obstante el pequeño volumen obtenido lleva a que resulte el conjunto producción y estereoquímica igualmente falto de atractivo.

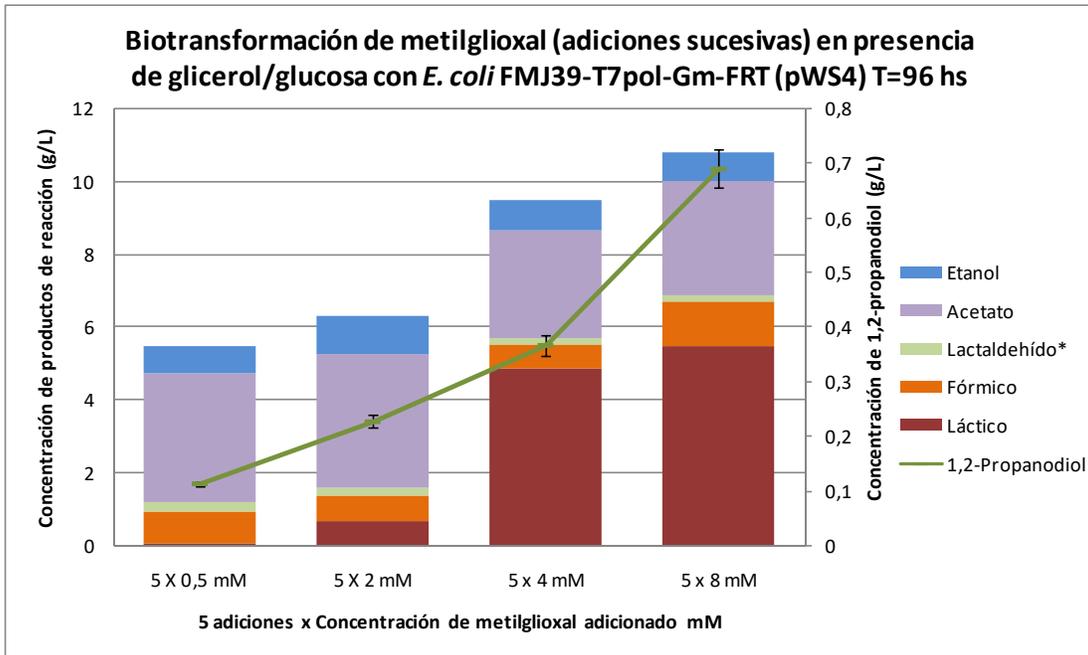


**Figura 3.45: Concentración de ácido láctico (11) (g/L) en biotransformaciones de metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1) /glucosa (6) en función de metilglioxal (3) adicionado. Régimen de células en reposo en anaerobiosis. Evaluación a 96 horas (5 agregados).**

### Cuantificación de ácido fórmico (13) y etanol (12)

Los resultados obtenidos son consistentes con la atenuación en la actividad *pfl* (piruvato formiato liasa) en la cepa utilizada como punto de partida en la construcción de los biocatalizadores, pero no la anulación de la actividad piruvato formiato liasa, que como se discutiera anteriormente puede estar vinculada a la expresión de la  $\alpha$ -cetobutirato formiato liasa, *tdcE*.

Finalmente se presentan los resultados agrupados a tiempo final (96 hs) y el balance de Carbono y de equivalentes de reducción (Figuras 3.46 y 3.47).



(\*) Estimado por no contar con estándar que permita su cuantificación.

**Figura 3.46: Concentración relativa de productos (g/L) en biotransformaciones de metilgloxal (3) (adiciones sucesivas) en presencia de glicerol (1)/glucosa (6) a 96 hs.**

**Figura 3.47: Balance de Carbono y Balance de equivalentes de reducción. Biotransformación de metilgloxal (3)/glicerol (1) /glucosa (6) en anaerobiosis, células en reposo, adición fraccionada de metilgloxal (3).**

**METABOLISMO - BALANCE DE REACCIONES**

<b>wsiv155D96 BALANCE DE CARBONO</b>								
Consumido	Concentración (g/L)	Voúmen (L)	masa (g)	PM	moles (g/PM)	n° mMoles	mMoles C	
Glicerol	0,52	1,00E-02	5,20E-03	92,09	2,89E-05	0,03	0,1	
Glucosa	4,64	1,00E-02	4,64E-02	180,16	5,04E-04	0,50	3,0	
Metilgloxal **				72		0,40	1,2	
<b>Total reactivos</b>								<b>4,3</b>
Producido	Concentración (g/L)	Voúmen (L)	masa (g)	PM	moles (g/PM)	n° mMoles	mMoles C	
Ácido Láctico	5,46	1,00E-02	5,46E-02	90,08	6,06E-04	0,61	1,8	
Ácido Acético	3,12	1,00E-02	3,12E-02	60,05	5,20E-04	0,52	1,0	
Lactaldehído*	0,18	1,00E-02	1,80E-03	74,08	2,43E-05	0,02	0,1	
Ácido Fórmico	1,23	1,00E-02	1,23E-02	46,03	2,67E-04	0,27	0,3	
1,2-Propanodiol	0,69	1,00E-02	6,90E-03	76,09	9,07E-05	0,09	0,3	
Etanol	0,77	1,00E-02	7,70E-03	46,07	1,67E-04	0,17	0,3	
<b>Total productos</b>								<b>3,8</b>
<b>Diferencia (%)</b>								<b>12</b>

\* cuantificaciones estimadas

\*\* 0,08 106,7 microlitros a tiempo 0, 24, 36,48 y 72 horas de solución stock de concentración 0,75 M  
5 adiciones de 0,08 mM

<b>wsiv155D96 BALANCE DE PODER REDUCTOR</b>			
Consumido	n° mMoles	H disponible/mol	H disponible
Glicerol	0,03	14	0,4
Glucosa	0,50	24	12,1
Metilgloxal **	0,40	12	4,8
<b>Total reactivos</b>			<b>17,3</b>
Producido	n° mMoles	H disponible/mol	H disponible
Ácido Láctico	0,61	12	7,3
Ácido Acético	0,52	8	4,2
Lactaldehído*	0,02	14	0,3
Ácido Fórmico	0,27	2	0,5
1,2-Propanodiol	0,09	16	1,5
Etanol	0,17	12	2,0
<b>Total productos</b>			<b>15,8</b>
<b>Diferencia(%)</b>			<b>10</b>

### 3.5.5.3 Comparación de resultados obtenidos en las diferentes modalidades de adición de sustrato

Para facilitar la comparación de resultados obtenidos por uno u otro método de adición de sustrato se agrupan los ensayos que presentan una misma concentración del material de partida, por ejemplo: una reacción en la que se cargó “un pulso” de metilglioxal (3) que permite alcanzar una concentración en el medio de reacción de 4 mM, será considerada equivalente a una reacción en la que se haya adicionado ese nivel de sustrato a partir de 2 agregados de concentración 2 mM, la que se identifica como 2 x 2 mM. Esta comparación se realiza con independencia del tiempo de muestreo por lo que se selecciona en cada pulso el valor de mayor producción de 1,2-propanodiol (2).

La comparación de los resultados obtenidos puede hacerse utilizando diferentes criterios entre los que se pueden mencionar: maximizar la concentración obtenida de producto objetivo, maximizar el rendimiento verificado en la reacción, minimizar el tiempo de reacción, la concentración de productos de reacción no deseados o combinaciones de ellos.

Desde el punto de la concentración máxima de producto obtenido se puede afirmar que no se observan grandes diferencias entre uno y otro método, ubicándose la **concentración de 1,2-propanodiol (2) en el entorno de los 0,7 g/L**.

Complementando este análisis con el criterio rendimiento molar y tiempo de reacción puede comentarse que **el mejor desempeño en las condiciones ensayadas se obtiene con el agregado realizado en forma de pulso con una concentración de metilglioxal (3) de 16 mM, la que, a tiempo de biotransformación de 36 horas permite alcanzar una acumulación de 1,2-propanodiol (2) de aproximadamente 0,7 g/L y con un rendimiento molar de 53 %**.

Por otro lado, analizando las dificultades que podrían afrontarse en etapas de purificación posteriores puede verse como más favorable el resultado obtenido en adición fraccionada de metilglioxal (3) que como característica general presenta un menor nivel acumulación de subproductos.

Un aspecto adicional a considerar lo constituye la posibilidad de continuar acumulando diol en la modalidad adición fraccionada, mediante nuevos agregados de metilglioxal (3) atendiendo a lo oportunamente observado respecto a la ausencia de máximo en la superficie de respuesta calculada.

Cuando se realiza reposición de glucosa (6) en las biotransformaciones la acumulación del producto 1,2-propanodiol (2) aumenta, llegando a obtenerse una **concentración de 1,1 g/L**.

Un aspecto interesante lo constituye el hecho de que la cepa *E. coli* FMJ39-T7 $_{pol}$ -Gm-FRT utilizada como control, en las condiciones descritas muestra producción marginal (pero observable) del producto de interés.

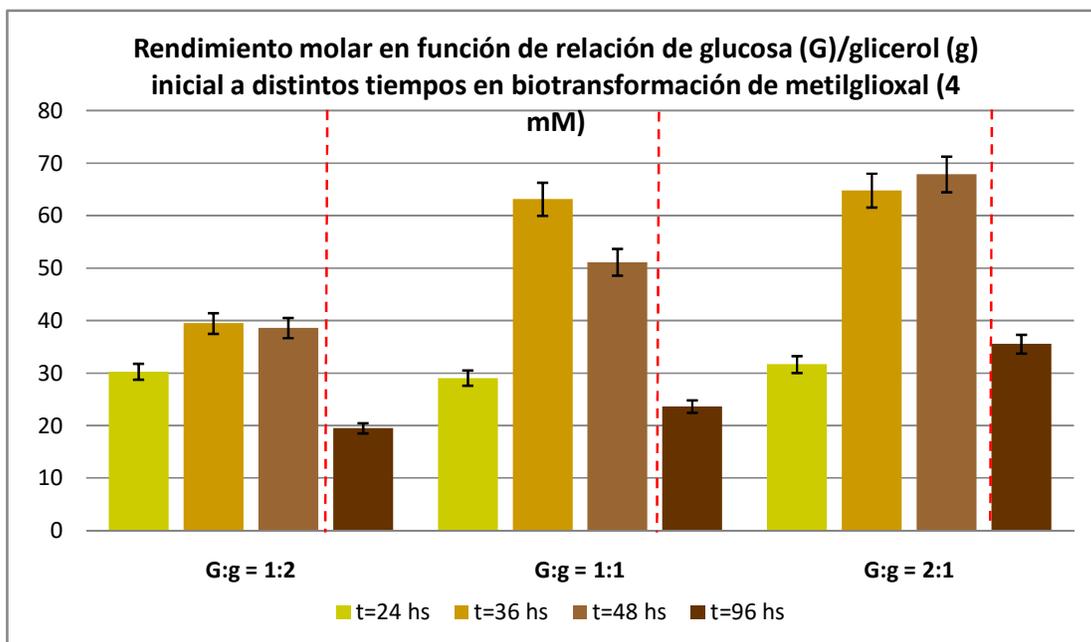
Con independencia del mecanismo de adición que se considere se puede afirmar que todas las biotransformaciones realizadas con la cepa *E. coli* FMJ39-T7 $\rho$ ol-Gm-FRT (pWS4) acumulan niveles significativamente mayores de 1,2-propanodiol (2) a las logradas con la cepa control.

En orden se evidencia que la disponibilidad de metilglioxal (3) es esencial para el avance de la reacción, pudiendo constituir su falta de disponibilidad una restricción al avance de la reacción.

Los balances de Carbono y de equivalentes de reducción desarrollados presentan un ajuste que puede considerarse aceptable.

### 3.5.6 Efecto de la relación glicerol (1)/glucosa (6) en biotransformaciones de metilglioxal (3) con *E. coli* FMJ39-T7 $\rho$ ol-Gm-FRT (pWS4) en régimen de células en reposo

La concentración de glucosa (6), según se ha señalado anteriormente resulta relevante para el avance de la biotransformación.



--- Indica momento de la adición de un segundo pulso de Metilglioxal (3).

**Figura 3.48: Comparación de rendimientos molares en la producción de 1,2-propanodiol (2) a partir de metilglioxal (3) en función de la relación de glucosa (6)/glicerol (1) y el tiempo de reacción.**

En base a lo anterior es que se ejecuta una serie de ensayos en los que se evalúa el rendimiento molar obtenido en la producción de 1,2-propanodiol (2) en biotransformaciones de metilglioxal (3), 4 mM adicionado como pulso a tiempo cero con

reiteración del agregado a las 48 horas usando como variable la relación glucosa (6)/glicerol (1) inicial.

Los ensayos se llevan a cabo por triplicado con muestreos a las 24 hs, 36 hs, 48 hs y 96 hs, en la Figura 3.48 se representa la media obtenida para cada condición de ensayo.

Si bien existen variaciones en la tendencia verificada para cada tiempo de muestreo, la misma es creciente con el aumento en la relación glucosa (6)/glicerol (1) obteniéndose los mayores niveles de conversión para una proporción de glucosa (6) /glicerol (1) de 2:1.

Adicionalmente, este resultado es consistente con el obtenido a partir de la gráfica siguiente donde se observa que esa relación glucosa (6)/glicerol (1) es la única que presenta remanente de glucosa (6) a partir de las 36 horas de reacción.

A las 96 horas, se verifica consumo total de glucosa (6) en todas las muestras ensayadas.

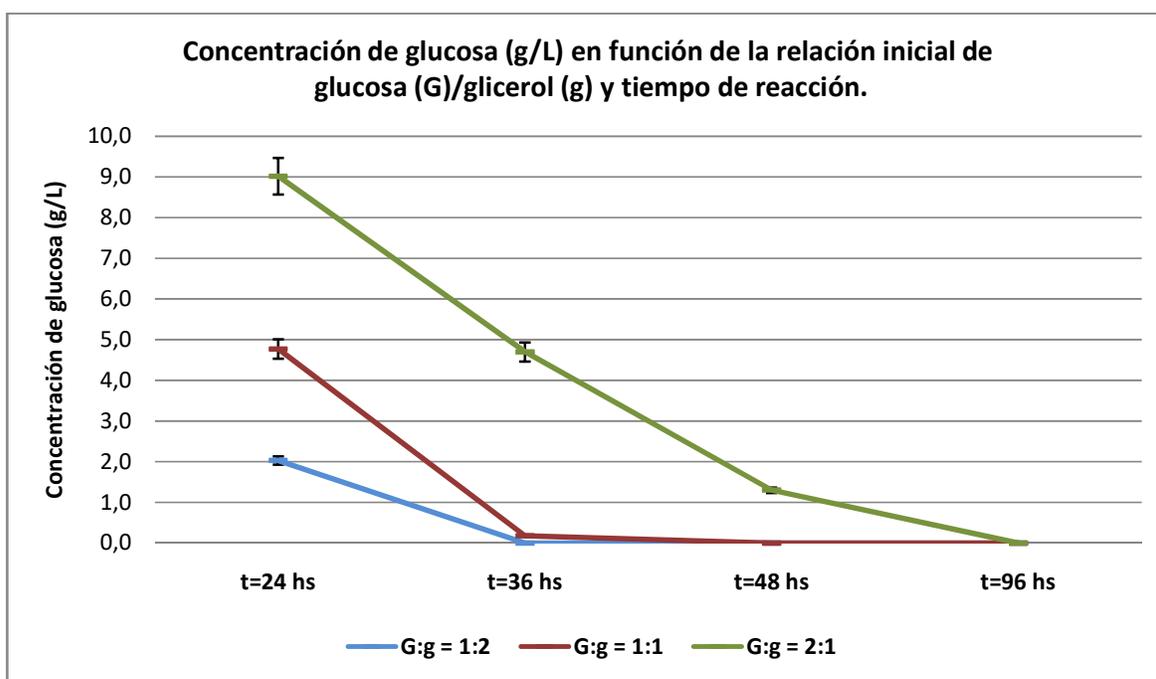
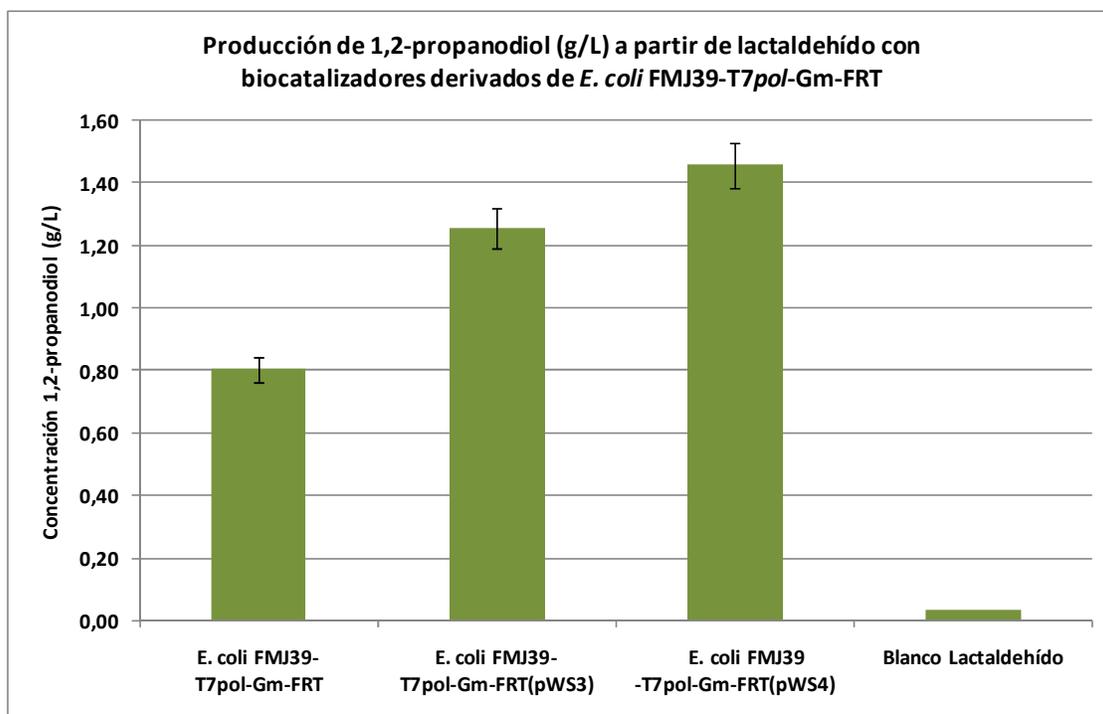


Figura 3.49: Biotransformación de metilglioxal (3) 4 mM. Concentración de glucosa (6) en función de la relación de concentración inicial glucosa (6)/glicerol (1) y el tiempo de reacción.

### 3.5.7 Biotransformación de lactaldehído (4)- Producción de 1,2-propanodiol (2)

Con la intención de terminar de caracterizar el desempeño de la vía metabólica diseñada es que se enfrenta a los biocatalizadores que expresan Ypr1p al lactaldehído (4).



**Figura 3.50: Biotransformación de lactaldehído (4) en presencia de glucosa (6)/glicerol (1). Régimen de células en reposo anaerobias con biocatalizadores derivados de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT.**

En la Figura 3.50 se observa buen nivel de producción de 1,2-propanodiol (2) en las cepas *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS3) y *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) alcanzando los **1.47 g/L**, nivel que duplica la máxima producción obtenida a partir de biotransformación de metilglioxal (3).

Estos resultados implicarían que la limitante en los niveles de producción de 1,2-propanodiol (2) en los ensayos previos se ubicaría en la disponibilidad de lactaldehído (4), pues en la medida en que este intermediario se encuentra disponible (y en condiciones de exceso) parece posible avanzar a mayores conversiones hacia el diol.

De esta forma la evaluación del desempeño de cepas que expresan Ypr1p reafirma la importancia de Gre2p (enzima responsable del aporte de lactaldehído) como resultado más importante.

Simultáneamente se observa un nivel de producción importante por parte de la cepa control *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT, resultado a priori inesperado.

### 3.5.8 Resumen de resultados obtenidos

La Tabla 3.6 resume la concentración de 1,2-propanodiol (2) alcanzada para cada sustrato, las condiciones en que se realiza el ensayo y el biocatalizador que presenta el mejor

desempeño en biotransformaciones en células en reposo con biocatalizadores de la Estrategia 2.

**Tabla 3.6: Concentraciones de 1,2-propanodiol (2) obtenidas en biotransformaciones con células en reposo.**

Entrada	Sustrato (Forma de Adición)	Cepa de mejor desempeño	Concentración (g/L)
1	Glicerol	<i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pPP8)	< Límite de cuantificación
2	Glicerol/Glucosa	<i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS3)	< Límite de cuantificación
3	Metilglioxal /Glucosa	<i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)	< Límite de cuantificación (Estimado: 0,09)
4	Glucosa	<i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)	0,3
5	Glicerol/Glucosa/Metilglioxal (Pulso)	No aplica	0,7
6	Glicerol/Glucosa/Metilglioxal (Adiciones sucesivas con reposición de Glucosa)	No aplica	1,1
7	Glicerol/Glucosa/Metilglioxal (Adiciones sucesivas)	No aplica	0,7
8	Lactaldehído	<i>E. coli</i> FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)	1,5

### 3.5.9 Revisión de la estrategia 2 e introducción de mejoras (Estrategia 2.5)

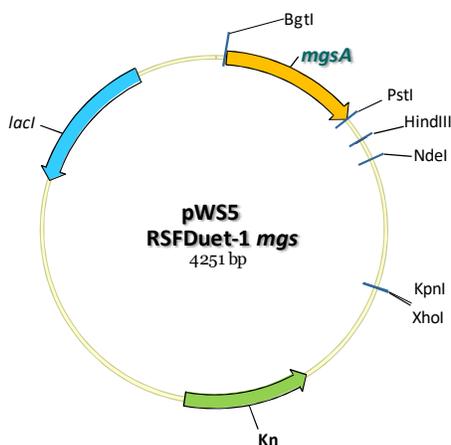
Los resultados obtenidos a partir de los ensayos presentados en el marco de la Estrategia 2 permiten establecer que: la producción de 1,2-propanodiol (2) obtenida a partir de lactaldehído (4) es mayor que la lograda a partir de metilglioxal (3), que a su vez resulta mayor que la alcanzada a partir de glicerol (1)/glucosa (6), la que es mucho mayor que la acumulada solamente al biotransformar solamente glicerol (1).

Estos resultados permiten afirmar que la vía metabólica diseñada *de novo* es funcional, no obstante, los resultados serían consistentes con la existencia de una restricción en el acceso de metilglioxal (3) a la vía (hecho razonable atendiendo a la toxicidad de este intermediario).

Con base en lo anterior se concluye respecto a la necesidad de recorrer el camino previsto en el apartado 2.3 del Capítulo Estrategia y Objetivos, donde se establece este escenario como altamente probable y para el cual se establece una posible forma de mitigarlo. La transformación del biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) con un vector de expresión derivado del plásmido pRSFDuet-1 incluyendo el gen que codifica la metilglioxal (3) sintasa (*mgsA*) de *E. coli*, origina al biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5).

#### 3.5.9.1 Construcción del biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5)

Células electrocompetentes de *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) se transforman con el vector (pWS5) recuperándose transformantes en medio LB-Gm-Amp-Kan.



**Figura 3.51: Vector de expresión pWS5 para metilgloxal sintasa a partir de vector pRSFDuet-1**

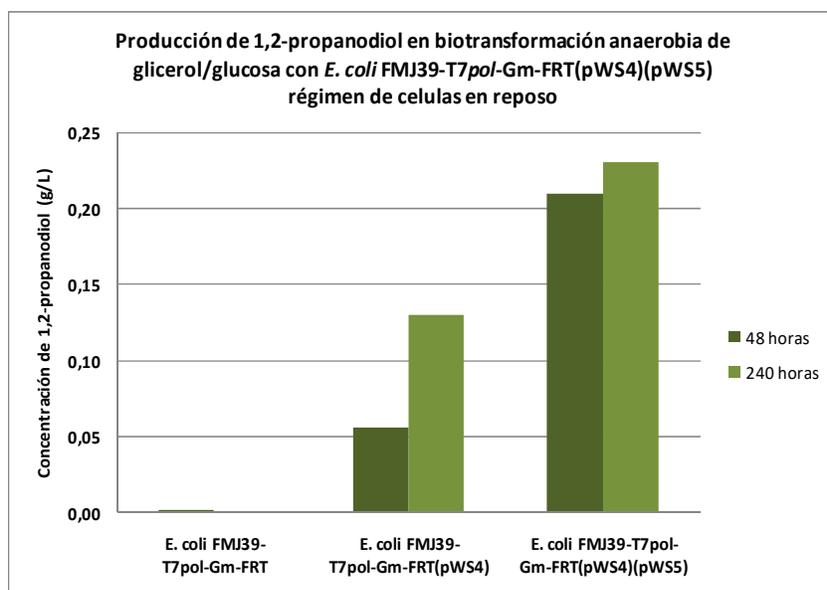
### 3.5.9.2 Verificación de actividad frente a glicerol (1) y glicerol (1)/glucosa (6) del biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT (pWS4)(pWS5)

A efectos de determinar si existen diferencias observables en los productos de biotransformación de glicerol (1) con las cepas *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT, *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) y *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5) se desarrollan ensayos comparativos de biotransformaciones de glicerol (1)/glucosa (6), en los que las dos primeras cepas actúan como controles del desempeño del tercer biocatalizador en todas las condiciones previamente evaluadas.

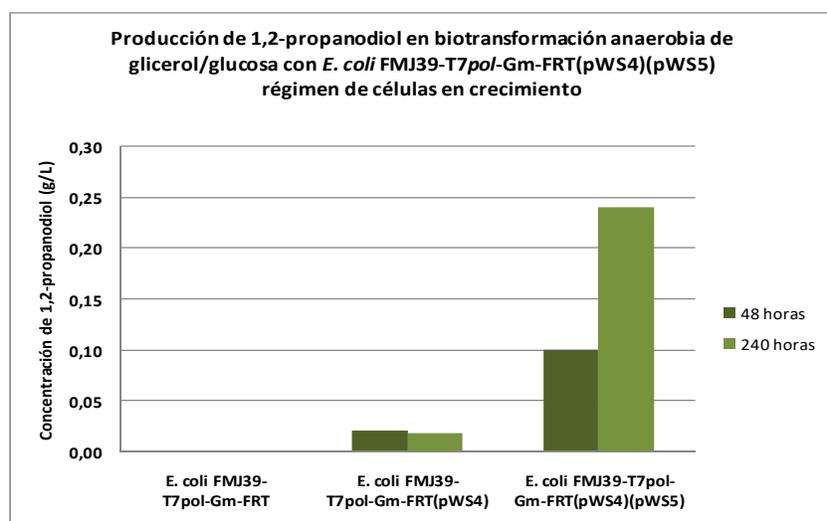
En la Figura 3.52 se observan los resultados obtenidos para el ensayo en régimen de células en reposo donde se representa la concentración de 1,2-propanodiol (2) obtenida en función del tiempo para el conjunto de biocatalizadores evaluados en biotransformaciones de glicerol (1) /glucosa (6). Como puede observarse, el nivel de acumulación del producto objetivo con el nuevo biocatalizador prácticamente duplica la obtenida con la cepa transformada utilizada como control.

Similar nivel de producción de diol se observa en las biotransformaciones de glicerol (1) /glucosa (6) en régimen de células en crecimiento con el nuevo biocatalizador. La diferencia con las cepas control es aún más marcada en estas condiciones (Figura 3.53).

El ensayo desarrollado con células en crecimiento permite visualizar por primera vez la formación de producto en estas condiciones en concentraciones cuantificables, hecho que resultaría asignable a la nueva modificación introducida.



**Figura 3.52: Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6). Régimen de células en reposo en anaerobiosis con *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5).<sup>2</sup>**

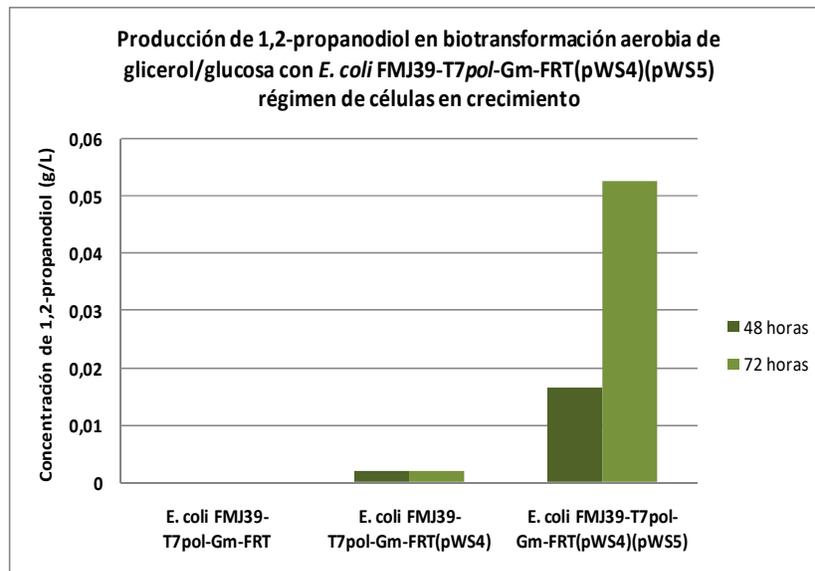


**Figura 3.53: Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6). Régimen de células en crecimiento en anaerobiosis con *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5).<sup>3</sup>**

Por otra parte se realiza la evaluación de desempeño del nuevo biocatalizador en régimen de células en crecimiento en aerobiosis. Los resultados se resumen en la Figura 3.54. Es posible observar que las cepas transformadas son las únicas capaces de producir -aunque en concentraciones marginales- el diol de interés- resulta apreciable la diferencia en los niveles de producción a partir de una y otra construcción ensayada.

<sup>2</sup>Valores graficados para cepa control y *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) a las 48 hs corresponden a estimaciones (<Límite de Cuantificación).

<sup>3</sup>Valores graficados para cepa control y *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4) a las 48 hs corresponden a estimaciones (<Límite de Cuantificación).



**Figura 3.54: Biotransformación de glicerol (1)/glucosa (6). Régimen de células en crecimiento en aerobiosis con *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5).**<sup>4</sup>

En ninguna de las biotransformaciones en que se recurre a glicerol (1) como único sustrato se observa formación de producto de interés.

Con los resultados previamente comentados se podría haber optado por avanzar en la optimización multivariable con el biocatalizador que expresa las dos reductasas y la metilglicoxal sintasa tanto para células en crecimiento como para el régimen de células en reposo en anaerobiosis. Sin embargo atendiendo al volumen de antecedentes acumulado en uno y otro caso es que se resuelve realizar el diseño experimental con fines de optimización para el régimen de células en reposo.

### 3.5.10 Optimización multivariable con cepa *E. coli* FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4)(pWS5)

El presente ensayo se desarrolla con la intención de identificar los parámetros que influyen la producción de 1,2-propanodiol (2) y en qué configuración de dichas variables se maximiza su producción.

Se recurre a la aplicación del diseño de Plackett-Burman con dos niveles para cada variable a ser utilizados en la etapa de tamizado de variables, los niveles que adoptan las variables se codifican como (+1) y (-1). Posteriormente se realiza en ensayo de optimización recurriendo al model de Wilson y Box con las variables seleccionadas en Plackett-Burman.

<sup>4</sup>Valores estimados (<Límite de Cuantificación).

## Evaluación preliminar - identificación de variables críticas

Considerando las características del proceso en estudio se identifican variables relacionadas a la preparación del biocatalizador y variables relacionadas a las condiciones de realización de la reacción.

Las variables asociadas a la preparación del biocatalizador seleccionadas incluyen:

- i) **Concentración de IPTG (20) utilizado en la etapa de inducción.** Debe considerarse que dependiendo del aporte del inductor podría lograrse un mayor o menor nivel de producción de las enzimas. Particularmente para el caso de la metilglioxal sintasa esto podría acarrear que pudiera obtenerse una mayor concentración de metilglioxal (3), producto que presenta según se ha señalado previamente un interesante compromiso entre su toxicidad a concentraciones relativamente bajas y por otro lado la necesidad de su producción para alimentar la vía metabólica diseñada. Por lo expuesto resulta razonable su inclusión como variable de ensayo, analizando la concentración de IPTG (20) utilizada hasta este momento (Nivel +1: 12 mM de IPTG (20) y Nivel -1: 36 mM).
  
- ii) **La temperatura de incubación en la inducción.** El biocatalizador a estudio presenta 4 modificaciones genéticas que implican la inclusión de material codificante de diferente origen. Por un lado se incluyen, según se ha descrito genes provenientes de *S. cerevisiae* y por otro genes provenientes de *E. coli*, siendo sensible su actividad y nivel de expresión (producción de enzima), entre otras variables, a la temperatura de incubación post-inducción. La preparación del material celular en las reacciones desarrolladas con *E. coli* FMJ39-T7 $\rho$ l-Gm-FRT(pWS4) se realizó estableciendo en 30 °C la Temperatura de incubación posterior al agregado de IPTG (20). El valor asignado a este parámetro es revisado en esta ocasión atendiendo que se pretende remover una barrera ligada directamente a la biosíntesis del metilglioxal (3) por lo que tiene interés evaluar el desempeño del proceso global cuando la temperatura se fija en 30 °C (Nivel +1) y en 37 °C (Nivel -1).

Paralelamente cuando se analizan las condiciones de reacción en régimen en células en reposo y anaerobiosis se identifican:

- i) **El pH del medio.** Tal como se observara en la ejecución de reacciones en régimen de células en reposo en anaerobiosis en Suero Fisiológico existe una correlación clara entre el pH del medio y el avance de reacción. Por ese motivo se plantea evaluar el desempeño del sistema en dos valores de este parámetro (Nivel +1: pH=6.4 y Nivel-1 : pH 6.8).

- ii) **La concentración del biocatalizador en el medio de reacción.** La influencia de esta variable se ha comentado oportunamente al desarrollar ensayos con la finalidad de ajustar las condiciones de biotransformación con *E. coli* FMJ9-T7 $\rho$ l-Gm-FRT(pWS4) (Ver apartado 3.5.4). En esta instancia se evalúa la concentración habitual de biocatalizador (utilizada normalmente en ensayos previos) y una concentración que la triplique. (Nivel +1: Concentración previamente utilizada y Nivel -1: 3 x Concentración previamente utilizada).
  
- iii) **El compuesto como co-sustrato.** En ensayos previos se ha evidenciado la necesidad de contar con glucosa (**6**) como co-sustrato, no obstante atendiendo a la posibilidad de obtener el co-sustrato de fuentes más económicas resulta de interés evaluar el desempeño de otras fuentes de Carbono que puedan jugar este rol. En este ensayo se incluye como alternativa a la glucosa (**6**), el aporte de lactosa (**19**). (Nivel +1: glucosa (**6**) y Nivel -1: lactosa(**19**)).

A partir de estas definiciones se diseña el siguiente ensayo siguiendo el modelo Plackett-Burman de 32 entradas con la finalidad de segregar las variables determinantes en el resultado de la biotransformación de las accesorias. Adicionalmente su ejecución permite identificar la existencia de posibles interacciones entre las variables consideradas. (Ver Tabla 3.7)

Para cada variable se representan los resultados obtenidos de producción de 1,2-propanodiol (**2**) agrupados por nivel del parámetro, se calcula la media y la desviación estándar y se representa la línea de tendencia. (Ver Figura 3.55)

Tabla 3.7: Diseño de ensayo según Plackett-Burman de 32 entradas.

Ensayo Plackett Burman						
Ensayo	IPTG	Temp en inducción	Concentración de biocatalizador	pH	Co-sustrato (G ó L)	Concentración producto (g/L)
PB1	1	1	1	1	1	0,02
PB2	1	1	1	1	-1	0,00
PB3	1	1	1	-1	1	0,24
PB4	1	1	1	-1	-1	0,01
PB5	1	1	-1	1	1	0,05
PB6	1	1	-1	1	-1	0,00
PB7	1	1	-1	-1	1	0,29
PB8	1	1	-1	-1	-1	0,09
PB9	1	-1	1	1	1	0,11
PB10	1	-1	1	1	-1	0,13
PB11	1	-1	1	-1	1	0,39
PB12	1	-1	1	-1	-1	0,26
PB13	1	-1	-1	1	1	0,16
PB14	1	-1	-1	1	-1	0,09
PB15	1	-1	-1	-1	1	0,31
PB16	1	-1	-1	-1	-1	0,16
PB17	-1	1	1	1	1	0,06
PB18	-1	1	1	1	-1	0,04
PB19	-1	1	1	-1	1	0,31
PB20	-1	1	1	-1	-1	0,08
PB21	-1	1	-1	1	1	0,08
PB22	-1	1	-1	1	-1	0,04
PB23	-1	1	-1	-1	1	0,33
PB24	-1	1	-1	-1	-1	0,11
PB25	-1	-1	1	1	1	0,08
PB26	-1	-1	1	1	-1	0,04
PB27	-1	-1	1	-1	1	0,26
PB28	-1	-1	1	-1	-1	0,18
PB29	-1	-1	-1	1	1	0,09
PB30	-1	-1	-1	1	-1	0,10
PB31	-1	-1	-1	-1	1	0,42
PB32	-1	-1	-1	-1	-1	0,18

El efecto de un determinado parámetro es evaluado como el cambio en la concentración verificado en el rango total (2 veces la pendiente).

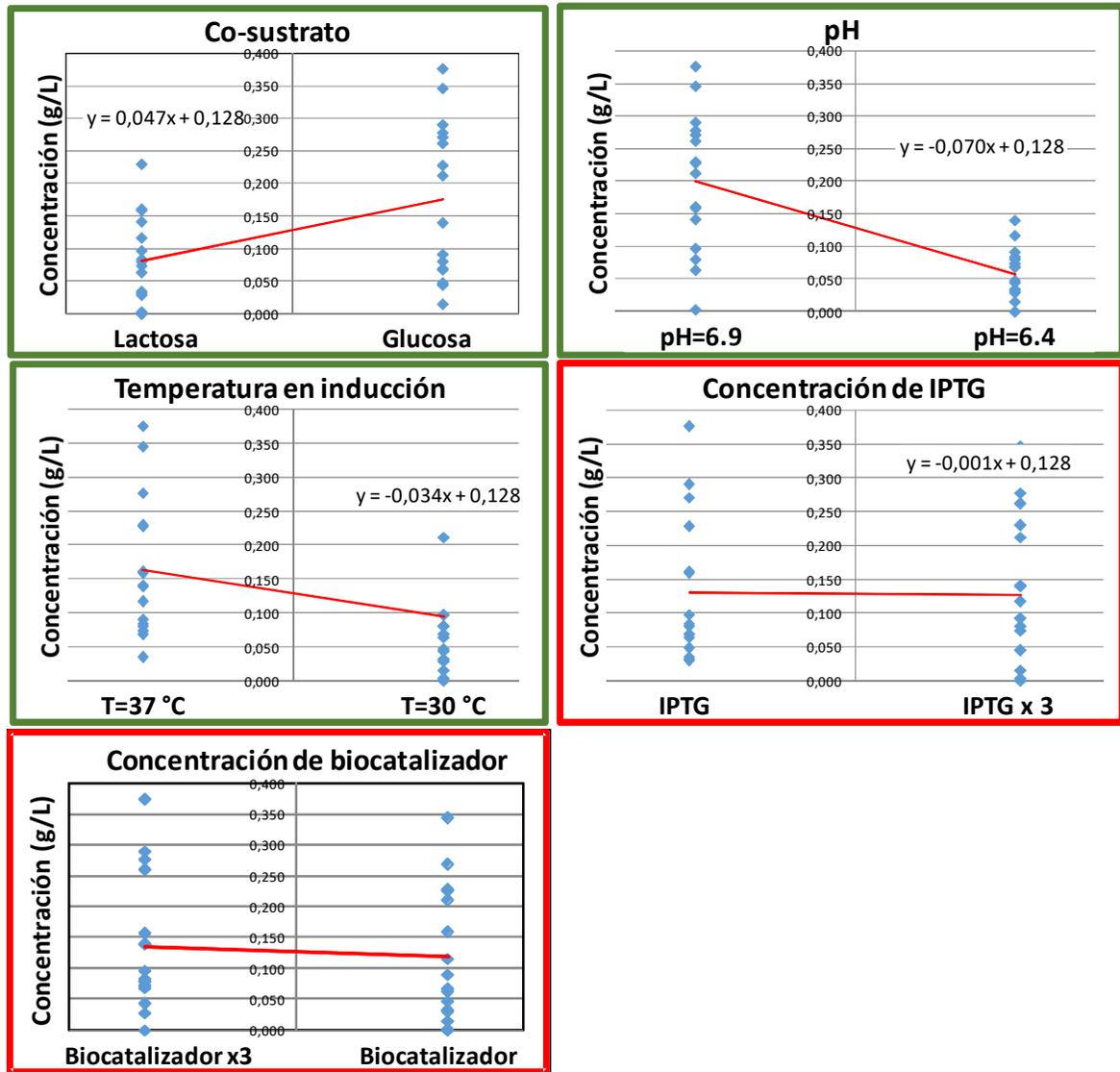


Figura 3.55: Estimación de efectos para cada parámetro evaluado.

Simultáneamente con las dos poblaciones de datos (una por valor del parámetro) se realiza el Test de Hipótesis con un nivel de significación del 5 % a efectos de evaluar la probabilidad de considerar por azar datos iguales como diferentes.

**Tabla 3.8: Análisis de diferencia entre poblaciones en los dos niveles ( $\alpha < 0,05$ ).**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas			Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
<b>IPTG</b>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<b>Temperatura en inducción</b>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,127	0,130	Media	0,0944	0,1625
Varianza	0,012	0,011	Varianza	0,0105	0,0103
Observaciones	16	16	Observaciones	16	16
Coefficiente de correlación de Pearson	0,855		Coefficiente de correlación de Pearson	0,8123	
Diferencia hipotética de las medias	0,000		Diferencia hipotética de las medias	0,0000	
Grados de libertad	15,000		Grados de libertad	15,0000	
Estadístico t	-0,243		Estadístico t	-4,3495	
P(T<=t) una cola	0,406		P(T<=t) una cola	0,0003	
Valor crítico de t (una cola)	1,753		Valor crítico de t (una cola)	1,7531	
P(T<=t) dos colas	0,811		P(T<=t) dos colas	0,0006	
Valor crítico de t (dos colas)	2,131		Valor crítico de t (dos colas)	2,1314	
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas			Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
<b>Concentración de biocatalizador</b>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<b>Co-sustrato</b>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,120	0,137	Media	0,176	0,081
Varianza	0,012	0,012	Varianza	0,014	0,004
Observaciones	16	16	Observaciones	16	16
Coefficiente de correlación de Pearson	0,864		Coefficiente de correlación de Pearson	0,722	
Diferencia hipotética de las medias	0,000		Diferencia hipotética de las medias	0,000	
Grados de libertad	15,000		Grados de libertad	15,000	
Estadístico t	-1,267		Estadístico t	4,468	
P(T<=t) una cola	0,112		P(T<=t) una cola	0,000	
Valor crítico de t (una cola)	1,753		Valor crítico de t (una cola)	1,753	
P(T<=t) dos colas	0,224		P(T<=t) dos colas	0,000	
Valor crítico de t (dos colas)	2,131		Valor crítico de t (dos colas)	2,131	
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas			Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
<b>pH</b>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>			
Media	0,058	0,199			
Varianza	0,002	0,011			
Observaciones	16	16			
Coefficiente de correlación de Pearson	0,635				
Diferencia hipotética de las medias	0,000				
Grados de libertad	15,000				
Estadístico t	-6,630				
P(T<=t) una cola	0,000004				
Valor crítico de t (una cola)	1,753				
P(T<=t) dos colas	0,000				
Valor crítico de t (dos colas)	2,131				

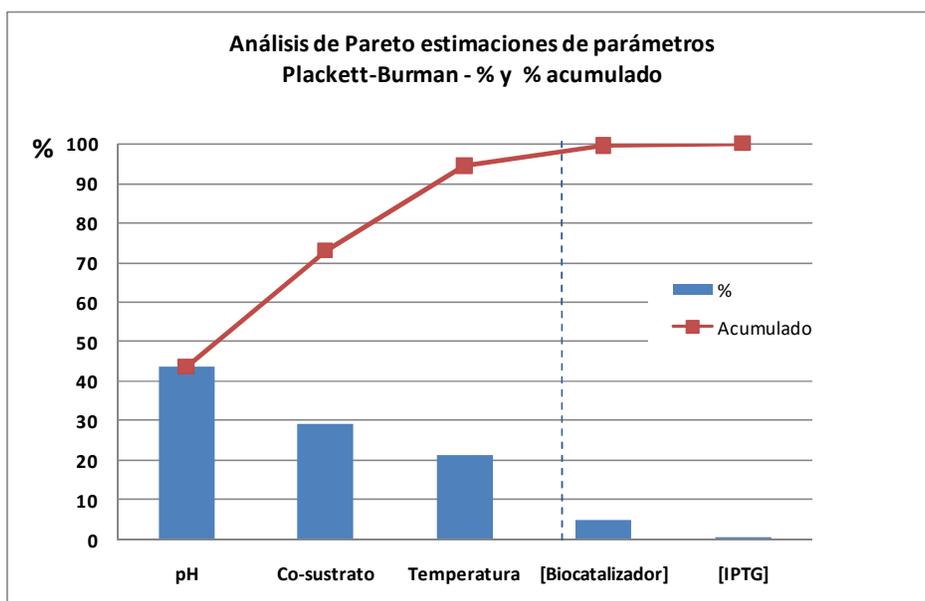
El valor  $P < 0,05$  se adopta como umbral para considerar la existencia de efecto significativo, de esta manera los valores de P obtenidos para el pH, la Temperatura en inducción y el co-sustrato representan la confirmación de que las diferencias observadas anteriormente responden a la existencia de un efecto real.

A partir de la suma de los estimados calculados (2 veces el valor de la pendiente en la línea de tendencia de los gráficos de la Figura 3.55), se calcula el peso relativo de cada estimado en el efecto total.

**Tabla 3.9: Peso relativo de los estimados de cada parámetro.**

Parámetro	Estimado	%
pH	0,140	43,75
Glucosa (6) /Lactosa (19)	0,094	29,38
Temperatura	0,068	21,25
Pellet	0,016	5,00
IPTG (20)	0,002	0,63

A partir del ordenamiento en forma decreciente de los parámetros se discrimina mediante la construcción de un diagrama de Pareto aquellos parámetros que explican al menos el 80 % de las variaciones calculadas.



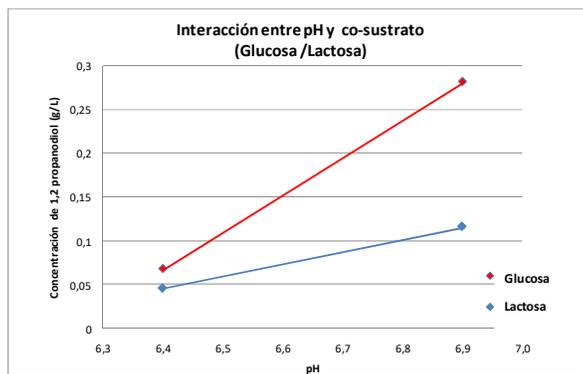
**Figura 3.56: Diagrama de Pareto. Peso relativo de los diferentes parámetros.**

Consistentemente con los resultados obtenidos a partir del valor P y de lo observado en las gráficas que resumían las estimaciones de los efectos para cada parámetro se concluye que las variables que mayor incidencia presentan sobre el nivel de producción de 1,2-propanodiol (2) con el biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT (pWS4)(pWS5) son -en orden- el pH, el co-sustrato empleado y la Temperatura de incubación en el período de inducción. Por su parte la concentración de biocatalizador en el vial donde se desarrolla el ensayo en condiciones de células en reposo y la concentración de IPTG (20) adicionada en la inducción del sistema no presentan incidencia significativa en el resultado final alcanzado.

A efectos de analizar las interacciones existentes entre dos parámetros se evalúa la producción de 1,2-propanodiol (2) obtenida para un determinado nivel de un parámetro, considerando separadamente los resultados para cada nivel del segundo parámetro.

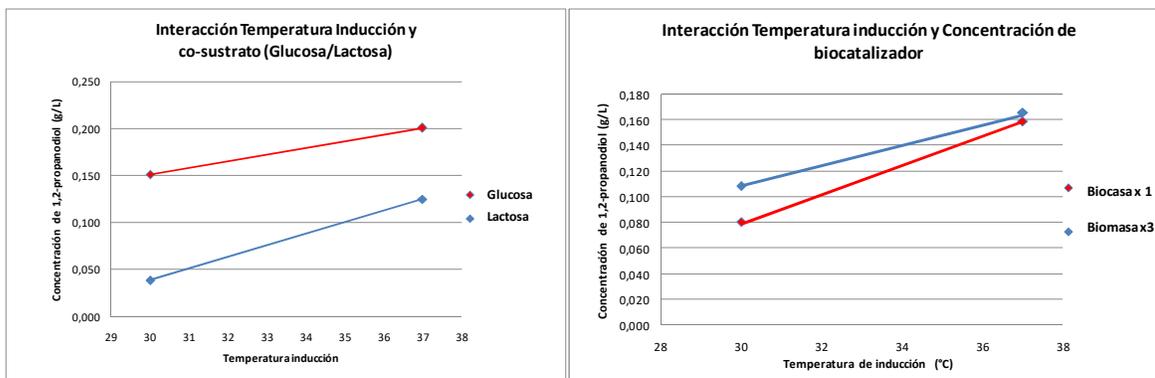
Por ejemplo, en el caso de la Figura 3.57 el primer parámetro pH (presenta dos niveles 6,4 y 6,9) y para cada nivel de pH se agrupan los resultados obtenidos para cada nivel del segundo parámetro co-sustrato empleado (glucosa (6) y lactosa (19)), de esta manera se obtienen 4

grupos de resultados (pH 6,4 y glucosa (6)), (pH 6,4 y lactosa (19)), (pH 6,9 y glucosa (6)) y (pH 6,9 y lactosa (19)). Representando para cada combinación el promedio de la concentración del diol obtenido es posible evidenciar la existencia de interacciones entre estas variables. En este caso es posible observar que el efecto obtenido al aumentar el pH es mayor cuando el co-sustrato es glucosa (6) que cuando la lactosa (19) es empleada como co-sustrato. La ausencia de interacción se evidenciaría a través de segmentos paralelos.



**Figura 3.57: Interacciones entre parámetros: pH y co-sustrato.**

A partir de este análisis se concluye la existencia de interacción entre los parámetros pH y co-sustrato, elemento a tener presente en futuros diseños de ensayo (cuidando que el valor asignado al primer parámetro no incida negativamente sobre el segundo).



**Figura 3.58: Interacción entre parámetros.**

Realizando un análisis similar con las restantes combinaciones de variables se identifican como potenciales interacciones las siguientes: Temperatura en inducción y co-sustrato y Temperatura en inducción y Concentración de biocatalizador (Figura 3.58).

Respecto a esta última interacción, considerando que de acuerdo al resultado del test de hipótesis los efectos obtenidos a partir de la variación de la concentración de biocatalizador no responderían a un efecto real, se resuelve descartar su consideración.

Finalmente al reiterar el análisis la Temperatura de incubación post-inducción y el co-sustrato se observa la existencia de una interacción entre estas variables, presentando en el

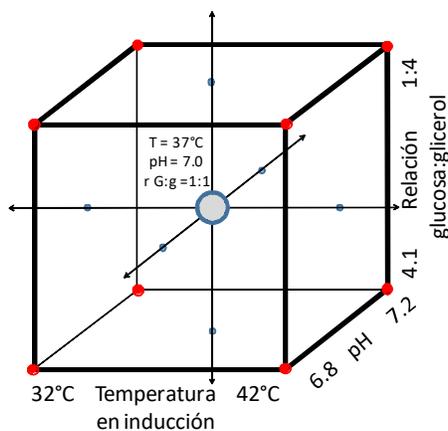
caso del uso de lactosa (19) como co-sustrato un notorio mejor desempeño a 37 °C, comparativamente al obtenido a 30 °C. No obstante, en cualquier caso el resultado es más magro que el verificado para el uso de glucosa (6) por lo que no altera la decisión previamente adoptada en relación al uso de este segundo compuesto como co-sustrato en futuros ensayo.

### Diseño factorial

Las variables pH, concentración de co-sustrato y temperatura de incubación en la inducción se seleccionan para el desarrollo del ensayo de optimización. Los restantes parámetros se mantienen fijos. En el caso del parámetro co-sustrato, atendiendo al notorio bajo desempeño presentado por lactosa (19) se resuelve ensayar diferentes niveles de relación glicerol (1) y glucosa (6) (sistematizando el ensayo descrito en 3.5.6).

Considerando que son tres los factores definidos para avanzar en el estudio de optimización se recurre a un diseño factorial  $2^3$  (ocho puntos de evaluación) los que gráficamente pueden visualizarse como un cubo en el que en cada vértice se ubica una condición a ensayar, según el modelo de Box y Wilson que se representa en la Figura 3.59.

Adicionalmente se incluyen en el ensayo la reiteración del punto calculado en el ensayo de Plakett-Burmann que permitió alcanzar el máximo valor absoluto (ensayo PB31 de la Tabla 3.9).



**Figura 3.59: Representación gráfica de un diseño factorial  $2^3$  modelo de Box y Wilson.**

A esos 8 puntos se le agregan a efectos de lograr una mejor aproximación acerca de la forma en que se da el pasaje desde un punto a otro (análisis de curvatura), 6 puntos de ensayo adicionales (correspondientes a los centros de las caras en la representación del cubo) finalmente se agregará el centro del cubo en cuadruplicado. (Ver Tabla 3.10)

Tabla 3.10: Diseño factorial 2<sup>3</sup> – modelo de Box y Wilson.

	Temp. p/Induc.	pH	Glucosa/glicerol	Punto en modelo de Box yWilson
OPT1	32	6,8	4 a 1	A vértice
OPT2	32	6,8	1 a 4	D vértice
OPT3	32	7,0	1 a 1	M centro de cara
OPT4	32	7,2	4 a 1	B vértice
OPT5	32	7,2	1 a 4	C vértice
OPT6	42	6,8	4 a 1	E vértice
OPT7	42	6,8	1 a 4	H vértice
OPT8	42	7,0	1 a 1	N centro de cara
OPT9	42	7,2	4 a 1	F vértice
OPT10	42	7,2	1 a 4	G vértice
OPT11	37	6,8	1 a 1	L centro de cara
OPT12	37	7,0	4 a 1	I centro de cara
OPT13	37	7,0	1 a 4	K centro de cara
OPT14	37	7,0	1 a 1	Ñ punto centralcuadruplicado
OPT15	37	7,0	1 a 1	O punto central cuadruplicado
OPT16	37	7,0	1 a 1	P punto central cuadruplicado
OPT17	37	7,0	1 a 1	Q punto central cuadruplicado
OPT18	37	7,2	1 a 1	J centro de cara

Tabla 3.11: Niveles definidos para cada parámetro.

	Niveles de los parámetros		
	-1	0	1
pH	6,8	7,0	7,2
Glucosa (6) /glicerol (1)	4 a 1	1 a 1	1 a 4
Temperatura en inducción	32 °C	37 °C	42 °C

El desarrollo de las reacciones en las condiciones previamente definidas permite obtener la serie de valores de concentración de 1,2-propanodiol (2), con los que resolver el polinomio de segundo grado que modela el desarrollo de la biotransformación. Para ello se recurre al Programa estadístico JMP.<sup>382</sup>

$$C_{1,2\text{-propanodiol (2)}} \text{ (g/L)} = 0.2501 - 0.0450 * T - 0.0051 * Gg + 0.0017 * pH + 0.0175 * Gg * T - 0.0202 * pH * Gg - 0.0183 * pH * T - 0.0857 * Gg^2 - 0.1836 * T^2 - 0.1150 * pH^2$$

En la Tabla 3.12 se presentan los valores obtenidos experimentalmente y el apartamiento (en valor absoluto) entre el valor experimental y el resultado del modelado.

Tabla 3.12: Ajuste del modelo a los datos experimentales en optimización.

	C <sub>1,2propanodiol</sub> (g/L)	Δ <sub>medido-calculado</sub>
OPT1	0,11	0,02
OPT2	0,16	0,09
OPT3	0,12	0,00
OPT4	0,07	0,07
OPT5	0,04	0,04
OPT6	0,00	0,00
OPT7	0,00	0,00
OPT8	0,00	0,00
OPT9	0,00	0,00
OPT10	0,00	0,00
OPT11	0,04	0,02
OPT12	0,22	0,05
OPT13	0,23	0,08
OPT14	0,27	0,02
OPT15	0,20	0,05
OPT16	0,21	0,04
OPT17	0,20	0,05
OPT18	0,25	0,02

El ajuste obtenido permite afirmar que el ajuste de segundo orden es significativo, presentando un  $R^2 = 0.9714$ .

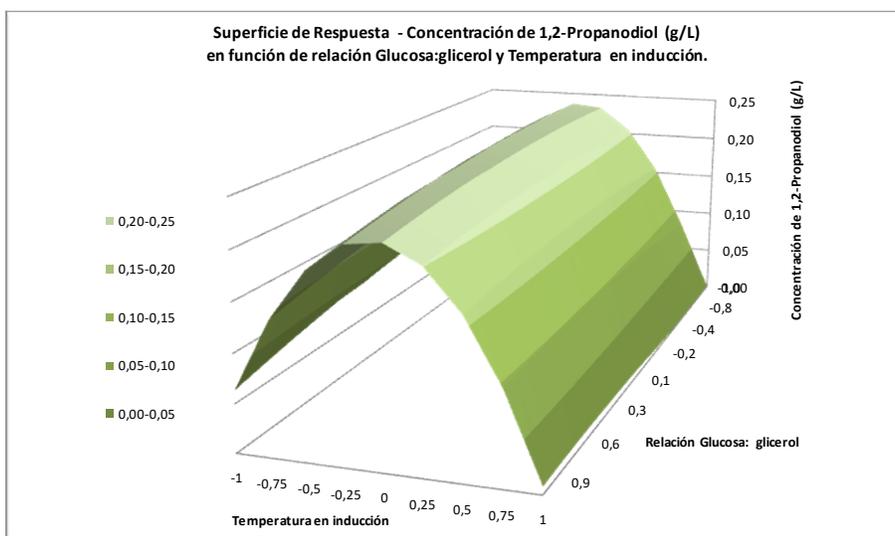


Figura 3.60: Superficie de respuesta Relación glucosa (6):glicerol (1) y temperatura en inducción.

En las Figura 3.60 a 3.62 se representan las superficies de respuesta obtenidas al combinar dos variables fijando el restante parámetro en nivel 0.

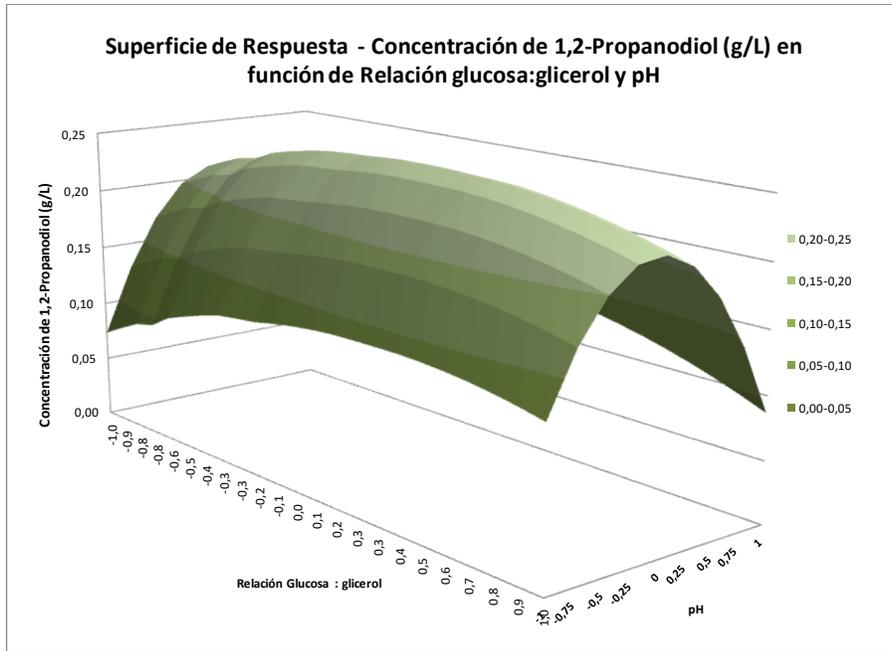


Figura 3.61: Superficie de respuesta Relación glucosa (6):glicerol (1) y pH.

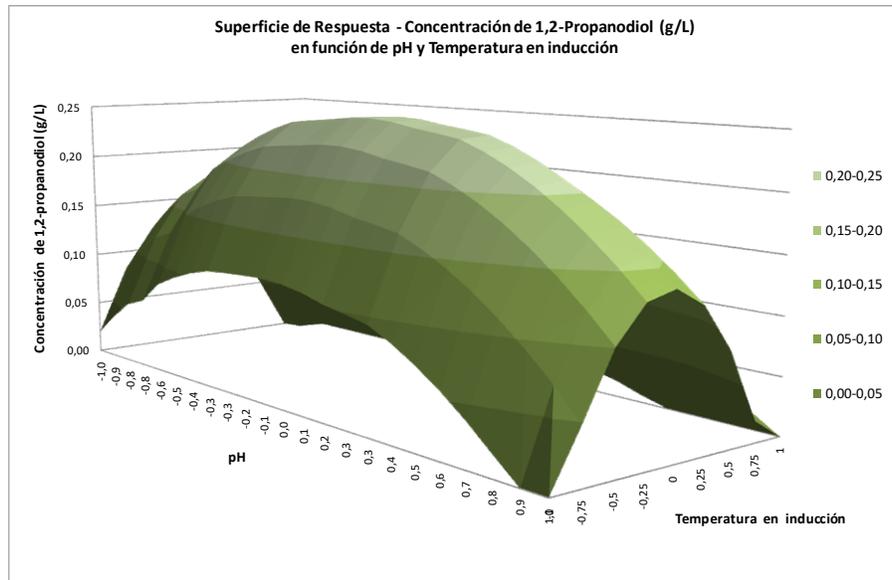


Figura 3.62: Superficie de respuesta Relación Temperatura en inducción y pH.

La optimización multivariable de la producción de 1,2-propanodiol (**2**) permite determinar que las condiciones que maximizan su producción son: pH=7.0, Relación glucosa (**6**) /glicerol (**1**) en rango 1:1 a 4:1 y Temperatura en inducción de 37 °C.

El valor de concentración de 1,2-propanodiol alcanzado en esas condiciones asciende a  $C_{1,2\text{-propanodiol}} = 0.27 \text{ g/L}$ .

No obstante lo anterior, en el proceso se alcanzó un valor puntual de **0,42 g/L** (Ver Tabla 3.7, entrada PB31).

Lo anterior podría explicarse o bien porque el sistema presenta un comportamiento que no está siendo modelado adecuadamente (comportamiento multimodal), lo cual parece difícil considerando lo próximo que esas condiciones se encuentran del punto central ensayado por cuadruplicado, o bien que, al descartar los dos parámetros menos relevantes se pierden más efectos que los previstos o visualizados en el análisis de Pareto.

Para concluir en este tema resultaría necesario reiterar el análisis estadístico reubicando los puntos en el modelo de Wilson y Cox o recurrir -según se recomienda en la bibliografía a un diseño escalonado que permita obtener la dirección del gradiente en la cual se ubica el máximo hasta alcanzar una solución en la que el máximo puntual y el obtenido a partir del modelo converjan.

A los efectos del presente trabajo se define continuar produciendo el diol con las siguientes condiciones Temperatura en inducción: 37°C, pH: 6,8; Co-sustrato: glucosa (**6**) en relación 1 a 1 con glicerol (**1**).

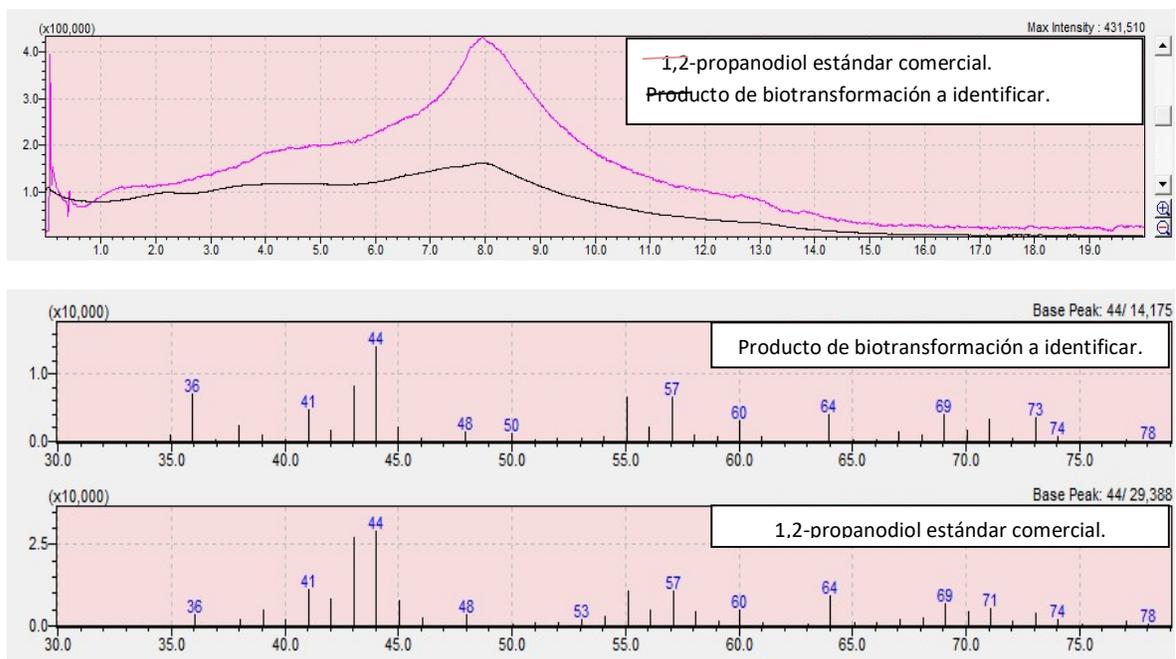
Estas condiciones permiten su producción a razón de  $C_{1,2\text{-propanodiol (2)}} = 0,42 \text{ g/L}$ .

### 3.6 Caracterización del producto de biotransformación

Una confirmación inicial de la identidad del producto obtenido en las biotransformaciones se realiza mediante la co-inyección de la muestra obtenida con estándar comercial de 1,2-propanodiol (**2**). (Método que permitió descartar en ensayos con cepa *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$  falsos positivos a partir de la obtención de productos con tiempos de retención en análisis por HPLC iguales a los del 1,2-propanodiol (**2**)).

Sobre muestras que co-inyectan con el 1,2-propanodiol (**2**) se realizan sucesivas corridas semipreparativas en HPLC colectando las fracciones correspondientes a los tiempos de elución del diol. Las muestras se liofilizan a efectos de remover la fase acuosa presente. El producto obtenido se analiza mediante Espectrometría de Masas por Inyección Directa.

Del análisis MS-ID se obtiene como resultado una total coincidencia tanto en la corriente iónica como en los perfiles de fragmentación observados para el producto aislado por HPLC semipreparativo y el estándar comercial de 1,2-propanodiol (**2**) utilizado como referencia.



**Figura 3.63: Espectrometría de Masas – Inyección Directa para producto obtenido de biotransformación y estándar de 1,2-propanodiol (2) comercial.**

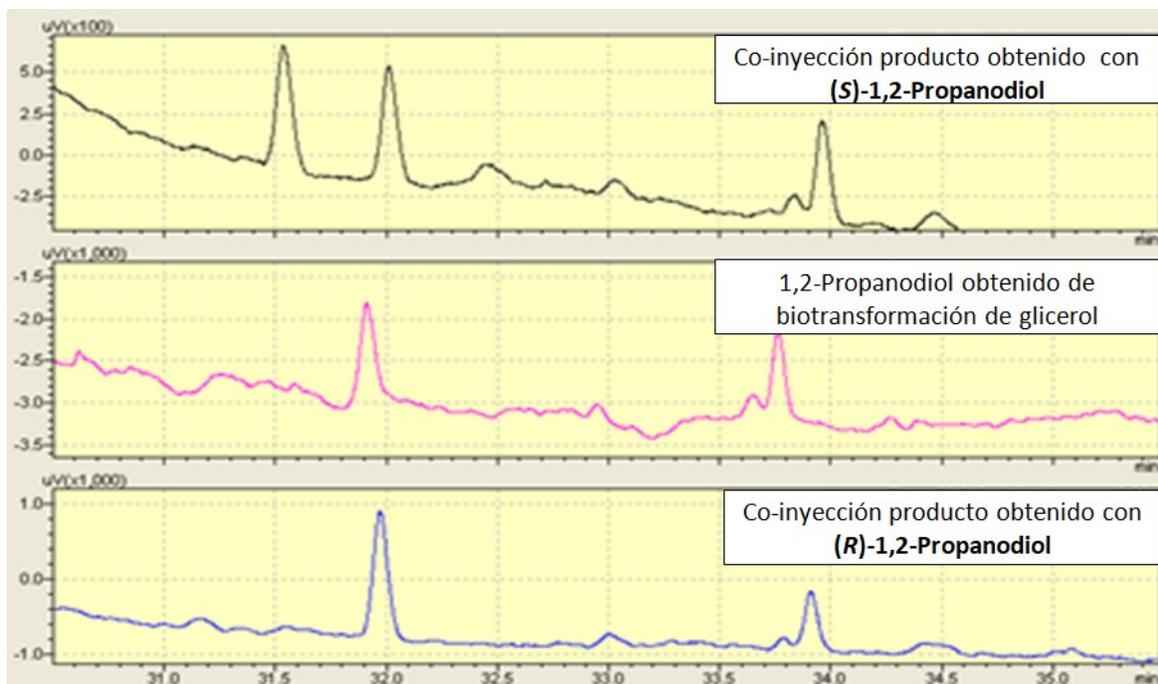
En relación al resultado obtenido se debe señalar que comparando el perfil de fragmentación del producto de biotransformación con el obtenido a partir del estándar comercial -en idénticas condiciones experimentales de ionización-, **resulta concluyente la identidad del producto obtenido en la biotransformación como 1,2-propanodiol(2).**

Simultáneamente el patrón obtenido difiere parcialmente del descrito en bibliografía, en la que los fragmentos característicos descritos son  $m/z=45(100)$ ,  $m/z=43(35)$ ,  $m/z=31(22)$ ,  $m/z=27(18)$ ,  $m/z=29(16)$ ,  $m/z=61(15)$ ,  $m/z=44(14)$ ,  $m/z=57(10)$ ,  $m/z=46(10)$  y  $m/z=28(10)$ .<sup>383</sup>

Lo anterior a la vez que confirma la importancia de las condiciones experimentales al momento de reportar los resultados restringe la posibilidad de avanzar en la caracterización de los restantes productos intervinientes en la vía metabólica de los que no se dispone del producto comercial para ser utilizado como referencia en las condiciones de ensayo.

### 3.7 Estereoquímica del Producto obtenido

Como se señalara en diversos apartados de este trabajo la estrategia de valorización a la que se apuesta pasa por la síntesis de moléculas con estereoisomería definida. Sobre esa base resulta necesario verificar la característica del producto obtenido como resultado de este proceso.



**Figura 3.64:** GC-quiral-inyección del producto de biotransformación con estándares comerciales (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**) y (*S*)-1,2-propanodiol (**2b**).

Para este objetivo se recurre a Cromatografía Gaseosa Quiral, ensayando en una primera instancia sobre el extracto del producto directo racémico, sin que fuera posible identificar condiciones que permitieran la separación de enantiómeros ( $R_s \ll 1$ ). Sobre la base de este resultado se recurre a la acetilación e inyección del producto derivatizado verificándose buena resolución cromatográfica ( $R_s = 2.8$ )

Ajustadas las condiciones de análisis se inyecta el producto de reacción de derivatización de la muestra de biotransformación (fracción liofilizada de la alícuota obtenida en HPLC semi-preparativa recuperada en solvente), confirmándose en primera instancia por comparación con los estándares y posteriormente mediante co-inyección la identidad del producto de biotransformación como (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**) con **exceso enantiomérico superior a 99 %** (Ver Figura 3.64).

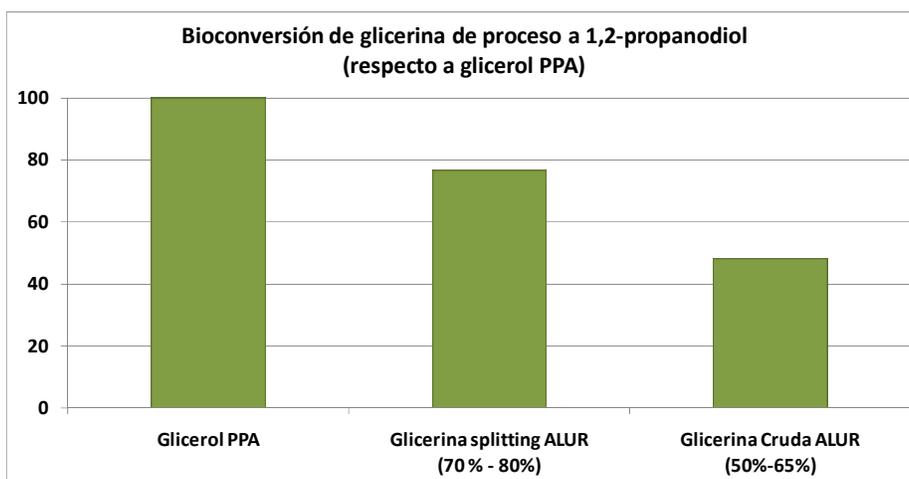
### 3.8 Biotransformación con *E.coli*/FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4) en régimen de células en reposo de glicerina obtenida en proceso industrial

Una vez verificada la funcionalidad de la vía metabólica diseñada y caracterizado el producto obtenido en la reacción se procede a evaluar el desempeño del biocatalizador cuando se lo enfrenta no a glicerol (**1**) PPA (utilizado hasta el momento en todas las etapas previas) sino a glicerina (**21**) obtenida de proceso productivo al que se pretende aportar.

Se utiliza con este fin glicerina cruda (**21a**) y glicerina splitting (**21b**) (obtenida del proceso de purificación por el que se separa oleína de glicerina), ambos insumos provistos por la firma ALUR S.A.(ver caracterización analítica en apartado 5.4.13).

Se evalúa la biotransformación de glicerina cruda (**21a**), glicerina splitting (**21b**) y glicerol (**1**) PPA con el biocatalizador *E.coli*FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4)en régimen de células en reposo en condición de anaerobiosis, evaluando los resultados a las 48 horas, cuando se utiliza el glicerol (**1**) como sustrato sólo y con glucosa (**6**) como co-sustrato.

En las biotransformación a partir de glicerina si bien se observa formación de producto la concentración de 1,2-propanodiol (**2**) se ubica por debajo del límite de cuantificación.



**Figura 3.65: Biotransformación de glicerina cruda (21a) y splitting (21b)/glucosa (6) respecto a glicerol (1) PPA/ glucosa (6). Células en reposo con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4).**

Seguidamente, se ensaya la biotransformación de los mismos tres productos con glucosa (**6**) como co-sustrato obteniéndose los resultados que se incluyen en la Figura 3.65. En estas condiciones se calculan niveles de bioconversión (corregida por la pureza de glicerol (**1**) en los sustratos) del 77 % cuando se recurre a glicerina splitting y del 48 % cuando se utiliza glicerina cruda tomando como referencia la obtenida con glicerol (**1**) PPA. Se concluye que no existiría barrera que impida avanzar a futuro en el ajuste de las condiciones del proceso para utilizar glicerina obtenida como subproducto de la industria de biodiésel.

En relación a las alternativas glicerinasplitting (**21b**) y glicerina cruda (**21a**), si bien con este último producto se obtendría una menor concentración del diol, correspondería evaluar el impacto que por un lado pudiera presentar la etapa de purificación sobre el costo contra el incremento en el rendimiento obtenible. En principio se considera que podría no ameritar una instancia de purificación previa a la biotransformación por lo que se considera razonable mantener ambos productos como potenciales sustratos.

En cualquier caso, el resultado más importante de estos ensayos es cualitativo, pudiendo resumirse que frente a ambos productos de origen industrial la vía metabólica diseñada es funcional según lo previsto.

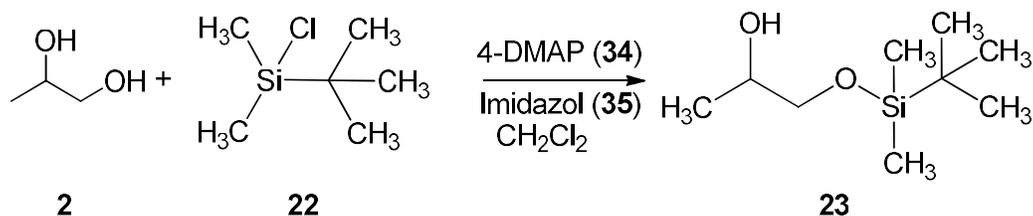
### 3.9 Síntesis de productos de interés a partir de (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**)

La síntesis de productos derivados de 1,2-propanodiol (**2**) se realiza en el marco de una colaboración con la Dra. Carmela Molinaro del Dipartimento di Chimica e Technologie del Farmaco Sapienza Università di Roma (Italia), en el marco de su pasantía realizada en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de la República quien ajustó las condiciones de reacción química con el sustrato racémico y posteriormente con el reactivo ópticamente puro.

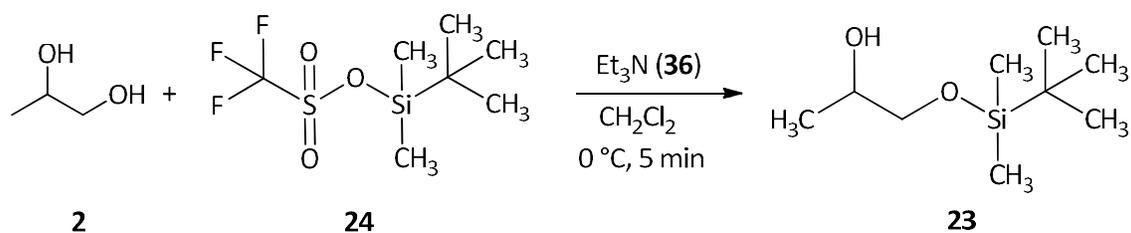
#### Síntesis de (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8a**)

La búsqueda de las mejores condiciones de reacción para la síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol (**8**) se realiza a partir de propilenglicol siguiendo las etapas de reacción que se detallan a continuación:

- i) Protección del alcohol primario para la cual se recurre a cloruro de *tert*-butil dimetil silano (**22**) y alternativamente a trifluorometanosulfonato de *tert*-butil dimetil silano (triflato de *tert*-butil dimetil silano) (**24**) según se describe en los Esquemas 3.1 y 3.2.

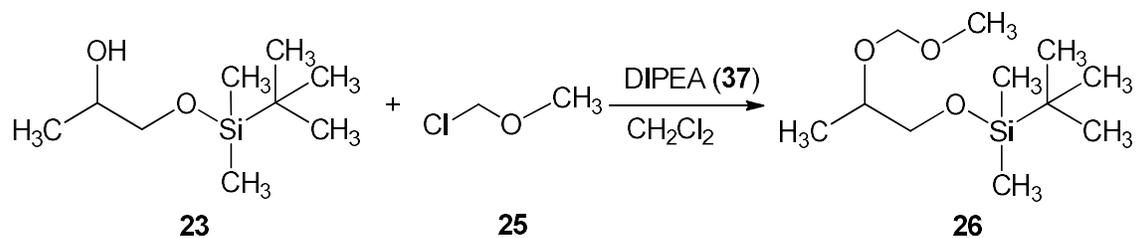


Esquema 3.1: Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol - protección del alcohol primario.



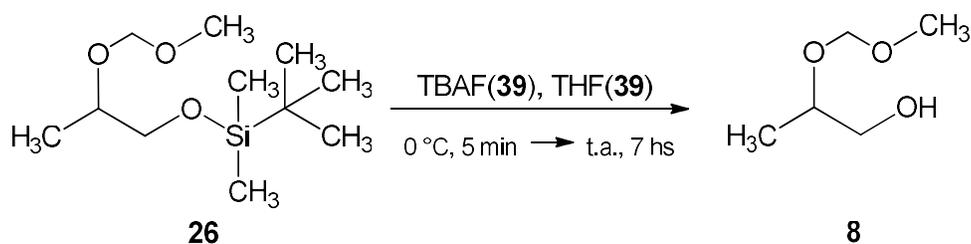
Esquema 3.2: Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol – método de protección alternativo.

- ii) Reacción del 1,2-propanodiol (**2**) con el alcohol primario protegido (**23**) con Cloro-metil-metil éter (**25**) según se describe en las Esquema 3.3.

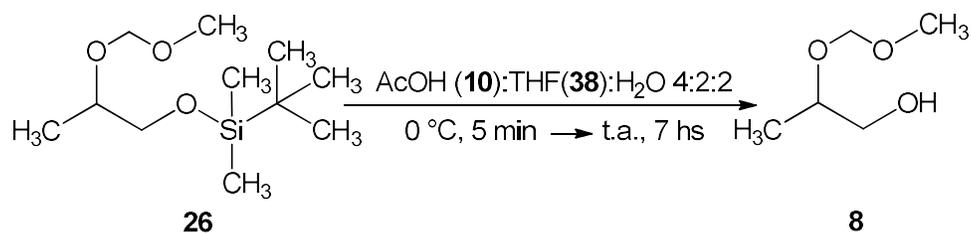


**Esquema 3.3: Reacción de 1-((*tert*-butildimetilsilil)oxy)propan-2-ol (**23**) con cloro-metil-metil éter (**25**).**

- iii) Desprotección del alcohol primario para la cual se recurre a TBAF/THF y alternativamente a AcOH:THF:H<sub>2</sub>O según se describe en los Esquemas 3.4 y 3.5.



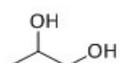
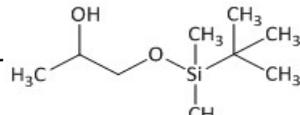
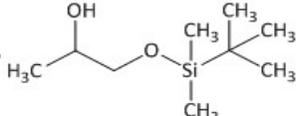
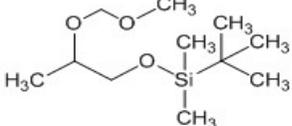
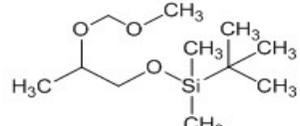
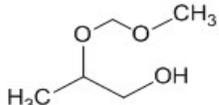
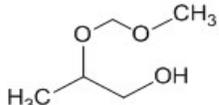
**Esquema 3.4: Reacción de desprotección de *tert*-butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetilsilano (**26**) y obtención de 2-metoximetoxi-1-propanol (**8**).**



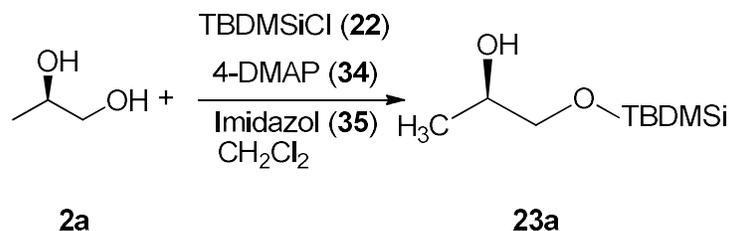
**Esquema 3.5: Desprotección de *tert*-butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetilsilano (**26**) y obtención alternativa de 2-metoximetoxi-1-propanol (**8**).**

En la Tabla 3.13 se resumen los rendimientos obtenidos en cada etapa de reacción. Las condiciones seleccionadas para la reacción con el reactivo quiral son las establecidas en entradas 1, 3 y 6 para cada etapa de reacción.

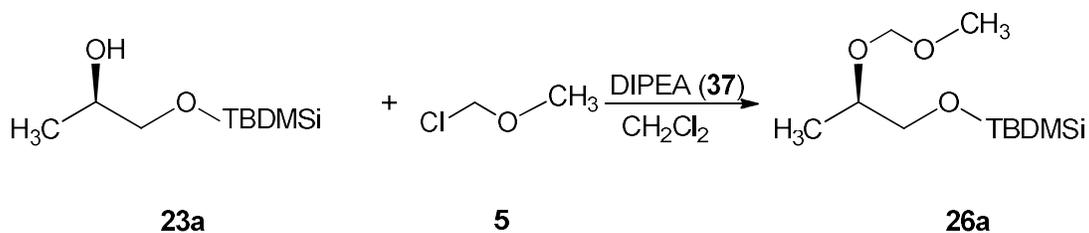
**Tabla 3.13: Resultados obtenidos en síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol.**

Entrada	Reactivo	Condiciones	Producto	Rendimiento
1		4-DMAP / imidazol / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco t.a., 2 hs		70%
2		Et <sub>3</sub> N / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco 0 °C, 5 min		66%
3		MOMCl / DIPEA / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco 0 °C, 1 h - t.a., 12 hs		58%
4		MOMCl / DIPEA 0 °C, 1 h - t.a., 12 hs		43%
5		TBAF/THF 0 °C, 5 min - t.a., 7 hs		Muy bajo
6		AcOH:THF:H <sub>2</sub> O (4:2:2) t.a., 20 hs		20%

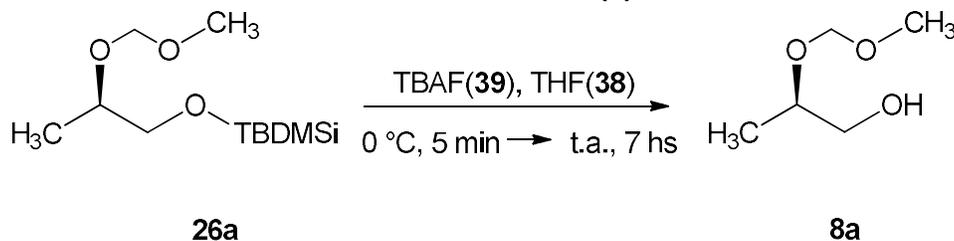
En base a los resultados obtenidos previamente la reacción de (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (8a) se realiza siguiendo los mismos pasos según se describe en los Esquemas 3.6 a 3.8.



**Esquema 3.6: Síntesis de (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (8), protección del alcohol primario.**

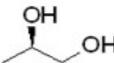
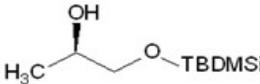
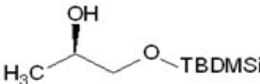
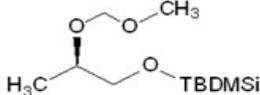
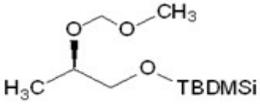
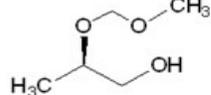


**Esquema 3.7: Reacción de (*R*)-1-((*tert*-butil dimetil silil)oxy)propan-2-ol (23a) con cloro-metil-metil éter (5).**



**Esquema 3.8: Desprotección de (*R*)-*tert*-butil(2-metoximetoxi propoxi)dimetil silano (26a) y obtención de (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (8a).**

**Tabla 3.14: Resultados obtenidos en síntesis de (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8a**).**

Entrada	Reactivo	Condiciones	Producto	Rendimiento
1		4-DMAP / imidazol / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco t.a., 2 hs		90%
2		MOMCl ( <b>5</b> ) / DIPEA / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco 0 °C, 1 h - t.a., 12 hs		96%
3		AcOH:THF:H <sub>2</sub> O (4:2:2) t.a., 20 hs		70%

En Tabla 3.14 se resumen los resultados obtenidos en esas reacciones.

El rendimiento global de la conversión de (*R*)-1,2-propanol (**2a**) a (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8a**) asciende a 61 %.

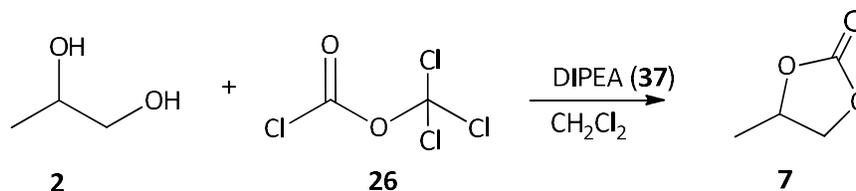
La caracterización del producto obtenido se realiza mediante RMN, GC quiral y determinación de rotación óptica.

GC quiral  $t_R$  (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8a**) = 30.233 min

$\alpha_D^{20}$  (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8a**) = -33.23 min (3.2 g/100 mL; CHCl<sub>3</sub>)

### Síntesis de (*R*)-propilencarbonato (**7a**)

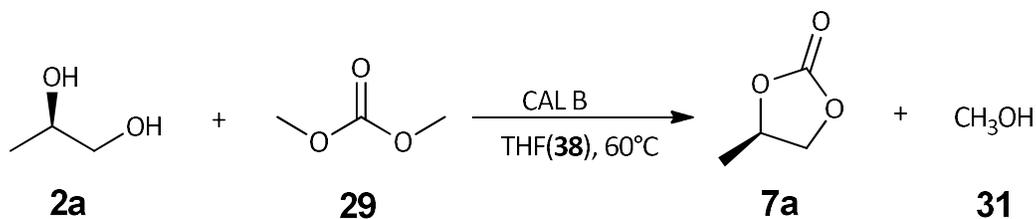
La búsqueda de las mejores condiciones de reacción para la síntesis de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) se realiza a partir de propilenglicol siguiendo la reacción en un paso que se detalla en el Esquema 3.9.



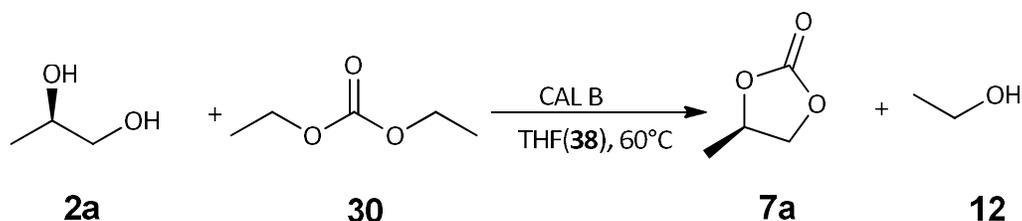
**Esquema 3.9: Síntesis de propilencarbonato (**7**).**



La actividad de esta lipasa se evalúa en las siguientes reacciones en que el (*R*)- 1,2-propanodiol (**2a**) reacciona con dimetilcarbonato (**29**) y con dietilcarbonato (**30**) según se describe en los Esquemas 3.12 y 3.13.



**Esquema 3.11: Síntesis enzimática de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) - reacción con dimetilcarbonato (**29**).**

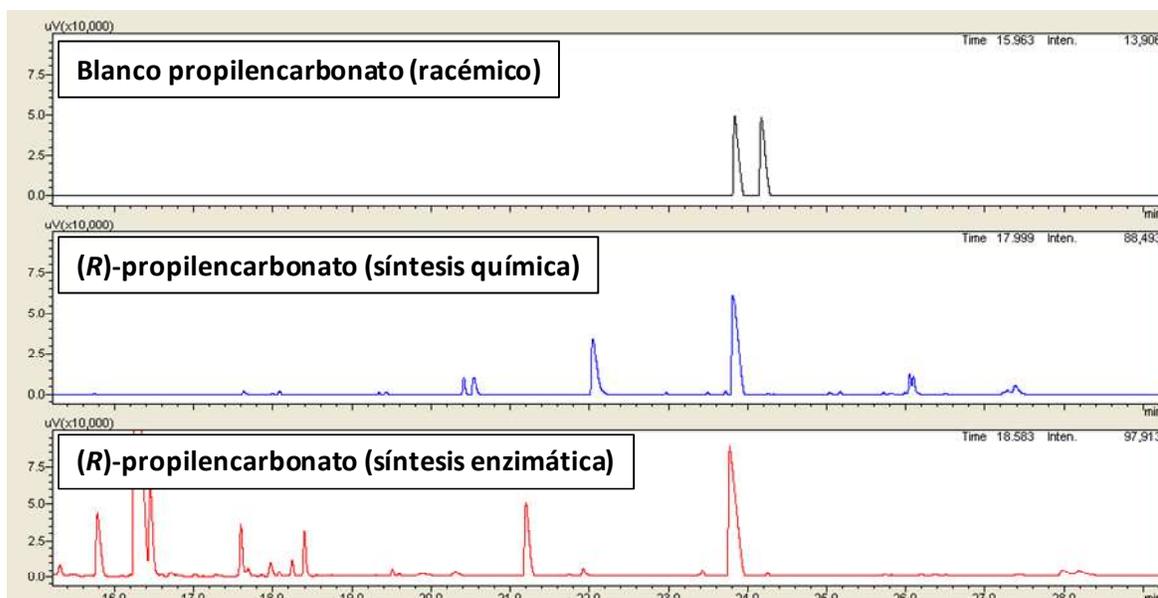


**Esquema 3.12: Síntesis enzimática de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) – reacción con dietilcarbonato (**30**).**

El análisis de los resultados obtenidos confirma la obtención enzimática de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) enantioméricamente puro (e.e. > 99 %) a partir de ambos sustratos con conversiones de 5,2 % y 14,8 % a partir de dietilcarbonato (**30**) y dimetilcarbonato (**29**) respectivamente.

La asignación de la estereoisomería se realiza utilizando el propilencarbonato (**7**) racémico y al (*R*)-propilencarbonato (**7a**) obtenido en la síntesis química como estándares (ver Figura 3.66).

Si bien resulta necesario afinar las condiciones de reacción a efectos de mejorar los rendimientos, este resultado preliminar permite afirmar que se ha completado la **síntesis de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) a partir de glicerol (**1**) recurriendo exclusivamente a biocatálisis.**



**Figura 3.66: GC-quiral - Estándar comercial de propilencarbonato (7) racémico, (R)-propilencarbonato (7a) síntesis química y (R)-propilencarbonato (7a) obtenido enzimáticamente.**

### 3.10 Síntesis de lactaldehído (4)

Este producto se encuentra comercialmente disponible desde hace relativamente poco tiempo. Al momento de su utilización según se describe en los apartados 3.5.5.1 y 5.4.8 no resulta posible su adquisición hecho éste que motiva su síntesis, la que fue desarrollada por la vía quimio-enzimática. Por otra parte, para la actividad descrita 3.5.7 se recurre a la síntesis química del sustrato.

#### 3.10.1 Síntesis quimio-enzimática de lactaldehído (4)

Para la síntesis quimio-enzimática de lactaldehído (4) se recurre a la siguiente estrategia:

- i) Reducción enzimática de metilglioxal 1,1-dimetil acetal (**32**), con posterior hidrólisis del acetal (**33**) para obtener el lactaldehído (**4**).
- ii) Reducción enzimática de metilglioxal (**3**) obteniéndose potencialmente los siguientes tres productos: lactaldehído (**4**), acetol (**14**) y 1,2-propanodiol (**2**).

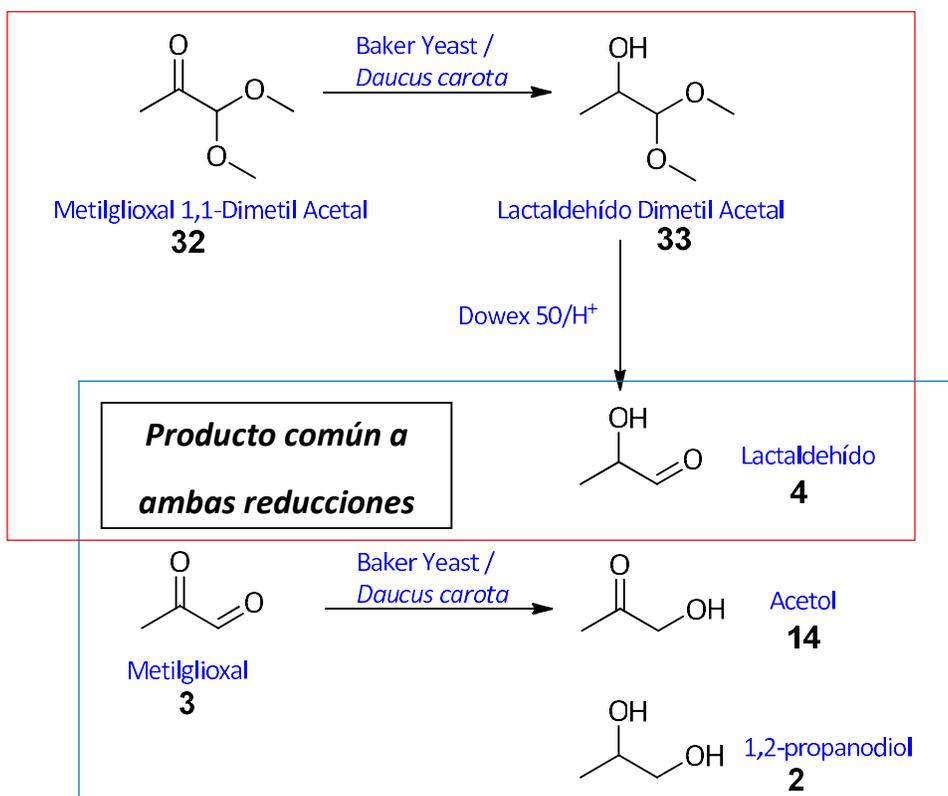


Figura 3.67: Productos de biorreducciones de metilglioxal 1,1-dimetil acetal (**32**) y de metilglioxal (**3**) con *S. cerevisiae* y *Daucus carota*.

Las reacciones i) y ii) se realizan paralelamente usando como biocatalizadores levadura de panificación (*S. cerevisiae*) y zanahoria (*D. carota*) (ver Figura 3.67).<sup>369,384–386</sup>

Como resultado de ambas biorreducciones es posible asignar el  $t_R$  del lactaldehído (**4**) en los cromatogramas de seguimiento de reacciones mediante HPLC. No obstante lo anterior, la concentración de producto obtenido no permite su aislamiento con fines de cuantificación.

### 3.10.2 Síntesis química de lactaldehído (**4**)

La reacción de síntesis se realiza reduciendo con  $\text{NaBH}_4$  el dimetil acetal del piruvaldehído (o metilglioxal 1,1-dimetil acetal) (**32**), seguida de la desprotección del lactaldehído dimetilacetal (**33**) por incubación con resina Dowex 50-X8  $\text{H}^+$ .<sup>387</sup>

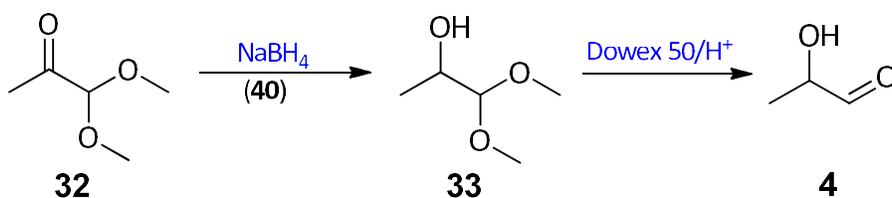


Figura 3.68: Síntesis de DL-lactaldehído (**4**).

Se confirma la identidad del producto obtenido en esta reacción como lactaldehído (4) a través de <sup>1</sup>H RMN y GC-MS.

Los resultados obtenidos a partir de la síntesis química permiten adicionalmente validar las conclusiones a que se arribara a partir de la síntesis quimio-enzimática.

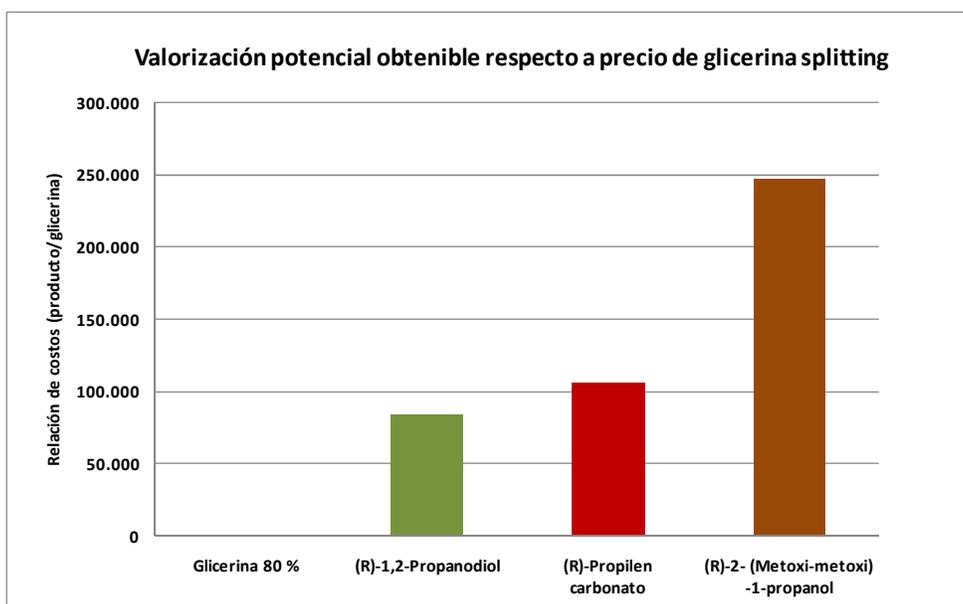
### 3.11 Valorización obtenida en las biotransformaciones realizadas

En la Tabla 3.16 se incluyen los costos de la glicerina splitting (80 %) y de los productos obtenidos en el marco del presente trabajo. Se debe señalar la dificultad que presenta identificar en el actual contexto, en el mercado local, un valor para la glicerina cruda (a nivel internacional se obtienen ofertas en el rango 80-200 USD/ton).

**Tabla 3.16 Costos unitarios glicerina splitting (21b) y productos obtenidos.**<sup>5</sup>

Producto	Costo unitario
Glicerina 80 %	350 USD/ton
(R)-1,2-Propanodiol	29,5 USD/g
(R)-Propilen carbonato	37,1 USD/g
(R)-2-(Metoxi-metoxi)-1-propanol	86,6 USD/g

Por su parte, en la Figura 3.69 se representa la valorización potencial calculada a partir de los costos unitarios de los productos.



**Figura 3.69: Valorización obtenida en el marco del presente trabajo.**

<sup>5</sup> Valores tomados de catálogos comerciales en octubre de 2017.

## **Capítulo 4**

### ***Conclusiones y perspectivas***

Página intencionalmente dejada en blanco

## 4.1 Conclusiones

La ejecución del presente trabajo ha permitido el aporte de una alternativa innovadora tendiente a lograr la valorización de glicerol (1) obtenido como subproducto de la industria del biodiésel, enmarcada en los conceptos de biorrefinería, química verde y de economía circular.

A partir del diseño racional de una vía metabólica *de novo* se ha concretado su ejecución y evaluado su funcionalidad.

Para el conjunto de biocatalizadores desarrollados (once hasta el momento) se ha evaluado su funcionalidad enfrentándolos a glicerol (1), glicerol (1)-glucosa (6), metilglioxal (3) en presencia de glicerol (1)-glucosa (6) y lactaldehído (4) en presencia de glicerol (1)-glucosa (6) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, en régimen de células en crecimiento y de células en reposo. Concluyéndose que la vía metabólica resulta funcional.

Los sistemas diseñados presentan un comportamiento que se diferencia del observado en la cepa control. Los biocatalizadores en los que se expresa una de las reductasas presentan comportamiento intermedio entre el observado para la cepa control y para los biocatalizadores que co-expresan ambas reductasas, en los que es posible observar comportamiento sinérgico en el accionar conjunto de ambas enzimas.

Se observa un mejor desempeño para las cepas derivadas de *E. coli* FMJ39 (doble mutante lactato deshidrogenasa-piruvato formiato liasa), que para la serie construida a partir de *E. coli* BL21(DE3), lo cual *a priori* se considera razonable, atendiendo a que precisamente la afectación de vías competitivas en la regeneración de equivalentes de reducción ha sido la característica que ha motivado su selección para el presente trabajo.

Para arribar a las conclusiones anteriores ha sido necesario alcanzar la incorporación a nivel del cromosoma de *E. coli* FMJ39 de la T7 RNA polimerasa regulada por el promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (20), modificación que da lugar a la cepa que es punto de partida de una nueva serie de biocatalizadores la *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT.

En relación a la serie de biocatalizadores obtenida a partir de esta cepa ha sido motivo de preocupación el hecho de observar volúmenes no despreciables de lactato (11) y formiato (13) en las biotransformaciones. Para este resultado experimental se han ensayado diversas explicaciones, dependiendo del producto que se considere. La presencia de ácido láctico (11), puede asignarse a la existencia de otras posibles vías que permitieran su síntesis como producto de detoxificación de metilglioxal (3), por ejemplo mediante el *by-pass* del S-lactoilglutación o a través de la dismutación del lactaldehído (4). Por su parte, la presencia del ácido fórmico (13) estaría justificada por la acción de la  $\alpha$ -cetobutirato formiato-liasa (codificada por el gen *tdcE*). Esta enzima presenta, en condiciones de crecimiento anaerobio

a partir de glucosa (6), actividad piruvato formiato-liasa aceptando como sustrato al piruvato (17) con igual eficiencia que al  $\alpha$ -cetobutirato (18).<sup>377-379</sup>

Realizada la evaluación preliminar de desempeño se ha introducido una mejora al sistema inicialmente diseñado con la finalidad de favorecer el acceso de metilglioxal (3) a la vía metabólica y remover de esa forma la restricción más importante identificada para el funcionamiento del sistema. La expresión de la metilglioxal sintasa de *E. coli* ha permitido mejorar -aunque solo parcialmente- el rendimiento en la biotransformación de glicerol (1)-glucosa (6) con *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4)(pWS5). Al respecto se concluye que esta actividad en *E. coli* se encuentra fuertemente regulada atendiendo a que el producto de su actividad es un compuesto altamente tóxico para el microorganismo hospedero.

Adicionalmente, para el biocatalizador *E. coli* FMJ39-T7*pol*-Gm-FRT(pWS4), se ha evaluado su desempeño al enfrentarlo al producto obtenido en la producción industrial de biodiésel, alcanzándose rendimientos más que razonables para la biotransformación de glicerina splitting y glicerina cruda al compararlo con el glicerol (1) PPA (77 % y 48 % respectivamente). A partir de lo anteriormente expuesto es posible concluir que, a priori el uso de glicerina cruda como sustrato constituye una alternativa pasible de ser considerada en etapas futuras para la obtención del diol.

**Tabla 4.1: Comparativo de resultados de biotransformaciones a (R)-1,2-propanodiol (2a).**

Producción de (R)-1,2-propanodiol				
Microorganismo (Ingeniería metabólica)	Sustrato	Referencia	Concentración (g/L)	Observaciones
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa	Hoffman, 1999	0,52	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> AG1	Glucosa	Altaras, <i>et al.</i> , 1999	0,49	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)(pWS5)	Glicerol/Glucosa	Este trabajo	0,45	<i>mgs</i> de <i>E. coli</i> , <i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> AG1	Glucosa	Cameron, <i>et al.</i> , 1998	0,34	<i>dhaD</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)	Glicerol/Glucosa	Este trabajo	0,33	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Fructosa	Huang, <i>et al.</i> , 1999	0,30	<i>mgs</i> de <i>Clostridium</i> y <i>gld</i> de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)	Glicerina splitting/ Glucosa	Este trabajo	0,26	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> AG1	Glucosa	Altaras, <i>et al.</i> , 1999	0,26	<i>mgs</i> de <i>E. coli</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosa	Hoffman, 1999	0,24	<i>mgs</i> de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)	Glicerina cruda/ Glucosa	Este trabajo	0,17	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> AG1	Glucosa	Cameron, <i>et al.</i> , 1998	0,15	<i>gld</i> de <i>E. coli</i>

Desde el punto de vista cuantitativo se ha obtenido enzimáticamente el producto (R)-1,2-propanodiol (2a) enantioméricamente puro y en niveles de concentración que si bien se ubican distantes de los máximos obtenidos con *T. thermosaccharolyticum* en procesos

continuos se posicionan razonablemente bien dentro del rango descrito en la bibliografía, para microorganismos genéticamente modificados en sistemas batch (Ver Tabla 4.1).

Por otra parte, al realizar la comparación con biotransformaciones de glicerol (1) se observan dos grupos de reacciones, las que no reportan la estereoquímica del producto obtenido (asumidas en principio como racémicas o con excesos enantioméricos bajos) y las que permiten la obtención de producto enantioméricamente puro (ver Tabla 4.2).

**Tabla 4.2: Comparativo resultados biotransformaciones de glicerol (1) a 1,2-propanodiol (2)**

Uso de glicerol como sustrato					
Microorganismo	Sustrato	Referencia	Concentración (g/L)	Estereoquímica	Observaciones
MG1655 $\Delta ackA-pta \Delta ldhA \Delta dhak$ (pTHKLcglidA mgsAyqhD)	Glicerol	Clomburg, 2011	5,60	Nd	<i>mgs, gldA</i> e <i>yqhD</i> de <i>E.coli</i> , dihidroxiacetona kinasa de <i>C. freundii</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Glicerol	Jung, 2011	2,19	Nd	<i>mgs</i> y <i>gld</i> de <i>E.coli</i> , <i>gdh</i> de <i>Pichia angusta</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)(pWS5)	Glicerol/Glucosa	Este trabajo	0,33	(R), 99 % ee	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)(pWS5)	Glicerina splitting/Glucosa	Este trabajo	0,26	(R), 99 % ee	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>E. coli</i> FMJ9-T7 <i>pol</i> -Gm-FRT-(pWS4)(pWS5)	Glicerina cruda/Glucosa	Este trabajo	0,17	(R), 99 % ee	<i>GRE2</i> e <i>YPR1</i> de <i>S. cerevisiae</i>

En otro orden, ha sido posible alcanzar la síntesis químico-enzimática de (R)-2-metoxi metoxi-1-propanol y de (R)-propilencarbonato (7a) alcanzando rendimientos globales por encima del 60 % y 90 % respectivamente. Los productos obtenidos son en ambos casos enantioméricamente puros (e.e. > 99 %).

Complementariamente, se ha demostrado la posibilidad de lograr la síntesis biocatalítica del (R)-propilencarbonato (7a), catalizando la reacción de transesterificación entre el (R)-1,2-propanodiol (2a) y el dietilcarbonato (30) ó el dimetilcarbonato (29) con la lipasa inmovilizada CAL-B de *Candida antarctica*, (logrando bioconversiones de aproximadamente 5 % y 15 % respectivamente y e.e. > 99 %).

De esta forma se ha logrado completar la producción de (R)-propilencarbonato (7a) a partir de glicerol (1) recurriendo exclusivamente a técnicas biocatalíticas (hecho éste que habilitaría el reemplazo de reactivos como el difósgeno (26) y el trifósgeno (27) que presentan cuestionamientos tanto desde el punto de vista ambiental como desde el punto de vista de la seguridad laboral).

Se ha evaluado la valorización económica potencial que estas derivatizaciones del (R)-1,2-propanodiol (2a) obtenido permitirían alcanzar, concluyéndose que, la relación de precios entre estos productos y el glicerol (1) obtenido en el proceso industrial, permitiría iniciar el análisis de pre-factibilidad económica de su producción.

## 4.2 Perspectivas

Las líneas identificadas para dar continuidad a este trabajo pueden clasificarse en: posibles mejoras a introducir a los biocatalizadores diseñados, trabajos necesarios de cara a un potencial escalado del proceso y revisión de las condiciones de síntesis de productos derivados de interés.

En relación a la construcción de los biocatalizadores, a futuro correspondería ensayar la mejora introducida que permite la expresión de la metilglioxal sintasa de *E. coli* en los biocatalizadores derivados de *E. coli* BL21(DE3) y de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *yqhE*, reevaluando su desempeño.

Una línea de trabajo a desarrollar a futuro podría estar integrada por lograr la expresión de los vectores construidos en cepas de *E. coli* que presenten deleciones de los genes *pfl* y *tdcE*. Asimismo, modificaciones genéticas adicionales podrían considerarse afectando las vías metabólicas competitivas por ejemplo la obtención de lactato (**11**) a partir de metilglioxal (**3**) mediante el *by-pass* del S-lactoilglutatión.

En esa misma línea podría evaluarse la expresión de la enzima glicerol deshidrogenasa (*gldA*) con la finalidad de favorecer la formación de dihidroxiacetona (DHA), sustrato de la *mgsA* y/o la deleción del gen que codifica para la triosa-fosfato-isomerasa-1 (*tpi1*) a efectos de evitar la demanda competente de DHA hacia gliceraldehído 3-fosfato, dejando como única posibilidad su transformación en metilglioxal (**3**).

En relación al escalado del proceso se entiende necesario evaluar el desempeño de la vía metabólica en biotransformaciones en régimen continuo.

A partir de la optimización multivariable desarrollada en condiciones batch se ha identificado como variables con incidencia predominante en el resultado de la biotransformación el pH, la temperatura de incubación en la etapa posterior a la inducción, y la relación glicerol (**1**):glucosa (**6**). Correspondería desarrollar el análisis de la influencia de las variables no incluidas a partir del análisis de Pareto en régimen continuo, durante el escalado del proceso. La obtención en régimen continuo del producto genera nuevos desafíos a ser considerados, entre los que se pueden mencionar las actividades de extracción y purificación del producto.

Correspondería, analizar alternativas que permitan reducir el volumen de antibióticos demandado como presión positiva por parte de los biocatalizadores, a la vez que, buscar alternativas económicas a medios de cultivo de cara a su posible uso en fase comercial.

En otro orden, respecto a la revisión de las condiciones de síntesis de productos derivados de interés se propone profundizar en el ajuste de las condiciones de reacción a efectos de incrementar los rendimientos obtenidos preliminarmente en la síntesis enzimática de (*R*)-

propilencarbonato (**7a**). Adicionalmente, se prevé evaluar el desempeño de otros biocatalizadores (lipasas y microorganismos que las expresan) de la colección del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química - UdelaR.

En forma análoga se plantea explorar alternativas que permitan aplicar este mismo concepto a la síntesis del (*R*)-2-metoximetoxi-1-propanol (**8**), recurriendo a herramientas biocatalíticas, en la búsqueda de completar su obtención a partir de glicerol (**1**) mediante técnicas de química verde ambientalmente amigables.

Finalmente, la identificación de nuevos derivados de (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**) a ser sintetizados podría abordarse con igual criterio.

### 4.3 Comentarios finales

La obtención -hasta donde se tiene conocimiento- del primer microorganismo desarrollado por ingeniería metabólica en la Cátedra de Microbiología y el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química de la UdelaR, representa un hito en sí mismo.

A su vez el conocimiento acuñado a lo largo de este proceso puede constituir una base sólida para el desarrollo de futuras actividades que, o bien avancen según se ha descrito hacia el desarrollo comercial de los productos referidos, o bien permitan desencadenar nuevas líneas de investigación en temas similares.

En síntesis, existen posibilidades para continuar avanzando sobre la base de los resultados aquí expuestos en el desarrollo de esta alternativa que pretende aportar a la sostenibilidad de la producción de biodiésel, contribuyendo a la remoción -en forma ambientalmente amigable- de la restricción más importante identificada a la fecha para la producción de este biocombustible, su balance económico.

Página intencionalmente dejada en blanco

# **Capítulo 5**

## ***Metodología***

Página intencionalmente dejada en blanco

## 5.1 Materiales y métodos microbiológicos

### 5.1.1 Secuencias de genes de interés

**GRE2:**Systematic Name: YOL151W, SGD ID: S000005511.

**YPR1:**Systematic Name: YDR368W, SGD ID: S000002776.

**mgsA:**Alternate Gene Symbols:yccG, ID: EG12307.

### 5.1.2 Vectores utilizados y construidos

En la Tabla 5.1 se incluyen los vectores utilizados en el presente trabajo.

**Tabla 5.1: Vectores utilizados**

Vector	Selección	Origen	Característica utilizada /uso	Referencia
<b>pETDuet-1</b>	Amp	EMD Biosciences	Vector de expresión	<sup>388</sup>
<b>pACYCDuet-1</b>	Cm	Novagen	Vector de expresión	<sup>389</sup>
<b>pSRG14</b>	Ura	Dra. Sonia Rodríguez	Molde <i>YPR1</i>	<sup>320</sup>
<b>pSRG41</b>	Leu	Dra. Sonia Rodríguez	Molde <i>GRE2</i>	<sup>320</sup>
<b>pTZ57R/T</b>	Amp	Thermo Fisher Scientific	Vector de clonado	<sup>390</sup>
<b>pCR™2.1-TOPO®TA</b>	Amp/Kan	Invitrogen	Vector de clonado	<sup>391</sup>
<b>pGEMTeasy</b>	Amp	Promega	Vector de clonado	<sup>392</sup>
<b>pBT20-Δbla</b>	Gm	Dr. Tung T. Hoang.	Transposón Mariner	<sup>372</sup>

En la Tabla 5.2 se listan los vectores construidos en el marco del presente trabajo.

**Tabla 5.2: Vectores construidos**

Vector	Selección	Descripción
<b>pWS1</b>	Amp	<i>YPR1</i> en pGEM Teasy Vector System
<b>pWS2</b>	Amp	<i>GRE2</i> en pCR™ 2.1-TOPO® TA vector
<b>pWS3</b>	Amp	<i>YPR1</i> en pETDuet-1
<b>pWS4</b>	Amp	<i>GRE2 e YPR1</i> en pETDuet-1
<b>pWS5</b>	Kan	<i>mgsA</i> en pRSFDuet-1
<b>pPP8</b>	Cm	<i>GRE2</i> en pACYCDuet-1
<b>pPP9</b>	Amp	<i>GRE2</i> en pETDuet-1
<b>pSRG13</b>	Gm	<i>YPR1</i> en pACYCDuet-1

### 5.1.3 Secuencias de oligonucleótidos utilizados

En la Tabla 5.3 se incluyen los oligonucleótidos utilizados en el marco del presente trabajo (obtenidos de Operon o Macrogen).

**Tabla 5.3: Primers utilizados**

Identificación del Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3') cuando corresponde, subrayado sitio de actuación enzima de restricción	Enzima de restricción
<b>ws1GRE2f</b>	GCT <u>CAT ATG</u> TCA GTT TTC GTT TCA GG	NdeI
<b>ws1GRE2r</b>	GCG <u>GGT ACC</u> TTA TAT TCT GCC CTC AAA TT	KpnI
<b>ws1YPR1f</b>	GTC <u>GGT CTC TCA TGC</u> CTG CTA CGT TAA AGA ATT	BsaI
<b>ws1YPR1r</b>	CAC <u>CTG CAG</u> TCA TTG GAA AAT TGG GAA GG	PstI
<b>wsYPR1for300</b>	GGC TTG GAT TAT GTT GAC	N/A
<b>wsGRE2for342</b>	CGCCGC TGA TTC TGT AG	N/A
<b>M13forward</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	N/A
<b>M13reverse</b>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	N/A
<b>pET Upstream Primer #69214-3</b>	ATG CGT CCG GCG TAG A	N/A
<b>DuetUP2 Primer #71180-3</b>	TTG TAC ACG GCC GCA TAA TC	N/A
<b>DuetDOWN1 Primer #71179-3</b>	CTA ATA CGC CGG CAC ATG TT	N/A
<b>T7 Terminator Primer #69337-3</b>	CCG CTG AGC AAT AAC TAG C	N/A
<b>ACYCDuetUP1 Primer #71178-3</b>	GGA TCT CGA CGC TCT CCC T	N/A

### 5.1.4 Cepas utilizadas y construidas en el presente trabajo

En la Tabla 5.4 y 5.5 se incluyen las cepas utilizadas y construidas respectivamente en el marco del presente trabajo.

**Tabla 5.4: Cepas utilizadas**

Identificación	Características relevantes
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3)</b>	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07<sup>°</sup>ind1<sup>°</sup> sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )
<b><i>E. coli</i>BL21(DE3)ΔyqhE</b>	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1<sup>°</sup> sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i>
<b><i>E. coli</i> FMJ39</b>	F <sup>-</sup> , <i>thr-1, leuB6</i> (Am), <i>fhuA21, lacY1, glnX44</i> (AS), <i>pflB1, ldhA9, rfbC1, rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i>
<b><i>E. coli</i> JM109</b>	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, laq<sup>q</sup>ΔM15</i> ]
<b><i>E. coli</i> XL1</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB laclq ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]
<b><i>E. coli</i> Top10</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
<b><i>E. coli</i> JM105(pKTS3)</b>	F' <i>traD36 laclqΔ(lacZ)M15 proA+B+/thi rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA sbcB15 sbcC hsdR4</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) Δ( <i>lac-proAB</i> ) (pKTS3)
<b><i>E. coli</i> (HPS1-mob-Δasd-pir116)</b>	<i>e14- (mcrA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1Δ(lac-proAB) rif zxx::miniTn5Lac4 (lacI<sup>q</sup>lacZΔM15) Δasd::FRT uidA::pir116 zdg-232::Tn10</i>
<b><i>E. coli</i> DH10B</b>	F <sup>-</sup> <i>endA1 deoR<sup>+</sup> recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74Φ80lacZ ΔM15araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str<sup>R</sup> λ<sup>-</sup></i>
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3)ΔyqhE(pPP4)</b>	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i> (pPP4)

**Tabla 5.5: Cepas construidas**

Identificación	Características relevantes
<i>E. coli</i> BL21(DE3)(pWS3)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) (pWS3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)(pPP8)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) (pPP8)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)(pWS4)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) (pWS4)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>yqhE</i> (pWS3)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i> (pWS3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>yqhE</i> (pPP8)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i> (pPP8)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>yqhE</i> (pWS4)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i> (pWS4)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>yqhE</i> (pWS3)(pPP8)	str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) Δ <i>yqhE</i> (pWS3)(pPP8)
<i>E. coli</i> FMJ39T7 <i>pol</i> -Gm-FRT	F <sup>-</sup> , <i>thr-1, leuB6</i> (Am), <i>fhuA21, lacY1, glnX44</i> (AS), <i>pflB1, ldhA9, rfbC1, rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT
<i>E. coli</i> FMJ39T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS3)	F <sup>-</sup> , <i>thr-1, leuB6</i> (Am), <i>fhuA21, lacY1, glnX44</i> (AS), <i>pflB1, ldhA9, rfbC1, rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS3)
<i>E. coli</i> FMJ39T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pPP8)	F <sup>-</sup> , <i>thr-1, leuB6</i> (Am), <i>fhuA21, lacY1, glnX44</i> (AS), <i>pflB1, ldhA9, rfbC1, rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pPP8)
<i>E. coli</i> FMJ39T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4)	F <sup>-</sup> , <i>thr-1, leuB6</i> (Am), <i>fhuA21, lacY1, glnX44</i> (AS), <i>pflB1, ldhA9, rfbC1, rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS4)

<b><i>E. coli</i> FMJ39T7<i>pol</i>-Gm-FRT(pWS5)</b>	F <sup>-</sup> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> (Am), <i>fhuA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>glnX44</i> (AS), <i>pflB1</i> , <i>ldhA9</i> , <i>rfbC1</i> , <i>rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT (pWS5)
<b><i>E. coli</i> FMJ39T7<i>pol</i>-Gm-FRT (pWS4) (pWS5)</b>	F <sup>-</sup> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> (Am), <i>fhuA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>glnX44</i> (AS), <i>pflB1</i> , <i>ldhA9</i> , <i>rfbC1</i> , <i>rpsL175</i> (strR), <i>thiE1</i> , T7 <i>pol</i> -Gm-FRT(pWS4)(pWS5)
<b><i>E. coli</i> JM109 (pWS1)</b>	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ](pWS1)
<b><i>E. coli</i> JM109 (pWS2)</b>	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ] (pWS2)
<b><i>E. coli</i> XL1 (pWS1)</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB laclq ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] (pWS1)
<b><i>E. coli</i> XL1 (pWS2)</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB laclq ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] (pWS2)
<b><i>E. coli</i> Top10 (pPP8)</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZΔM15ΔlacX74</i> <sup>°</sup> <i>recA1</i> <sup>°</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (pPP8)
<b><i>E. coli</i> Top10 (pPP9)</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZΔM15ΔlacX74</i> <sup>°</sup> <i>recA1</i> <sup>°</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (pPP9)
<b><i>E. coli</i> Top10 (pSRG13)</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZΔM15ΔlacX74</i> <sup>°</sup> <i>recA1</i> <sup>°</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (pSRG13)
<b><i>E. coli</i> DH10B(pWS4)</b>	F <sup>-</sup> <i>endA1 deoR<sup>+</sup> recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> Δ( <i>lac</i> )X74 φ80 <i>lacZΔM15 araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Str <sup>R</sup> λ <sup>-</sup> (pWS4)
<b><i>E. coli</i> (HPS1-<i>mob</i>-Δ<i>asd</i>-<i>pir116</i>) (pBT20-Δ<i>bla</i> T7<i>pol</i>)</b>	<i>e14-</i> ( <i>mcrA</i> ) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rif zxx::miniTn5Lac4</i> ( <i>lacl<sup>q</sup>lacZΔM15</i> ) Δ <i>asd::FRT uidA::pir116 zdg-232::Tn10</i> (pBT20-Δ <i>bla</i> T7 <i>pol</i> )

## 5.1.5 Enzimas

### Enzimas de restricción utilizadas

En la siguiente tabla se listan las principales enzimas de restricción a las que se recurrió en diferentes instancias en el presente trabajo. Las enzimas utilizadas fueron provistas por Fermentas o Invitrogen y aplicadas siguiendo las recomendaciones del proveedor.

**Tabla 5.6: Enzimas de restricción utilizadas**

Enzimas de restricción		
BsaI	Eco31I	EcoRI
EcoRV	HaeIII	HindIII
KpnI	NcoI	NdeI
PstI	XbaI	XhoI

### 5.1.6 Otros insumos microbiológicos

En las reacciones de PCR se recurre al uso de polimerasas *Taq* (Invitrogen).

La ADN T4 ligasa utilizada en las construcciones de vectores se adquiere a Invitrogen.

Para la extracción de ADN genómico bacteriano se utiliza el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen).

Para la extracción de ADN plasmídico se utiliza el kit comercial de Quiagen™.

En las reacciones de PCR se usan los dNTPs de New England Biolabs.

En las corridas electroforéticas se utiliza agarosa (Sigma-Aldrich) y se emplea buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles se tiñen con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich).

Como marcador de peso molecular y como estándar en la cuantificación de ADN se emplea Gene Ruler 1Kb DNA LADDER (Fermentas®).

La tRNA utilizada en la co-precipitación del productode ligación previo a su transformación por electroporación, según lo descrito por Zhu y colaboradores se adquiere a BioBasic Inc.<sup>374</sup>

### 5.1.7 Medios de cultivo

#### Medio para biotransformación en aerobiosis/anaerobiosis células en crecimiento

**Tabla 5.7: Medio cultivo aerobiosis/anaerobiosis**

Producto	m (g)/L
Acetato de Potasio	1,0
Extracto de Levadura	5,0
Cloruro de Sodio	5,0
Cloruro de Potasio	1,5
Cloruro de Amonio	1,0
Cloruro de Magnesio	0,2
Sulfato de Sodio	0,07
Cloruro Ferroso	0,005
Fuente de C (solución 20 %)*	1 mL
Buffer MOPS**	ajuste a pH=6,8
Agua destilada	csp 1000 mL

\* Glucosa (6) /glicerol (1) (0,5 mL/0,5 mL)

\*\* Esterilizado por filtración MOPS pH= 6,8 corresponde a aproximadamente a: 10,0 g MOPS y 13,3 g NaHCO<sub>3</sub>

#### Buffer para reacción en régimen de células en reposo

**Tabla 5.8: Buffer MOPS (15) /Bicarbonato**

Producto	m (g)/L
Buffer MOPS (15)	10,0
Bicarbonato de Sodio	13,3

\* Se esteriliza por filtración a vacío

#### Medio similar M9 con acetato (10)

**Tabla 5.9: Medio similar M9 con acetato (10)**

Producto	m (g)/L
Fosfato dibásico de Sodio	6,0
Fosfato monobásico de Potasio	3,0
Cloruro de Sodio	0,5
Cloruro de Amonio	1,0
Acetato de Sodio	1,0
Agua destilada	csp 950 mL

Autoclavar y una vez termostatizado alicuotar en viales de 9,5 mL.

En cada vial agregar 0,5 mL de la siguiente solución:

Cloruro de Calcio (1M)	100 µL
Vitamina B1	500 µL
Sulfato de Magnesio hexa hidratado (1M)	1 mL
Glucosa (6) (8 %)	csp 50 mL

### Medio similar M9 para biotransformación de glicerol (1)

**Tabla 5.10: Medio similar M9 para biotransformación de Glicerol (1)**

Producto	m (g)/L
Acetato de Sodio	1,0
Extracto de Levadura	5,0
Cloruro de Sodio	0,5
Cloruro de Amonio	1,0
Agua destilada	csp 800 mL
Autoclavar y una vez termostatzado agregar:	
Vitamina B1	50 µL
Cloruro de Calcio (1M)	100 µL
Glucosa (6) (20 %) /glicerol (1) (20 %)	20,0 mL
Sulfato de Magnesio hexa hidratado (1M)	1 mL
Buffer MOPS o PIPES*	ajuste a pH=6,8

\* Esterilizado por filtración

### 5.1.8 Mantenimiento de cepas

Se utilizan técnicas estándar de microbiología para el manejo de todas las cepas. Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se utiliza el medio Luria Bertani (LB) en forma sólida (adicionado de agar bacteriológico al 1,5 %) o en caldo.

**Tabla 5.11: Dosificación de antibióticos en medios de cultivo**

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ampicilina	50
Cloranfenicol	100
Kanamicina	50
Gentamicina	50

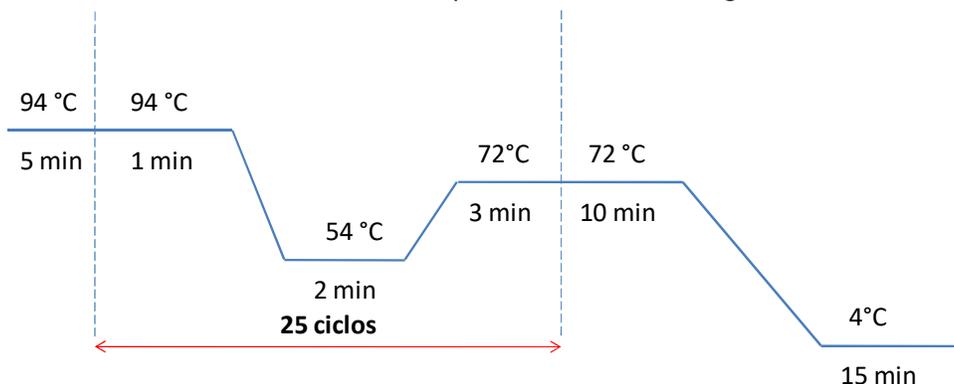
En el caso de las cepas que presentan resistencia a antibiótico (ya sea por haber sido incorporado a su genoma cromosómico o por portar plásmidos que la codifican) se realiza el agregado del antibiótico correspondiente al medio previamente autoclavado, las concentraciones utilizadas se incluyen en la Tabla 5.11. El mantenimiento de corto plazo de las cepas se realiza mediante cultivos en placa, las que se mantienen selladas con Parafilm® y almacenadas a 4 °C. El mantenimiento de largo plazo se realiza almacenando las cepas a -70 °C en caldo LB con glicerol (1) al 15 %.

### 5.1.9 Métodos de biología molecular

Salvo en los casos en que se explicite otra condición, se utilizan técnicas estándar de biología molecular.<sup>393</sup>

#### 5.1.10 Condiciones de PCR

Se utiliza en todos los casos el ciclo de PCR que se muestra en la Figura 5.1.



**Figura 5.1: Ciclo de PCR utilizado en amplificación de ADN genómico de *E. coli*.**

La verificación de la integridad, así como la cuantificación de ADN obtenido de los productos de amplificación se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8% p/v) en buffer TBE 0.5X, teñido con Bromuro de Etidio (5 µg/µL).

En paralelo se corre un marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, Fermentas®) de forma de estimar el tamaño de los amplicones obtenidos así como poder valorar la concentración de ADN. Se fotografía bajo luz UV con cámara digital Kodak DC120 (Kodak Digital Science) y convirtiendo a archivo de imagen usando el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis 120 de Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

#### 5.1.11 Secuenciado de los genes

En aquellos vectores construidos que requieren de secuenciado a efectos de confirmar su identidad, se recurre al servicio de secuenciado de la empresa Macrogen Corporation Seoul, Korea (Secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems).

#### 5.1.12 Gel de proteínas

Se sigue la técnica para SDS-PAGE sobre las fracciones solubles e insolubles del producto de extracción obtenido por ultrasonido en buffer de pH 8,0.

### 5.1.13 Condiciones de conjugación

El ensayo de conjugación se desarrolla de acuerdo el siguiente procedimiento adaptado de Kang y colaboradores:<sup>372</sup> A partir de cultivos en fase exponencial tanto del donador como del receptor, en este caso las cepas *E. coli* (HPS1-*mob*- $\Delta$ *asd*-*pir116*) (pBT20- $\Delta$ *bla* T7pol) y *E. coli* FMJ39 respectivamente, se toman 0,7 mL de cada cultivo y se mezclan en un tubo eppendorf. Se centrifuga a 9.000 x g durante 1 minuto. Se toman 30  $\mu$ L del sobrenadante, se descarta el resto del sobrenadante y se suspende el centrifugado en los 30  $\mu$ L del sobrenadante separados anteriormente. Se coloca un filtro (Acetato de celulosa) sobre una placa con LB. Se incuba a 37 °C durante 6 hs. Se retira el filtro y se coloca en un tubo eppendorf que contiene 1 mL de medio LB-broth sin agregado de DAP(16) (para prevenir el crecimiento de los donantes). Se agita en vórtex durante 1 min y se siembran placas de LB-Gm (repartiendo la totalidad del medio en tantas placas como sea necesario). Se incuba a 37 °C. Se recuperan los conjugantes a las 24 hs.

## 5.2 Materiales y métodos biocatalíticos

### 5.2.1 Sustratos y reactivos

En la tabla 5.12 se detallan los sustratos y reactivos empleados en las biotransformaciones

**Tabla 5.12: Sustratos y reactivos utilizados en Biotransformaciones**

Producto	N° CAS	% Pureza	Proveedor
$\alpha$ -Etil acetoacetato de etilo (5)	78-98-8	90%	Sigma-Aldrich®
Metilglioxal 1,1-dimetil acetal (32)	6342-56-9	97%	Sigma-Aldrich®
Glicerol (1)	56-81-5	> 99 %	J.T.Baker®
Glucosa (6)	50-99-7	> 99 %	Oxoid®
Metilglioxal (3)	78-98-8	40%	Sigma-Aldrich®
1,2-Propanodiol (2)	504-63-2	99,5%	Sigma-Aldrich®
(R)-1,2-Propanodiol (2a)	4254-14-2	96%	Sigma-Aldrich®
(S)-1,2-Propanodiol (2b)	4254-15-3	96 %	Sigma-Aldrich®
DL-Lactaldehído (4)	598-35-6	No cuantificado	Síntesis propia
Glicerina splitting (21b)	N/A	(70-80) %	ALUR
Glicerina cruda (21a)	N/A	(50- 65) %	ALUR

:

### 5.2.2 Biotransformaciones en régimen de células en crecimiento en aerobiosis

Se toma asépticamente una muestra del stock de la cepa mantenida en freezer a -70 °C con la cual se inocula una placa de LB-agar/Ant (Ant: antibiótico requerido para mantener presión selectiva según la cepa). Se incuba durante 24 hs a 37 °C. Se toma una colonia aislada y se siembra en 5 mL de LB/Ant.

El precultivo se incuba a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm durante 16 a 24 horas, momento en el que se adiciona la glucosa (6), glicerol (1) o una combinación de ambas según el ensayo que se esté ejecutando. Se toman 200 µL del cultivo y se inoculan 20mL de LB/Ant conteniendo igual composición de azúcares que la del precultivo, en matraces de 100mL. Se monitorea el crecimiento incubando a 37 °C y 200 rpm en agitador orbital hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,5$ . En ese momento se induce el sistema mediante la adición de 24 µL de IPTG (20) 800 mM y se adiciona el sustrato en estudio hasta alcanzar una concentración final de 10 mM.

Las biotransformaciones a partir del punto de inducción se desarrollan, salvo que se indique lo contrario a 30 °C. Alternativamente a LB/Ant se recurre a otros medios de cultivos (por ejemplo variantes de medio mínimo M9) manteniendo el resto de las condiciones de ensayo.

### 5.2.3 Biotransformaciones en régimen de células en crecimiento en anaerobiosis

Las biotransformaciones en anaerobiosis en régimen de células en crecimiento se desarrollan utilizando como inóculo las células cosechadas en las biotransformaciones en régimen de células en crecimiento aerobio. Las células así obtenidas se lavan y se utilizan para inocular un vial preparado para asegurar condición anaerobia (medio hervido, gaseado bajo corriente de N<sub>2</sub>, vial con septo y sellado, etc.).

Al momento de inocular el vial se reitera la adición de IPTG (20) manteniendo las proporciones previamente descritas. Los ensayos en condiciones de anaerobiosis se desarrollan utilizando Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) incorporada al medio de cultivo como indicador de potencial redox.

La incubación se desarrolla en estufa a 37 °C.

### 5.2.4 Biotransformaciones en régimen de células en reposo en anaerobiosis

Se toma asépticamente una muestra del stock de la cepa mantenida en freezer a -70 °C con el cual se inocula una placa de LB-agar/Ant (Ant: antibiótico requerido para mantener presión selectiva según la cepa). Se incuba durante 24 hs a 37 °C. Se toma una colonia aislada y se siembra en 5 mL de LB/Ant.

Cada cultivo se incuba a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm durante 16 a 24 horas. Se toman 2mL del cultivo y se inoculan 200 mL de medio LB/Ant, en matraces de 1000mL, se monitorea el crecimiento incubando a 37°C y 200 rpm en agitador orbital hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,5$  momento en que se induce el sistema mediante la adición de 240  $\mu$ L de IPTG (20) 800 mM y se baja la temperatura a 30 °C, incubando por 16 horas adicionales.

Cumplido ese tiempo se procede a centrifugar el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se lava con suero fisiológico a 30 °C y centrifuga nuevamente. El proceso de lavado se reitera en dos ocasiones y finalmente el centrifugado se suspende en 15 mL de buffer MOPS (15) -bicarbonato (3-Morfolin propano-1-ácido sulfónico).

La reacción se desarrolla, -salvo que se indique otra cosa en un medio- de composición 6:3:1 Buffer MOPS (15) -bicarbonato:biomasa:glucosa (6) -glicerol (1), adicionando sobre esta base el resto de los sustratos que se deseen ensayar.

La mezcla de reacción se coloca en jarra anaerobia generando atmósfera anaerobia a través del uso de AnaeroGen® de Oxoid o similar el que es descartado y repuesto en ocasión de cada muestreo. Se incuba, salvo que se indique otra condición a 37 °C durante el período de evaluación del ensayo.

### 5.2.5 Muestreo de Biotransformaciones

De las reacciones de Biotransformación se extraen muestras periódicamente, para el caso de análisis mediante Cromatografía Gaseosa (GC) se toman 400  $\mu$ L de mezcla de reacción las que se extraen con 800  $\mu$ L de Acetato de Etilo.

Se agita en vórtex durante 1 minuto y se separan las fases mediante centrifugación. Los extractos orgánicos se separan, se secan con  $Na_2SO_4$ anhidro y se guardan en freezer a -20 °C hasta el momento de su inyección en GC.

En el caso de ensayo mediante Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), se toma una muestra de 1000  $\mu$ L, se filtra sobre acetato de celulosa de 0,45  $\mu$ m (Sartorius Stedium Biotech o equivalente) y se mantiene a -20 °C hasta el momento de su inyección en HPLC.

Para ensayos de expresión de proteína mediante análisis de electroforesis de proteínas en geles con matriz de poliacrilamida, se extraen 1500  $\mu$ L de muestra que se mantienen a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

## 5.3 Materiales y métodos de síntesis orgánica

### 5.3.1 Solventes y reactivos

Los solventes utilizados se destilan previamente a su uso y se secan siguiendo las recomendaciones de la literatura especializada.<sup>394</sup>

Se utilizan los siguientes solventes acetato de etilo, metanol, etanol, éter de petróleo, cloroformo y diclorometano. Los mismos fueron destilados previos a su uso. Para las micro-extracciones de seguimiento de reacción se utilizó acetato de etilo calidad HPLC, controlado previamente por GC.

### 5.3.2 Procedimientos generales

Los reactivos comerciales se obtienen de Sigma-Aldrich y se usan, salvo que se especifique lo contrario, sin mayor purificación posterior. Las reacciones, cuando se requieren condiciones anhidras, se desarrollan en material de vidrio previamente secado por aplicación de calor, en atmósfera de nitrógeno o argón y utilizando solventes secos.

En general el seguimiento de las reacciones se desarrolla por TLC según lo descrito en el apartado 5.4.1.

Los productos de reacción, salvo que se explicita lo contrario se purifican por cromatografía flash usando sílica gel (Kieselgel 60, EM Reagents, 230-400 mesh).

La caracterización de los productos se realiza por MS-ID, GC-MS, GC-MS con SPME,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN y rotación óptica de ser aplicable, según lo descrito en los apartados 5.4.4 a 5.4.7 y 5.4.10

### 5.3.3 Síntesis de 2-metoximetoxi-1-propanol (8)

#### Protección del alcohol primario

En un balón de dos bocas 500 mg (6.57 mmol) de 1,2-propanodiol (**2**), 80.26 mg (0.657 mmol) de 4-Dimetilaminopiridina (**34**), 630.27 mg (9.2637 mmol) de Imidazol (**35**) y 1.050 g (9.96 mmol) de Tert-butildimetilsililcloruro (**22**) se mezclan en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla de reacción se diluye en éter con HCl 1N acuoso y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

La reacción se sigue a través de TLC (utilizando como fase móvil Éter de Petróleo / Acetato de Etilo 8:1,  $R_f=0,2-0,3$  revelador p-anisaldehído. La purificación se realiza mediante cromatografía en columna flash usando como solvente de elución Éter de Petróleo / Acetato de Etilo 10:1. El producto de reacción (**23**) es un aceite. (70 %).

Alternativamente se realiza la reacción en las siguientes condiciones: El 1,2-propanodiol (**2**) 500 mg (6.57 mmol) se agrega a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, la mezcla se enfría por debajo de  $0^\circ\text{C}$ , alcanzada esa temperatura 997.2 mg (9.855 mmol) de Trietilamina (**36**) se adicionan a la mezcla y se agita durante 20 min. Seguidamente 1.736 g (6.57 mmol) de Triflato del TBDMSi (Ter-butil-dimetil-silil-tri-fluoruro-metan-sulfonato) (**24**) se agrega mediante goteo lentamente. La reacción se detiene a los 15 minutos.

La mezcla de reacción se diluye en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lava con solución de  $\text{NaHCO}_3$  saturada y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se filtra. La purificación se desarrolla según se ha

descrito anteriormente, se eluye con Éter de Petróleo / Acetato de Etilo 10:1. El producto obtenido (**23**) es un aceite. (66 %).

#### Reacción sobre alcohol secundario

En un balón de dos bocas, en baño de hielo se mezclan 500 mg (2.64 mmol) del producto (**23**), 3.412 g (26.4 mmol) de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) (**37**), 19 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco y 2.124 g (26.4 mmol) de Cloro-metil-metil-eter (MOMCl) (**25**). La mezcla se agita durante una hora a 0 °C y posteriormente se mantiene agitación a Temperatura ambiente durante 12 horas. Se neutraliza el exceso de DIPEA (**37**) con HCl 1N (26.4 mL). Se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se elimina el solvente y se purifica en columna flash eluyendo el producto con Éter de Petróleo:Acetato de Etilo 10:1. El seguimiento de la reacción se desarrolla en TLC con Éter de Petróleo:Acetato de Etilo 8:1. Esta reacción da lugar al producto de reacción (**26**). (58 %).

Alternativamente, la reacción se desarrolla en un balón seco de dos bocas en baño de hielo recurriendo a la mezcla de 374 mg (1.975 mmol) del producto (**23**) con MOMCl (**25**) 1.652 g (20.54 mmol) usando DIPEA (**37**) como solvente (14 mL). La mezcla se agita durante una hora a 0 °C y posteriormente se mantiene agitación a Temperatura ambiente durante 12 horas. La neutralización de DIPEA (**37**) se realiza con HCl 1N (aproximadamente 84.7 mL). El resto de las condiciones se mantiene incambiada respecto a lo descrito anteriormente obteniéndose (**26**). (43%).

#### Desprotección del alcohol primario

En un balón de dos bocas en baño de hielo a 180 mg de (**26**), disueltos en 3 mL de THF (**38**) se adiciona TBAF (36.55 mg, 1.538 mmol) (**39**). La mezcla se agita inicialmente durante 5 minutos a 0 °C y posteriormente a temperatura ambiente por 7 horas. El seguimiento de la reacción se realiza en TLC usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  96:4, Rf: 0.4. La purificación del producto se desarrolla mediante cromatografía flash. Se empaca la columna con EP/AcOEt 7:3 y se eluye en etapas, iniciando en EP/AcOEt =7:3, luego EP/AcOEt 6:4 y finalmente EP/AcOEt 5:5. Se obtiene el producto final 2-metoximetoxi-1-propanol (**8**). (Muy bajorendimiento).

Alternativamente la reacción se desarrolla en balón agregando el producto (**26**) (118 mg, 0,504 mmol) a una mezcla de AcOH:THF:H<sub>2</sub>O 4:2:2 (2 mL) a temperatura ambiente durante 20 hs.

El producto de reacción se neutraliza con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El seguimiento de la reacción se realiza en TLC usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  96:4, Rf: 0.4. La purificación de (**8**) se desarrolla mediante cromatografía flash en columna empacada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  98:2 se eluye en dos etapas, con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  98:2 y luego  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  96:4. Se obtiene el producto final 2-metoximetoxi-1-propanol (**7**). (20 %).

### 5.3.4 Síntesis de (*R*)-2-metoxi metoxi-1-propanol (**8a**)

Se reiteran las reacciones anteriormente descritas, que mejor desempeño presentan recurriendo como reactivo a (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**). Se obtienen los productos intermediarios (**23a**) y (**26a**), para finalmente conducir a la obtención del producto final (**8a**). (61 %).

### 5.3.5 Síntesis de propilencarbonato (**7**)

En un balón de dos bocas seco 50 mg (0.657 mmol) de 1,2-propanodiol (**2**), y 170 mg (1.314 mmol) de DIPEA (**37**) se agregan en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Finalmente, en baño de hielo, 130 mg (0.657 mmol) de Difósgeno (**26**) es agregado por goteo muy lentamente. La reacción se deja avanzar por 5 horas a temperatura ambiente. El DIPEA (**37**) presente en la mezcla de reacción se neutraliza con HCl 1 N previo a desarrollar extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de (**7**). El extracto se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El seguimiento de la reacción se realiza con TLC usando CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5. (66 %).

### 5.3.6 Síntesis de (*R*)-propilencarbonato (**7a**)

Análogamente a lo previamente descrito se realiza la síntesis de (*R*)-propilencarbonato (**7a**) con los siguientes ajustes, se reemplaza el Propilenglicol (**2**) por el (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**) y se utiliza Trifósgeno (**27**) en vez de Difósgeno (**26**) (reduciendo la dosificación de manera de mantener los equivalentes de fósgeno a reaccionar) (94 %).

### 5.3.7 Síntesis enzimática de (*R*)-propilencarbonato (**7a**)

En un balón de 100 mL equipado con agitación magnética, condensador y termómetro se colocan (*R*)-1,2-propanodiol (**2a**) (0.46 mL, 6 mmol) y dimetil carbonato (**29**) (0.54 g, 6 mmol). Se disuelven en 12 mL de THF (**38**). En la mezcla de reacción se adiciona lipasa de *C. antarctica* (Novozyme 435, 0.30 g) como biocatalizador y tamices moleculares de 5 Å (2.0 g) como sumidero del metanol (**31**) formado en la reacción de transesterificación. La reacción se lleva a cabo a 60 °C por 24 hs. Monitoreando la reacción por TLC usando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5. (15 %)

Una vez finalizada la reacción se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min para remoción de lipasa y tamices moleculares. El sobrenadante se evapora bajo presión reducida para obtener un aceite incoloro- amarillento (**7a**). La identidad del producto obtenido se confirma por RMN (Ver Anexo III) y la pureza enantiomérica del se verifica mediante GC quiral.

### 5.3.8 Síntesis quimio-enzimática de lactaldehído(4) a partir de metilglioxal 1,1-dimetilacetel (32)

#### Reducción de metilglioxal 1,1-dimetilacetel (32) con *Saccharomyces cerevisiae*

En 100 mL de agua se disuelve metilglioxal 1,1-dimetil acetel (**32**) (500  $\mu$ L, 4,13 mmol) y sacarosa (10 g). En esa solución se suspenden 10 g de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Se realizan en simultáneo dos controles (blanco levadura y blanco sustrato). Se incuba a 30 °C en agitador orbital a 200 rpm. Se realizan muestreos a tiempos de reacción 0, 24 y 48 hs. A las 48 hs se filtra la solución y se continúa la reacción con el sobrenadanteconteniendo (**33**).

#### Reducción de metilglioxal 1,1-dimetilacetel (32) con *Daucus carota*

En 100 mL de solución acuosa de metilglioxal 1,1-dimetil acetel (**32**) (500  $\mu$ L, 4,13 mmol) se suspenden 25 g de zanahoria (*D. carota*) finamente picada en cubos de aproximadamente 0,3 mm de lado. Se realizan en simultáneo dos controles (blanco zanahoria y blanco sustrato). Se incuba a 30 °C en agitador orbital a 200 rpm. Se realizan muestreos a tiempos de reacción 0, 24 y 48 hs. A las 48 hs se filtra la solución y se continúa la reacción con el sobrenadante conteniendo (**33**).

#### Desprotección del dimetilacetel (33)

La desprotección del dimetil acetel (**33**) obtenido en las etapas anteriores se realiza mediante incubación con 2 mL de resina Dowex 50W-X8 H<sup>+</sup> durante 24 horas a temperatura ambiente obteniéndose una solución conteniendo lactaldehído (**4**).

### 5.3.9 Síntesis enzimática de lactaldehído (4) a partir de metilglioxal (3)

#### Reducción de metilglioxal (3) con *Saccharomyces cerevisiae*

En 100 mL de agua se disuelve metilglioxal (**3**) (1000  $\mu$ L, 16,2 mmol) y sacarosa (10 g). En esa solución se suspenden 10 g de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Se realizan en simultáneo dos controles (blanco levadura y blanco sustrato). Se incuba a 30 °C en agitador orbital a 200 rpm. Se realizan muestreos a tiempos de reacción 0, 24 y 48 hs. A las 48 horas se interrumpe la reacción ensayándose la solución conteniendo los productos de reducción del carbonilo primario, el acetol (**14**),del carbonilo secundario, el lactaldehído (**4**)y el producto de reducción de ambos carbonilos, el 1,2-propanodiol (**2**).

#### Reducción de metilglioxal (3) con *Daucus carota*

En 100 mL de solución acuosa de metilglioxal (**3**) (1000  $\mu$ L, 16,2 mmol) se suspenden 25 g de zanahoria (*D. carota*) finamente picada en cubos de aproximadamente 0,3 mm de lado. Se realizan en simultáneo dos controles (blanco zanahoria y blanco sustrato). Se incuba a 30 °C

en agitador orbital a 200 rpm. Se realizan muestreos a tiempos de reacción 0, 24 y 48 hs. A las 48 horas se interrumpe la reacción ensayándose la solución conteniendo los productos de reducción del carbonilo primario, el acetol (**14**), del carbonilo secundario, el lactaldehído (**4**) y el producto de reducción de ambos carbonilos, el 1,2-propanodiol (**2**).

### 5.3.10 Síntesis química de DL-lactaldehído (**4**)

La síntesis de DL-lactaldehído (**4**) se realiza siguiendo la técnica descrita por Grochowski y colaboradores con modificaciones.<sup>395</sup>

#### Reducción del carbonilo

El metilglioxal 1,1-dimetil acetal (**32**) (1,18 g, 10 mmol) se disuelve en 1 mL de CH<sub>3</sub>OH (**31**). Se agregan lentamente (en 10 minutos) 0,4 g de NaBH<sub>4</sub> (**40**) manteniendo agitada la solución sobre baño de hielo. La solución resultante se agita por 1 hora a temperatura ambiente, se centrifuga para separar el exceso de sólido y la capa metanólica se evapora con corriente de nitrógeno. El producto resultante DL-lactaldehído dimetil acetal (**33**) se disuelve en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lava con 2 mL de solución de NaHCO<sub>3</sub>.

Se separan las fases y la capa orgánica se separa y se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> obteniéndose (**33**) bajo la forma de un aceite incoloro.

#### Desprotección del acetal

La desprotección del dimetil acetal (**33**) obtenido en la etapa anterior se realiza mediante incubación con 2 mL de resina Dowex 50W-X8 H<sup>+</sup> (200 a 400 mesh) durante 18 horas a temperatura ambiente obteniéndose la solución de DL-Lactaldehído (**4**).

### 5.3.11 Datos de espectroscopía y rotación óptica

#### 1-(*tert*-butildimetilsilil)oxi-2 propanol (**23**)

<sup>1</sup>H RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 3.58 (dd,  $J_{12}=1.6$  Hz  $J_{23}=1.9$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-O), 3.56 (m,  $J_{23}=1.9$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.35 (m,  $J_{23}=1.9$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 2.52 (s, 1H, C-OH), 1.11 (d,  $J_1=1.6$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH), 0.90 (s, 9H, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.07 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 68.95 (CH-CH<sub>2</sub>-O), 68.30 (CH<sub>3</sub>-CH-O), 26.23 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.51 (CH<sub>3</sub>-C), -5.02 (Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### *tert*-butil(2-metoximetoxipropoxi)dimetilsilano(**26**)

<sup>1</sup>H RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 4.55 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 3.60 (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-O), 3.47 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.35 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.23 (s, 1H, C-OH), 3.44 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 0.99 (d,  $J=2.6$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH), 0.75 (s, 9H, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0.07 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 95.74 (O-CH<sub>2</sub>-O), 69.67 (CH<sub>3</sub>-CH-O), 67.51 (CH-CH<sub>2</sub>-O), 55.29 (O-CH<sub>3</sub>), 26.05 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.57 (CH<sub>3</sub>-C), -0.07 (Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### (R)-2-metoximetoxi-1-propanol (8a)

<sup>1</sup>H RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 4.73 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 3.73 (dd,  $J_{12}=4$  Hz  $J_{23}=3$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-O), 3.71 (s, 1H, C-OH), 3.64 (m,  $J_{12}=4$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.52 (m,  $J_{23}=3$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.44 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 1.18 (d,  $J_{23}=4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 95.94 (O-CH<sub>2</sub>-O), 74.34 (CH<sub>3</sub>-CH-O), 67.69 (CH-CH<sub>2</sub>-O), 55.54 (O-CH<sub>3</sub>), 17.67 (CH<sub>3</sub>-C). [α]<sub>D20</sub>: (R) = -33.23. T<sub>R</sub> en GC quiral (R): 30.233 min.

### (R)-propilencarbonato (7a)

<sup>1</sup>H RMN, (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 4.86 (ddd,  $J_{CH-CH_3}=8$  Hz,  $J_{CH-CH_2}=8$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 4.57 (dd,  $J_{CH_2-CH}=8$  Hz,  $J_{CH_2-CH_2}=8$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.04 (dd,  $J_{CH_2-CH}=8$  Hz,  $J_{CH_2-CH_2}=8$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 1.50 (d,  $J_{CH-CH_2}=8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 155.1 (C=O), 73.54 (CH<sub>3</sub>-CH-O), 70.66 (CH-CH<sub>2</sub>-O), 19.11 (CH<sub>3</sub>-C). t<sub>R</sub>(R)-propilencarbonato (7a) = 23.85 min (GC quiral), e.e. > 99%.

### Lactaldehído (4)

<sup>1</sup>H RMN, (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ (ppm): 1.27 (d,  $J_{CH-CH_3}=4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 2.58 (s, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 4.28 (m (parcialmente cubierto por señal del D<sub>2</sub>O),  $J_{CH_2-CH}=4$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 9.49 (s, 1H, COH-CO-H). GC-MS-SPME: m/z = 45 (100), m/z = 31 (20), m/z = 74 (15), m/z = 45 (10), m/z = 58 (5), m/z = 55 (5), m/z = 39 (5).

## 5.4 Técnicas analíticas

### 5.4.1 Cromatografía en capa fina

Las cromatografías en capa fina (TLC) fueron llevadas a cabo en placas de sílica gel 60F-254 Mallinckrodt y visualizadas con luz UV (254 nm) y/o reveladas primeramente en cámara de Yodo y posteriormente con Anisaldehído-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Etanol o Ácido Fosfomolibdico.

### 5.4.2 Cromatografía gaseosa

Los ensayos de seguimiento de reacciones desarrollados mediante Cromatografía Gaseosa se realizaron en Cromatógrafos Shimadzu, con diferentes columnas y condiciones de reacción según se describe en la Tabla 5.13

En todos los casos se inyecta 1 μL del extracto obtenido en disolvente orgánico. El gas carrier empleado en todos los ensayos es H<sub>2</sub> (3 mL/min), el sistema de inyección es Split 1:50 y se utiliza un detector FID.

Los datos se analizan con el software GC Solution.

## Derivatizaciones para cromatografía gaseosa quiral - acetilación

Las derivatizaciones de los productos de Biotransformación para ensayo en Cromatografía Gaseosa Quiral de 1,2-propanodiol (**2**) se realizan adicionando a 100  $\mu$ L de muestra obtenida de HPLC preparativa previamente liofilizada, 5  $\mu$ L de Trietilamina (**36**) y 10  $\mu$ L de Anhídrido Acético (**41**).

Se agita 10 veces por inversión y se deja reposar 10 minutos previo a la inyección del producto acetilado.

Similar procedimiento se realiza para los estándares (R)-1,2-propanodiol (**2a**) y (S)-1,2-Propanodiol (**2b**).

**Tabla 5.13: Condiciones utilizadas en ensayos por Cromatografía Gaseosa.**

Descripción de análisis	Sustrato	Columna	Programa de Temperatura
No quiral Cromatógrafo Shimadzu 2014	$\alpha$ -Etil Acetato de Etilo ( <b>5</b> )	Carbowax 20 L=30 m, D <sub>int</sub> = 0,25 mm; 0,25 $\mu$ m	60 °C (5 min) - 8 °C/min hasta 140 °C - 25 °C/min hasta 240 °C – 240 °C (5 min). Split (relación 1:50) con T <sub>Split</sub> : 220 °C. T <sub>FID</sub> = 240 °C
Quiral Cromatógrafo Shimadzu 2010	1,2-Propanodiol ( <b>2</b> ) <sup>(a)</sup> Ácido Láctico ( <b>11</b> ) <sup>(b)</sup>	Mega - Dex DAC $\beta$ L=25 m, D <sub>int</sub> = 0,25 mm; T <sub>máx</sub> =230 °C, ID#: 14768	40 °C (10 min) - 2 °C/min hasta 100 °C - 100 °C (1 min) - 25 °C/min hasta 210 °C – 210 °C (5 min). Split (relación 1:50) con T <sub>Split</sub> : 250 °C. T <sub>FID</sub> = 250 °C
No quiral GC-MS Shimadzu	Lactaldehído ( <b>4</b> ) (SPME)	Carbowax 20 L=30 m, D <sub>int</sub> = 0,25 mm; EF=0,4 $\mu$ m T <sub>máx</sub> =250 °C,	40 °C (5 min) - 5 °C/min hasta 150 °C - 15 °C/min hasta 240 °C – 240 °C (5 min). Split (relación 1:50) con T <sub>Split</sub> : 101 °C. T <sub>FID</sub> = 250 °C <sup>(c)</sup>
Quiral Cromatógrafo Shimadzu 2010	2- Metoximetoxi-1-Propanol ( <b>8</b> ) Propilencarbonato ( <b>7</b> )	Megadex det-tbs $\beta$ Fase estacionaria: Diethyl t-butyl silil $\beta$ - ciclodextrina. Temp. Max: 230°C	60 °C (5 min) -0,5 °C/min hasta 80 °C 10 °C/min hasta 150 °C – 150 °C (5 min). Split (relación 1:50) con T <sub>Split</sub> : 220 °C. T <sub>FID</sub> = 250 °C <sup>(c)</sup>

<sup>(a)</sup>Producto de acetilación, <sup>(b)</sup> Producto de metilación, <sup>(c)</sup> Método base, se ensayan variantes sobre esta base.

## Derivatización para cromatografía gaseosa quiral – formación de metilésteres

La derivatización de muestras de biotransformaciones destinadas a ensayo en Cromatografía Gaseosa Quiral de ácido láctico (**11**) se realiza adicionando a una solución de concentración aproximada de 10  $\mu$ mol/mL en H<sub>2</sub>O; 0,1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1,0 mL de metanol

(31). La mezcla así obtenida se mantiene o bien 20 horas a temperatura ambiente o durante 5 minutos a 100 °C (alternativa mayormente utilizada en el presente trabajo). Una vez terminada la reacción se realiza una extracción con 200 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se agita en vórtex durante 1 minuto y se centrifuga. La fracción orgánica se separa para inyección en GC-quiral.

Se realiza el procedimiento descrito para el producto racémico D/L-(+/-)-ácido láctico (**11a**) y para el L-(+)-ácido láctico (**11b**), procediendo a asignar en el cromatograma por diferencia el pico correspondiente al obtenido para el D-(-)-Ácido Láctico (**11a**). Se procede de esta forma al no ser posible obtener estándar comercial de D-(-)-ácido láctico (**11a**).

### 5.4.3 Cromatografía líquida

Los ensayos de HPLC se llevan a cabo inicialmente en el cromatógrafo Waters 590-Millipore y posteriormente en el Cromatógrafo Shimadzu LC-20AT, con columna Supelcogel® 610H (30 cm, 7.8 mm, ID59304-U).

Fase Móvil: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 N ó CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM. Flujo: 0.5 mL/min. Temperatura de columna: 35 °C. Detector: Índice de refracción RID-10A. Volumen de inyección: 20 µL.

La preparación de la fase móvil en análisis de muestras de HPLC se realiza con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (95 – 98) %, provisto por J.T. Baker® disuelto en agua Milli-Q hasta alcanzar la concentración deseada.

La preparación de ácido fórmico (**13**) como fase móvil se realiza con CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adquirido a Sigma Aldrich®, disuelto en agua Milli-Q hasta alcanzar la concentración deseada.

Por defecto la fase móvil utilizada es H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se recurre a CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como fase móvil cuando se requiere resolver los picos asignados a ácido láctico (**11**) y glicerol (**1**) que no presentan buena resolución en fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Los ensayos de HPLC quiral se realizaron en las columnas Daicel Chiralcel OD y de la columna Phenomenex (Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenyl)carbamate) no lográndose resultados concluyentes en muestras de ácido láctico (**11**).

### 5.4.4 Espectrometría de masas (MS-ID)

Los ensayos de Espectrometría de Masas mediante Inyección Directa se realizan en el equipo GCMS-QP2010 sobre muestras obtenidas de HPLC semi-preparativas previamente liofilizadas.

El programa de temperatura utilizado consiste en Temperatura inicial = 50 °C (2 min), 20 °C/min; hasta Temperatura final= 350 °C (2 min). Los resultados se analizan usando el software GC Solution y la base de datos de Shimadzu.

#### 5.4.5 Cromatografía gaseosa - espectrometría de masas (GC-MS)

Los ensayos de Cromatografía Gaseosa - Espectrometría de Masas se realizan en equipo GCMS - QP2010. Se utiliza el siguiente programa de temperatura: Temperatura inicial = 60 °C (5 min), 8 °C/min; hasta 140 °C y 25 °C/min hasta 240 °C (5 min). Gas carrier: Helio (3 mL/min). Inyector: Split (relación 1:50) con  $T_{\text{Split}}$ : 220 °C. Volumen inyectado: 1  $\mu$ L de la muestra extraída. EI-MS (electron ionization-MS) se obtiene en modo scan en el rango m/z 40 a 350. Los resultados se analizan usando el software GC Solution y la base de datos de Shimadzu.

#### 5.4.6 Cromatografía gaseosa- espectrometría de masas con SPME (Solid Phase Micro Extraction)

Para la confirmación de identidad de productos de síntesis volátil (caso del lactaldehído (**4**) sintetizado) se recurre a cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) a partir de muestra extraída en fase sólida (SPME). El ensayo se realiza en las siguientes condiciones:

Fibra SPME, Sigma-Aldrich.

Fibra: Poli dimetilsiloxane (PDMS), pH= 2-10, (Fibra roja).

Condiciones de acondicionamiento:  $T_{\text{acondicionamiento}} = 250$  °C,  $t = 30$  min.

Condiciones de adsorción: 30 °C, 30 min.

Condiciones cromatográficas: 40 °C (5 min); 5 °C/min hasta 150 °C; 15 °C/min hasta 240 °C; 240 °C (5 min).

Registro en MS:  $t > 1$  min.

Inyector: Split (relación 1:50)  $T_{\text{inyector}} = 150$  °C.

#### 5.4.7 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se realizan en un espectrómetro Bruker Avance DPX-400. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando Tetrametilsilano (**42**) como referencia. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están expresadas en Hertz.

#### 5.4.8 Asignación de compuestos en cromatogramas de HPLC

La asignación inicial de los compuestos en los cromatogramas de HPLC obtenidos a partir de ensayos de muestras de biotransformaciones se realiza en primer término, a partir de la co-inyección con estándares comerciales para aquellos productos disponibles comercialmente y a partir de productos de síntesis en el caso del lactaldehído (**4**).

## Tiempos de retención asignados en las condiciones de cromatografía usadas enHPLC

En la Tabla 5.14 se resumen los tiempos de retención asignados para cada compuesto de interés en base a la metodología descrita con anterioridad.

Si bien estos tiempos de retención presentan pequeñas variaciones a lo largo del tiempo (en comparación interdiaria) el perfil de elución se mantiene inalterado.

La asignación de tiempos de retención tabulada anteriormente resulta válida solamente para las condiciones de ensayos descritas en el apartado 5.4.3 “Cromatografía líquida” en cromatógrafo Shimadzu LC-20AT.

**Tabla 5.14: Tiempos de retención asignados para compuestos relevantes en biotransformaciones de glicerol (1) /glucosa (6) en las condiciones de ensayo descritas.**

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Glucosa (6)	12.95
Metilglioxal (3)	16.37
Lactaldehído (4)	17.23
Lactato (11)	17.36
Glicerol (1)	18.07
Formiato (13)	19,12
Acetato (10)	20.53
1,2-Propanodiol (2)	22.22
Hidroxiacetona (14)	23.42
Etanol (12)	27.40
MOPS (15)	28.84

### 5.4.9 Asignación de compuestos en cromatografía gaseosa

#### Análisis de la bio-reducción de $\alpha$ -etil acetoacetato de etilo (5)

La asignación de los picos obtenidos en los cromatogramas de GC a diferentes tiempos de retención se realiza en base a los resultados obtenidos con cepas con actividad descrita. Los compuestos *anti* (2S, 3S) y *syn* (2R, 3S) se obtienen de la reducción de este sustrato mediante *E. coli* BL21(DE3) $\Delta yqhE$ (pPP4) y *E. coli* JM105(pKTS3) de acuerdo a lo descrito en la bibliografía.<sup>330,376</sup>

**Tabla 5.15: Tiempos de retención asignados para  $\alpha$ -Etil acetoacetato de etilo (5) y los posibles alcoholes productos de biorreducción en las condiciones de ensayo descritas.**

Compuesto	Tiempo de retención (min)
$\alpha$ -etil acetoacetato de etilo	14.5
<i>anti</i> (2S-3S)- $\alpha$ -etil- $\beta$ -hidroxibutirato de etilo ( <b>43</b> )	16.5
<i>syn</i> (2R-3S)- $\alpha$ -etil- $\beta$ -hidroxibutirato de etilo ( <b>44</b> )	17.4

Los estándares utilizados para identificar los productos de reducción de  $\alpha$ -Etil acetoacetato de etilo (**5**) se obtuvieron mediante:

- Reducción con  $\text{NaBH}_4$ (**40**) en Etanol (**12**), para la obtención de los cuatro alcoholes posibles. Aportados por la Dra. Paola Panizza.<sup>375</sup>
- Biotransformación mediante la cepa *E.coli*BL21(DE3) $\Delta yqhE$ (pPP4), con esta cepa se obtiene como producto mayoritario el isómero *anti* (2S-3S)- $\alpha$ -etil- $\beta$ -hidroxibutirato de etilo (**43**).<sup>375,376</sup>
- Biotransformación mediante la cepa *E.coli*JM105(pKTS3). En esta biotransformación se obtiene como único producto el alcohol con configuración *syn* (2R-3S)- $\alpha$ -etil- $\beta$ -hidroxibutirato de etilo (**44**).<sup>330</sup>

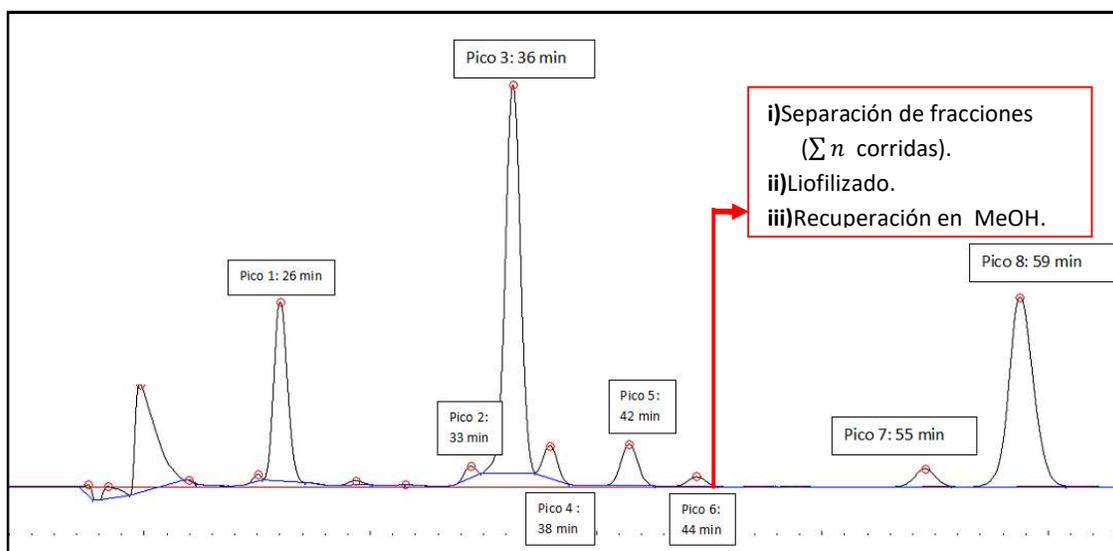
#### 5.4.10 Determinación de rotación óptica

La medida de rotación óptica se realiza en un polarímetro Kruss OPtronic GmbH P8000 en una celda de 0.5 dm (concentración expresada en g/100 mL). Las soluciones se preparan en  $\text{CHCl}_3$ .

#### 5.4.11 Separación e identificación de productos de biotransformación

La separación de productos de biotransformación con fines de identificación o de confirmación de identidad se realiza colectando las diferentes fracciones eluidas en el puerto de salida del detector IR.

Atendiendo a la dilución de las muestras se reitera esta operación sobre múltiples reiteraciones de una misma muestra. Con la finalidad de favorecer la separación completa y facilitar la colecta de los diferentes productos se reduce la presión en la bomba del HPLC, con la consecuente disminución del flujo y ensanche de la base de cada pico con la finalidad de facilitar su colecta. El seguimiento se realiza a través de la observación de la señal en monitor en tiempo real.



**Figura 5.2: Fracciones colectadas para identificación por MS-ID.**

La verificación de una adecuada separación se realiza a través de la reinyección de una alícuota de una de las fracciones separadas confirmando presencia únicamente del producto esperado. Las muestras se liofilizan a efectos de remover la fase acuosa presente previo a su análisis mediante Espectrometría de Masas por Inyección Directa.

#### 5.4.12 Parámetros utilizados para caracterizar las biotransformaciones a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas.

$$\% \text{ Conversión} = 100 * \frac{\sum(\text{área productos})}{\sum(\text{área sustratos} + \text{área productos})}$$

$$\% \text{ Exceso diastereomérico} = 100 * \left( \frac{\text{área}_{d \text{ may}} - \text{área}_{d \text{ min}}}{\text{área}_{d \text{ may}} + \text{área}_{d \text{ min}}} \right)$$

d may: Diastereómero mayoritario

d min: Diastereómero minoritario

$$\text{Relación de Área} = \frac{\text{área producto } i}{\text{área producto de referencia}_{(\text{buffer MOPS (15)})}}$$

### 5.4.13 Certificados de ensayo y especificaciones técnicas de glicerina obtenida en proceso productivo de biodiésel



## ESPECIFICACIÓN DE MATERIAL

23/03/2015  
Ing. Andrés Pena

**CODIGO PRODUCTO:** ND

**DESCRIPCIÓN:** Glicerina de splitting

#### 1- CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	UNIDAD	METODO DE ENSAYO
Punto de Inflamación	40 - 60	°C	ASTM D9307
Contenido de Agua (Karl Fischer)	<12	%(m/m)	UNIT ISO - 12937
Viscosidad a 25°C	0,047	Pa.s	ASTM D445
Densidad a 20°C	1,20-1,25	g/ml	ASTM D4052
Cenizas	<7	%(m/m)	ASTM D5468-95
PCI base seca	14.200	kJ/kg	ASTM D5468-95
Contenido de glicerol	70-80	%(m/m)	USP 32 Glycerin
Materia grasa	<1	%(m/m)	AOAC Met14019
pH	5-7	-	Dilución 1/10
Contenido de metanol	<5	%(m/m)	Medida indirecta con Flash Point
Cloruros	<3	%(m/m)	BS5711-12:1979

#### 2- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Subproducto de la producción de biodiesel.  
Elaborada a partir de: aceite de canola, de soja, de girasol, sebo vacuno y aceite usado de fritura. Catalizador: metilato de potasio.  
Glicerina purificada con HCl.

#### 3- EMBALAJE

Entrega a granel en camión cisterna. Opcional en isotanque, IBC y/o tambores.

#### 4- VALIDACIÓN DE CALIDAD

El producto se entrega con certificado de análisis que puede incluir los siguientes ensayos: Punto de inflamación, contenido de agua y densidad a 20°C. En caso de ser necesario se determina contenido de glicerol y materia grasa.  
Se requiere la validación de la carga, previo al envío, mediante los ensayos de contenido de agua y Punto de Inflamación.

**Figura 5.3: Especificación glicerina de splitting ALUR.**

## ESPECIFICACIÓN DE MATERIAL

N° ESPECIFICACIÓN: 006

19/03/2015  
Ing. Andrés Pena

CODIGO PRODUCTO:	60020704
DESCRIPCIÓN:	Glicerina Cruda

### 1- CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	UNIDAD	METODO DE ENSAYO
Punto de Inflamación	38 - 60	°C	ASTM D9307
Contenido de Agua (Karl Fischer)	2,0 - 6,0	%(m/m)	UNIT ISO - 12937
Viscosidad a 20°C (*)	350-550	cSt	ASTM D445
Densidad a 20°C(*)	1,05 -1,23	g/ml	ASTM D4052
Cenizas	3,0 - 7,0	%(m/m)	ASTM D5468-95
Valor Calorífico Bruto	4100 - 4800	kcal/kg	ASTM D5468-95
Contenido de glicerol	50 - 65	%(m/m)	USP 32 Glycerin
Materia grasa	15 - 35	%(m/m)	AOAC Met14019
pH	9-12	-	Dilución 1/10
Contenido de metanol	3-8	%(m/m)	Medida indirecta con Flash Point

### 2- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Subproducto de la producción de biodiesel.  
Elaborada a partir de: aceite de canola, de soja, de girasol, sebo vacuno y aceite usado de fritura. Catalizador: metilato de potasio.

### 3- EMBALAJE

Entrega a granel en camión cisterna. Opcional en isotanque, IBC y/o tambores.

### 4- VALIDACIÓN DE CALIDAD

El producto se entrega con certificado de análisis que puede incluir los siguientes ensayos: Punto de inflamación, contenido de agua y densidad a 20°C. En caso de ser necesario se determina contenido de glicerol y materia grasa.  
Se requiere la validación de la carga, previo al envío, mediante los ensayos de contenido de agua y Punto de inflamación.

Figura 5.4: Especificación glicerina cruda ALUR.

**Capítulo 6**  
***Bibliografía***

Página intencionalmente dejada en blanco

1. Stocker T.F. *et al.*, Summary for Policymakers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *CEUR Workshop Proc.*1542,33–36 (2015).
2. Field, C. B. *et al.*, *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation, and Vulnerability Part A : Global and Sectoral Aspects Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (2014).
3. UNFCCC. *The Paris Agreement*, (2016).
4. IEA, *World Energy Outlook*, (2012).
5. IEA, *Energy Technology Perspectives 2017 - Catalysing Energy Technology Transformations*, (2017).
6. IRENA, *Accelerating the Energy Transition through Innovation*, (2017).
7. IRENA, *Renewable Energy Statistics, Statistiques D'Énergie Renouvelable*, (2017).
8. IRENA, *REthinking Energy*, (2017).
9. Renewable Energy Policy Network for the 21<sup>st</sup> Century (REN21). *Renewables 2016: Global Status Report*. (2016).
10. IRENA, *Road Transport: The Cost of Renewable Solutions*, (2013).
11. Chapman, L., Transport and climate change: a review. *J. Transp. Geogr.*, **15**, 354–367 (2007).
12. Finn, P. *et al.*, Demand side management of electric car charging: Benefits for consumer and grid. *Energy*, **42**, 358–363 (2012).
13. IRENA, *Boosting Biofuels Sustainable Paths to Greater Energy Security*, (2016).
14. Cheng, J.J. & Timilsina, G.R., Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review, *Renew. Energy*, **36**, 3541–3549 (2011).
15. ABFA. Advanced Biofuels Association. Available at: <http://www.advancedbiofuelsassociation.com> (Accessed: 10th July 2017).
16. Tabatabaei, M. *et al.*, Recent trends in biodiesel production. *Biofuel. Res. J.*, **7**, 258–267 (2015).
17. Renewable Energy Policy Network for the 21<sup>st</sup> Century (REN21). *Renewables 2017: Global Status Report*. (2017).
18. Eyraud, L. *et al.*, Green investment : Trends and determinants. *Energ. Policy*, **60**, 852–865 (2013).
19. DNE-MIEM. *Política Energética Uruguay 2005-2030*. (2005).
20. DNE-MIEM. *Balance Energético Nacional- Uruguay*. (2015).
21. Ley 18.195 *Agrocombustibles*, Uruguay. (2007).
22. Swaminathan, M. *et al.*, HLPE. A report by the High Level Panel of Expertson Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security, Rome (2013).
23. Hamelinck, C., Biofuels and food security Risks and opportunities. *Ecofys*, 29 (2013).
24. UNIDO's Biofuels Strategy Sustainable Industrial Conversion and Productive Uses of Biofuels, (2007).
25. Saladini, F. *et al.*, Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **66**, 221–227 (2016).
26. Meher, L. C. *et al.*, Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **10**, 248–268 (2006).
27. Bourbon, E. Clean Cities Alternative Fuel Price Report. 11 (2015).
28. RMBGroup. Soybean oil should benefit from fading El Niño. Available at: <http://www.rmbgroup.com/>. (Accessed: 12th July 2017).

29. Schnitkey, G. Lower Fuel Prices Unlikely to have Large Impact on Non-Land Corn and Soybean Costs.' *farmdoc daily* (4):218, Department of Agricultural and Consumer Economics, University of Illinois at Urbana-Champaign (2014).
30. Commodities - markets. Available at: <http://www.nasdaq.com/markets>. (Accessed: 12th July 2017).
31. Singhabhandhu, A. & Tezuka, T., The waste-to-energy framework for integrated multi-waste utilization: Waste cooking oil, waste lubricating oil, and waste plastics.*Energ.*,**35**, 2544–2551 (2010).
32. Johnson, D. T. & Taconi, K. A., The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. *Environ. Prog.*,**26**, 338–348 (2007).
33. Yazdani, S.S. & González, R., Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.*,**18**, 213–219 (2007).
34. Martins, A. *et al.*, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*,**14**, 217–232 (2010).
35. Leung, D.Y.C.*et al.*, A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy*,**87**,1083–1095 (2010).
36. Stelmachowski, M., Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils: a review. *Ecol. Chem. Eng. S.*,**18**,9–30 (2011).
37. Mota, C.J.A.*et al.*,*Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry* 11–19, Springer International Publishing, (2017).
38. Research and Markets. Global Glycerol Market Report 2013. (2013).
39. IEA, Tracking Clean Energy Progress 2013 IEA Input to the Clean Energy Ministerial (2013).
40. Ayoub, M. & Abdullah, A.Z., 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 (2012).
41. Quispe, C.A.G. *et al.*, Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **27**, 475–493 (2013).
42. Yang, F.*et al.*, Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels*, **5**:13 (2012).
43. Werpy, T. & Petersen, G., Top Value added chemicals from biomass Volume I- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas: Results of Screening for Potential Candidates,*PBD 1 Aug 2004*, pag 76 (2004).
44. Bozell, J.J. & Petersen, G.R., Cutting-edge research for a greener sustainable future technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - the US Department of Energy's 'Top 10' revisited. (2010).
45. Geissdoerfer, M. *et al.*, The Circular Economy a new sustainability paradigm?. *J. Clean. Prod.*,**143**, 757–768 (2017).
46. Winans, K. *et al.*, The history and current applications of the circular economy concept. *Renew. Sustain. Energy Rev.*,**68**, 825–833 (2017).
47. Mohan, S. V.*et al.*, Bioresource Technology Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresour. Technol.*,**215**, 2–12 (2016).
48. Mac Arthur, E.,*Towards the circular economy - Economic and business rationale for an accelerated transition*. (2013).
49. Ngo, T.A.*et al.*, High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing

- waste by *Thermotoga neapolitana*. *Int. J. Hydrogen Energy*,**36**, 5836–5842 (2011).
50. Atadashi, I.M. *et al.*, Biodiesel separation and purification: A review. *Renew. Energy*,**36**, 437–443 (2011).
  51. Chi, Z. *et al.*, A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.*,**42**, 1537–1545 (2007).
  52. Van Gerpen, J., Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.*,**86**, 1097–1107 (2005).
  53. Isahak, W.N.R.W. *et al.*, Purification of crude glycerol from industrial waste: Experimental and simulation studies. *J. Eng. Sci. Technol.*,**11**, 1056–1072 (2016).
  54. Sivasankaran, C. *et al.*, Recent progress on transforming crude glycerol into high value chemicals: a critical review. *Biofuels*,**7269**, 1–6 (2016).
  55. Singhabhandhu, A. & Tezuka, T., A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. *Energy*,**35**, 2493–2504 (2010).
  56. Manuel, C.J. *et al.*, Suplementación con glicerina cruda y afrechillo de arroz entero a vacas de carne pastoreando campo natural- Supplementation of Beef Cows Grazing Natural Pasture with Crude Glycerin and Whole Rice Bran. *Agrociencia Uruguay*,**20**, 121–131 (2016).
  57. Yang, F. *et al.*, Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels*,**5**, 13 (2012).
  58. Freitas, L.A. *et al.*, High early strength cement and additives and methods for making the same, USPTO-US6641661B1 (2003).
  59. Rossi, M. *et al.*, Ciment a resistance a la compression amelioree, WO 2006051574 A2. (2006).
  60. Rossi, M. *et al.*, Greening the Construction Industry: Enhancing the Performance of Cements by Adding Bioglycerol. *Chem. Sus. Chem.*,**1**, 809–812 (2008).
  61. Moon, T.Y. & Cooper, R.H., Method of preventing surface cracking of Portland cement mortar and concrete containing a film forming polymer modifier, US4141737, (1979).
  62. Pagliaro, M. & Rossi, M., *The future of glycerol. Focus on Catalysts***2008**, RSC Publishing, (2008).
  63. McNeil, J., Day, P., *et al.*, Glycerine from biodiesel: The perfect diesel fuel. *Process Saf. Environ. Prot.*,**90**, 180–188 (2012).
  64. Mc Neil, J., United States Patent, Patent NO US 8,875,685 B2. Date of Patent : **2**, 2–8 (2014).
  65. Steinmetz, S. A., *et al.*, Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions. *Proc. Combust. Inst.*,**34**, 2749–2757 (2013).
  66. Bohon, M.D., Metzger, B.A., *et al.*, Glycerol combustion and emissions. *Proc. Combust. Inst.*,**33**, 2717–2724 (2011).
  67. Diaz-Alvarez, A.E., Francos, J., *et al.*, Recent Advances in the Use of Glycerol as Green Solvent for Synthetic Organic Chemistry. *Current Green Ch.*,**1**, 51–65 (2014).
  68. Gu, Y., Barrault, J., *et al.*, Glycerol as an efficient promoting medium for organic reactions. *Adv. Synth. Catal.*,**350**, 2007–2012 (2008).
  69. Pagliaro, M., Ciriminna, R., *et al.*, Recent advances in the conversion of bioglycerol into value-added products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*,**111**, 788–799 (2009).
  70. Arechederra, R.L. & Minteer, S.D., Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. *Fuel Cells*,**9**, 63–69 (2009).
  71. Arechederra, R.L., Treu, B.L., *et al.*, Development of glycerol/O<sub>2</sub> biofuel cell. *J. Power*

- Sources*, **173**, 156–161 (2007).
72. ANII. Timbó: Trama Interinstitucional Multidisciplinaria de Bibliografía Online. *Google Scholar* (2017). Available at: <http://www.timbo.org.uy> (Accessed: 18<sup>th</sup> November 2017).
  73. Novartis, C. M. Nitroderm TTS<sup>®</sup>. 1–5 (2011). Available at: <http://www.medsafe.govt.nz/Consumers/CMI/n/nitroderm.pdf>. (Accessed: 18<sup>th</sup> July 2017).
  74. Highsmith, T.K., Sanderson, *et al.*, Polymerization of poly(glycidyl nitrate) from high purity glycidyl nitrate synthesized from glycerol, USPTO, US6362311 B1, (2002).
  75. Highsmith, T.K. & Johnston, H.E., Continuous process and system for production of glycidyl nitrate from glycerin, nitric acid and caustic and conversion of glycidyl nitrate to poly(glycidyl nitrate), USPTO, US6870061 B2. (2005).
  76. Carrettin, S. *et al.*, Selective oxidation of glycerol to glyceric acid using a gold catalyst in aqueous sodium hydroxide. *Chem. Commun.*, **57**, 696–697 (2002).
  77. Bianchi, C.L., Canton, P., *et al.*, Selective oxidation of glycerol with oxygen using mono and bimetallic catalysts based on Au, Pd and Pt metals. *Catal. Today*, **102**, 203–212 (2005).
  78. Fordham, P., Besson, M. *et al.*, Selective catalytic oxidation of glyceric acid to tartronic and hydroxypyruvic acids. *Appl. Catal. A. Gen.*, **133**, L179–L184. (1995).
  79. Fordham, P., Besson, M., *et al.*, Catalytic oxidation with air of tartronic acid to mesoxalic acid on bismuth-promoted platinum. *Catal. Letters*, **46**, 195–199 (1997).
  80. Fordham, P., Garcia, R., *et al.*, Selective catalytic oxidation with air of glycerol and oxygenated derivatives on platinum metals. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **101**, 161–170 (1996).
  81. Behr, A. & Urschey, M. Highly Selective Biphasic Telomerization of Butadiene with Glycols: Scope and Limitations. *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 1242–1246 (2003).
  82. Palkovits, R., Nieddu, I., *et al.*, Palladium-based telomerization of 1,3-butadiene with glycerol using methoxy-functionalized triphenylphosphine ligands. *Chem. - A Eur. J.*, **14**, 8995–9005 (2008).
  83. Ruppert, A.M., Meeldijk, J.D., *et al.*, Glycerol etherification over highly active CaO-based materials: New mechanistic aspects and related colloidal particle formation. *Chem. - A Eur. J.*, **14**, 2016–2024 (2008).
  84. Ciriminna, R., Pina, C. *et al.*, Understanding the glycerol market. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **116**, 1432–1439 (2014).
  85. Barrault, J., Pouilloux, Y., *et al.*, Catalysis and fine chemistry. *Catal. Today*, **75**, 177–181 (2002).
  86. Sunder, A., Krämer, M., *et al.*, Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerols. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **38**, 3552–3555 (1999).
  87. Sunder, A., Hanselmann, R., *et al.*, Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. *Macromolecules*, **32**, 4240–4246 (1999).
  88. Kimura, H., Oxidation assisted new reaction of glycerol. *Polym. Adv. Technol.*, **12**, 697–710 (2001).
  89. Winowiski, T.S. & Gargulak, D.J., Glycerose synthesis, WO2009100068A1. (2009).
  90. Ciriminna, R., Palmisano, G., *et al.*, One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 6993–6995 (2006).

91. Liu, L., Ye, X.P., *et al.*, A comparative review of petroleum-based and bio-based acrolein production. *Chem. Sus. Chem.*, **5**, 1162–1180 (2012).
92. Guerrero-Pérez, M.O. & Bañares, M.A., New reaction: Conversion of glycerol into acrylonitrile. *Chem. Sus. Chem.*, **1**, 511–513 (2008).
93. Dubois, J., Duquenne, C. *et al.*, Method for producing acrylic acid from glycerol, WO2006114506A1, (2006).
94. Gupta, V. P., Glycerine ditertiary butyl ether preparation, USPTO, US5476971A. (1995).
95. Behr, A. & Obendorf, L., Development of a Process for the Acid-Catalyzed Etherification of Glycerine and Isobutene Forming Glycerine Tertiary Butyl Ethers. *Eng. Life Sci.*, **2**, 185–189 (2002).
96. Klepáčová, K., Mravec, D., *et al.*, Tert-Butylation of glycerol catalysed by ion-exchange resins. *Appl. Catal. A Gen.*, **294**, 141–147 (2005).
97. Melero, J. A., van Grieken, R., *et al.*, Acidic mesoporous silica for the acetylation of glycerol: Synthesis of bioadditives to petrol fuel. *Energy and Fuels*, **21**, 1782–1791 (2007).
98. Yadav, G.D. & Mehta, P.H., Heterogeneous Catalysis in Esterification Reactions: Preparation of Phenethyl Acetate and Cyclohexyl Acetate by Using a Variety of Solid Acidic Catalysts. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **33**, 2198–2208 (1994).
99. Mouloungui, Z., Conférence Chevreul: Voies inhabituelles de synthèse de composés oléophiles à partir des substrats végétaux solides (graines oléoprotéagineuses), liquides (huiles végétales et dérivés, glycérol) pour l'industrie chimique. *OCL - Ol. Corps Gras Lipides*, **11**, 425–435 (2004).
100. Indran, V.P., Saud, A.S.H., *et al.*, Viable Glycerol Carbonate Synthesis Through Direct Crude Glycerol Utilization from Biodiesel Industry. *Waste and Biomass Valorization*, **8**, 1049–1059 (2017).
101. Pyo, S.H. & Hatti-Kaul, R., Chlorine-Free Synthesis of Organic Alkyl Carbonates and Five and Six-Membered Cyclic Carbonates. *Adv. Synth. Catal.*, **358**, 834–839 (2016).
102. Edwards, P. A., Striemer, G., *et al.*, Synthesis, characterization and self-crosslinking of glycidyl carbamate functional resins. *Prog. Org. Coatings*, **57**, 128–139 (2006).
103. Jin, F.L., Li, X., *et al.*, Synthesis and application of epoxy resins: A review. *J. Ind. Eng. Chem.*, **29**, 1–11 (2015).
104. Bell, B.M., *et al.*, Glycerin as a renewable feedstock for epichlorohydrin production. The GTE process. *Clean - Soil, Air, Water*, **36**, 657–661 (2008).
105. Santacesaria, E., Tesser, R., *et al.*, New process for producing epichlorohydrin via glycerol chlorination. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **49**, 964–970 (2010).
106. Siano, D. *et al.*, Procédé de production d'alpha, gamma-dichlorohydrine à partir de glycerine et d'acide hydrochlorique, WO2006111810A2, (2006).
107. Olah, G. A., Goepfert, A., *et al.*, Chemical recycling of carbon dioxide to methanol and dimethyl ether: From greenhouse gas to renewable, environmentally carbon neutral fuels and synthetic hydrocarbons. *J. Org. Chem.*, **74**, 487–498 (2009).
108. Galindo Cifre, P. & Badr, O., Renewable hydrogen utilisation for the production of methanol. *Energy Convers. Manag.*, **48**, 519–527 (2007).
109. Behr, A., Eilting, J. *et al.*, Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chem.*, **10**, 13–30 (2008).
110. Hirai, T., Ikenaga, N.O., *et al.*, Production of hydrogen by steam reforming of glycerin on ruthenium catalyst. *Energy and Fuels*, **19**, 1761–1762 (2005).

111. Davda, R.R., Shabaker, J.W., *et al.*, A review of catalytic issues and process conditions for renewable hydrogen and alkanes by aqueous-phase reforming of oxygenated hydrocarbons over supported metal catalysts. *Appl. Catal. B Environ.*,**56**, 171–186 (2005).
112. Chakinala, A. G., Brillman, D.W.F., *et al.*, Catalytic and non-catalytic supercritical water gasification of microalgae and glycerol. *Ind. Eng. Chem. Res.*,**49**,1113–1122 (2010).
113. Lam, K.T., Powell, J.P.P.,*et al.*, Process for preparing 1,3-propanediol, WO9716250, (1997).
114. Kraus, G.A., Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. *Clean - Soil, Air, Water*,**36**,648–651 (2008).
115. Wang, K., Hawley, M.C.,*et al.*, Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation. *Ind. Eng. Chem. Res.*,**42**, 2913–2923 (2003).
116. Dasari, M.A., Kiatsimkul, P.P., *et al.*, Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Appl. Catal. A Gen.*,**281**,225–231 (2005).
117. Chiu, C.W., Dasari, M.A., *et al.*, Removal of residual catalyst from simulated biodiesel's crude glycerol for glycerol hydrogenolysis to propylene glycol. *Ind. Eng. Chem. Res.*,**45**,791–795 (2006).
118. Tuck, M.M.W. & Tilley, S.N., Vapor-phase hydrogenation of glycerol, WO2007010299A1, (2007).
119. Henkelmann, J., Becker, M., *et al.*, Process for the preparation of 1,2-propanediol, WO2007099161A1, (2007).
120. Che, T.M., Production of propanediols, USPTO, US4642394A. (1987).
121. Drent, E. & Jager, W.W., Hydrogenolysis of glycerol, USPTO, US6080898A, (2000).
122. Miyazawa, T., Kusunoki, Y., *et al.*, Glycerol conversion in the aqueous solution under hydrogen over Ru/C + an ion-exchange resin and its reaction mechanism. *J. Catal.*,**240**,213–221 (2006).
123. Furikado, I. *et al.*, Catalytic performance of Rh/SiO<sub>2</sub> in glycerol reaction under hydrogen. *Green Chem.*,**9**,582–588 (2007).
124. Choi, W.J., Glycerol-Based Biorefinery for Fuels and Chemicals. *Recent Pat. Biotechnol.*,**2**, 173–180 (2008).
125. da Silva, G.P., Mack, M.,*et al.*, Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*,**27**, 30–39 (2009).
126. Montaner, B., Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol. Histopathol.*,**16**, 415-421(2001).
127. Dalmau, M., Montaner, B.,*et al.*, Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*,**3**, 746–750 (2003).
128. Giri, A.V, Anandkumar, N., *et al.*, A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.*,**4**, 1–10 (2004).
129. Tao, J., Wang, X., *et al.*, Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. *World J. Microb. Biot.*, **21**, 969–972, (2005).
130. Kusdiyantini, E., Gaudin, P.,*et al.*, Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnology Letters*,**20**, 929–934 (1998).
131. Nakano, H., Kiso, T., *et al.*, Synthesis of glycosyl glycerol by cyclodextrin glucanotransferases. *J. Biosci. Bioeng.*,**95**,583–588 (2003).

132. Edward, A.X.D. & Hehre, J. A., Novel Amylase (*Candida transglucosyl-amylose*) that catalyzes glucosyl transfer from starch and dextrans. *J. Biol. Chem.*, **237**,2047-2052 (1962).
133. Takenaka, F. & Uchiyama, H., Synthesis of alpha-D-glucosylglycerol by alpha-glucosidase and some of its characteristics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**64**,1821–1826 (2000).
134. Xu, S. & Minter, S.D., Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO<sub>2</sub>.*ACS Catal.*, **2**, 91-94 (2012).
135. Minter, S., Akers, N.,*et al.*, Enzyme immobilization for use in biofuel cells and sensors, USPTO, US20040101741A1 (2004).
136. Johnson, M.B. & Wen, Z., Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy Fuels*,**48**, 5179–5183 (2009).
137. Liang, Y., Sarkany, N.,*et al.*, Bioresource technology batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresour. Technol.*,**101**,6745–6750 (2010).
138. Meesters, P.A.E.P, Huijbertset, G.N.M., *etal.*, High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source.*Appl. Microbiol. Biotechnol.*,**45**, 575-579(1996).
139. Saenge, C., Cheirsilp, B., *et al.*, Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process. Biochem.*,**46**, 210–218 (2011).
140. O’Grady, J. & Morgan, J.A., Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol.*Bioprocess Biosyst. Eng.*,**34**, 121–125 (2011).
141. Chatzifragkou, A. *et al.*, Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*,**36**, 1097–1108 (2011).
142. Walker, Y.C.T.H., Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol Lett.*,**33**, 1973–1983 (2011).
143. Anupama & Ravindra, P., Value-added food: Single cell protein.*Biotechnol. Adv.*,**18**,459–479 (2000).
144. Vieira-Costa, J.A., Colla, L.M., *et al.*, Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process.*Bioresour. Technol.*,**92**, 237–241 (2004).
145. dos Santos, E.O., Michelon, M., *et al.*, Evaluation of the composition of culture medium for Yeast Biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis.*Brazilian J. Microbiol.*,**43**,432–440 (2012).
146. Nitayavardhana, S. & Khanal, S.K., Bioresource technology biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresour. Technol.*,**102**,5808–5814 (2011).
147. Sudesh, K., Abe, H., *et al.*, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, **25**,1503–1555 (2000).
148. Ke, Y., Zhang, X.Y., *et al.*, Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application.*Mat. Sci. Eng. C.*,**70**, 1107–1119 (2017).
149. Khanna, S. & Srivastava, A.K., Recent advances in microbial polyhydroxy alkanoates. *Process Biochem.*,**40**, 607–619 (2005).
150. Lee, S.Y., Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*,**49**, 1–14 (1996).

151. Lee, S.Y., Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Tibtech.*, **14**, 431–438 (1996).
152. Anderson, A.J. & Dawes, E.A., Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, **54**, 450–472 (1990).
153. Li, Z. & Loh, X. J., Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 2865–2879 (2015).
154. Reddy, C.S.K., Ghai, R., Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technol.*, **87**, 137–146 (2003).
155. Slawomir, C., Pokoj, T., *et al.*, Cultivation-Dependent and -Independent Characterization of Microbial Community Producing Polyhydroxyalkanoates from Raw Glycerol. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 853–861 (2010).
156. Kumar, P., Ray, S., *et al.*, Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *Int. J. Biol. Macromol.*, **78**, 9–16 (2015).
157. Reddy, S.V., Thirumala, M., *et al.*, Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 391–397 (2009).
158. Moita, R., Freches, A., *et al.*, Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Res.*, **58**, 9–20 (2014).
159. Kenny, S.T., Runic, J.N., *et al.*, Development of a bioprocess to convert PET derived terephthalic acid and biodiesel derived glycerol to medium chain length polyhydroxyalkanoate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 623–633 (2012).
160. Wang, Q., Yang, P., *et al.*, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly (3-hydroxypropionate) production from glycerol and glucose. *Biotechnol. Lett.*, **36**, 2257–2262 (2014).
161. Chung, H. *et al.* Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **36**, 73–84 (2015).
162. Beckers, V., Castro, I. P., *et al.* Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA producing *Pseudomonas putida* grown on glycerol. *Microb. Cell Fact.*, **15**, 1–18 (2016).
163. Svitel, J. & Sturdik, E. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *J. Ferment. Bioeng.*, **1783**, 351–355 (1994).
164. Habe, H., Fukuoka, T., *et al.*, Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 1033–1039 (2009).
165. De Paula, C., Gomez, C., *et al.*, Poly (3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) Production from biodiesel by-product and propionic acid by mutant strains of *Pandora sp.* *Biotechnol. Prog.*, en imprenta, (2017).
166. Niu, K., Xiong, T., *et al.*, 3-Hydroxypropionic acid production by recombinant *Escherichia coli* ZJU-3HP01 using glycerol-glucose dual-substrate fermentative strategy. *Biotechnol. Appl. Bioc.*, **64**, 572–578 (2017).
167. Ahmadi, N., Khosravi-darani, K., *et al.*, An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electron. J. Biotechnol.*, **28**, 67–75 (2017).
168. Liang, Y., Sarkani N., *et al.*, Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresour. Technol.*, **101**, 3623–3627 (2010).

169. Yokochi, T., Honda, D., *et al.*, Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 72–76 (1998).
170. Ethier, S., Woisard, K., *et al.*, Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour. Technol.*, **102**, 88–93 (2011).
171. Watanabe, T., Importance of Docosahexaenoic Acid in Marine Larval Fish. *J. World Aquacult. Soc.*, **24**, 152–161 (1993).
172. Mohamad, R., Mohamed, M.S., *et al.*, Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnol. Molecular Biol. Rev.*, **5**, 24–37 (2010).
173. Brtko, J. & Fickova, M., Kojic acid and its derivatives: History and present state of art. *Cent. Eur. J. Publ. Health*, **12**, S16-S17 (2004).
174. Bentley, R., From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 1046–1062, (2006)
175. Bellik, A., Kojic acid. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **11**, 145–183 (1956).
176. Gould, B.S., The metabolism of *Aspergillus tamarii* kito. Kojic acid production. *Biochem.*, **85**, 0–5 (1938).
177. Coelho, R.S., Anschau, A., *et al.*, Kojic acid production from glycerol: Optimization using central composite rotatable design. *J. Biotechnol.*, **150S**, S1-S576 (2010).
178. Galiotou, M., Paramithiotis, S., *et al.*, Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng. Life Sci.*, **12**, 57–68 (2012).
179. Ma, F. & Hanna, M. A., Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, **70**, 1–15 (1999).
180. Morschbacker, A., Bio-Ethanol Based Ethylene. *Polym. Rev.*, **49**, 79–84 (2009).
181. Temudo, M.F., Poldermans, R., *et al.*, Glycerol Fermentation by (Open) Mixed Cultures: A Chemostat Study. *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 1088–1098 (2008).
182. Gupta, A., Murarka, A., *et al.*, Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: Metabolic pathways and environmental determinants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5871–5883 (2009).
183. Ito, T., Nakashimada, Y., *et al.*, Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 260–265 (2005).
184. Sakai, S. & Yagishita, T., Microbial production of Hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with Thionine. *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 340–348 (2007).
185. Lee, J.S., Lee, J.H., *et al.*, Re-utilization of waste glycerol for continuous production of bioethanol by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *J. Clean. Prod.*, **161**, 757–764 (2017).
186. Choi, W.J. & Hartono, M.R., Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1255–1264 (2011)
187. Jarvis, G.N., Moore, E.R.B., *et al.*, Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 166–174 (1997).
188. Oh, B.R., Seo, J.W., *et al.*, Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresour. Technol.*, **102**, 3918–3922 (2011).

189. Liu, X., Jensen, P.R.,*et al.*, Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*.*Bioresour. Technol.*,**104**, 579–586 (2012).
190. Dharmadi, Y., Murarka,A.,*et al.*,Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.*,**189**, 821–829 (2006).
191. Murarka, A., Dharmadi, Y.,*et al.*, Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.*,**74**,1124–1135 (2008).
192. Durnin, G., Clomburg, J.,*et al.*, Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*,**103**, 148–161 (2009).
193. Trinh, C. T. & Srienc, F., Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient conversion of glycerol to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*,**75**, 6696–6705 (2009).
194. Nickel, P.I., Ramirez, M.C., *et al.*, Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing adhE from *Leuconostoc mesenteroides*.*J. Appl.Microbiol.*,**109**, 492–504 (2010).
195. Yazdani, S. & Gonzalez, R., Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products.*Metab. Eng.*,**10**, 340–351 (2008).
196. Ok, K., Wook, S., *et al.*,Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*.*Bioresour. Technol.*,**101**, 4157–4161 (2010).
197. Ok, K., Jung, J.,*et al.*, Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. *Enzyme Microb. Technol.*,**51**, 237–243 (2012).
198. Taconi, K.A., Venkataramanan, K.P.,*et al.*, Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. *Environ. Prog. Sustain., Energy*, **28**, 100–110 (2009).
199. Qureshi, N. & Blaschek, H.P., ABE production from corn: a recent economic evaluation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*,**27**, 292–297 (2001).
200. Vasconcelos, I., Girbal, I.,*et al.*, Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum*grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.*,**176**, 1443–1450 (1994).
201. Dabrock, B., Bahl, H. & Gottschalk, G.,Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*.*Appl. Environ. Microbiol.*,**58**,1233–1239 (1992).
202. Biebl, H., Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*,**27**, 18–26 (2001).
203. Atsumi, S., Cann, A.F.,*et al.*, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.*,**10**,305–311 (2008).
204. Atsumi, S., Hanai, T.,*et al.*, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nat.*,**451**, 1–5 (2008).
205. Song, H. & Yup, S. Production of succinic acid by bacterial fermentation.*Enzyme Microb. Technol.*,**39**, 352–361 (2006).
206. Maziere, A., Prinsen,*et al.*, A review of progress in (bio) catalytic routes from/to renewable succinic. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*,**11**, 908–931 (2017).
207. Lee, P.C., Lee, W.G.,*et al.*, Succinic Acid Production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioeng.*,**72**, 41-48(2001).
208. Beauprez, J.J., De Mey, M., *et al.*, Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers.*Process Biochem.*,**45**, 1103–1114 (2010).

209. Scholten, E., Renz, Æ.T., *et al.*, Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnol Lett.*,**31**, 1947–1951 (2009).
210. Blankschien, M.D., Clomburg, J.M., *et al.*, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metab. Eng.*,**12**, 409–419 (2010).
211. Vlysidis, A., Binns, M.,*et al.*, Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochem. Eng. J.*,**58–59**, 1–11 (2011).
212. Carvalho, M., Matos, M., *et al.*, Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor. *N. Biotechnol.*,**31**, 133–139 (2014).
213. Schindler, B.D., Joshi, R.V, *et al.*, Respiratory glycerol metabolism of *Actinobacillus succinogenes* 130Z for succinate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*,**41**, 1339–1352 (2014).
214. Litsanov, B., Brocker, M., *et al.*, Brief report Glycerol as a substrate for aerobic succinate production in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*.*Microb. Biotechnol.*,**6**, 189–195 (2012).
215. Li, C., Yang, X.,*et al.*, High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.*,**225**,9–16 (2017).
216. Fan, X., Burton, R.,*et al.*, Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals-Mini Review. *Open Fuels Energy Sci. J.*,**3**,17–22 (2010).
217. Papanikolaou, S., Muniglia, L.,*et al.*, *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol.*J. Appl. Microbiol.*, **92**, 737–744 (2002).
218. Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. & Rodrigues, C. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technol. Biotechnol.*,**44**, 141–149 (2006).
219. Papanikolaou, S. & Aggelis, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.*,**21**, 83–87 (2009).
220. Papanikolaou, S., Fakas, S., *et al.*, Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenerg.*,**32**, 60–71 (2008).
221. Rymowicz, W., Rywi, A.,*et al.*, Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia wraislavia* K1. *Chem. Pap.*, **62**, 239–246 (2008).
222. Anastassiadis, S., Morgunov, I.G., *et al.*, Citric Acid production patent review. *Recent Pat. Biotechnol.*,**2**, 107–123 (2008).
223. Rywinska, A., Rymowicz, W., High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors.*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*,**37**, 431–435 (2010).
224. Imandi, S.B., Ratnam, V., *et al.*, Optimization of medium constituents for the production of citric acid from by-product glycerol using Doehlert experimental design.*Enzyme Microb. Technol.*,**40**, 1367–1372 (2007).
225. Cheng, K., Zhang J.A.,*et al.*, Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnol Lett.*,**28**, 1817–1821 (2006).

226. El-Zinei, M.G., Arneborg, N., *et al.*, Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol Lett.*, **20**, 913–916 (1998).
227. Hong, A., Cheng, K., *et al.* Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **84**, 1576–1581 (2009).
228. Kishimoto, K. & Shi, K., Method for production of Lactic acid, USPTO, 0086980 A1 (2010).
229. Tian, K., Cheng, X., *et al.*, High-efficiency conversion of glycerol to D-lactic acid with metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **11**, 4860–4867 (2012).
230. Gonzalez, R., Murarka, A., *et al.*, A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, **10**, 234–245 (2008).
231. Mazumdar, S., Clomburg, J.M., *et al.*, *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-Lactic Acid from glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4327–4336 (2010).
232. Mazumdar, S., Blankschien, M.D., *et al.*, Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, **12**, 1–11 (2013).
233. Pagliaro, M., *Glycerol The Renewable Platform Chemical*, (John Fedor Ed., 2017).
234. Stroud, E. & Scott, J. Self-tanning dihydroxyacetone formulations having improved stability and providing enhanced delivery, USPTO, US 6,231,837 B1 (2001).
235. Levy, S.B., Hill, M.D., *et al.*, Dihydroxyacetone-containing self-tanning lotions. *Clinical reviews, J. Am. Acad. Dermatol.*, **27**, 6–1 (1992).
236. Nabe, K., Izuo, N., *et al.*, Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized Whole Cells of *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 1056–1060 (1979).
237. Gätgens, C., Degner, U., Bringer-meyer, S. & Herrmann, U., Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 553–559 (2007).
238. Hoist, O., Enfors, S., *et al.*, Oxygenation of immobilized cells using Hydrogen-Peroxide; A model study of *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 64–68 (1982).
239. Claret, C., Bories, A., *et al.*, Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Curr. Microbiol.*, **25**, 149–155 (1992).
240. Katsikis, R. B. Æ. N. & Hekmat, Æ. S. V. Æ. D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **5**, 37–43 (2005).
241. Wei, S., Song, Q., *et al.*, Repeated Use of Immobilized *Gluconobacter oxydans* cells for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **37**, 67–76 (2007).
242. Vancauwenberge, J.E., Slininger, P.J. *et al.*, Bacterial conversion of glycerol to  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 329–332 (1990).
243. Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., *et al.*, Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 73–80 (2003).

244. Vollenweider, S. & Lacroix, C., 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,**64**, 16–27 (2004).
245. Barbirato, F., Grivet, J.P.,*et al.*,3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by Enterobacterial Species. *Appl. Environmental Microbiol.*,**62**, 3–7 (1996).
246. Cameron, D. & Cooney, C., A novel fermentation: The production of R(-)-1,2-propanediol and acetol by *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Nat. Biotechnol.*,**4**,651–654 (1986).
247. Forsberg, C.W., Donaldson, L.,*et al.*,Metabolism of rhamnose and other sugars by strains of *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species.*Can. J. Microbiol.*,**33**, 22–26 (1987).
248. Skraly, F.A., Lytle, B.L.,*et al.*,Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon.*Appl. Environ. Microbiol.*,**64**, 98–105 (1998).
249. Jiang, W., Wang, S., *et al.*, Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol. *Biotechnol. Biofuels*,**9**, 1–19 (2016).
250. Barbirato, F., Himmi, E.H., *et al.*, 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Prod.*,**7**, 281–289 (1998).
251. Tabah, B., Varvak, A., *et al.*, Production of 1,3-propanediol from glycerol viafermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Green Chem.*,**18**, 4657-4666 (2016).
252. Nakamura, C.E. & Whited, G.M., Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol.*Curr. Opin. Biotechnol.*,**14**, 454–459 (2003).
253. Nagarajan, V. & Nakamura, C., Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase, USPTO 5633362 (1997).
254. Emptage, M., Haynie, S. L., *et al.*, Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer, USPTO, US6514733 (2003).
255. Díaz-Torres, M., Dunn-Coleman,*et al.*, Method for the recombinant production of 1,3-Propanediol, USPTO, 6136576 (2000).
256. Cameron, D.C., Altaras, N.E., *et al.*, Metabolic Engineering of Propanediol Pathways.*Biotechnol. Prog.*,**14**, 116–125 (1998).
257. Hoffman, M.L. Metabolic engineering of 1,2- propanediol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D.Thesis University of Wisconsin, Madison, (1999).
258. Simon, E. & Whitesides, G.A combined microbial/chemical synthesis of (+)-(R)-Methyloxirane having high enantiomeric excess.*J.Org. Chem.*,**52**, 4042–4044 (1987).
259. Enebo, L., Studies in cellulose decomposition by an anaerobic thermophilic bacterium and two associated non-cellobiolytic species. in *Viktor Pettersons Bokindustie Aktiebolag* (1954).
260. Suzuai, T. & Onishi, H., Aerobic dissimilation of L-Rhamnose acid and and the production of L-Rhamnonic and 1,2-propanediol by Yeasts.*Agric. Biol. Chem.*,**32**, 888–893 (1968).
261. Bennett, G. N. & San, K. Y. Microbial formation, biotechnological production and applications of 1,2-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,**55**,1–9 (2001).
262. Saxena, R.K., Anand, P., *et al.*, Microbial production and applications of 1,2-propanediol. *Indian J. Microbiol.*,**50**, 2–11 (2010).

263. Huff, E., The metabolism of 1,2-propanediol. *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 506-517 (1961).
264. Kluyver, A.J. & Schellen, C., Uber die Vergärung von Rhamnose. *Enzymologia*, **4**, 7-12 (1937).
265. Farber, E. & Nord, F.F., *Biochem. Z. Biochem. Z.*, **112**, 313 (1920).
266. Neuberg, C. & Vercellone, A., *Biochem. Z. Biochem. Z.*, **279**, 140 (1935).
267. Neuberg, C. & Kobel, M. *Biochem. Z. Biochem. Z.*, **182**, 470 (1927).
268. Turnert, K. W. & Roberton, A. M. Xylose, Arabinose, and Rhamnose Fermentation by *Bacteroides ruminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 7-12 (1979).
269. Scardovi, V. Rhamnose metabolism by *L. casei* var. rhamnosus and *Pediococcus* spp. *Ann. Microbiol.*, **10**, 99-114 (1960).
270. Boronat, A. & Aguilar, J., Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol.*, **140**, 320-326 (1979).
271. Teichmann, S.A. *et al.*, Small-molecule metabolism: an enzyme mosaic. *Trends Biotechnol.*, **19**, 823-826 (2001).
272. Boronatt, A. & Aguilar, J., Metabolism of L-Fucose and L-Rhamnose in *Escherichia coli*: Differences in Induction of Propanediol Oxidoreductase. *J. Bacteriol.*, **147**, 181-185 (1981).
273. Chen, Y. & Lin, E. C. C. Dual control of a common L-1,2-propanediol oxidoreductase by Fucose and L-Rhamnose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **157**, 828-832 (1984).
274. Wu, T.T., Growth of a mutant of *Escherichia coli* K-12 on xilitol by recruiting enzymes for D-Xilose and L-1,2-propanediol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 656-663 (1976).
275. Wu, T. T., Growth on D-Arabitol of a mutant Strain of *Escherichia coli* K12 using a novel dehydrogenase and enzymes related to L-1,2-propanediol and D-xilose metabolism. *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 246-256 (1976).
276. Sridhara, S. & Wu, T.T., Purification and Properties of Lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5233-5238 (1969).
277. Sridhara, S., Wu, T.T., *et al.*, Ferrous-activated Nicotinamide Adenine dinucleotide-linked dehydrogenase from a mutant of *Escherichia coli* capable of growth on 1,2-propanediol. *J. Bacteriol.*, **98**, 87-95 (1969).
278. Hacking, A.J. & Lin, E.C., Regulatory Changes in the fucose system associated with the evolution of a catabolic pathway for propanediol in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **130**, 832-838 (1977).
279. Hacking, A.J. & Lin, E.C., Disruption of the fucose pathway as a consequence of genetic adaptation to propanediol as a Carbon source in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **126**, 1166-1172 (1976).
280. Sanderson, K.E. & Roth, J.R., Linkage Map of *Salmonella typhimurium*, Edition VIII. *Microbiological reviews*, **52**, 485-532 (1988).
281. St Martin, E.J. & Mortlock, R.P., Natural and altered induction of the L-Fucose catabolic enzymes in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.*, **127**, 91-97 (1976).
282. Obradors, N., Badia, J., *et al.*, Anaerobic Metabolism of the L-Rhamnose Fermentation Product 1,2-Propanediol in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2159-2162 (1988).
283. Al-Zarban, S., Heffernan, L., *et al.*, Positive control of the L-Rhamnose genetic system in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.*, **158**, 603-608 (1984).

284. Badia, J., Ros, J. & Aguilar, J. Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **161**, 435–437 (1985).
285. Elferink, S.J., Krooneman, J., *et al.*, Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 125–132 (2001).
286. Krooneman, J., Faber, F., *et al.*, *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int. J. Systematic Evol. Microbiol.*, **52**, 639–646 (2002).
287. Driehuis, F., Elferink, S.J., *et al.*, Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 583–594 (1999).
288. Nishino, N., Yoshida, M., *et al.*, Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 800–807 (2003).
289. Sundquist, J. A. University of California at Berkeley Ph.D. Thesis. (1987).
290. Altaras, N.E., Etsel, M.R., *et al.*, Conversion of Sugars to 1,2-Propanediol by *Thermoanaerobacterium*. *Biotechnol., Prog.*, **17**, 52–56 (2001).
291. Tran-Din, K. & Gottschalk, G., Formation of D(-)-1,2-propanediol and L(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation. *Arch. Microbiol.*, **142**, 87–92 (1985).
292. Pertierra, A.G. & Cooper, R.A., Pyruvate Formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J. Bacteriol.*, **129**, 1208–1214 (1977).
293. Booth, I.R., Glycerol and Methylglyoxal Metabolism. *Ecosal Plus*, **1**, 1–2 (2005).
294. Bouvet, O.M.M., Lenormand, P., *et al.*, Phenotypic diversity of anaerobic glycerol dissimilation shown by seven enterobacterial species. *Res. Microbiol.*, **145**, 129–139 (1994).
295. Bouvet, O.M.M., Lenormand, P., *et al.*, Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriaceae*. *Res. Microbiol.*, **146**, 279–290 (1995).
296. Quastel, J.H. & Stephenson, M., Further Observations on the Anaerobic Growth of Bacteria. *Biochem. J.*, **19**, 660–666 (1925).
297. Quastel, J.H., Stephenson, M., *et al.*, Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth. *Biochem. J.*, **14**, 304–316 (1925).
298. Dowd, M.K., Reilly, P.J., *et al.*, Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from corn. *Cereal Chem.*, **70**, 204–209 (1993).
299. Dowd, M.K., Johansen, S.L., *et al.*, Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 283–288 (1994).
300. Altaras, N.E. & Cameron, D.C. Metabolic engineering of a 1,2-Propanediol pathway in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1180–1185 (1999).
301. Altaras, N.E. & Cameron, D.C. Enhanced production of (R)-1,2-Propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 940–946 (2000).
302. Berríos-Rivera, S.J., San, K.Y., *et al.*, The effect of carbon sources and lactate dehydrogenase deletion on 1,2-propanediol production in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 34–40 (2003).

303. Clomburg, J.M. & Gonzalez, R., Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 867-879 (2011).
304. Lee, W. & Dasilva, N.A., Application of sequential integration for metabolic engineering of 1,2-propanediol production in yeast. *Metab. Eng.*, **8**, 58–65 (2006).
305. Jung, J.Y., Yun, H.S., *et al.*, Production of 1,2-Propanediol from Glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 846–853 (2011).
306. Jung, J.Y., Choi, E.S., *et al.*, Enhanced Production of 1,2-Propanediol by *tpil* deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1797–1802 (2008).
307. Niimi, S., Suzuki, N., *et al.*, Metabolic engineering of 1,2-propanediol pathways in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1721–1729 (2011).
308. Siebert, D. & Wendisch, V.F., Metabolic pathway engineering for production of 1,2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 91 (2015).
309. Li, H. & Liao, J. C., Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to 1,2-propanediol. *Microb. Cell Fact.*, **12**, 4 (2013).
310. Sanchez-Riera, F., Cameron, D.C., *et al.*, Influence of environmental factors in the production of R(-)1,2-propanediol by *Clostridium Thermosaccharolyticum*. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 449–454 (1987).
311. Altaras, N.E. & Cameron, D.C. Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1180–1185 (1999).
312. Zeng, A.P. & Sabra, W., Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 749–757 (2011).
313. Aguilera, J. & Prieto, J.A. The *Saccharomyces cerevisiae* aldose reductase is implied in the metabolism of methylglyoxal in response to stress conditions. *Curr. Genet.*, **39**, 273–283 (2001).
314. Chen, C.N., Porubleva, L., *et al.*, Associating protein activities with their genes: Rapid identification of a gene encoding a methylglyoxal reductase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **20**, 545–554 (2003).
315. Baldoma, L. & Aguilars, J., Involvement of Lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13991-19996 (1987).
316. Chang, Q., Harter, T., *et al.*, Aldo-Keto Reductases in the Stress Response of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Diversity of Yeast Aldo-Keto Reductases, In Aldo-Keto Reductases and Toxicant Metabolism; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, (2003).
317. Garay-Arroyo, A. & Covarrubias, A.A., Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 879–892 (1999).
318. Saccharomyces Genome Database. Available at: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005511> (Accessed: September 2017).
319. Rodriguez, S., Kayser, M.M., *et al.*, Highly stereoselective reagents for  $\beta$ -keto ester reductions by genetic engineering of Baker's yeast. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8, (2001).
320. Rodriguez, S., Baker's Yeast B-Keto Ester Reductions: Whole Cell Biocatalists with improved stereoselectivity by recombinant DNA techniques. Ph.D. Thesis University of Florida (2000).
321. Kaluzna, I.A., Matsuda, T., *et al.*, Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12827-12832 (2004).

322. Murata, K., Fukuda, Y., *et al.*, Phenotypic character of the Methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression in *Escherichia coli* and application to breeding Wild-Type Yeast Strains. *Appl. Environmental Microbiol.*, **50**, 1200–1207 (1985).
323. Murata, K., Inoue, Y., *et al.*, Metabolism of  $\alpha$ -Ketoaldehydes in Yeast: Inducible Formation of Methylglyoxal Reductase and Its Relation to Growth Arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.*, **64**, 1–4 (1986).
324. Jayakody, L.N., Horie, K., *et al.*, Engineering redox cofactor utilization for detoxification of glycolaldehyde, a key inhibitor of bioethanol production, in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 6589–6600 (2013).
325. Guo, P., Bao, Z., *et al.*, Structural insights into the cofactor-assisted substrate recognition of yeast methylglyoxal/isovaleraldehyde reductase Gre2. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1844**, 1486–1492 (2014).
326. Ellis, E. M. Microbial aldo-keto reductases. *FEMS Microbiol. Lett.*, **216**, 123–131 (2002).
327. Nakamura, K., Kondo, S., *et al.*, Amino Acid Sequence and Characterization of Aldo-keto Reductase from Bakers' Yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2, 375–377, (1997).
328. Ford, G. & Ellis, E.M., Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast*, **19**, 1087–1096 (2002).
329. Traff, K.L., Jonsson, L.J., *et al.*, Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **19**, 1233–1241 (2002).
330. Rodríguez, S., Schroeder, K.T., *et al.*, Asymmetric synthesis of  $\beta$ -hydroxy esters and  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy esters by recombinant *Escherichia coli* expressing enzymes from baker's yeast. *J. Org. Chem.*, **65**, 2586–2587 (2000).
331. Klein, M., Swinnen, S., *et al.*, Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ. Microbiol.*, **19**, 878–893. (2017).
332. Protein Data Bank. Available at: <https://www.rcsb.org/> (Accessed: Octubre 2017).
333. AKR Superfamily. *School of Medicine, University of Pennsylvania* Available at: <https://www.med.upenn.edu/akr/>. (Accessed: 21st September 2017).
334. Cooper, R.A. & Anderson, A., The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **11**, 273–276 (1970).
335. Cooper, R.A. Metabolism of Methylglyoxal in Microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 49–68 (1984).
336. Hopper, B.D J. & Cooper, R.A., The purification and properties of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase. *Biochem. J.*, **104**, 321–329 (1972).
337. Töttemeyer, S., Booth, N.A., *et al.*, From famine to feast: The role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 553–562 (1998).
338. Kalapos, M.P., Methylglyoxal in living organisms chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.*, **110**, 145–175 (1999).
339. Egyud, G. & Szent-Gyorgyi, A., On the regulation of cell division. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **56**, 203–207 (1966).
340. Rahman, A. & Hadi, S.M. Formation of strand breaks and interstrand cross-links in DNA by methylglyoxal. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **5**, 161–166 (1990).
341. Saadat, D. & Harrison, D.H.T., The crystal structure of methylglyoxal synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, **7**, 309–317 (1999).
342. Shin, S., Song, S., *et al.*, Accepted article. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2017).
343. Summers, M.C. & Rose, I.A., Proton Transfer reactions of methylglyoxal synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4475–4478 (1977).

344. Atabakhshi-kashi, M., Mohammadi, M., *et al.*, An alternative allosteric pathway in thermophilic methylglyoxal synthase. *Int. J. Biol. Macromol.*, **93**, 526–533 (2016).
345. Yuan, P. M., The conversion of dihydroxyacetone phosphate inorganic phosphate by methylglyoxal to methylglyoxal synthase. *Arch. Biochim. Biophys.*, **183**, 1-6 (1977).
346. Saadat, D. & Harrison, D.H.T., Identification of Catalytic Bases in the Active Site of *Escherichia coli* Methylglyoxal Synthase: Cloning , Expression, and Functional Characterization of Conserved Aspartic Acid Residues. *Biochem.*, **37**, 10074-10086 (1998).
347. Inhibitor, C., Saadat, D., et al., Mirroring Perfection: The structure of methylglyoxal synthase complexed with the competitive Inhibitor 2-Phosphoglycolate. *Biochem.*, **39**, 2950–2960 (2000).
348. Marks, G.T., Harris, T.K., et al., Mechanistic implications of methylglyoxal synthase complexed with phosphoglycolohydroxamic acid as observed by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Biochem.*, **40**, 6805–6818 (2001).
349. Pyo, S., Persson, P., *et al.*, Solvent-free lipase-mediated synthesis of six-membered cyclic carbonates from trimethylolpropane and dialkyl carbonates. *Green Chem.*, **13**, 976–982 (2011).
350. Lu, X., Liang, B., *et al.*, Asymmetric Catalysis with CO<sub>2</sub> : direct synthesis of optically active propylene carbonate from racemic epoxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3732–3733 (2004).
351. Clements, J. H., Reactive Applications of Cyclic Alkylene Carbonates. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42**, 663-674 (2003).
352. Tsai, A. C. *et al.* Prevention of SIV Infection in Macaques by (R)-9-(2-Phosphonyl methoxypropyl) adenine. *Science*, **270**, 1197–1199 (2017).
353. Bischofberger, N.W., PMPA Preparation, USPTO, 5,733,788 (1998).
354. Schultze, L.M., Chapman, H.H., *et al.*, Practical Synthesis of the anti-HIV Drug, PMPA. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1853–1856 (1998).
355. Holý, A. & Rosenberg, I., Preparation of 5'-o-Phosphonylmethyl analogues of nucleoside-5'-phosphates, S'-diphosphates and 5'-triphosphates. *Collect Czech. Chem. Commun.*, **47**, 3447–3463 (1982).
356. Information, N.U.S.N.L. of M.N.C. for B. Pub Chem - Open Chemistry Database (2017). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Accessed: September 2017).
357. Corey, E.J. & Venkateswarlu, A. Protection of hydroxyl groups as tert-butyl dimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1490**, 6190–6191 (1972).
358. Stork, G. & Takahasi, T., Chiral synthesis of prostaglandins (PGE<sub>1</sub>) from D-Glyceraldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, **10**, 1275–1276 (1939).
359. Sabitha, G., Senkara, A., *et al.*, Stereoselective synthesis of (À)-synparvolide B. *Tetrahedron: Asymmetry*, **22**, 866–871 (2011).
360. Srihari, P., Bhasker, E.V., *et al.*, Stereoselective total synthesis of synparvolide B and epi-synparvolide A. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 2420–2424 (2009).
361. Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., *et al.*, Targeting the endocannabinoid system : future therapeutic strategies. *Drug Discov. Today*, **0**, 1–6 (2016).
362. Pu, Y., Christesen, A., *et al.*, Process for preparing cannabinoid receptor ligands, USPTO, 12/969.047, (2011).
363. Brabander, J. De & Vandewalle, M. Bryostatins: The asymmetric synthesis of the C1-C9 and C17-C27 fragments. *Synthesis (Stuttg.)*, **8**, 855–865 (1994).

364. Pettit, G., Day, J. F., Hartwell, J. L. & Wood, H. B. Antineoplastic components of marine animals. *Nature*, **227**, 962 (1970).
365. Tyagi, S. *et al.* Preparation of an N-sec-alkyl 2,6-disubstituted aniline: a key intermediate in the divergent synthesis of S-Metolachlor metabolites. *Tetrahedron Lett.*, **57**, 5363–5367 (2016).
366. Eckermann, C., Matthes B., *et al.*, Covalent binding of chloroacetamide herbicides to the active site cysteine of plant type III polyketide synthases. *Phytochemistry*, **64**, 1045–1054 (2003).
367. Wang, Z., Shi, X., *et al.*, Discovery of cycloalkyl-fused N-thiazol-2-yl-benzamides as tissue non-specific glucokinase activators: Design, synthesis, and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **139**, 128–152 (2017).
368. Ko, J., Kim, I., *et al.*, Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **187**, 5782–5789 (2005).
369. Rodríguez, P., Barton M., *et al.*, Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root? *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **49**, 8–11 (2007).
370. Rodríguez, P., Reyes, B., *et al.*, Stereoselective biotransformation of  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters by endophytic bacteria and yeast. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **71**, 90–94 (2011).
371. Mat-jan, F., Alam, K.Y. & Clark, D.P. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, **171**, 342–348 (1989).
372. Kang, Y., Son, M.S., *et al.*, One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein Expr. Purif.*, **55**, 325–333 (2007).
373. Chung, C.T., Niemela, S.L., *et al.*, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA - Biochem.*, **86**, 2172–2175 (1989).
374. Zhu, H. & Dean, R.A., A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherichia coli*- application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 910–911 (1999).
375. Panizza, P.,  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiésteres quirales: ampliando el repertorio de biocatalizadores hacia las síntesis enantiodivergentes. Tesis de Maestría Universidad de la República (2005).
376. Panizza, P., Onetto, S., *et al.*, A recombinant *Escherichia coli* expressing an  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -ketoester reductase with unusual stereoselectivity. *Biocatal. Biotransformation.*, **25**, 414–417 (2007).
377. Jantama, K., Zhang, X., *et al.*, Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli*. *C. Biotechnol. Bioeng.*, **101**, 881–893 (2008).
378. Sawers, G., Heßlinger, C., *et al.*, The glycyl radical enzyme TdcE can replace pyruvate formate-lyase in glucose fermentation. *J. Bacteriol.*, **180**, 3509–3516 (1998).
379. Hesslinger, C. & Fairhurst, S.A. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol. Microbiol.*, **27**, 477–492 (1998).
380. Grabar, T. B., Zhou, S., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P. & Ingram, L. O., Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1527–1535 (2006).

381. White, D., Drummond, J.T., *et al.*, 'The physiology and biochemistry of prokaryotes.' (Oxford University Press, Inc., 2012).
382. SAS. JMP- Statistical Discovery. (2017).
383. National Institute of Standards and Technology - US Department of Commerce. NIST-webbook de Química. Available at:  
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57556&Mask=200#Mass-Spec>.  
(Accessed: 21st October 2017).
384. Yadav, J. S., Nanda, S., *et al.*, Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. *J. Org. Chem.*, **67**, 3900–3903 (2002).
385. Ravía, S., Gaménara D., *et al.*, Enantioselective reduction by crude plant parts: reduction of benzofuran-2-yl methyl ketone with carrot (*Daucus carota*) bits. *J. Chem. Educ.*, **83**, 1049 (2006).
386. Aldabalde, V., Arcia, P., *et al.*, Enzymatic synthesis of chiral heteroaryl alcohols using plant fragments as the only biocatalyst and reducing agent. *Green Chem. Lett. Rev.*, **1**, 25–30 (2007).
387. Grochowski, L.L., Xu, H., *et al.*, Identification of lactaldehyde dehydrogenase in *Methanocaldococcus jannaschii* and its involvement in production of lactate for F<sub>420</sub> biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **188**, 2836–2844 (2006).
388. Novagen. pETDUET-1. Available at:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/71146?lang=en&region=UY>.  
(Accessed: 24th July 2017)
389. Novagen. pACYCDuet<sup>TM</sup>-1. Available at:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/71147?lang=en&regionUY>.  
(Accessed: 24<sup>th</sup> July 2017)
390. Thermo Fischer Scientific, T. PCR Cloning Vectors - pTZ57R/T. Available at:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1213>. (Accessed: 24th July 2017).
391. Invitrogen. TOPO<sup>TM</sup> TA Cloning<sup>TM</sup> Kit, with pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO<sup>TM</sup>, One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli, and PureLink<sup>TM</sup> Quick Plasmid Miniprep Kit. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K450002>. (Accessed: 24<sup>th</sup> July 2017).
392. Promega. pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems. Available at:  
<https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>. (Accessed: 24<sup>th</sup> July 2017).
393. Malke, H. J., Sambrock, E.F., *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition), Volumes 1, 2 and 3. 1625 S., zahlreiche Abb. und Tab. Cold Spring Harbor 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN: 0-87969-309-6. *J. Basic Microbiol.*, **30**, 623–623 (1990).
394. Armarego, W.L. & Perrin, D., Purification of Laboratory Chemicals. *Molecules*, **2**, 152 (1997).
395. Grochowski, L.L., Xu, H., *et al.*, Identification of lactaldehyde dehydrogenase in *Methanocaldococcus jannaschii* and its involvement in production of lactate for F<sub>420</sub> biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **188**, 2836–2844 (2006).

**Anexo I**  
***Curvas de calibración***

Página intencionalmente dejada en blanco

A partir de estándares comerciales de los diferentes productos se preparan soluciones de concentración conocidas. Se correlacionan las concentraciones en g/L de las diferentes soluciones y el área obtenida en los diferentes cromatogramas en HPLC en las condiciones de ensayo utilizadas en el seguimiento de biotransformaciones.

### 1,2-propanodiol (2)

$$C \text{ (g/L)}_{1,2\text{-propanodiol (2)}} = 4E-06 \times (\text{Área HPLC}) - 0,031$$

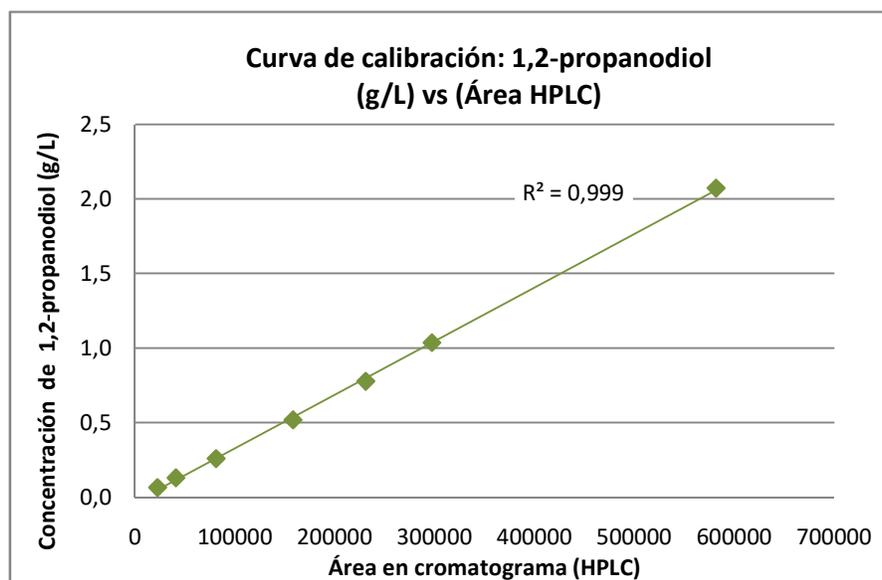


Figura A1.1: Curva de calibración de 1,2-propanodiol (2) para cuantificación en HPLC.

### Glicerol (1)

$$C (\text{g/L})_{\text{glicerol (1)}} = 3\text{E-}06 \times (\text{Área HPLC}) + 0,010$$

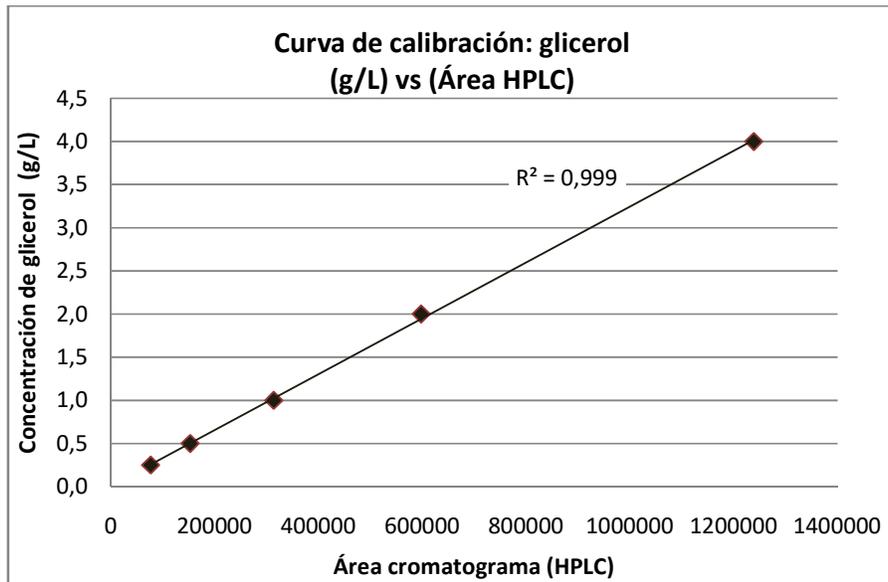


Figura AI.2: Curva de calibración de glicerol (1) para cuantificación en HPLC.

### Glucosa (6)

$$C (\text{g/L})_{\text{glucosa (6)}} = 5\text{E-}06 \times (\text{Área HPLC}) + 0,165$$

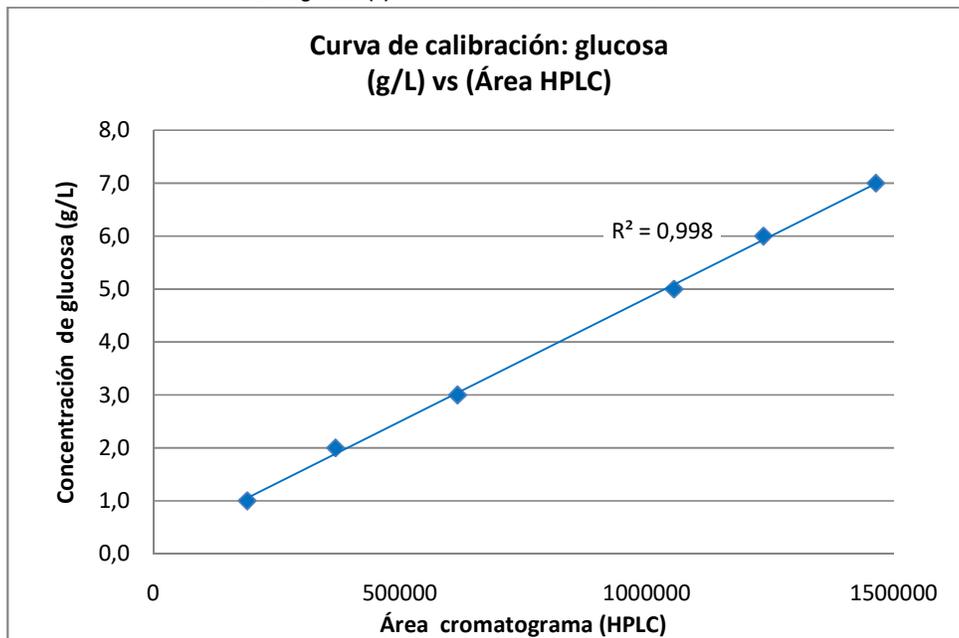


Figura AI.3: Curva de calibración de glucosa (6) para cuantificación en HPLC.

### Metilglioxal (3)

$$C \text{ (g/L)}_{\text{metilglioxal (3)}} = 5\text{E-}06 \times (\text{Área HPLC}) - 0,020$$

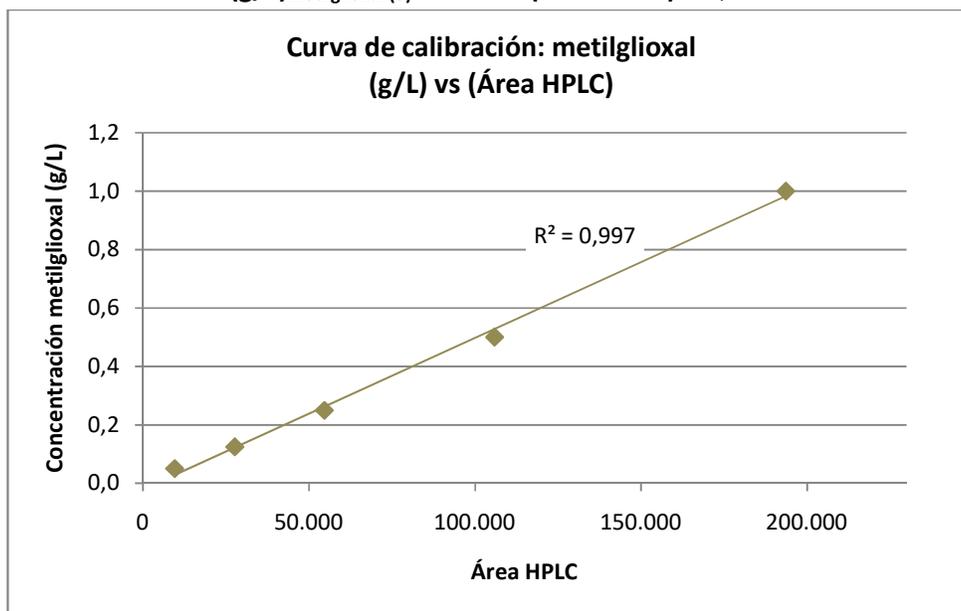


Figura AI.4: Curva de calibración de metilglioxal (3) para cuantificación en HPLC.

### Ácido Láctico (11)

$$C \text{ (g/L)}_{\text{ácido láctico (11)}} = 7\text{E-}06 \times (\text{Área HPLC}) - 0,039$$

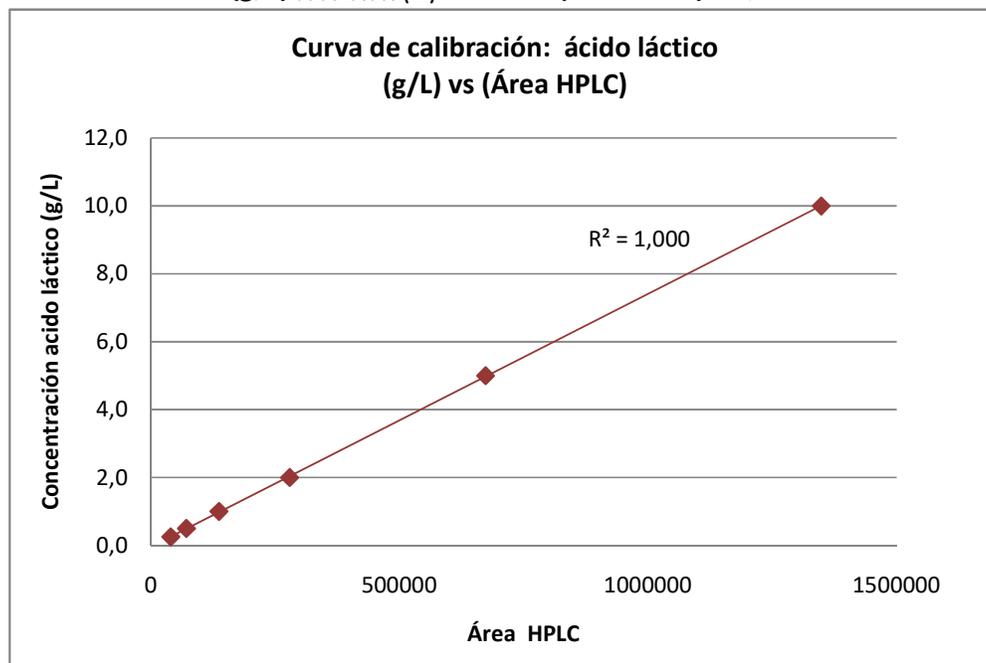


Figura AI.5: Curva de calibración de ácido láctico (11) para cuantificación en HPLC.

### Ácido Fórmico (13)

$$C \text{ (g/L)}_{\text{ácido fórmico (13)}} = 1\text{E-}05 \times (\text{Área HPLC}) - 0,064$$

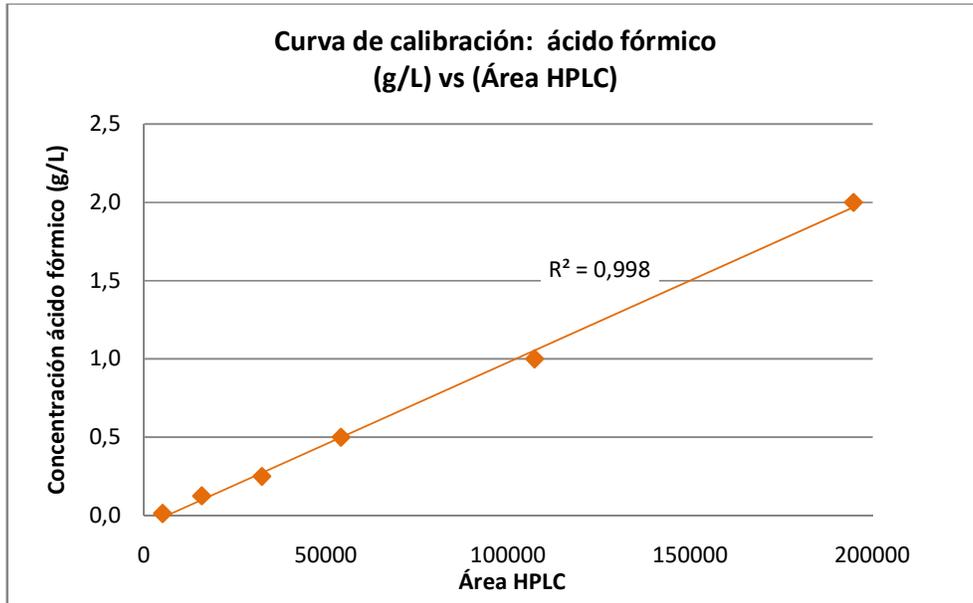


Figura AI.6: Curva de calibración de ácido fórmico (13) para cuantificación en HPLC.

### Acetato (10)

$$C \text{ (g/L)}_{\text{acetato (10)}} = 2\text{E-}05 \times (\text{Área HPLC}) + 0,089$$

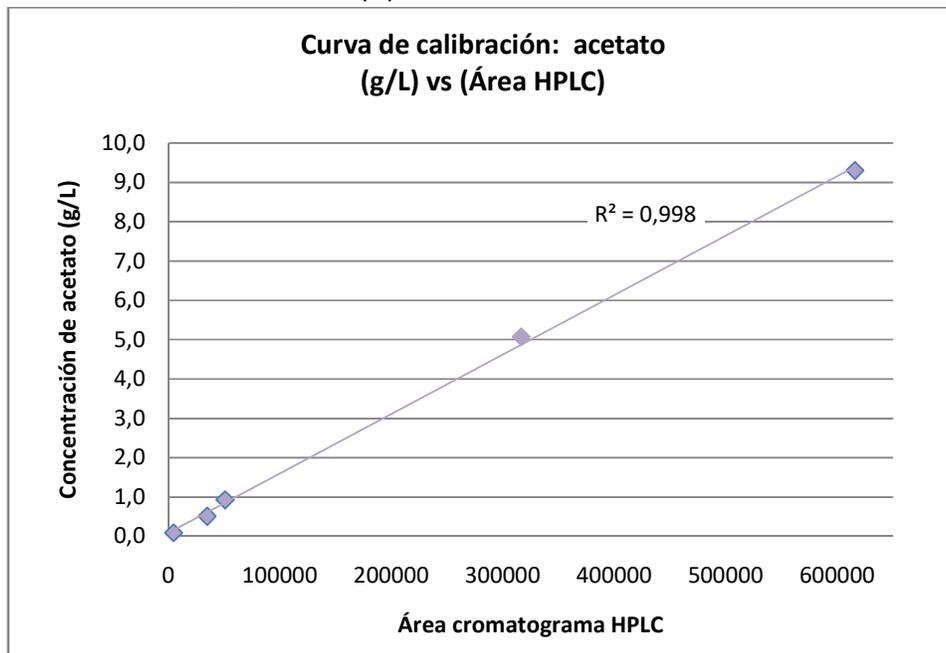


Figura AI.7: Curva de calibración de acetato (10) para cuantificación en HPLC.

## Etanol (12)

$$C \text{ (g/L)}_{\text{etanol (12)}} = 9\text{E-}06 \times (\text{Área HPLC}) + 0,204$$

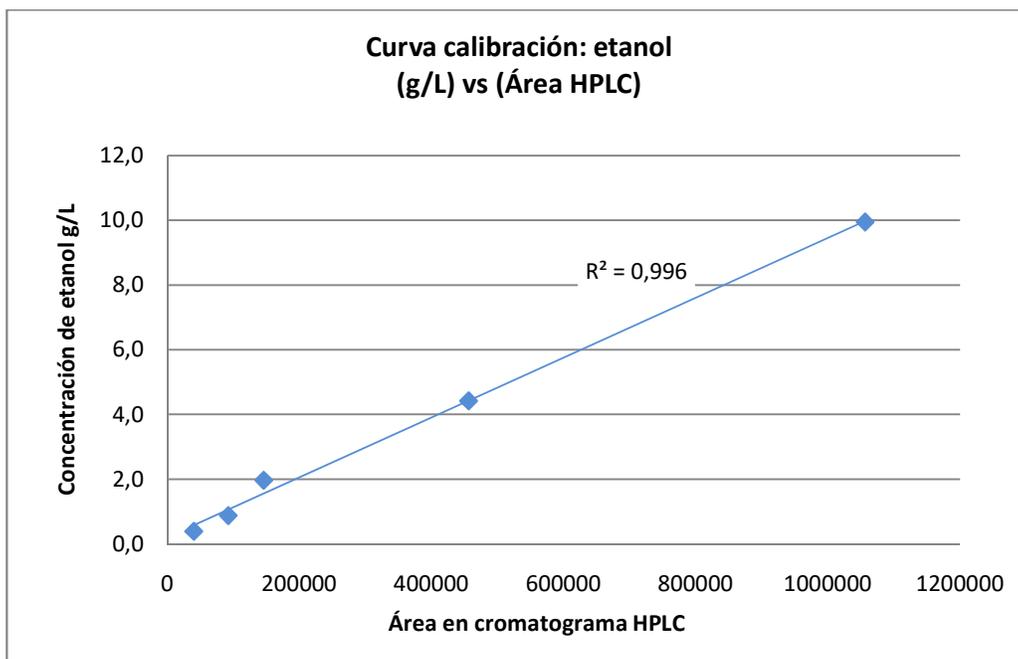


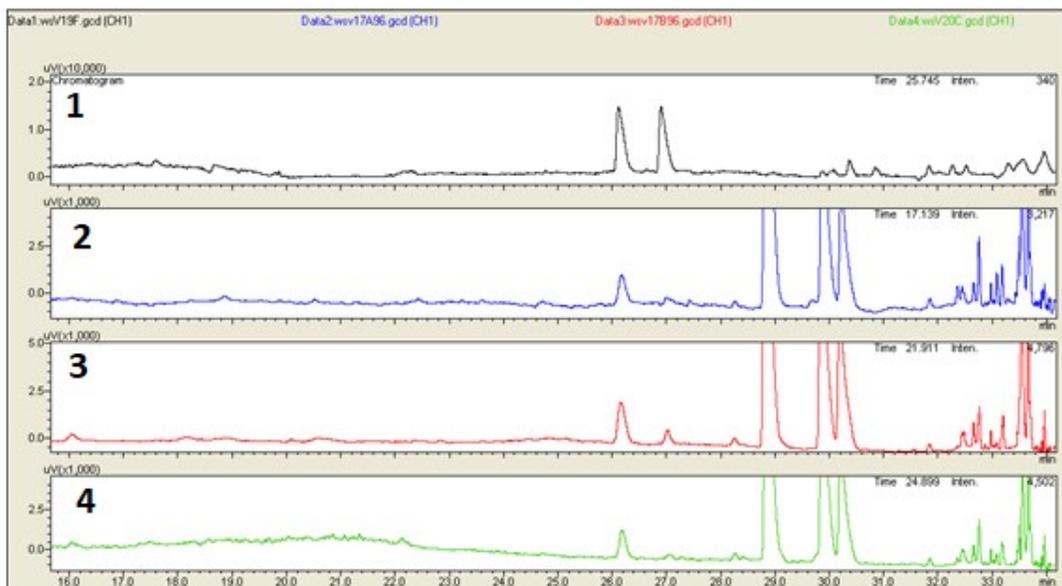
Figura AI.8: Curva de calibración de etanol (12) para cuantificación en HPLC.

Página intencionalmente dejada en blanco

## **Anexo II**

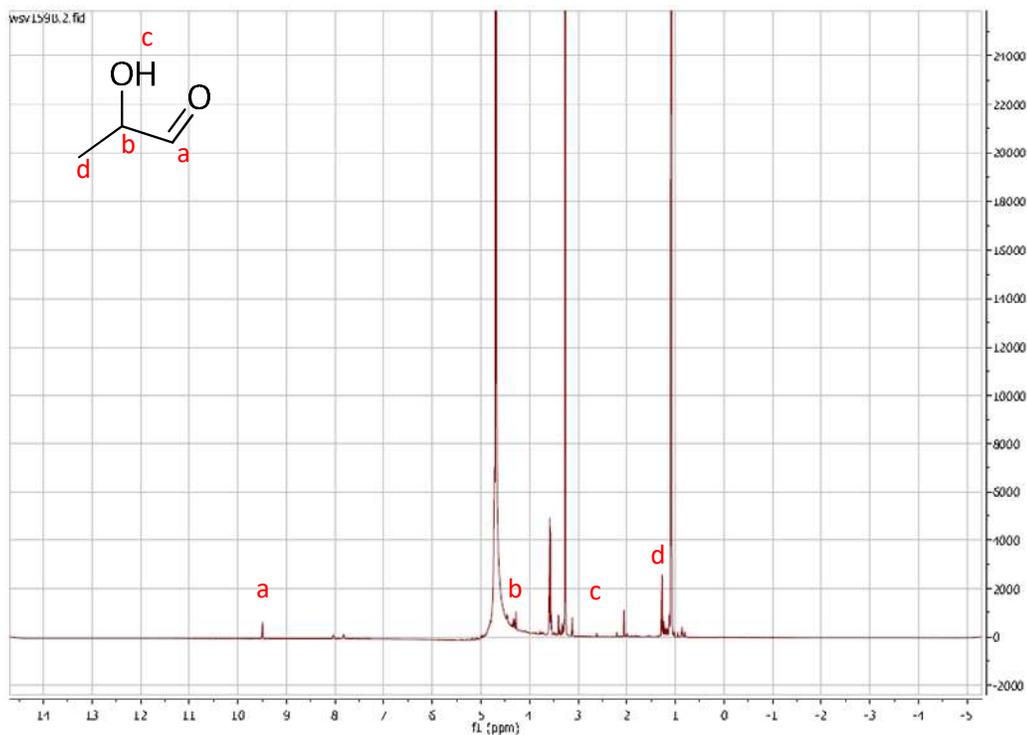
***Lactaldehído (4) como intermediario de  
biotransformaciones de  
metilglioxal (3)/glicerol (1)/glucosa (6)***

Página intencionalmente dejada en blanco



- 1: Estándar de lactaldehído (4) (síntesis química).  
 2: Biotransformación de metilglioxal (3)/glicerol (1) /glucosa (6) con E. coli FMJ39-T7pol-Gm-FRT.  
 3: Biotransformación de metilglioxal (3)/glicerol (1) /glucosa (6) con E. coli FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS3).  
 4: Biotransformación de metilglioxal (3)/glicerol (1) /glucosa (6) con E. coli FMJ39-T7pol-Gm-FRT(pWS4).

**Figura AII.1: CG-Quiral de lactaldehído (4) estándar y muestras de biotransformación de metilglioxal (3)/glicerol (1)/glucosa (6).**



**Figura AII.2: RMN <sup>1</sup>H de lactaldehído (4).**

Página intencionalmente dejada en blanco

## **Anexo III**

### ***RMN - Síntesis enzimática de (R)-propilencarbonato (7a)***

Página intencionalmente dejada en blanco

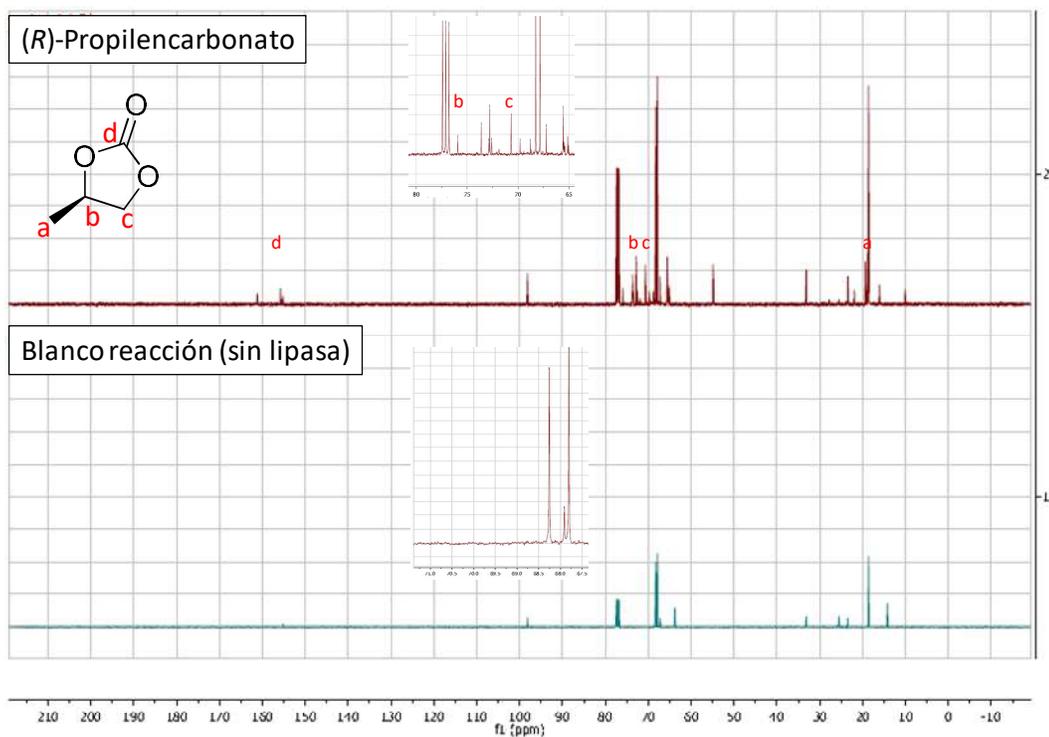


Figura AIII.1: RNM  $^{13}\text{C}$  de producto de reacción y blanco (sin lipasa).

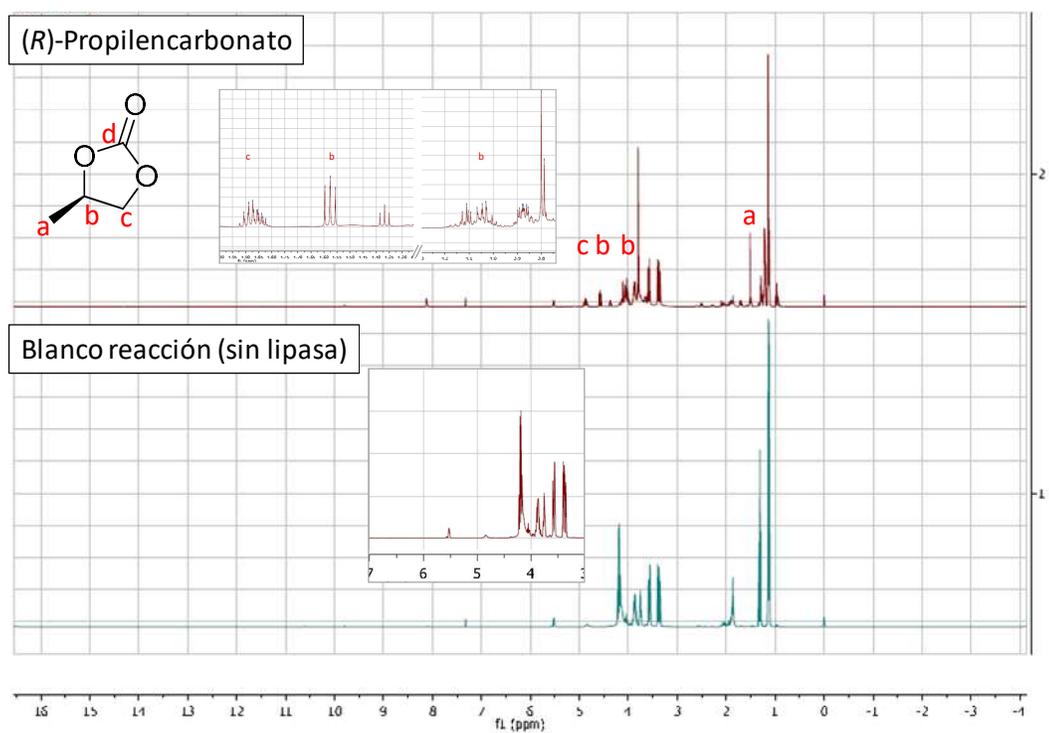


Figura AIII.2: RNM  $^1\text{H}$  de producto de reacción y blanco (sin lipasa).

Página intencionalmente dejada en blanco

## **Anexo IV**

### ***Estimación de incertidumbre en las determinaciones cuantitativas en HPLC***

Página intencionalmente dejada en blanco

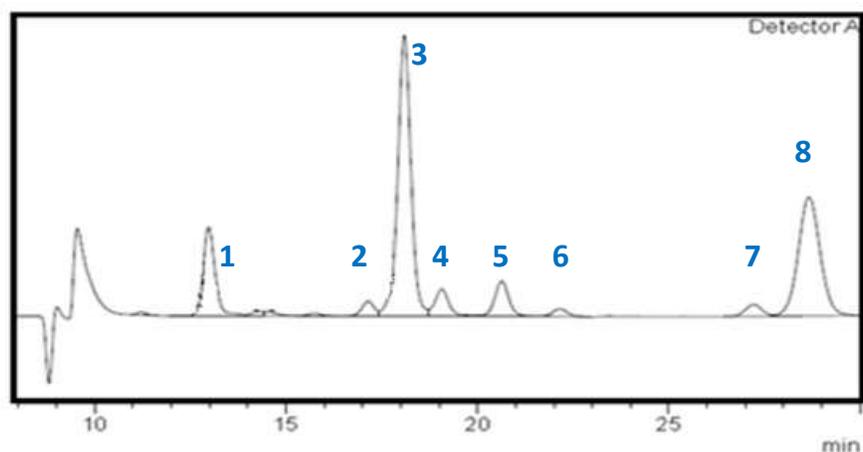
## Estimación de incertidumbre en las determinaciones cuantitativas

### Estimación de incertidumbres en repeticiones

Una misma muestra se inyecta 16 veces en HPLC en las mismas condiciones en el transcurso de un mismo día por parte de un mismo operador. Se integra y se asignan 8 de los 13 picos integrados en base a determinaciones previas.

Para 6 de esos 8 productos se dispone de curvas de calibración con las que se calcula la concentración (expresada en g/L). En los casos en que no se cuenta con curva de calibración a efectos de una adecuada representación se divide el valor por un factor que permita alcanzar el mismo orden que el resto de los productos (1 E+6).

Se calcula para cada producto la media, el valor máximo, el valor mínimo, la desviación estándar así como la relación existente entre la desviación estándar y el valor medio de las medidas obtenidas para cada producto (en g/L o en área dependiendo de los productos).



1: glucosa                      3: glicerol                      5: acetato                      7: etanol  
 2: lactaldehído              4: formiato                      6: 1,2-propanodiol              8: MOPS

Figura AIV.1: Cromatograma en HPLC típico en fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabla AIV.1: Concentración obtenida para cada reactivo y producto de reacción en cada repetición de medida, Valores máximo, mínimo, media y desviación estándar.

tr (min)	Concentración de Producto (g/L) *							
	Glucosa	Lactaldehído	Glicerol	Formiato	Acetato	1,2-Propanodiol	Etanol	MOPS
	12,979	17,144	18,096	19,071	20,636	22,155	27,212	28,656
Repetición 1	2,30	0,74	4,45	1,48	4,15	0,18	0,92	1,05
Repetición 2	2,36	0,75	4,57	1,52	4,26	0,18	0,93	1,08
Repetición 3	2,08	0,66	3,99	1,31	3,71	0,15	0,84	0,94
Repetición 4	2,29	0,74	4,44	1,49	4,14	0,18	0,91	1,04
Repetición 5	2,55	0,83	4,95	1,65	4,59	0,19	1,01	1,20
Repetición 6	2,26	0,73	4,37	1,48	4,10	0,17	0,92	1,05
Repetición 7	2,25	0,72	4,35	1,46	4,06	0,17	0,89	1,02
Repetición 8	2,25	0,76	4,33	1,34	3,68	0,15	0,89	1,04
Repetición 9	2,09	0,67	4,00	1,38	3,93	0,19	0,86	0,96
Repetición 10	2,21	0,71	4,25	1,43	4,02	0,17	0,88	1,02
Repetición 11	2,02	0,64	3,85	1,29	3,65	0,15	0,82	0,93
Repetición 12	1,94	0,62	3,69	1,23	3,50	0,14	0,78	0,89
Repetición 13	2,22	0,72	4,28	1,44	4,03	0,17	0,86	1,03
Repetición 14	1,93	0,61	3,67	1,22	3,46	0,14	0,76	0,88
Repetición 15	2,04	0,65	3,89	1,31	3,68	0,15	0,79	0,93
Repetición 16	1,82	0,58	3,45	1,18	3,39	0,16	0,69	0,81
Máx	2,55	0,83	4,95	1,65	4,59	0,19	1,01	1,20
mín	1,82	0,58	3,45	1,18	3,39	0,14	0,69	0,81
media	2,16	0,70	4,16	1,39	3,90	0,16	0,86	0,99
Desv est.	0,19	0,07	0,39	0,13	0,33	0,02	0,08	0,09
(Incertidumbre / Media)*100	2,2	2,4	2,3	2,3	2,1	2,5	2,2	2,4

\*En el caso del producto lactaldehído (4) y el buffer MOPS (15) se representa Área \* 1E-6.

A continuación se representa la Concentración media y rango calculado según: (Concentración máxima – Concentración mínima) y por otro lado Concentración media y rango calculado según: (Media + 3\*Desviación Estándar, Media – 3\*Desviación Estándar).

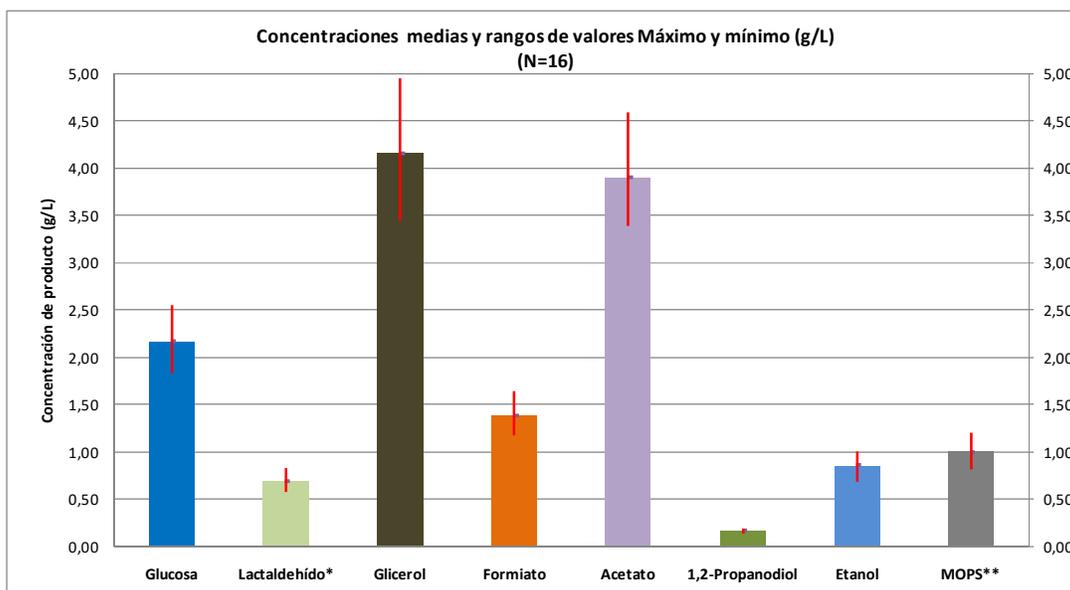


Figura AIV.2: Concentraciones medias y rangos valor máximo, valor mínimo (g/L) para sustratos y productos en repeticiones.

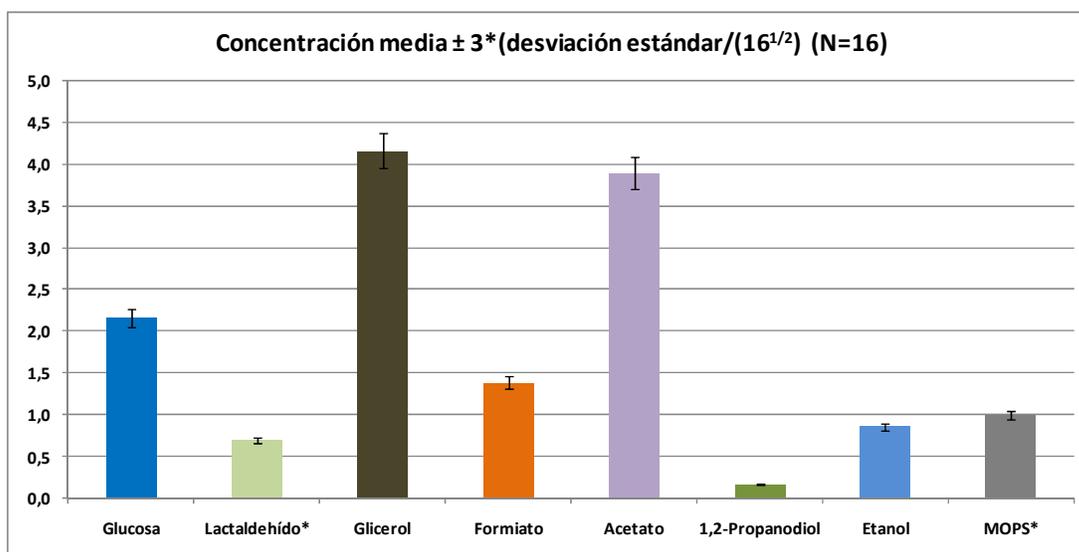


Figura AIV.3: Concentraciones medias (g/L) y rangos  $\pm 3 \times$  Desviación Estándar/ $16^{1/2}$  para sustratos y productos en repeticiones.

\*Para lactaldehído (4) y MOPS (15) se representa Área  $\times 1 \text{ E-6}$ .

En las representaciones de biotransformaciones salvo que se indique otra condición se representa como barra de error el 5 % del valor medio. Este valor según surge de la Tabla AIV.1 cubre es la cota máxima de las incertidumbres obtenidas a partir de la estimación de la desviación estándar con 16 repeticiones.

## Estimación de incertidumbres en réplicas

A partir de datos de concentración de 1,2-propanodiol (2) obtenidos de 3 ensayos diferentes y realizados espaciados en el tiempo (por triplicado) con muestreos a las 24 hs y 48 hs se obtiene un conjunto de datos sobre el que se realiza el análisis de incertidumbre asociada a las réplicas.

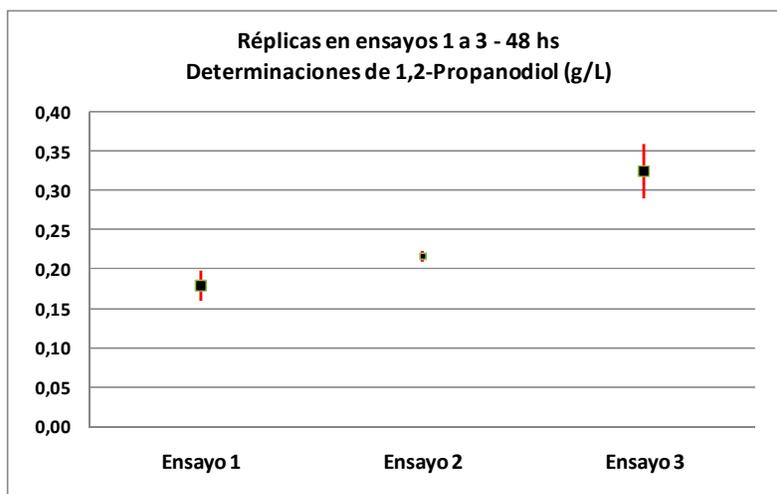
**Tabla AIV.2: Desviación estándar en triplicados de réplicas–Muestras a 24 hs y 48 hs.**

Tiempo de muestreo 24 horas			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<b>Media + Desv. Est.</b>	0,106	0,096	0,100
<b>Media - Desv. Est.</b>	0,079	0,081	0,093
<b>Media</b>	0,092	0,088	0,096
<b>Desv. Est.</b>	0,014	0,007	0,004

Tiempo de muestreo 48 horas			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<b>Media + Desv. Est.</b>	0,197	0,223	0,358
<b>Media - Desv. Est.</b>	0,159	0,209	0,290
<b>Media</b>	0,178	0,216	0,324
<b>Desv. Est.</b>	0,019	0,007	0,034

Se representa la media obtenida en las determinaciones y el rango calculado según 2 veces la desviación estándar (tomada como aproximación del error aleatorio) en cada ensayo para cada tiempo de evaluación.



**Figura AIV.4: Determinación de 1,2-propanodiol (2). Estimación de incertidumbres en réplicas en 3 ensayos diferentes realizados por triplicado, 24 y 48 hs, media  $\pm$  2\*desviación estándar.**

En caso de desear representarse resultados de réplicas se representan con una barra de error estimada a partir del 10 % del valor medio.

*...pero hoy lo haría.*

Líber Falco

(1906-1955)