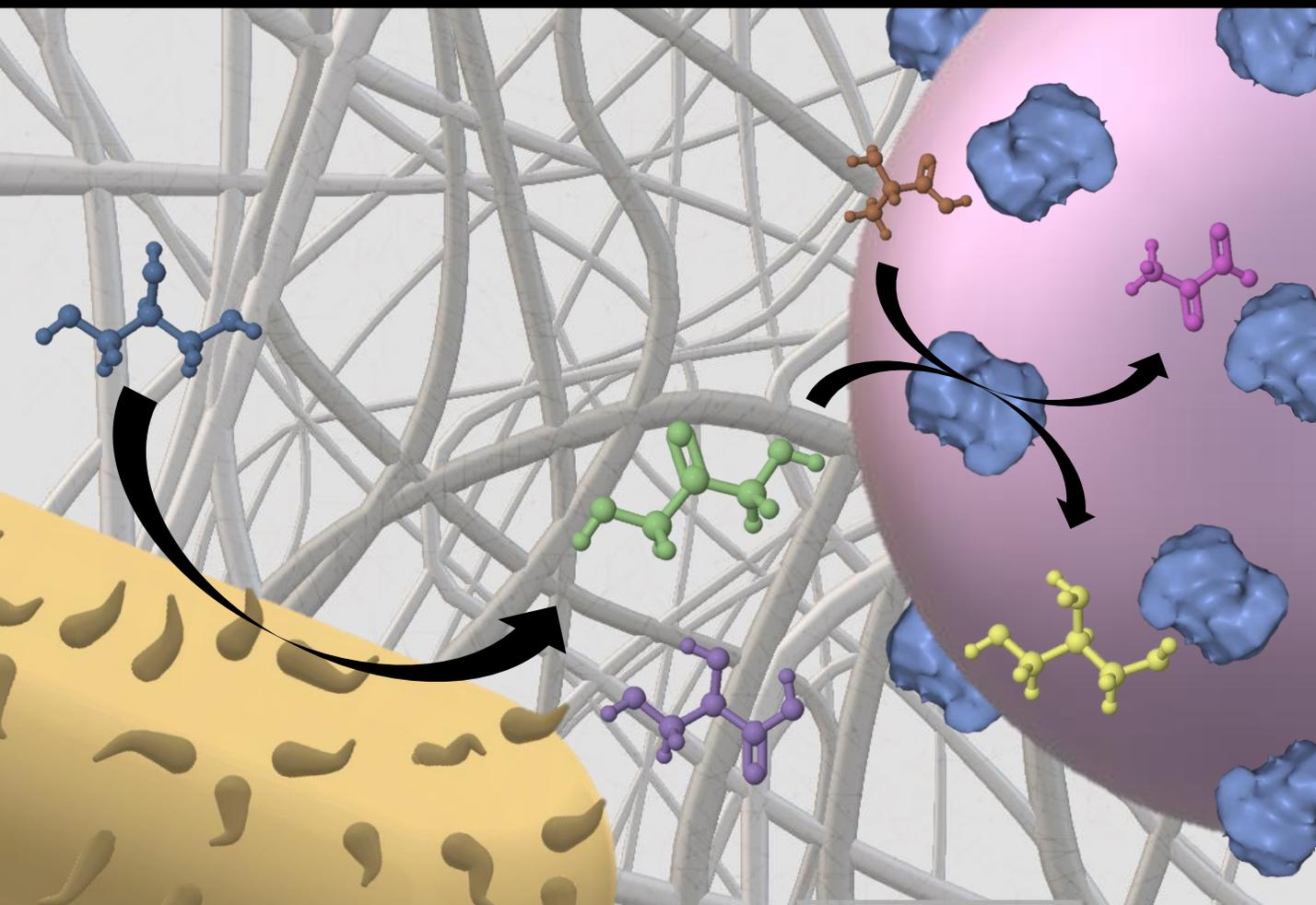


Biotransformaciones de glicerol por cepas inmovilizadas de *Gluconobacter*



Ing. Biotec. Magdalena Ripoll

Tutora: Dra. Lorena Betancor

Tutor académico: Dr. David González

Tesis de Maestría realizada en el marco del programa de Posgrado en
Química de Facultad de Química (UdelAR) y PEDECIBA Química

2017 - 2020

Biotransformaciones de glicerol por cepas inmovilizadas de *Gluconobacter*

Ing. Biotec. Magdalena Ripoll

Tesis de Maestría realizada en el marco del programa de Posgrado en Química de Facultad de
Química (UdelaR) y PEDECIBA Química

Tutora: Dra. Lorena Betancor

(Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay)

Tutor académico: Dr. David González

(Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Facultad de Química, Universidad de la República)

2017 - 2020

Resumen

Las biotransformaciones se realizan bajo condiciones suaves con menores requerimientos energéticos, ofreciendo tecnologías medioambientalmente limpias con respecto a las reacciones de síntesis química convencional. Pueden ser llevadas a cabo tanto por enzimas como por células enteras. Además, las biotransformaciones se benefician por el uso de múltiples biocatalizadores trabajando de manera concertada para desarrollar nuevos productos o procesos. Cuando las biotransformaciones se realizan con biocatalizadores inmovilizados a menudo se obtienen ventajas operacionales tales como, fácil separación y reuso, reducción de costos y aumento de la estabilidad y productividad del proceso.

El glicerol es un subproducto inevitable de la producción de biodiesel. Una gran cantidad de este producto crudo, a menudo contaminado con metanol y grasas, es generado durante la transesterificación de grasas y aceites con alcohol. El exceso de oferta y la limitada demanda de este producto afectan directamente los costos de producción del biodiesel. Sin embargo, el glicerol puede ser convertido a productos de más alto valor agregado mediante procesos puramente químicos o mediante biotransformaciones.

En este trabajo se propone estudiar estrategias de conversión biológica de glicerol crudo excedente de la industria del biodiesel a dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA). Nuestra hipótesis de estudio se basará en que el uso de cepas de *Gluconobacter* inmovilizadas puede aportar ventajas operacionales en dichas conversiones y además permitiría el acoplamiento a biocatalizadores enzimáticos inmovilizados para la generación de otros productos de interés biotecnológico. Se propone entonces estudiar la implementación de una cascada biosintética que acople la producción de DHA por parte de *Gluconobacter* inmovilizado, con un paso de aminación reductiva de la misma para obtener serinol, junto con su co-producto piruvato con gasto de L-alanina.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi Directora de Tesis, la Dra. Lorena Betancor, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por confiar en mí y haberme guiado a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Erienne Jackson, que me acompañó durante todo este proceso y que junto con la Dra. Betancor me ayudó a llevar adelante mi investigación, aportando sus conocimientos en la temática y su apoyo moral.

A mi Director Académico, el Dr. David González, por su buena disposición y valiosos aportes durante el desarrollo de esta Tesis.

Al MSc. Carlos Sanguinetti por permitirme formar parte del equipo del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay y por poder llevar a cabo mi investigación allí.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología.

Al Dr. Fernando López-Gallego y a su equipo de investigación del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH) de la Universidad de Zaragoza, especialmente a la Dra. Susana Velasco-Lozano, por haberme recibido en su laboratorio. Algunos de los resultados obtenidos durante la estancia forman parte del Capítulo 3 de esta Tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme una beca de maestría para poder llevar a cabo mis estudios y por financiar el proyecto “Cascada biosintética para la valorización del glicerol a ácido L-láctico”.

A la Universidad ORT Uruguay y a PEDECIBA Química por el apoyo financiero recibido para mi estancia en la Universidad de Zaragoza y la participación en diversos eventos de divulgación científica.

A Alcoholes del Uruguay por donarnos el glicerol de *splitting*.

Finalmente, me queda agradecer a mis padres, mi familia, mis amigos y mi novio por su paciencia y apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso.

Abreviaturas

APS: Persulfato de Amonio

BSA: Seroalbúmina bovina

CLEAs: *Cross-linked Enzyme Aggregates*

DHA: Dihidroxiacetona

DO_{600 nm}: Densidad óptica medida a 600 nm

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FEA: Feniletilamina

GA: Ácido glicérico

GC-FID: *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector* (Cromatografía de gases – Detector de ionización de llama)

GC-MS: *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* (Cromatografía de gases – Espectrometría de Masas)

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficacia)

IDA: Ácido iminodiacético

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: *Lysogeny Broth*

LPS: Lipopolisacáridos

NMIM: *N*-metilimidazol

PEI: Polietilenimina

PLP: Piridoxal-5'-fosfato

PQQ: Pirroloquinolina quinona

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SBN: Sobrenadante

TA: Transaminasa

TEMED: *N, N, N', N'*-tetrametiletilendiamina

TEOS: Tetraetil ortosilicato

TMOS: Tetrametil ortosilicato

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia por mililitro

UI/g: Unidades de actividad enzimática por gramo

UI/mL: Unidades de actividad enzimática por mililitro

Índice

Introducción general.....	11
Biotransformaciones.....	11
Tipos de biocatalizadores	11
Inmovilización de biocatalizadores	13
Estrategias de inmovilización de enzimas	13
Estrategias de inmovilización de células	16
Cascadas biosintéticas	18
Biotransformaciones de glicerol.....	21
Objetivos	26
Materiales y métodos	28
Análisis de crecimiento bacteriano	28
Preparación de inóculo bacteriano	29
Conversiones de glicerol a DHA y GA por células en reposo	29
Conversiones utilizando células en reposo en diferentes estadios de crecimiento.....	29
Efecto del pH inicial en la conversión.....	30
Reuso de las células en reposo	30
Permeabilización bacteriana	30
Obtención de preparados inmovilizados de <i>Gluconobacter</i>	30
Caracterización de los inmovilizados.....	31
Medida de dimensiones	31

Ensayos de viabilidad	31
Evaluación de pérdida de células.....	31
Conversiones de glicerol a DHA y GA por células inmovilizadas	32
Reuso de células inmovilizadas	32
Conversiones con extracto celular inmovilizado de <i>G. oxydans</i>	32
Obtención de preparados inmovilizados de ω -transaminasas	32
Obtención de extracto crudo de Cv- ω TA y Pf- ω TA	32
Medidas de actividad transaminasa	33
Preparación de inmovilizados de Cv- ω TA en perlas de agar	34
Preparación de inmovilizados de Pf- ω TA en Agarosa-IDA-Co ²⁺	35
Preparación de CLEAs de Pf- ω TA.....	35
Conversiones de glicerol a piruvato y serinol	35
Conversión de DHA con Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co ²⁺	35
Conversión de glicerol a DHA por <i>G. oxydans</i> en el tampón de actividad de la enzima.....	36
Implementación de la cascada en formato <i>one-pot</i> con células en reposo de <i>G. oxydans</i> y Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co ²⁺	36
Ensayo de consumo de piruvato por <i>G. oxydans</i>	36
Implementación de sistema continuo	36
Preparado de co-inmovilizados de <i>G. oxydans</i> y Pf- ω TA.....	37
Implementación de la cascada en formato <i>one-pot</i> con los preparados co-inmovilizados.....	37

Análisis de muestras.....	37
HPLC.....	37
GC-FID.....	38
GC-MS.....	38
RMN.....	38
Microscopía confocal.....	39

CAPÍTULO 1: Conversiones de glicerol a DHA y GA con células en reposo..... 41

Introducción.....	41
Dihidroxiacetona (DHA).....	41
Ácido glicérico (GA).....	42
El género <i>Gluconobacter</i>	44
Resultados y discusión.....	48
Conversiones de glicerol puro por células en reposo libres.....	48
Conversiones de glicerol de <i>splitting</i> por células en reposo libres.....	50
Estrategias para el aumento de la productividad.....	52
Conclusiones.....	57

CAPÍTULO 2: Inmovilización de cepas de *Gluconobacter* 60

Introducción.....	60
Inmovilización de <i>Gluconobacter</i> en biotransformaciones.....	60
Resultados y discusión.....	63
Inmovilización de especies de <i>Gluconobacter</i> en distintos soportes.....	63

Conversiones de glicerol de <i>splitting</i> con preparados inmovilizados de <i>Gluconobacter</i>	65
Conclusiones	74
CAPÍTULO 3: Cascada biocatalítica para la preparación de serinol y piruvato a partir de glicerol y L-alanina	77
Introducción	77
Transaminasas	78
Serinol.....	80
Piruvato.....	81
Resultados y discusión	84
Inmovilización de ω -transaminasas	84
Acoplamiento de los biocatalizadores	89
Implementación de un sistema continuo para la producción de piruvato y serinol	92
Implementación de un sistema <i>one-pot</i> para la producción de serinol	93
Conclusiones	102
Conclusiones generales y perspectivas futuras	105
Bibliografía	110
Anexos	127

Introducción general

Introducción general

Biotransformaciones

El aumento global de la población acontecido en los últimos años impacta directamente sobre la economía, aumentando la demanda por alimentos, combustibles y otros productos. Consecuentemente, los requerimientos por recursos de origen fósil aumentan, así como también los desechos generados, lo que produce un impacto negativo tanto en el ambiente como en el resto de los recursos [1]. Por estas razones, existe una necesidad general de una química más limpia y sostenible. La industria química se ve forzada a prestar atención a estas cuestiones, considerando la naturaleza finita de algunos recursos y la necesidad de utilizarlos de manera eficiente [2].

Las bioconversiones son una alternativa verde a las conversiones químicas clásicas. Estas constituyen todas aquellas reacciones químicas que son catalizadas por células completas o enzimas aisladas [3]. Procesos de este tipo han sido utilizados por la humanidad por miles de años, y aún hoy en día el número de aplicaciones en el campo de las biotransformaciones continúa en aumento [4]. De esta forma, las biotransformaciones se han vuelto una valiosa herramienta sintética tanto en la industria como en la academia [2], [5], [6].

Tipos de biocatalizadores

Las enzimas son catalizadores naturales, biocompatibles y biodegradables [7]. A diferencia de las reacciones químicas convencionales, las reacciones enzimáticas se dan generalmente en condiciones suaves de temperatura, presión y pH [8]. Son además catalizadores muy eficientes, aumentando entre 10^8 y 10^{10} veces la velocidad de reacción frente a la de la reacción no catalizada. Estos valores son significativamente superiores a los alcanzados con catalizadores químicos [2]. Esta alta eficiencia permite además disminuir la cantidad de catalizador agregado en las reacciones. A su vez, muchas enzimas exhiben una gran tolerancia de sustrato, pudiendo catalizar reacciones a partir de una variedad de sustratos, tanto naturales como artificiales [2]. Otra ventaja del uso de enzimas es que generalmente son compatibles entre sí debido a sus condiciones similares de operación, por lo que se pueden utilizar para llevar a cabo varias reacciones en forma secuencial [9]. Estas cascadas biocatalíticas serán tratadas más adelante en esta Introducción. Sin embargo, una de las características más notables de las enzimas

y que las convierten en herramientas indispensables en síntesis química, es su selectividad. Las enzimas presentan tres tipos de selectividad: quimio-, regio y enantioselectividad. Estas propiedades permiten a las enzimas discriminar entre distintos grupos químicos, entre diferentes posiciones dentro de la molécula del sustrato y entre enantiómeros, respectivamente [8]. Esta característica permite muchas veces la reducción del número de pasos en una reacción de síntesis, ya que elimina la necesidad de pasos de protección y desprotección de grupos funcionales [10].

El uso de enzimas solubles presenta algunas desventajas. Entre estas se destacan la poca estabilidad del catalizador fuera de las condiciones óptimas de trabajo, la necesidad de cosustratos y/o cofactores que deben ser agregados constantemente a la mezcla de reacción, y sus costos, debido a la complejidad de la obtención de las mismas en forma pura [8]. Pueden además presentar inhibición tanto por producto como por sustrato, lo que causa una disminución en la velocidad de reacción [2].

Por otro lado, los microorganismos son catalizadores eficientes, ecológicos y de bajo costo que han sido empleados de forma satisfactoria en varias industrias, como la farmacéutica, química, alimentaria, agroquímica y cosmética, entre otras [11], [12]. Además de una serie de ventajas que comparten con el uso de enzimas, la utilización de células enteras como catalizadores en biotransformaciones presenta una variedad interesante de ventajas adicionales. En primera instancia, una célula microbiana es por lo general más resistente a los cambios en su entorno que una enzima en solución [8]. A su vez, dentro de un microorganismo conviven varias enzimas de una misma vía metabólica, responsables de la transformación de un producto en otro. Esto se presenta como una ventaja en el caso de reacciones que requieran múltiples pasos [13]. Además, al trabajar con microorganismos completos, el agregado de cofactores no es un problema ya que la propia célula los produce y se encarga de reciclarlos [6]. Esto último y el bajo costo de producción del biocatalizador contribuyen a una producción más económica.

Los microorganismos pueden ser utilizados como catalizadores en crecimiento o como células en reposo [13]. Las células en crecimiento tienden a tener muy buenas productividades cuando se trata de producir metabolitos primarios, como son los alcoholes, α -aminoácidos y ácidos orgánicos. Sin embargo, cuando de producir metabolitos secundarios se trata (esteroides, terpenoides antibióticos) frecuentemente las productividades caen, debido a su toxicidad inherente [2]. En este tipo de conversiones, el metabolismo completo del microorganismo se encuentra activo, por lo que además de la conversión de interés se están llevando a cabo otra multitud de reacciones cuyos productos serán

contaminantes del producto final. Para evitar esto es posible utilizar células en reposo como catalizadores.

Las células en reposo, también denominadas *resting cells*, no se encuentran en crecimiento, pero están metabólicamente activas. Dado su metabolismo limitado, se producen menos reacciones secundarias [12]. A su vez, tienen un gran potencial en biotransformaciones redox dependientes de cofactores ya que no necesitan destinar energía a la producción de biomasa [14]. Las características de estos biocatalizadores facilitan su uso y el posterior procesamiento *downstream* del producto, aunque muchas veces no presentan las mismas productividades que las células en crecimiento [2].

Inmovilización de biocatalizadores

Tanto las enzimas como las células presentan una serie de debilidades a la hora de ser utilizadas en reacciones a nivel industrial [15]. En la mayoría de los casos, existen dificultades para separar los catalizadores de la mezcla reactiva una vez finalizada la producción. A su vez, generalmente se trabaja con el catalizador a pérdida, es decir, que no puede ser reutilizado. Estas problemáticas pueden ser resueltas mediante la inmovilización tanto de enzimas como de células. La inmovilización de un biocatalizador refiere a la confinación o localización física del mismo en una región del espacio, con la retención de su actividad catalítica y que puede ser utilizado de forma continua y repetida [16].

La inmovilización acarrea consigo una serie de ventajas. En algunos casos, la misma permite un aumento en la productividad, en consecuencia de un aumento de estabilidad del biocatalizador [12]. Permite además una separación más simple de los catalizadores del medio de reacción, que además posibilita su reuso, así como también el desarrollo de sistemas en continuo [17]. Sin embargo, la inmovilización puede a veces generar problemas difusionales, inactivación, o incluso un aumento en los costos del proceso [12]. Por estas razones, la selección de la matriz y la estrategia de inmovilización, son fundamentales para el desarrollo de un biocatalizador eficiente. Esta selección debe tomar en cuenta además el proceso en el que se va a utilizar el catalizador y su aplicación [18].

Estrategias de inmovilización de enzimas

Existe en la actualidad una gran variedad de protocolos de inmovilización de enzimas. La selección del método a utilizar dependerá de la matriz seleccionada, la enzima en cuestión y el uso que se le quiera dar al derivado inmovilizado. Estos métodos pueden dividirse a grandes rasgos en métodos

irreversibles y métodos reversibles (Figura 1) [16]. Los métodos irreversibles son aquellos con los que se trabaja con la enzima a pérdida y que una vez que se inactive el preparado, la matriz no puede ser regenerada. Estos involucran la formación de uniones de tipo covalente, el atrapamiento, la encapsulación y el entrecruzamiento con polímeros polifuncionales (*Cross-linking*) para formar CLEAs [19]. Por otro lado, los métodos reversibles involucran la unión por adsorción física (interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals o interacciones iónicas) o la formación de puentes disulfuro. Estos últimos son de naturaleza covalente pero susceptibles a la reducción, por lo que los soportes pueden ser reutilizados [16].

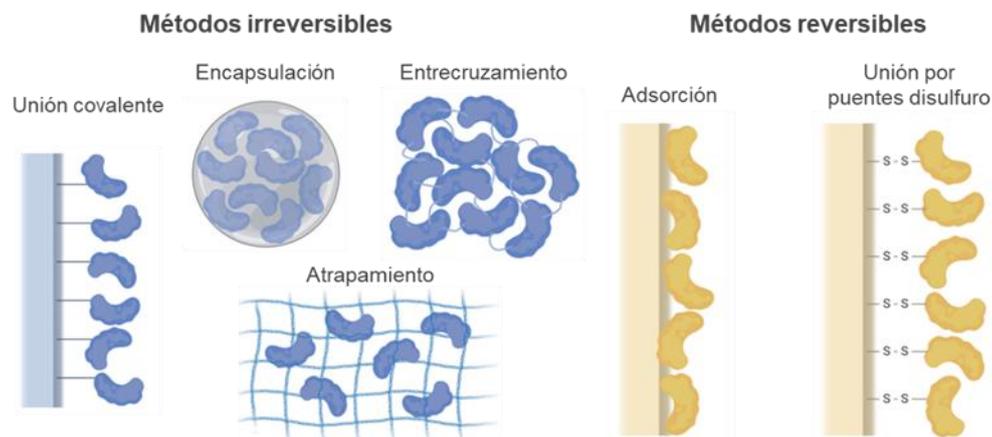


Figura 1: Metodologías reversibles e irreversibles para la inmovilización de enzimas.

Idealmente, el soporte seleccionado para llevar a cabo la inmovilización debe ser físicamente resistente, estable, hidrofílico, inerte, fácilmente derivatizable, biocompatible, resistente al ataque microbiano y de bajo costo [20]. Los soportes pueden ser de naturaleza orgánica e inorgánica. Los soportes orgánicos se subdividen en polímeros naturales (celulosa, dextranos, agar, agarosa, quitina, alginato, colágeno, albúmina, etc) o polímeros sintéticos (poliestireno, poliacrilato, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, etc) [7]. Por otro lado, los soportes inorgánicos pueden ser minerales naturales como la sílica o la bentonita, o bien materiales procesados como vidrio, cerámica o metales sin poros o con porosidad controlada [20]. La porosidad y el tamaño de las partículas del soporte definen el área superficial disponible para llevar a cabo la inmovilización, siendo mayor mientras más porosidad presente el material. Sin embargo, la alta porosidad muchas veces puede significar problemas difusionales [16].

Por razones técnicas y económicas la mayoría de los procesos industriales catalizados por enzimas requieren del uso y reuso de las mismas por un tiempo considerable, por lo que la inmovilización de

las mismas resulta imperativa. Como se mencionó anteriormente, la inmovilización no permite solamente el reuso, sino que también puede tener efectos que mejoren las propiedades de la enzima. Por ejemplo, el atrapado dentro de una matriz puede protegerla de procesos intramoleculares como la autólisis, proteólisis o agregación, así como protegerla de interacciones indeseadas con componentes del medio de reacción [15]. Por otro lado, la generación de uniones multipuntuales con brazos espaciadores cortos entre la enzima y el soporte pueden rigidificar la estructura. Esto generalmente aumenta la estabilidad de la estructura tridimensional de la proteína, pudiendo incluso mejorar su actividad [21]. Esta aproximación es a su vez muy interesante a la hora de trabajar con enzimas multiméricas, en las cuales es frecuente la inactivación por pérdida de su estructura cuaternaria. Por esto resulta fundamental considerar aspectos tales como la estructura enzimática, medio de reacción a utilizar, la reacción a catalizar, productividades objetivo o tipo de reactores a la hora de seleccionar una estrategia de inmovilización.

En este trabajo los métodos de inmovilización utilizados fueron el atrapamiento, la adsorción iónica, la afinidad por quelatos metálicos y la formación de CLEAs. El atrapamiento en una matriz de gel es ventajoso a la hora de inmovilizar enzimas que no toleran una unión directa a un soporte. Por el contrario, las enzimas se encuentran atrapadas por una matriz macroscópica [22]. Para evitar la pérdida del catalizador, el tamaño de poro debe permitir el paso de sustratos y productos desde y hacia el medio de reacción, pero debe poder retener a la enzima en su interior. Los geles pueden ser de origen biológico, como por ejemplo agar o agarosa, o de origen inorgánico, como las matrices de sílica [19]. Estas últimas resultan más estables, presentando una mayor resistencia a la temperatura y una mayor estabilidad mecánica.

La adsorción de enzimas a una matriz es una de las técnicas más simples y antiguas de inmovilización. Las fuerzas de unión que mantienen unida la enzima al soporte son de carácter débil (Van der Waals, iónicas, enlaces de hidrógeno) por lo que usualmente la actividad enzimática no se ve afectada significativamente. Sin embargo, la debilidad de las uniones puede causar la desorción de la enzima, fenómeno conocido como *leakage*. En particular, la adsorción iónica es llevada a cabo en resinas de intercambio catiónico o aniónico, ya que sus superficies polares tienen la capacidad de adsorber proteínas. Las interacciones iónicas que se generan son más fuertes que las generadas durante una adsorción física, sin embargo, este tipo de unión es susceptible a la presencia de otros iones por lo que el control del pH del medio es de vital importancia durante la inmovilización [22].

Por otro lado, la afinidad por quelatos metálicos es utilizada tanto para la purificación de proteínas y péptidos como para la inmovilización de enzimas [23]. Los soportes utilizados para este tipo de inmovilización cuentan con agentes quelantes unidos covalentemente a su superficie, frecuentemente ácido iminodiacético (IDA) [24]. Estos agentes interactúan con cationes metálicos (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+}), que pueden unirse a residuos presentes en las proteínas como la histidina, la cisteína y el triptófano [25]. Generalmente, la unión de las enzimas a este tipo de soportes procede a través de una cola de histidina, agregada a uno de los extremos terminales de la proteína.

Los CLEAs son agregados insolubles de alto peso molecular, generados por precipitación y posterior entrecruzamiento de moléculas enzimáticas [7]. Esta es una metodología simple, económica, que no requiere de soportes, con la que se puede alcanzar altas actividades volumétricas. Los agentes entrecruzantes más utilizados son el glutaraldehído, polialdehído-dextrano, dimetil adipimidato, dimetil suberimidato y diisocianato de hexametileno [7], [22]. La preparación de los CLEAs puede llevarse a cabo utilizando solamente la enzima de interés o en compañía de proteínas “de relleno” como las albúminas [22]. Esta estrategia de inmovilización es particularmente ventajosa a la hora de inmovilizar enzimas multiméricas, ya que usualmente permite mantener su estructura cuaternaria [7], [26]. A su vez, se pueden preparar los llamados combi-CLEAs, agregados enzimáticos que consisten de dos o más enzimas, que permiten llevar a cabo reacciones en cascada [26]. Sin embargo, este tipo de preparaciones presenta algunas desventajas. El producto final obtenido puede presentar problemas difusionales y su aplicación en reactores de lecho empacado se dificulta, dada su consistencia gelatinosa [22].

Estrategias de inmovilización de células

Existen varias técnicas de inmovilización de células, las más frecuentemente utilizadas son acoplamiento, encapsulación, agregación y atrapamiento (Figura 2) [27], [28]. El acoplamiento, ya sea por adhesión o adsorción, es la unión de células a una superficie de forma natural o inducida por el agregado de agentes enlazantes [12]. La encapsulación consta del confinamiento de las células, que se encontrarán separadas del medio de reacción por una barrera, que puede ser simplemente el límite entre dos fluidos inmiscibles en una emulsión [18], [29]. La agregación involucra la formación de agrupaciones de células, unidas entre sí de forma natural o por el agregado de agentes floculantes o enlazantes [18]. En particular, en este trabajo se emplearon técnicas de atrapamiento para lograr la inmovilización de las células de *Gluconobacter*.

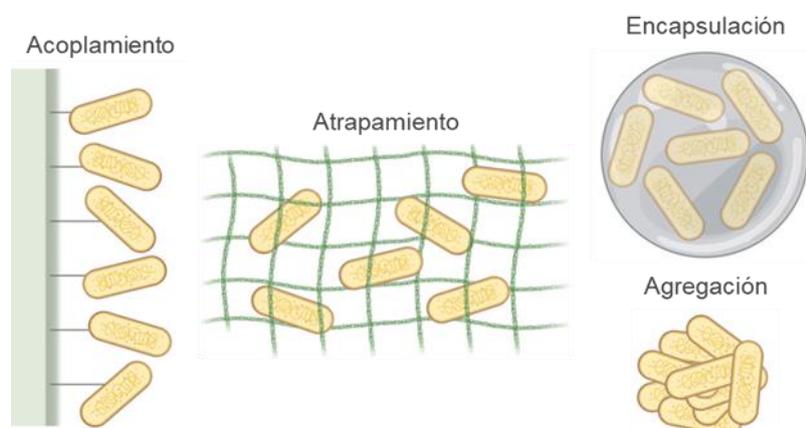


Figura 2: Metodologías para la inmovilización de células.

Las matrices utilizadas para atrapar células son muy variadas, con tamaños de poro que van desde la escala macro a la microscópica. Las distintas cepas bacterianas son afectadas diferencialmente por la interacción con los soportes, por lo que es habitual estudiar distintas matrices a la hora de llevar a cabo la inmovilización de una bacteria [11]. Estas matrices pueden ser inorgánicas, naturales o sintéticas. Entre las matrices inorgánicas se encuentran por ejemplo vidrio sinterizado, cerámica, carbón activado o espuma reticulada. Ejemplos de matrices naturales son colágeno, agar, agarosa, celulosa, κ -carragenano y alginato, mientras que las matrices sintéticas están constituidas por polímeros como la acrilamida, el poliuretano y el polivinil [17], [18]. En este trabajo se ensayaron como matrices de inmovilización el agar, la agarosa, el alginato y la poliacrilamida.

El agar y la agarosa son termocoloides extraídos de algas que gelifican por debajo de sus puntos de fusión (32-43°C) [12]. Al ser calentados por encima de los 85°C se convierten nuevamente en una solución que puede ser mezclada con las células [17]. Estos termogeles tienen la ventaja de ser económicos, siendo el agar significativamente más económico que la agarosa [12]. Sin embargo, la necesidad de emplear temperaturas relativamente altas para su fusión puede llegar a afectar la viabilidad de las células.

La utilización de hidrogeles de alginato es una estrategia de uso común para la inmovilización celular. El alginato de sodio, comúnmente denominado simplemente como alginato, es un polímero natural extraído de algas de la familia *Phaeophyta* [17], [30]. Este polímero es resistente al ácido, no tóxico, biocompatible, y tiene la capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} , el Zn^{2+} o el Ba^{2+} , siendo el primero el más ampliamente utilizado [30]. La preparación de este tipo de

hidrogel, a diferencia de los anteriormente mencionados, no requiere de temperatura. Esto resulta ventajoso ya que permite una mayor preservación de la viabilidad celular. De todas formas, este tipo de geles es inestable en presencia de quelantes del calcio, como los fosfatos [18].

Tanto los termogeles de agar y agarosa, como los hidrogeles de alginato, son matrices altamente biodegradables y poseen una baja estabilidad operacional [12], [18]. Una alternativa a las matrices de este tipo son las ya mencionadas matrices sintéticas. En particular, la poliacrilamida es un polímero resistente a la contaminación bacteriana y a la presencia de solventes orgánicos, entre otras propiedades [19]. Sin embargo, es importante considerar que la acrilamida líquida es tóxica para las células, pudiendo algunas veces afectar la viabilidad de las mismas durante el proceso de inmovilización.

Cascadas biosintéticas

Las reacciones de síntesis química convencional habitualmente se dan en una serie de pasos, requiriendo el aislamiento de cada intermediario luego de cada paso para continuar con el siguiente [22]. Además, cada paso puede involucrar diferentes condiciones de pH, temperatura o composición del medio de reacción [10]. Esta sucesión de pasos no solamente es laboriosa, sino que a la vez impacta en los rendimientos de las reacciones debido a la inevitable pérdida de material durante la recuperación de los intermediarios. De esta forma, se generan además una gran cantidad de desechos, impactando negativamente sobre la economía atómica de la reacción [22]. Además, como se mencionó con anterioridad, la síntesis química requiere de reactivos y condiciones de reacción poco amigables con el medio ambiente [2]. Dadas sus características, estos procesos no se alinean con la creciente tendencia observada en las últimas décadas de implementar procesos de síntesis más verdes [7].

En contraposición, dentro de los organismos vivos se dan una gran variedad de reacciones enzimáticas en un medio de reacción común, la mayoría de las veces bajo condiciones suaves de pH, presión, temperatura y fuerza iónica. Numerosos esfuerzos se han enfocado en emular este tipo de cascadas enzimáticas, acoplando la actividad de varias enzimas *in vitro*, con el fin de obtener cascadas artificiales para la preparación de productos naturales y no naturales [9]. Dichas cascadas artificiales, muchas veces resultan ser incluso más eficientes que las encontradas en la naturaleza. Un ejemplo de esto es la producción de piruvato a partir de glucosa. Mientras una levadura necesita de diez pasos enzimáticos para llevar a cabo esta conversión, Guterl y colaboradores reportaron una cascada artificial que requiere tan solo cuatro enzimas para llevarla a cabo [31].

El interés de la comunidad científica en este tópico ha venido creciendo significativamente en los últimos 10 años, presentando un aumento casi exponencial en la cantidad de trabajos publicados por año sobre el tema (Figura 3) [32], [33]. A modo de ejemplo, en el año 2019 se registraron más de 700 publicaciones relacionadas a cascadas enzimáticas utilizadas con diversos fines. Entre las publicaciones más recientes sobre cascadas enzimáticas utilizadas en síntesis química se encuentran, por ejemplo, los trabajos de los grupos de Zhang y Meng. En su trabajo, Zhang y colaboradores reportaron la implementación de una cascada en la que se combina la acción de una enzima nitrilasa de *Arabis alpina* con una amidasa de *Pantoea sp.* YR343 para mejorar la productividad de ácido (S)-3-ciano-5-metil hexanoico a partir de isobutil succinonitrilo [34]. Por su parte, Meng y colaboradores llevaron a cabo la síntesis de dos macrolactonas utilizadas en la industria de las fragancias, Exaltolide® y Silvanone® Supra. Para ello, utilizaron una mutante de la citocromo P450 hidroxilasa de *Bacillus megaterium* apareada con una lipasa de *Pseudomonas cepacia* [35].

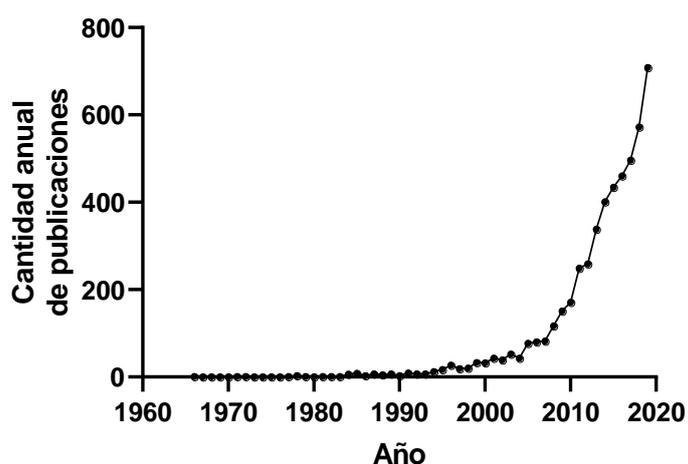


Figura 3: Número de publicaciones en el tema “cascadas enzimáticas” por año (Fuente: Scopus).

Las cascadas enzimáticas entonces, pueden definirse como la combinación de al menos dos pasos químicos, sin llevar a cabo el aislamiento de los intermediarios [36]. Estas pueden ser de carácter íntegramente enzimático o combinar también pasos de síntesis química convencional, en cuyo caso pasan a ser denominadas cascadas quimioenzimáticas [10]. Los biocatalizadores empleados en estas cascadas pueden ser enzimas aisladas, extractos crudos libres de células, enzimas inmovilizadas o células enteras, tanto libres como inmovilizadas [36].

La gran variedad de cascadas enzimáticas posibles puede clasificarse de acuerdo de a una variedad de parámetros. La clasificación más frecuentemente utilizada es de acuerdo al “diseño” de las mismas [9]. Las cascadas lineales son las más simples. En este diseño, un solo sustrato es convertido en un solo producto a través de uno o más intermediarios [37]. Por otro lado, en las cascadas ortogonales, la transformación del sustrato en producto está acompañada de otras reacciones paralelas. Estas reacciones cumplen funciones de regeneración de cofactores o de eliminación de subproductos [9]. Otro diseño similar al de las cascadas ortogonales es el de las cascadas paralelas. En el caso de las cascadas paralelas, dos sustratos distintos son convertidos en dos productos distintos por dos reacciones catalíticas distintas. La principal diferencia con las cascadas ortogonales es el valor de los productos obtenidos, ya que en este caso todos son considerados valiosos [6]. Por último, en las cascadas cíclicas un sustrato, de una mezcla sustratos, es convertido en un intermediario que luego es convertido en uno de los materiales de partida. Luego de sucesivos ciclos, el compuesto que no es convertido en el primer paso de la reacción es el producto que se acumula [10]. De todas formas, esta clasificación no es estricta, ya que existen muchos diseños posibles que pueden combinar los distintos tipos de cascada antes mencionados.

La implementación de cascadas biocatalíticas presenta una serie de ventajas. En primera instancia, como se mencionó anteriormente, son procesos intrínsecamente verdes, por las características de los catalizadores empleados [9]. La eliminación de los pasos de aislamiento y purificación de los intermediarios de reacción no solamente ahorra tiempo, sino recursos [33]. De esta forma, también es posible reducir los residuos generados durante el proceso de síntesis. A su vez, las cascadas son útiles cuando alguno de los intermediarios de reacción es inestable, ya que pueden ser consumidos rápidamente en el siguiente paso. Esto puede ayudar a alcanzar mejores rendimientos de reacción. Por otro lado, las cascadas potencialmente pueden evitar el agregado de sustratos tóxicos al inicio de la reacción. Esto ocurre en los casos en los que se puede agregar un precursor no tóxico del sustrato como sustrato inicial y convirtiéndolo *in situ* como parte de la cascada [36]. A su vez, se pueden aparear reacciones de reducción y oxidación, permitiendo la regeneración *in situ* de cofactores [22]. Este tipo de diseños además permite la disminución de los efectos de la inhibición por sustratos y productos, no permitiendo que se acumulen a lo largo de la cascada [36].

De todas formas, estos sistemas presentan ciertos desafíos. Con respecto al diseño, encontrar las condiciones ideales comunes de reacción para todos los catalizadores involucrados, puede resultar difícil [9]. Este problema puede ser solucionado llevando a cabo la cascada en forma secuencial,

agregando en distintos pasos los catalizadores, permitiendo cambiar las condiciones de reacción [36]. Esta aproximación permite además evitar reacciones cruzadas entre los distintos componentes del sistema. Por otro lado, es deseable que la cascada esté favorecida energéticamente. Esto puede controlarse modificando equilibrios desfavorables, utilizando diseños “cuesta abajo” hacia el producto de interés [22].

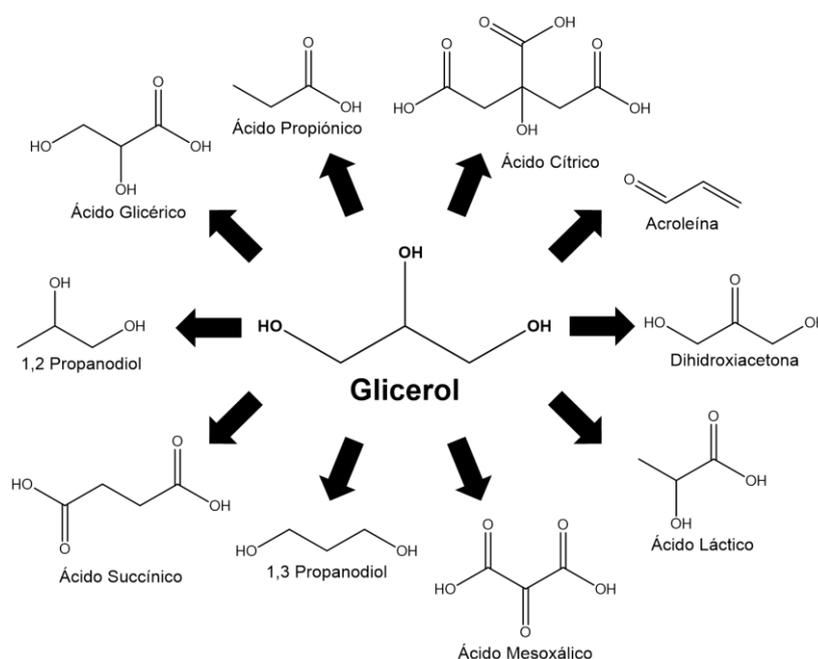
Biotransformaciones de glicerol

El glicerol (1,2,3 propanotriol, $C_3H_8O_3$) es un alcohol trihídrico soluble en agua, sin olor ni color, viscoso y con alto punto de ebullición. La versatilidad de este producto radica en su compatibilidad con un gran número de otras sustancias, su fácil manipulación y el hecho de que no es tóxico para la salud humana ni para el medio ambiente [38]. Se espera que el mercado mundial del glicerol alcance los 3 billones de dólares para el año 2022, siendo su demanda dominada por las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica [39]. Si bien este producto puede ser sintetizado de forma química, en el año 2015 más del 68% de la producción de glicerol provino de la industria del biodiesel [39], [40].

Este compuesto es muy versátil, ya que puede ser convertido a una gran variedad de productos a través de reacciones de deshidratación, condensación, transesterificación, reformado, hidrogenólisis, esterificación, oxidación, halogenación y eterificación [41]. Algunos compuestos que pueden ser obtenidos a partir de la utilización de glicerol como sustrato se observan en el Esquema 1.

A pesar de que el glicerol puro (> 95%) es un producto de gran valor en el mercado, el glicerol crudo obtenido como subproducto de la producción de biodiesel es significativamente más barato. De hecho, la generación de altas cantidades de este producto (1 Kg cada 10 Kg de biodiesel) representa un grave problema industrial y medioambiental [38], [42]. Luego del proceso de transesterificación con grasas y aceites para llevar a cabo la síntesis de biodiesel, el glicerol crudo resultante posee contaminantes, alcanzando grados de pureza máximos de entre 60 y 80% [38]. Esta baja pureza disminuye significativamente su valor de mercado. La composición de este glicerol crudo varía dependiendo del catalizador que se utilice en la reacción de transesterificación, la eficiencia de esta, el porcentaje de recuperación de biodiesel y la presencia de posibles impurezas en el material de partida. A su vez, la recuperación del metanol y los catalizadores de la reacción también impacta en la pureza del producto obtenido [43]. Generalmente el glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel contiene

cantidades variables de sales, cenizas, metanol, materia grasa y otros posibles contaminantes encontrados en el agua [43].



Esquema 1: Productos que pueden ser sintetizados partiendo de glicerol como sustrato [40], [43], [44].

Existen algunos procesos para mejorar el porcentaje de glicerol obtenido a partir del producto crudo inicial de la transesterificación. En particular, el proceso de *splitting* de alta presión permite un aumento en concentración de glicerol del producto obtenido, a la vez que disminuye la contaminación con grasas y aceites remanentes [41]. El producto obtenido luego de este proceso se denominará en adelante glicerol de *splitting*.

Se proyecta que para el año 2020 la producción mundial de glicerol crudo alcanzará las 3.000 millones de toneladas anuales, superando ampliamente la demanda de este producto [38]. A nivel de Uruguay, la producción anual de biodiesel por parte de ALUR deja como residuo aproximadamente 20.000 toneladas de glicerol crudo. Actualmente un porcentaje del mismo es comercializado a nivel nacional para su utilización como combustible en hornos industriales. Sin embargo, su combustión lleva a la formación de compuestos tóxicos como la acroleína, por lo que su quema se ve desalentada. Otro porcentaje es destinado a la alimentación animal mientras que el restante es exportado principalmente a Alemania [45]. La oferta de este producto supera significativamente la demanda debido al gran aumento en la producción de biodiesel que aconteció en los últimos años, hecho que ha impactado negativamente en el precio del glicerol crudo en el mercado. A su vez, la obtención de glicerol puro

para su uso en las industrias química y alimentaria (> 99%) a partir de este residuo es muy costosa [38]. Es por estas razones que resulta de especial interés comercial buscar formas de revalorizar este subproducto.

El glicerol crudo es un residuo con gran potencial para su revalorización, encontrando usos en diversas industrias como tal o a través de su conversión a otros productos de mayor valor agregado. Mientras la producción de biodiesel continúa creciendo, el mercado del glicerol crudo se ve cada vez más afectado, por lo que su comercio como tal no supone grandes ganancias [38]. Es por esta razón que su conversión a otros productos de mayor valor agregado es la alternativa más atractiva. Para llevar a cabo estas reacciones existen procesos de conversión química convencional y bioconversiones [43].

La mayoría de los compuestos de mayor valor agregado obtenidos a partir de glicerol crudo son producto de reacciones de bioconversión utilizando microorganismos. Estos son muy variados y se obtienen a través de reacciones con células en crecimiento o células en reposo, tanto libres como inmovilizadas, de una gran variedad de especies microbianas. Entre ellos se encuentra el 1,3 propanodiol que es obtenido utilizando como catalizadores especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Este compuesto sirve como monómero para la producción de polímeros fotoestables y es utilizado en las industrias química, alimenticia y farmacéutica [46]. Otro compuesto obtenido a partir del glicerol crudo es el ácido cítrico, utilizando como catalizador la bacteria *Yarrowia lipolytica* [43]. Este ácido es de importancia en las industrias química, farmacéutica, alimenticia y agropecuaria [46]. También es posible la producción de hidrógeno por parte de *Rhodospseudomonas palustris*, a través de reacciones de conversión foto-fermentativa del glicerol crudo [43]. La producción de bioplásticos, como los polihidroxialcanoatos (PHAs) por parte de especies como *Cupriavidus necator*, *Zobellella denitrificans* y *Pseudomonas oleovorans* es otro ejemplo de la gran variedad de productos que se pueden obtener a partir de la bioconversión del glicerol crudo [43], [46].

El uso de microorganismos para la conversión de glicerol crudo a distintos productos de mayor valor agregado es una opción interesante, ya que son generalmente procesos de bajo impacto ambiental, que pueden alcanzar muy buenos rendimientos. En particular, las bacterias del género *Gluconobacter* son ampliamente utilizadas en la industria por su capacidad de convertir el glicerol en ácido glicérico (GA) y dihidroxiacetona (DHA) [47]. Ambos productos son de interés industrial, particularmente como bloques de construcción en síntesis química, con un valor de mercado superior al del glicerol. Sin

embargo, a excepción de unos pocos reportes en los que se utilizan células en reposo, la mayoría de los reportes de conversiones de glicerol por bacterias del género *Gluconobacter* utilizan células en crecimiento [46], [48]. Como se mencionó anteriormente, la utilización de células en crecimiento como catalizadores tiene como desventaja la ocurrencia de reacciones secundarias que generan subproductos que contaminan el producto final. Es por esta razón que es necesario continuar investigando estrategias de síntesis de DHA y GA que utilicen células en reposo, con potencial uso industrial. Teniendo en cuenta esto último, también resulta de interés ampliar los conocimientos sobre inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter*, debido a la gran cantidad de ventajas operacionales que esta otorga para aplicaciones industriales. Actualmente, la literatura relacionada a la inmovilización de *Gluconobacter* para la síntesis de DHA es de alguna forma escasa, mientras que para la síntesis de GA no existen aún reportes publicados.

Por otro lado, sería posible sintetizar los productos serinol y piruvato mediante la aminación reductiva de la DHA utilizando una enzima transaminasa como catalizador. Al acoplar estas dos reacciones sería posible obtener una cascada biosintética sin precedentes, que permite convertir el glicerol en serinol y piruvato con gasto de L-alanina. De esta forma estaríamos aumentando aún más el espectro de productos obtenidos a partir de la biotransformación del glicerol.

Objetivos

Objetivos

El objetivo de esta Tesis es estudiar la biotransformación de glicerol a DHA y GA por cepas inmovilizadas de *Gluconobacter*, utilizando distintas matrices de inmovilización. Además, se buscará acoplar la síntesis de DHA a la producción de serinol y piruvato con gasto de L-alanina, utilizando preparaciones inmovilizadas de *G. oxydans* y ω -transaminasas. De esta forma, lograremos obtener cuatro productos de interés biotecnológico a partir de glicerol.

Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la conversión de glicerol puro y glicerol de *splitting* con cepas de *Gluconobacter* en reposo
- Inmovilizar los microorganismos en una variedad de soportes y caracterizarlos
- Sintetizar DHA y GA a partir de glicerol de *splitting* con inmovilizados de *Gluconobacter*
- Llevar a cabo la inmovilización de ω -transaminasas
- Acoplar *G. oxydans* y enzimas ω -transaminasas para la síntesis de piruvato y serinol a partir de glicerol con gasto de L-alanina

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Las cepas liofilizadas *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 y *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 fueron obtenidas del *National Institute of Technology and Evaluation* (NITE) (Tokio, Japón).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La D-glucosa fue obtenida de Amresco (Ohio, EEUU). La peptona y el agar fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el APS y el EDTA se obtuvieron de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El extracto de levadura se obtuvo de BD Biosciences (California, EEUU). La agarosa fue obtenida de Tiangen (Beijing, China). El KH_2PO_4 , el H_2SO_4 , el NaH_2PO_4 y el $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fueron obtenidos de Emsure (Massachusetts, EEUU). El K_2HPO_4 se obtuvo de Dorwil (Buenos Aires, Argentina). El glicerol puro, el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el Tris se obtuvieron de Carlo Erba (Barcelona, España). El glicerol crudo, producto del proceso de *splitting* (agua < 12%, cenizas < 7%, glicerol 70-80%, lípidos < 1%, metanol < 5%, cloruros < 3%) fue donado por Alcoholes del Uruguay (ALUR). El estándar de ácido D-glicérico, el alginato de sodio, el glutaraldehído, el serinol y el TEOS se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, EEUU). El estándar de DHA, el HEPES y el TMOS fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). La columna de HPLC Aminex HPX-87C 300 x 7.8 mm y el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™, All Blue (250-10 KDa) se obtuvieron de Bio-Rad (California, EEUU) y la pre columna para cartuchos Carbo-H 4 x 3.0 mm se obtuvo de Phenomenex (California, EEUU). El piruvato y la PEI 1300 fueron obtenidos de Aldrich Chemistry (Missouri, EEUU). La FEA se obtuvo de Acros Organics (Pensilvania, EEUU). La agarosa-IDA (Chelating Sepharose Fast Flow) fue obtenida de GE Healthcare (Illinois, EEUU). La L-alanina, el PLP y la BSA fueron obtenidos de Sigma (Missouri EEUU). La acrilamida y la Bisacrilamida 2K fueron obtenidas de PanReac Applichem (Darmstadt, Alemania). El TEMED fue obtenido de Invitrogen (California, EEUU). El SDS fue obtenido de J. T. Baker (Massachusetts, EEUU).

Análisis de crecimiento bacteriano

Se prepararon pre cultivos a partir de colonias aisladas de *G. frateurii*, *Gluconobacter sp.* y *G. oxydans*. Se inocularon 3 mL de medio de crecimiento con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,5) y se incubaron por 16 horas a 30°C y 180 rpm. Posteriormente se utilizaron los pre cultivos antes mencionados para inocular 250 mL de medio de crecimiento con glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L,

K_2HPO_4 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, pH 6,0), contenidos en un matraz de 1 L que fue incubado durante 76 horas a 30°C y 180 rpm. Se tomaron muestras de forma periódica para realizar medidas de $DO_{600\text{ nm}}$. Se estableció una correlación entre los valores de $DO_{600\text{ nm}}$ y el peso seco de células (g/L) mediante la construcción de un gráfico ($DO_{600\text{ nm}}$ vs peso seco de células). El protocolo para la realización de las medidas de peso seco fue una adaptación del previamente descrito por Black y Nair [49].

Preparación de inóculo bacteriano

Se incubaron cultivos de 250 mL a 30°C y 180 rpm en matraces de 1 L conteniendo medio de crecimiento con glicerol puro (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, pH 6,0). Se dejaron crecer hasta alcanzar el valor de $DO_{600\text{ nm}}$ necesario (0,4, 1,0, 2,5 o 3,0). El volumen correspondiente a 2 mg o 20 mg de peso seco de células fue centrifugado durante 15 minutos a 5.000 rpm y 4°C. El pellet bacteriano se lavó con tampón fosfato de sodio/potasio 30 mM (NaH_2PO_4 4,14 g/L, K_2HPO_4 5,23 g/L, pH 7,0), en adelante tampón de lavado, para eliminar restos del medio de crecimiento y finalmente se centrifugó a 5.000 rpm a 4°C durante 15 minutos nuevamente, descartando el sobrenadante.

Conversiones de glicerol a DHA y GA por células en reposo

Todas las conversiones de glicerol por células en reposo se llevaron a cabo en un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro o de *splitting* (glicerol 50 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, pH 3,0–8,0). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y 180 rpm. El inóculo para cada reacción fue de 2 mg o 20 mg de peso seco de células.

Conversiones utilizando células en reposo en diferentes estadios de crecimiento

Para poder representar los cuatro estadios del crecimiento microbiano, las células fueron colectadas cuando la $DO_{600\text{ nm}}$ de los cultivos alcanzó los valores de 0,4, 1,0, 2,5 y 3,0, representando la fase exponencial temprana, mitad de exponencial, exponencial tardía y estacionaria. Las mismas fueron centrifugadas y lavadas como se describió anteriormente en el apartado: Preparación de inóculo bacteriano. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y 180 rpm por 20 horas. Se utilizó glicerol puro como sustrato. El inóculo celular fue de 2 mg de peso seco. Se llevó a cabo un análisis estadístico de

varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos, utilizando el programa Prism 8.0.1 de GraphPad Software (California, EEUU).

Efecto del pH inicial en la conversión

Se evaluaron diferentes valores de pH inicial para el medio de reacción (3,0, 4,0, 6,0, 7,0 y 8,0). Cada reacción fue inoculada con 2 mg de peso seco de células obtenidas de un cultivo con un valor de $DO_{600\text{ nm}}$ de 1. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y 180 rpm durante 50 horas. Se utilizó glicerol puro como sustrato. Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos, utilizando el programa Prism 8.0.1 de GraphPad Software (California, EEUU).

Reuso de las células en reposo

Las células en reposo fueron reutilizadas hasta 5 veces, luego de 20 horas de reacción, tomando muestras de 1 mL al final de cada ciclo. Cada vez, las células fueron colectadas por centrifugación a 5.000 rpm por 10 minutos y lavadas utilizando el tampón de lavado. Luego, las células fueron centrifugadas nuevamente a 5.000 rpm durante 10 minutos y fueron resuspendidas en medio de reacción fresco conteniendo 50 g/L de glicerol de *splitting*.

Permeabilización bacteriana

Se permeabilizaron células en reposo de *G. oxydans* y *G. frateurii* utilizando tampón de lavado suplementado con 50 mM EDTA y 0,10% o 0,5% PEI. Se resuspendieron 20 mg de peso seco de células en 5 mL del tampón antes mencionado y se incubaron por 10 minutos a 4°C sin agitación. Las células se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos y se lavaron una vez, utilizando el tampón de lavado sin suplementar. Las células volvieron a centrifugarse a 5.000 rpm durante 10 minutos y fueron resuspendidas en tampón de reacción conteniendo 25 g/L (*G. frateurii*) o 50 g/L (*G. oxydans*) de glicerol de *splitting*.

Obtención de preparados inmovilizados de *Gluconobacter*

Para la preparación de las perlas de agar y agarosa, se mezclaron 20 mg de células con 3 mL de una solución de agar o agarosa al 3%. La mezcla homogénea se añadió gota a gota a un vaso de precipitados conteniendo aceite de girasol frío, en agitación. Las perlas resultantes se separaron utilizando un colador y se lavaron con hexano y tampón de lavado. Para el tratamiento con glutaraldehído, se preparó una solución de glutaraldehído al 1,5% en tampón de lavado. Las perlas de agar o agarosa se incubaron

en esta solución durante 30 minutos en agitación y luego se lavaron utilizando el tampón de lavado. Para la preparación de las perlas de alginato, se preparó una solución de alginato de sodio al 3% y se mezcló la misma con 20 mg de peso seco de células. Se gotearon 3 mL de la mezcla obtenida en una solución de CaCl_2 50 mM y se dejó reaccionando 1 hora hasta que se formaron las perlas. Las mismas fueron colectadas con un colador y lavadas con agua destilada. Para la preparación de los cubos de poliacrilamida al 20%, se preparó una mezcla de 665 μL de acrilamida al 30%, 315 μL de tampón de lavado, 15 μL de persulfato de amonio al 10% y 5 μL de TEMED. 1 mL de esta solución se mezcló con el pellet de 20 mg de peso seco de células y se colocó en un molde de plástico. Después de la polimerización, se cortaron cubos de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm.

Caracterización de los inmovilizados

Medida de dimensiones

Las dimensiones de todos los inmovilizados obtenidos fueron medidas utilizando un calibre.

Ensayos de viabilidad

La viabilidad de los inmovilizados de *G. oxydans* en agar y alginato se estudió cortando al medio las perlas con un bisturí estéril y arrastrándolas por una placa de Petri conteniendo medio de glucosa sólido (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5). Para ello fue necesario preparar los inmovilizados en condiciones de esterilidad siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado: Obtención de preparados inmovilizados de *Gluconobacter*. Se realizaron controles de esterilidad en placas de todos los insumos necesarios para la inmovilización.

Evaluación de pérdida de células

La liberación de células al medio se evaluó por recuento en placa de medio de glucosa sólido. En primera instancia se prepararon los inmovilizados en esterilidad siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado: Obtención de preparados inmovilizados de *Gluconobacter*. Los mismos fueron colocados en 30 mL de tampón fosfato de potasio (KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0) en un matraz de 250 mL. Se incubó el matraz a 30°C y 180 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 20, 44 y 68 horas de reacción y se plaquearon 50 μL de una dilución del medio de reacción que permitiera el recuento. Finalmente se construyó un gráfico de UFC/mL vs tiempo.

Conversiones de glicerol a DHA y GA por células inmovilizadas

Todas las conversiones de glicerol llevadas a cabo por células inmovilizadas en agar, agarosa, poliacrilamida se llevaron a cabo en matraces de 250 mL conteniendo 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro o de *splitting* (glicerol 25-170 g/L, KH₂PO₄ 0.9 g/L, K₂HPO₄ 0.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,0 u 8,0). Se llevaron a cabo experimentos adicionales en las mismas condiciones utilizando como medio de reacción agua destilada suplementada únicamente con 50 g/L de glicerol puro y de *splitting* para los inmovilizados en alginato. El inóculo de cada reacción fue 20 mg de peso seco de células inmovilizados en 3 mL de agar, agarosa o alginato al 3% o 1 mL de poliacrilamida al 20%.

Reuso de células inmovilizadas

Las células inmovilizadas fueron reutilizadas hasta 5 veces luego de 20 horas de reacción. Cada vez, las perlas conteniendo las células inmovilizadas fueron colectadas utilizando un colador y lavadas utilizando tampón de lavado o agua destilada en el caso de las perlas de alginato. Luego, las perlas fueron nuevamente agregadas a un matraz de 250 mL conteniendo 30 mL de medio de reacción suplementado con 50 g/L de glicerol de *splitting* o glicerol puro.

Conversiones con extracto celular inmovilizado de G. oxydans

Para obtener el extracto celular de *G. oxydans*, se tomaron pellets conteniendo 20 mg de células y se resuspendieron en 1,5 mL de tampón de lavado. La suspensión celular fue sonicada durante 10 minutos (10 segundos ON, 30 segundos OFF, amplitud 30%). Luego, cada suspensión sonicada se mezcló con 1,5 mL de una solución de agar al 6% o de alginato al 6%. Las perlas se formaron de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos en la sección: Obtención de preparados inmovilizados de *Gluconobacter*. Se llevaron a cabo conversiones control con inmovilizados con células sin sonicar, siguiendo el mismo procedimiento de inmovilización.

Obtención de preparados inmovilizados de ω -transaminasas

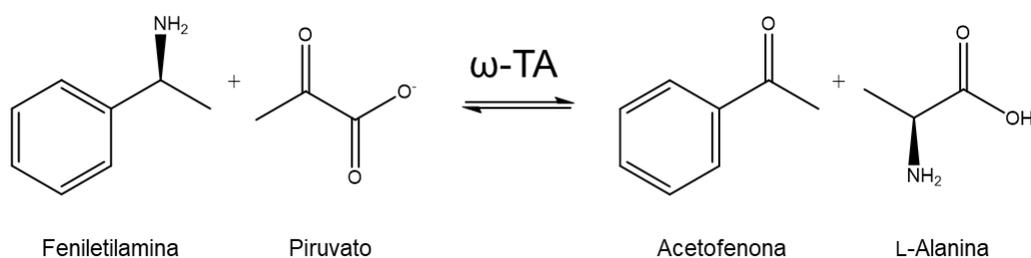
Obtención de extracto crudo de Cv- ω TA y Pf- ω TA

Para el caso de la expresión de la enzima Cv- ω TA de *Chromobacterium violaceum*, se siguió el protocolo reportado por Kaulmann y colaboradores [50]. Por otro lado, la enzima transaminasa de *Pseudomonas fluorescens* (Pf- ω TA) fue clonada y sobre expresada en *E. coli* BL21 transformadas con

el plásmido pET28b_Pf ω TA, donado por el Dr. Fernando López-Gallego [51]. Para ello se realizaron pre-cultivos de *E. coli* BL21 transformada en 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina (0,05 mg/mL). Los pre cultivos se incubaron a 37°C y 180 rpm por 16 horas. Se inocularon 250 mL de medio LB con kanamicina (0,05 mg/mL) con 5 mL de pre cultivo en un matraz de 1 L, que luego se incubó a 37°C y 180 rpm hasta obtener una DO_{600 nm} de 0,6. Se indujo la expresión de la Pf- ω TA agregando 250 μ L de IPTG 1 M e incubando el cultivo a 21°C y 180 rpm por 16 horas. Una vez culminada la expresión se centrifugaron los cultivos a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los pellets bacterianos obtenidos fueron resuspendidos en tampón HEPES 25 mM pH 8,0 suplementado con PLP 1 mM y sonicados durante 5 minutos (10 segundos ON, 30 segundos OFF, amplitud 30%). Luego de sonicar se centrifugó el extracto obtenido a 18.000 rpm durante 1 hora a 4°C y se descartó el pellet.

Medidas de actividad transaminasa

La actividad transaminasa se midió en el siguiente tampón de actividad: HEPES 100 mM pH 8,0, piruvato 2 mM, FEA 2 mM, PLP 1 mM. Para la medida de actividad de extractos crudos, sobrenadantes de inmovilización y preparados inmovilizados en Agarosa IDA-Co²⁺ o CLEAs, se utilizó un lector Infinite M200Pro de Tecan (Männedorf, Suiza) y el análisis de datos se realizó con el software Magellan 7.2 SP1 de Tecan (Männedorf, Suiza). Para cada medida se agregaron 200 μ L de tampón de actividad y 10 μ L de las muestras líquidas o de la suspensión de preparados inmovilizados por pocillo, en placas de 96 pocillos para UV. Las medidas de actividad de las perlas de agar se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 240 V (Kioto, Japón). El volumen del ensayo fue de 2 mL con el agregado de una sola perla de agar. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado. La aparición del producto acetofenona se siguió a 245 nm durante al menos 10 minutos. La reacción de la FEA con el piruvato se puede observar en el Esquema 2.



Esquema 2: Reacción utilizada para llevar a cabo las medidas de actividad de las enzimas TAs.

Una unidad de enzima se definió como los μ moles de producto formado por min y por mL de enzima, mL de soporte o gramo de soporte, en las condiciones descritas anteriormente.

Se determinaron los porcentajes de inmovilización y rendimiento de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Inmovilización} = \frac{UI_{\text{Totales aplicadas}} - UI_{\text{Totales en SBN y lavados}}}{UI_{\text{Totales aplicadas}}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{UI_{\text{Totales expresadas}}}{UI_{\text{Totales aplicadas}} - UI_{\text{Totales en SBN y lavados}}} \times 100$$

Preparación de inmovilizados de Cv- ω TA en perlas de agar

Para inmovilizar la enzima Cv- ω TA dentro de las perlas de agar se comenzó preparando una solución de agar al 6% en una solución de PEI 4%. Se mezclaron 1,5 mL de la solución anterior con 1,5 mL de extracto crudo de Cv- ω TA en presencia de 1 mM de PLP. Se formaron las perlas de agar por goteo en aceite frío y se lavaron con hexano y tampón de lavado. Por otro lado, se preparó una solución de agar al 6% en agua. Se mezclaron 1,5 mL de la solución anterior con 1,5 mL de extracto crudo de Cv- ω TA en presencia de PLP 1 mM. Se formaron las perlas de agar por goteo en aceite frío y se lavaron con hexano y tampón de lavado. Para preparar inmovilizados con la enzima Cv- ω TA inmovilizada por fuera se formaron las perlas de agar por goteo de 3 mL de una solución de agar al 3% en aceite frío, y se lavaron con hexano y tampón de lavado. Se incubaron por 1 hora en 3 mL de una solución de PEI al 2% y se lavaron con agua destilada. Posteriormente se incubaron por 1 hora en una solución diluida al medio del extracto crudo y se guardó el sobrenadante. Se lavaron con 3 mL de tampón de lavado y se guardó el sobrenadante. En los casos que se llevó a cabo un recubrimiento con sílica, luego de preparadas y lavadas, las perlas fueron resuspendidas en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 8,0. Se agregaron 250 μ L de TEOS hidrolizado por mL de tampón y se invirtió el tubo. Luego de la precipitación se lavó con tampón fosfato de sodio 100 mM pH 8,0. Una vez preparados todos los catalizadores se incubó una perla de cada condición en 60 μ L de tampón fosfato de sodio 100 mM pH 8,0 durante 16 horas a 25°C, se analizó el sobrenadante por electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrlamida al 12% y se midió su actividad.

Preparación de inmobilizados de Pf- ω TA en Agarosa-IDA-Co²⁺

Se preparó el soporte Agarosa-IDA-Co²⁺ utilizando como base 100 g de Agarosa-IDA comercial, tratados con una solución de 250 mL de CoSO₄.7H₂O 100 mM durante 1 hora en agitación. Luego de la incubación se lavó el soporte con agua destilada. Para la inmobilización se agregaron 20 o 40 mL de extracto crudo de TA cada 1g de soporte. Se dejó en incubación a 24°C durante 1 hora en agitación. Luego de la incubación se tomó una muestra del sobrenadante de inmobilización, colocando la mezcla en una columna PD10. Se procedió luego a lavar el inmobilizado con tampón HEPES 25 mM suplementado con PLP 0,1 mM. Al finalizar se preparó una suspensión estándar del inmobilizado en el mismo tampón para realizar las medidas de actividad.

Preparación de CLEAs de Pf- ω TA

A 40 mL de extracto crudo de Pf- ω TA (roto en tampón HEPES 20 mM pH 8,0, PLP 1 mM) se le adicionaron 10,8 mL de BSA (100 mg/mL en agua). Se homogeneizó la solución por agitación con palas y se adicionaron 340 mL de acetona con una agitación de 240 rpm, durante 1 minuto. Se agregaron 20 mL de una solución de glutaraldehído 100 mM recién preparada en tampón HEPES 100 mM pH 8,0. Se homogeneizó la mezcla con palas por 30 minutos. Luego, la mezcla fue centrifugada por 5 minutos a 5.000 rpm. El sobrenadante (mayoritariamente solvente) se descartó y se dividió el pellet obtenido en 4 tubos de 50 mL. Cada fracción del pellet se resuspendió en 40 mL de tampón HEPES 20 mM pH 8,0, PLP 1 mM. La suspensión se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó cuatro veces el pellet resultante nuevamente, con 20 mL de tampón HEPES 20 mM pH 8,0, PLP 1 mM. Se preparó una solución estándar para medir actividad en tampón HEPES 25 mM pH 8.

Conversiones de glicerol a piruvato y serinol

Conversión de DHA con Pf- ω TA inmobilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺

Se llevó a cabo una conversión de 50 g/L de glicerol puro a DHA por *G. oxydans* inmobilizado en agar como se describe en el apartado: Obtención de preparados inmobilizados de *Gluconobacter*. Una vez culminada la reacción, se cuantificó por HPLC la DHA obtenida. Se preparó un tampón de reacción HEPES 25 mM pH 8, PLP 1 mM, L-alanina 0,5 M, suplementado con 20 mM de la DHA producida previamente por *G. oxydans*. Se agregaron 4,2 UI de Pf- ω TA inmobilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺. La

reacción se llevó a cabo en un volumen de 0,6 mL en un tubo de 1,5 mL, a 30°C y 180 rpm durante 24 horas.

*Conversión de glicerol a DHA por *G. oxydans* en el tampón de actividad de la enzima*

Se probó la conversión de glicerol a DHA por parte de células en reposo de *G. oxydans* en el tampón de actividad de la enzima Pf- ω TA. La composición del mismo para este ensayo fue: HEPES 25 mM, pH 8,0, L-alanina 0,5 M, PLP 1 mM, glicerol 50 g/L. La reacción se llevó a cabo en 3 mL en un matraz de 25 mL, con 2 mg de *G. oxydans*. Se incubó el matraz a 30°C y 180 rpm por 24 horas. Los resultados de la conversión fueron analizados por HPLC.

*Implementación de la cascada en formato one-pot con células en reposo de *G. oxydans* y Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺*

La reacción fue llevada a cabo en 3 mL de tampón HEPES 25 mM, pH 8,0, PLP 1 mM, L-alanina 0,5 M y glicerol puro 50 g/L. El matraz conteniendo el medio de reacción, 2 mg de peso seco de *G. oxydans* y 20,4 UI totales de Pf- ω TA se incubaron a 30°C y 180 rpm, durante 24 horas. Se tomó una muestra al finalizar la reacción y se analizó por HPLC.

*Ensayo de consumo de piruvato por *G. oxydans**

Se agregaron 2 mg de peso seco de células a 3 mL de tampón HEPES 25 mM pH 8, PLP 1 mM, L-alanina 0,5 M suplementado con 50 g/L de glicerol puro y 0,7 g/L de piruvato. La reacción se llevó a cabo en un matraz de 25 mL, que fue incubado a 30°C y 180 rpm durante 44 horas. Se tomaron muestras a las 20 y 44 horas de reacción y se analizaron por HPLC.

Implementación de sistema continuo

Empleando una bomba de jeringa y dos columnas de plástico se construyó un reactor con dos módulos. En cada módulo se empacó un catalizador, perlas de agar conteniendo *G. oxydans* o Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺. En el primer módulo se empacaron 12 perlas de agar, con un total de 5 mg de *G. oxydans* inmovilizado en agar. En el segundo módulo se empacaron 10 UI de Pf- ω TA inmovilizada. El medio de reacción utilizado fue tampón HEPES 50 mM, pH 8,0, PLP 1 mM, L-alanina 1,5 M, glicerol puro 25 g/L. El flujo utilizado fue de 0,09 mL/h. Antes de comenzar a tomar muestras, se equilibró el reactor con el medio de reacción durante 24 horas. El ensayo se realizó a 25°C. Luego de 48 horas se midió la actividad remanente de la enzima Pf- ω TA inmovilizada.

Preparado de co-inmovilizados de G. oxydans y Pf- ω TA

Para preparar los inmovilizados se tomaron 2 mg de *G. oxydans* y 500 mg de Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺ (equivalente a 37 UI totales) y se colocaron en un tubo junto con 50 μ L de agua destilada. A la mezcla se le agregaron 300 μ L de agar al 3% o de alginato al 3%. Se mezcló la suspensión y se prosiguió en la inmovilización tal como se describió anteriormente en el apartado: Obtención de preparados inmovilizados de *Gluconobacter*.

Implementación de la cascada en formato one-pot con los preparados co-inmovilizados

La reacción fue llevada a cabo en 3 mL de tampón HEPES 25 mM, pH 8,0, PLP 1 mM, L-alanina 0,5 M y glicerol puro 50 g/L. El matraz conteniendo el medio de reacción y los preparados inmovilizados en alginato con *G. oxydans* y Pf- ω TA se incubaron a 30°C y 180 rpm, durante 44 horas. Se tomaron muestras a las 20 y 44 horas de la reacción y se analizaron por HPLC y GC.

Análisis de muestras

HPLC

Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se filtró cada muestra con un filtro de 0,22 μ m tratado con polivinilpirrolidona (PVP) al 2% para inertizar la superficie y se procedió a su análisis por HPLC. La concentración de GA, DHA, glicerol y piruvato presente en las muestras fue analizada utilizando un equipo de HPLC Shimadzu Nexera X2 (Kioto, Japón), con un detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue Aminex® HPX-87C 300 x 7.8 mm de Bio-Rad (California, EEUU), con una pre columna con cartuchos SecurityGuard™ 4 x 3.0 mm para columnas Carbo-H de Phenomenex (California, EEUU). La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 5 mM. La detección se llevó a cabo a 70°C a 210 nm para el GA, 271 nm para la DHA y 190 nm para el glicerol y piruvato, con un flujo de 0,6 mL/min durante 19 minutos. Los tiempos de retención registrados fueron: GA (13,7 min), DHA (16,7 min), glicerol (14,7 min), piruvato (9,1 min) (Figura A1). Cada inyección fue de un volumen de 20 μ l. Se construyeron curvas de calibración para GA (0,15 – 10 g/L), DHA (0,15 – 5 g/L), glicerol (0,15 – 20 g/L) y piruvato (0,06 – 2,4 g/L) (Figura A2). Las muestras fueron analizadas utilizando el software LabSolutions de Shimadzu (Kioto, Japón).

GC-FID

Las muestras fueron derivatizadas antes de su análisis. Cada vez, se colocaron 30 μ L de muestra en un tubo de 1,5 mL y se añadieron 30 μ L de *N*-metilimidazol (NMIM). Se añadieron luego 225 μ L de anhídrido acético y se dejó reaccionar durante 5 minutos a 25°C. Se adicionaron 300 μ L de agua mQ y se extrajeron los éteres con 300 μ L de diclorometano. Se descartó la fase acuosa y se secó la fase orgánica con 30-40 mg de MgSO₄ anhidro. Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 7890 series II (California, EEUU) utilizando una columna de fenil silicona 5,5% (Zebron ZB-5HT Inferno 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), helio como fase móvil y un detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector fue de 210°C y la del detector fue de 250°C. La temperatura inicial fue de 140°C, se mantuvo durante 2 minutos y luego se llevó a cabo una rampa hasta 240°C a 20°C/min y finalmente se mantuvo por 2 minutos. Se construyó una curva de calibración para el serinol (0,07 – 4,5 g/L) (Fig. A2). El tiempo de retención que presentó el compuesto fue de 5,6 min (Fig A1). Se analizaron estándares de glicerol puro y DHA por esta técnica y se obtuvieron tiempos de retención de 4,2 y 3,3 minutos, respectivamente.

GC-MS

Los ensayos de GC-MS fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Fernando López-Gallego (Universidad de Zaragoza). Las condiciones de separación fueron las mismas que las descritas en el apartado GC-FID, cambiando el detector por un espectrómetro de masas. El espectrómetro de masas utilizado fue un Bruker MicroTof-Q (Massachusetts, EEUU). El análisis se realizó con un delay de 3 minutos. El tiempo de retención que presentó el serinol en este equipo fue de 5,3 min. (Figura A1).

RMN

Los análisis por RMN fueron llevados a cabo por la empresa Vis Magnetica Scientific Solutions. Las muestras fueron preparadas disolviendo 50 μ L de muestra en 540 μ L de D₂O y fueron transferidas a un tubo de RMN de 5 mm. Los espectros de RMN de ¹H fueron adquiridos en un equipo Bruker Avance DPX-400 (Massachusetts, EEUU) a una frecuencia de 400,13 Mhz, una ventana espectral de 8.27 KHz, utilizando un pulso de 90° de 8,50 μ s, un tiempo de adquisición de 3 segundos y un tiempo de espera de relajación de 57 segundos. Típicamente 16 escanes fueron adquiridos por muestra. Luego los espectros fueron procesados utilizando el Software TopSpin 4.0.2 de Bruker (Massachusetts, EEUU) con una ventana de apodización exponencial de 0.3 Hz.

Microscopía confocal

La distribución del cofactor PLP en los preparados inmovilizados fue analizada en el laboratorio del Dr. Fernando-López-Gallego (Universidad de Zaragoza). Se utilizó un microscopio confocal ZEISS LSM510 (Oberkochen, Alemania). Se utilizó un objetivo 10X y se excitó la muestra con un láser UV a 405 nm. El filtro de emisión utilizado fue LP420. Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ desarrollado por los Institutos Nacionales de la Salud (Maryland, EEUU).

Todos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado y al menos dos veces de manera independiente.

CAPÍTULO 1:

Conversiones de glicerol a DHA y GA con células en reposo

CAPÍTULO 1: Conversiones de glicerol a DHA y GA con células en reposo

Introducción

Considerando la problemática que genera el excedente de glicerol en la industria del biodiesel, ya planteada en la Introducción general, en este trabajo de Tesis se plantea la revalorización de este subproducto via reacciones de biotransformación. En una primera instancia se abordó la reacción de transformación del glicerol a dos productos de mayor valor agregado: la dihidroxiacetona (DHA) y el ácido glicérico (GA)

Dihidroxiacetona (DHA)

La DHA (1,3-dihidroxi-2-propanona, $C_3H_6O_3$) es una cetotriosa que se produce en la remolacha azucarera y la caña de azúcar como producto de la oxidación del glicerol [46]. Su peso molecular es de 90,08 g/mol y su punto de fusión se encuentra entre los 75 y 80°C. Es un polvo blanco, higroscópico con sabor dulce y refrescante, y aroma característico. Es el representante más simple de las cetosas conocidas, no posee centros quirales ni muestra actividad óptica [52].

En el año 1970, la DHA fue incluida por la *Food serinoDrug Administration* (FDA) en la lista de componentes cosméticos permitidos [53]. Es ampliamente conocida y utilizada como agente bronceante ya que en contacto con la piel cambia su color a una tonalidad marrón. Este cambio de coloración resulta de una reacción de la DHA con grupos de aminoácidos libres de arginina que ocurre en la cutícula [52]. La DHA no solo encuentra usos en la cosmética, sino que también en la dermatología como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades como la Leucoderma y la Porfiria variegata [53]. También oficia como materia prima para la producción de sustancias químicas de importancia desde el punto de vista industrial, tales como el 1,2-propilenglicol, el ácido láctico, el metotrexato, algunos tensioactivos, etc [46]. A su vez, la DHA puede ser utilizada como donador en reacciones de síntesis química utilizando aldolasas, para la construcción estereoselectiva de enlaces C-C [54].

La DHA puede ser sintetizada por métodos químicos o biotecnológicos [41]. La síntesis química puede proceder a través de la oxidación catalítica de glicerol o condensación de formaldehído con carbonato

de calcio. Tal proceso de transformación de glicerol a DHA procede de un modo no homogéneo, adicionalmente resulta en la formación de compuestos complejos y difíciles de eliminar, y el rendimiento de reacción no es satisfactorio [53].

Por otra parte, los métodos biotecnológicos consisten generalmente en la oxidación parcial de glicerol a DHA mediante cepas seleccionadas de bacterias de ácido acético como *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter melanogenus*, y *Acetobacter xylinum*. Estas cepas se caracterizan por presentar una alta actividad de glicerol deshidrogenasa, la enzima que cataliza esa reacción [55]. La oxidación del glicerol por las bacterias del ácido acético puede darse por dos vías resultando en la producción de DHA. La primera vía ocurre en ausencia de adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), procede a pH 6,0. La única enzima que cataliza esa reacción es la glicerol deshidrogenasa ubicada en la membrana y genera como producto la DHA [56]. La segunda vía de transformación de glicerol ocurre a pH 8,5 y requiere la presencia de ATP, NAD, iones Mg^{2+} y de la enzima glicerol quinasa. En un primer paso, el glicerol es convertido en glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol quinasa y luego es oxidado a la forma fosforilada de la DHA, DHAP, por una deshidrogenasa dependiente de NAD [53]. La DHAP luego es metabolizada para la producción de biomasa [56]. La cepa más ampliamente estudiada para la producción de DHA es *Gluconobacter oxydans* [46]. Cabe destacar que desde el año 1998, la empresa Merck cuenta con una patente para la preparación de DHA utilizando *G. oxydans* en crecimiento [57].

Ácido glicérico (GA)

El GA (ácido 2,3-dihidroxi propiónico, $C_3H_6O_4$) se encuentra naturalmente como un componente fitoquímico en una gran variedad de plantas, tales como maní, alcachofa, manzana, banana y uva, aunque las composiciones enantioméricas y sus concentraciones permanecen desconocidas [46]. El GA también está presente en el cuerpo humano como un metabolito, formado como un producto de la ruptura de la fructosa. A su vez, sus derivados fosfato son intermediarios importantes en la vía glicolítica. Con excepción de pocas propiedades como su peso molecular de 106,08 g/mol, su pKa de 3,5, y su completa miscibilidad en agua, los datos sobre las propiedades fisiológicas y químicas del GA son escasos [58].

Existen varias patentes que implican la aplicación de GA como materia prima para productos químicos, farmacéuticos y cosméticos. En particular, se ha reportado que este compuesto y sus derivados presentan actividad biológica, estimulando la actividad colessterolítica en perros y acelerando la

eliminación de etanol y la oxidación del acetaldehído en ratas [42]. A su vez, se ha reportado que la utilización de GA como monómero o co-monómero con otros ácidos hidrocarboxílicos resulta en polímeros que pueden ser aplicables como sistemas de *delivery* drogas [58]. El GA también está siendo estudiado como material de partida para la preparación de tensioactivos que pueden ser utilizados en la industria textil para el acondicionamiento verde de telas [58]. De todas formas, el GA no es producido a granel, probablemente debido a que todavía no se han desarrollado un número considerable de aplicaciones para este producto químico. Sin embargo, la molécula de GA, con tres grupos funcionales, parece tener un enorme potencial como un químico que agrega valor al glicerol, además de ser comercializada a un precio elevado [42].

Al igual que la DHA, el GA puede sintetizarse químicamente y mediante biocatálisis. Químicamente el GA se sintetiza por oxidación selectiva del grupo alcohólico primario del glicerol por catalizadores heterogéneos de paladio (Pd), platino (Pt) y oro (Au) soportados sobre carbono [46]. La quimioselectividad de los catalizadores es importante ya que la oxidación del grupo alcohol primario del glicerol produce GA, mientras que la oxidación del grupo alcohol secundario forma la DHA. La mejor quimioselectividad se logra en condiciones básicas y en presencia de catalizadores de Au o Pd. La síntesis química no es la ruta preferida para la producción de GA, ya que el proceso no es favorable al medio ambiente, produciéndose altas concentraciones de ácidos inorgánicos como subproductos [46].

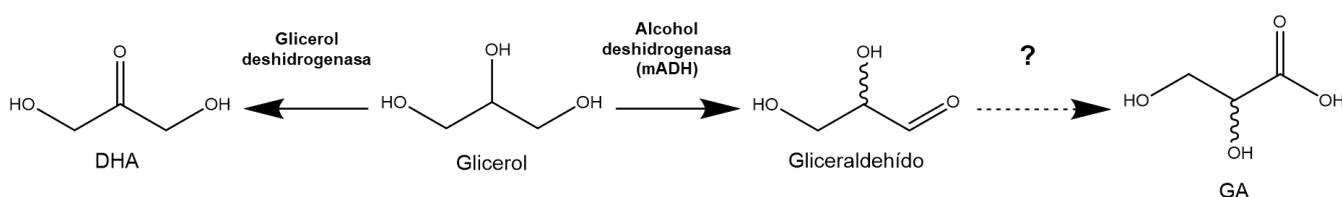
La biosíntesis de GA se produce por oxidación aeróbica del glicerol por bacterias pertenecientes a la familia del ácido acético. Estas son *Gluconobacter* y *Acetobacter* [46]. El GA fue originalmente conocido como un subproducto de la producción de DHA a partir de glicerol por *Gluconobacter oxydans*, pero poco trabajo se ha centrado en la producción biotecnológica de GA como un compuesto objetivo [58]. La bioquímica de la producción de GA no ha sido estudiada en detalle hasta ahora. Sin embargo, está reportado que uno de los primeros pasos de la conversión de glicerol a gliceraldehído, para su posterior transformación a GA, está catalizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (mADH) [59]. Sato y colaboradores han observado que una delección en el gen *adhA* (que codifica para la enzima mADH) en una cepa *G. oxydans* resulta en una pérdida total en la producción de GA por parte de esta bacteria, indicando que es una enzima clave en la vía de síntesis de GA [59]. La síntesis química de GA siempre produce una mezcla racémica de D y L-GA, mientras que la síntesis biológica preferentemente produce la forma D en exceso enantiomérico sobre la forma L [46]. Un estudio de

Habe y colaboradores ha demostrado que *Gluconobacter frateurii* es una de las cepas con mayor potencial para la producción de D-GA, presentando un exceso enantiomérico del 72% [42]. También se han obtenido buenos rendimientos utilizando *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 [58].

El género *Gluconobacter*

Las bacterias del género *Gluconobacter* pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*. Linajes de *Gluconobacter* han sido aislados de flores, tierra de jardín, miel de abeja, frutas, sidra, cerveza, vino y vinagre de vino [60]. Las especies del género *Gluconobacter* han mostrado no tener efectos patogénicos ni para el hombre ni para otros animales [61]. Este género está constituido por bacterias del ácido acético con forma de bastones, Gram negativas, que no forman endosporas. Son catalasa positivas, oxidasa negativas, no reducen nitrato, no producen indol, ni forman H₂S [61]. Poseen un metabolismo estrictamente respiratorio, con oxígeno como aceptor final de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 25 y 30°C y su pH óptimo se encuentra entre 5,5 y 6,0 [61].

Al igual que múltiples especies de bacterias del ácido acético, las bacterias del género *Gluconobacter* se destacan por el gran número de alcohol y aldehído deshidrogenasas de membrana que poseen, permitiendo la oxidación incompleta de carbohidratos y alcoholes a aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos [62]. A su vez, los productos de oxidación son secretados casi completamente al medio [62]. Es por esta razón que este género es de gran importancia en la industria para la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol, ácido D-glucónico, ácido 5-ceto- y 2-cetoglucónico a partir de D-glucosa; y DHA y GA a partir de glicerol, entre otros [61]. Las vías para la formación de DHA y GA a partir de glicerol se observan en el Esquema 3.



Esquema 3: Vías para la formación de GA y DHA a partir de glicerol por *Gluconobacter spp.* La flecha discontinua indica una reacción enzimática no identificada en la formación de GA.

La oxidación del glicerol para obtener DHA es catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa [47]. Esta enzima forma parte de un grupo de deshidrogenasas presentes en la membrana interna de las bacterias del ácido acético [63]. El sitio activo de estas enzimas está orientado hacia el espacio

periplásmico, por lo que no es necesario el transporte de sus sustratos hacia el interior de la célula [64]. En particular, esta enzima es una quinoproteína, es decir que es dependiente del cofactor Pirroloquinolina quinona (PQQ), que actúa junto a la ubiquinona para acoplar la oxidación de los sustratos de la enzima con la cadena respiratoria [63]. Por otro lado, el GA es obtenido mediante dos oxidaciones secuenciales. En un primer paso, la enzima mADH oxida el glicerol a gliceraldehído, mientras que en un segundo paso este último es oxidado a ácido glicérico. El catalizador involucrado en el segundo paso de la vía aún no ha sido elucidado. Al igual que la enzima glicerol deshidrogenasa, la mADH es también parte del grupo de deshidrogenasas de membrana presentes en bacterias del ácido acético. Esta enzima está comprendida por tres subunidades distintas: la unidad deshidrogenasa mayor, un citocromo c y otra subunidad pequeña, de 15 kDa, que posiblemente tenga una función de estabilización estructural de la enzima [65], [66].

La conversión microbiológica del glicerol crudo a DHA y GA requiere de cepas bacterianas que resistan los contaminantes presentes en el mismo. Frecuentemente este producto de descarte contiene una cantidad considerable de metanol, ya que este es uno de los alcoholes más frecuentemente utilizados durante la transesterificación de grasas y aceites para la producción de biodiesel [67]. A su vez, suele presentar otras impurezas como ácidos grasos, sales inorgánicas, jabón, cenizas o polioles [38], [41]. Existen en la bibliografía varios reportes de la síntesis de DHA y GA por bacterias del género *Gluconobacter*, muchas de ellas utilizando glicerol crudo como sustrato [46], [59].

Considerando los resultados recopilados por Khanna y colaboradores en su trabajo de revisión [46], en esta Tesis se seleccionaron tres cepas de *Gluconobacter* por su gran capacidad de conversión de glicerol a los productos de interés y por su potencial capacidad de llevar a cabo esta transformación utilizando glicerol crudo.

En primer lugar se seleccionó la cepa *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819, también denominada NCIB 9013, aislada de cerveza [68]. Se encuentra reportado por Habe y colaboradores que esta cepa es una buena productora de DHA a partir de glicerol puro, alcanzando una concentración de 108,2 g/L de este producto luego de 4 días de fermentación [69]. Cabe destacar además que los reportes previos de esta cepa en condiciones de crecimiento indican que la producción de GA, el producto alternativo de oxidación, es muy baja (1,4 g/L en 4 días) [69]. Esto resulta ventajoso considerando una posible aplicación de esta cepa en reposo, pudiendo obtener un producto final con menos contaminantes.

Para la producción de GA se obtuvieron dos cepas de *Gluconobacter* distintas, *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 y *Gluconobacter sp.* NBRC 3259. La cepa tipo *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, denominada también IFO 3264, fue aislada de fruta fermentada [70], [71]. Esta cepa fue reportada en varias ocasiones como una buena productora de GA en condiciones de crecimiento por Habe y colaboradores, a partir tanto de glicerol puro como crudo [42], [59], [65]. Partiendo de glicerol puro, experimentos realizados por Habe y colaboradores en un fermentador de 5 litros con sistema *fed-batch* de glicerol, aireación y control de pH alcanzaron 136,5 g/L de GA utilizando células en crecimiento [42]. El exceso enantiomérico de D-GA fue de 72% [42].

Se adquirió además la cepa *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 (IFO 3259) para la producción de GA. Anteriormente conocida como *Acetobacter pasteurianus* o *Acetobacter orleanens*, esta cepa fue aislada de flores de dalia [72]. Habe y colaboradores reportan una producción de 45,9 g/L de GA a partir de 174 g/L de glicerol crudo tratado con carbón activado luego de 4 días de incubación, con un exceso enantiomérico de D-GA de 77% [69].

La conversión enantioselectiva de ambas cepas resulta interesante ya que el GA es principalmente utilizado en química fina como bloque de construcción [38], [59]. Cabe destacar que tanto *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 como *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 son también cepas productoras de DHA [46], [59].

La conversión de glicerol por cepas de *Gluconobacter* frecuentemente se encuentra reportada para células en crecimiento [46]. Como se mencionó anteriormente, al trabajar con microorganismos en crecimiento se generan reacciones secundarias y por ende productos no deseados. Es por esta razón que es necesario minimizar la ocurrencia de este tipo de reacciones. Una forma de minimizar estas reacciones es trabajar con células en reposo [12]. Actualmente, existen pocos reportes en la literatura de la utilización de células de *Gluconobacter* en reposo en la síntesis de los compuestos de interés [66].

Las conversiones con células en reposo pueden llevarse a cabo con las mismas libres en suspensión o inmovilizadas. Sin embargo, estudios previos de la conversión de glicerol con células en reposo libres son fundamentales para establecer algunas condiciones de inmovilización del biocatalizador y parámetros de comparación con las cepas inmovilizadas.

Reportes previos demuestran que la conversión de glicerol a DHA y GA por bacterias del género *Gluconobacter* se ve afectada por el pH, la aireación, la agitación y la fuente de nitrógeno [46], [73]. Estudiar cómo afectan estos parámetros a las bacterias es de gran importancia para desarrollo del proceso. Por esta razón, en este capítulo se realizaron una serie de ensayos con el fin de estudiar condiciones para obtener máximas conversiones de glicerol a los productos de interés y así poder seleccionar las mejores cepas para su posterior inmovilización.

Resultados y discusión

Con el fin de determinar cuál cepa de *Gluconobacter* presenta una mayor capacidad de conversión de glicerol a dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA), se realizaron una serie de experimentos utilizando glicerol puro como sustrato. Las cepas en estudio fueron *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 (*Gluconobacter sp.*) y *G. frateurii* NBRC 13465 (*G. frateurii*) y *G. oxydans* NBRC 14189 (*G. oxydans*).

Conversiones de glicerol puro por células en reposo libres

En esta primera etapa las reacciones de conversión de glicerol por células en reposo se realizaron en tampón suplementado con 50 g/L de glicerol puro a 30°C y 180 rpm. Para todas las cepas se determinó el mejor estadio de crecimiento para colectar las células para las posteriores reacciones de conversión. Se determinó en todos los casos que al alcanzar un valor de OD_{600 nm} de 1, correspondiente con la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se obtienen los mejores rendimientos de conversión de glicerol a los productos esperados (Figura 4).

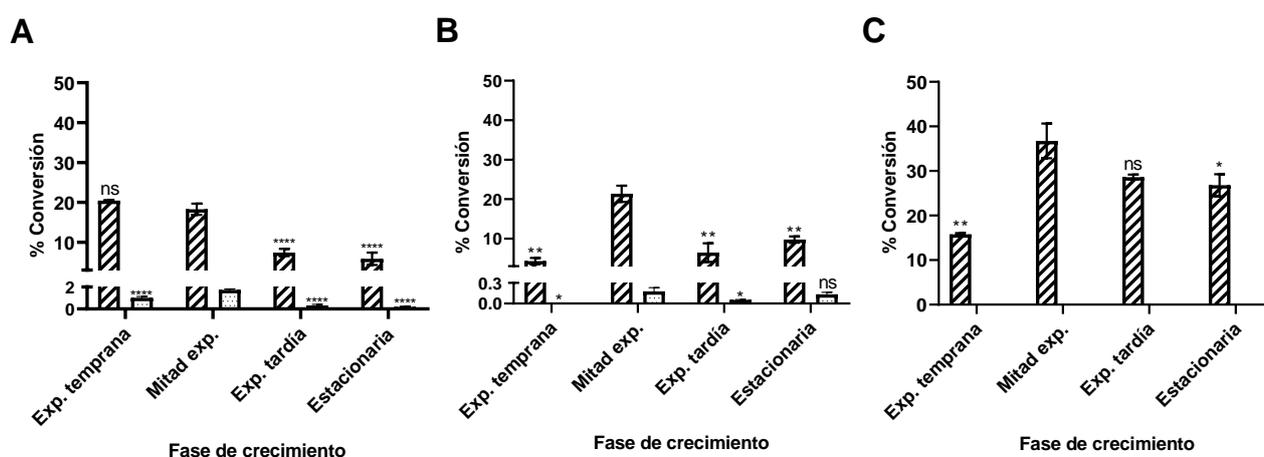


Figura 4: Conversión de glicerol puro a DHA y GA luego de 20 horas, utilizando células en reposo colectadas en diferentes estadios del crecimiento celular. A) *G. frateurii*. B) *Gluconobacter sp.* C) *G. oxydans*. DHA (rayas), GA (puntos). Diferencias significativas entre los valores obtenidos para la fase mitad exponencial y las otras fases de crecimiento son representadas con asteriscos. **** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,076$; * = $p < 0,0493$, ns = no se encontró diferencia significativa.

Dado que tanto el GA como la DHA son metabolitos primarios, se esperaba que su mayor producción se diera durante esta etapa del crecimiento [74]. En esta primera instancia se observó que *G. frateurii* y *Gluconobacter sp.* son cepas productoras tanto de GA como de DHA, tal como se ha reportado

previamente en la literatura [46]. Por su parte, *G. oxydans* produce exclusivamente DHA a partir de glicerol.

Se estudió además el efecto de distintos pHs iniciales en la reacción de conversión de 50 g/L de glicerol puro (Figura 5). A partir de los resultados obtenidos luego de 50 horas de reacción, se seleccionaron los pHs iniciales 8,0 y 6,0 para las cepas *G. frateurii* y *Gluconobacter sp*, respectivamente. Para el caso de *G. frateurii*, el análisis estadístico de los resultados determinó que no existen diferencias significativas en la producción de GA a los pHs iniciales 6,0, 7,0 y 8,0 (Figura 5A). Teniendo en cuenta que las reacciones son llevadas a cabo en *batch* y sin control de pH, y que el producto en cuestión es un ácido orgánico, se seleccionó el pH inicial más elevado en el que se obtuvo máxima conversión a GA, pH 8,0 ($4,8 \pm 0,1\%$). Esto se determinó con el fin de mantener a la bacteria en un entorno de pH entre 6,0 y 8,0 durante la reacción, ya que se observó que a pHs más bajos la producción de GA se ve afectada.

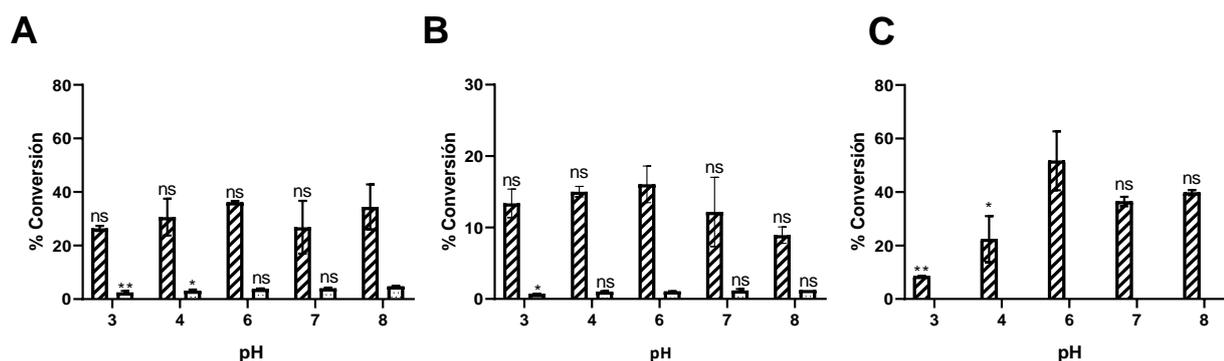


Figura 5: Conversión de glicerol puro a DHA y GA, a distintos pHs iniciales, luego de 50 horas de reacción. A) *G. frateurii*. B) *Gluconobacter sp.* C) *G. oxydans*. DHA (rayas), GA (puntos). Diferencias significativas entre los valores obtenidos para el pH 8,0 inicial en A) y el pH 6,0 inicial en B) y C) con el resto de los pHs iniciales ensayados son representadas con asteriscos. ** = $p < 0,066$; * = $p < 0,0415$, ns = no se encontró diferencia significativa.

Por otra parte, se observó que, a las 50 horas de reacción, la conversión de glicerol a GA por *Gluconobacter sp.* fue inferior a la de *G. frateurii* en todos los casos (Figura 5C). Teniendo en cuenta que *Gluconobacter sp.* mostró una conversión considerable de glicerol a DHA, se tomó la decisión de seleccionar un pH inicial en el que se viera favorecida la producción de este metabolito. Debido a que no se encontraron diferencias significativas a nivel estadístico en la producción de DHA a los pHs iniciales 6,0, 7,0 y 8,0 y considerando el pH óptimo de la bacteria, se seleccionó el pH 6,0 inicial para

llevar a cabo la producción de DHA por parte de *Gluconobacter sp.* En estas condiciones se obtuvo una conversión de glicerol a DHA del $16,1 \pm 2,6\%$.

Para el caso de *G. oxydans*, nuevamente se volvió a observar que no existen diferencias significativas en la producción de DHA a los pHs iniciales 6,0, 7,0, y 8,0 (Figura 5C). Aplicando el mismo criterio utilizado para *Gluconobacter sp.* se seleccionó el pH 6,0 inicial. En estas condiciones la conversión de glicerol a DHA por *G. oxydans* fue del $51,7 \pm 1,0\%$.

Con el fin de aumentar las productividades se incrementó el inóculo celular 10 veces. En los tres casos la producción tanto de GA como de DHA aumentó con el incremento de inóculo luego de 20 horas de reacción. En las condiciones del experimento, la mejor cepa productora de GA fue *G. frateurii*, obteniendo un $9,3 \pm 0,4\%$ de conversión al producto frente a un $6,9 \pm 0,1\%$ obtenido por *Gluconobacter sp.* A su vez, en estas condiciones la producción de DHA por parte de *G. frateurii* fue menor que la de *Gluconobacter sp.* Considerando que el objetivo final es obtener compuestos puros, una menor producción de DHA por parte del microorganismo es ventajosa a la hora de la purificación. En el caso de *G. oxydans* también existe un incremento sustancial en la producción de DHA, alcanzando un porcentaje de conversión del $91,4 \pm 16,0\%$ en 20 horas.

Para los siguientes experimentos se decidió acotar el número de cepas en estudio. Se seleccionó *G. frateurii* como cepa productora de GA y *G. oxydans* como cepa productora de DHA. Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que para el caso de *G. frateurii*, luego de 45 horas solo se obtiene una conversión total del glicerol agregado cuando se parte de una concentración de 25 g/L. Por otro lado, en el caso de *G. oxydans* se observó que en 45 horas era posible convertir en su totalidad 50 g/L de glicerol. Considerando estos resultados, los siguientes experimentos con células en reposo se llevaron a cabo con dichas concentraciones iniciales de glicerol.

Conversiones de glicerol de splitting por células en reposo libres

Se estudió la conversión en las condiciones previamente seleccionadas, pero utilizando glicerol crudo de calidad *splitting* como sustrato para las células en reposo (Figura 6). Se observó para el caso de *G. frateurii* una disminución en la producción de GA cuando se sustituye el glicerol puro por el glicerol de *splitting*. Luego de 45 horas, utilizando glicerol de *splitting* como sustrato se obtuvo una conversión del $3,3 \pm 0,2\%$ frente a un $9,1 \pm 0,1\%$ obtenido con el glicerol puro. Esto puede deberse a una inhibición de la enzima mADH por parte del metanol presente en el glicerol de *splitting*, fenómeno previamente reportado por Sato y colaboradores [59]. En el mismo trabajo, los autores observan además un

incremento en la producción de DHA por *G. frateurii* al utilizar glicerol crudo como sustrato [59]. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que no existen diferencias en la producción de DHA por parte de este microorganismo a partir de glicerol de *splitting*, en comparación con los resultados obtenidos con glicerol puro. La producción de DHA por parte de *G. oxydans* no se ve afectada por la presencia de los contaminantes del glicerol de *splitting*, obteniéndose luego de 45 horas una conversión cuantitativa de los 50 g/L de glicerol adicionado, partiendo de ambos tipos de glicerol.

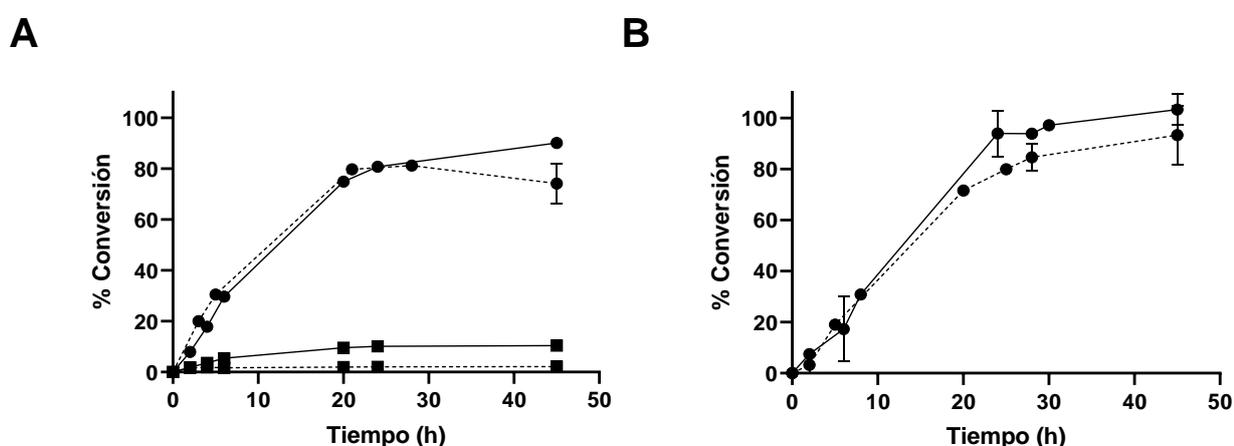


Figura 6: Producción de DHA y GA durante 45 horas partiendo de glicerol de *splitting* y puro. A) *G. frateurii*, B) *G. oxydans*. Productos obtenidos a partir de glicerol de *splitting* (línea discontinua), productos obtenidos a partir de glicerol puro (línea continua). DHA (círculo), GA (cuadrado).

Luego de la de conversión se tomaron muestras para llevar a cabo un análisis por espectroscopía ^1H -RMN de los sobrenadantes de reacción. Se analizaron también muestras de los tiempos iniciales de las reacciones por esta metodología. La finalidad de estos ensayos no solamente fue identificar los compuestos producidos por las cepas de *Gluconobacter*, sino también permitir identificar posibles contaminantes presentes de antemano en el glicerol de *splitting*. El análisis de los espectros ^1H -1D correspondientes a las muestras de tiempos iniciales de reacción presentó señales concordantes con la presencia de glicerol, metanol y en menor medida ácidos grasos, etanol y acetato (Figuras A3 y A4). Estos resultados confirman nuevamente la presencia de los contaminantes reportados por la empresa ALUR en el documento de especificación de material entregado junto con el producto.

Con respecto al sobrenadante de reacción de *G. oxydans* obtenido luego de 45 horas, el espectro ^1H -1D presenta señales que se corresponden con la presencia de DHA (76,9%), glicerol (5,7%) y metanol (17,5%). Estos resultados confirman que este microorganismo solamente produce DHA a partir de glicerol, ya que no se observa ninguna señal concordante con la presencia de GA (Figura A5). La señal obtenida para la DHA constó de dos singuletes a 4,405 y 3,563 ppm, lo que no concuerda con la estructura del compuesto en su forma monomérica. Para corroborar este resultado se analizó un estándar y se comparó el espectro obtenido con los espectros de las muestras analizadas, a la vez que se comparó con espectros de referencia de ^1H -RMN de DHA disponibles en *The Human Metabolome Database (HMDB)*. En todos los casos se observaron dos singuletes a 4,405 y 3,563 ppm. La DHA en solución acuosa puede encontrarse en forma de dímero, en equilibrio con el monómero de DHA. A su vez, al disociarse este dímero, se obtiene tanto la forma cetona como la forma diol geminal [75]. Estos equilibrios podrían explicar el espectro de RMN obtenido para este compuesto.

Para el caso de *G. frateurii*, el análisis del sobrenadante de reacción luego de 45 horas presentó un espectro ^1H -1D en el que se logró identificar la presencia de DHA (63,2%), glicerol (22,1%), metanol (14,4%) y ácido glicérico (3,2%) (Figura A6).

Se realizó además un análisis adicional con el fin de determinar si la DHA producida se encontraba fosforilada, lo que sería indicativo de que el glicerol puede estar ingresando a la vía metabólica alternativa, para la producción de biomasa [56]. El espectro ^{31}P -1D de las muestras mostró un solo pico entre 0-1 ppm que es consistente con el P presente en el tampón de reacción, por lo que se puede concluir que la DHA producida por los microorganismos no se encuentra fosforilada.

Los resultados de RMN confirmaron la identidad de los compuestos previamente analizados por HPLC y permitieron constatar que no existen otros contaminantes en el medio de reacción, al menos en cantidades considerables, más que los previamente detectados en el glicerol de *splitting*. Con estos resultados se logra justificar el uso de las células en reposo como catalizadores en la síntesis de DHA y GA.

Estrategias para el aumento de la productividad

Considerando que la capacidad de conversión de glicerol de ambas cepas en estudio se mantuvo aún en presencia de los contaminantes del glicerol de *splitting*, se estudió además la posibilidad de utilizar las células en un proceso *fed-batch*. Dadas las bajas productividades de GA por parte de *G. frateurii* partiendo de glicerol de *splitting*, el ensayo se focalizó solamente en la producción de DHA por parte

del microorganismo. Habiendo partido de 50 g/L (*G. oxydans*) o 25 g/L (*G. frateurii*) de glicerol de *splitting*, se observó un leve aumento en la cantidad de DHA producida por ambas cepas luego del agregado del primer pulso de este sustrato, a las 24 horas de reacción. Los pulsos de glicerol fueron de 25 g/L para *G. frateurii* y de 50 g/L para *G. oxydans* (Figura 7). Sin embargo, luego del agregado de sucesivos pulsos de glicerol no se observó un aumento de la producción de DHA en ninguno de los casos.

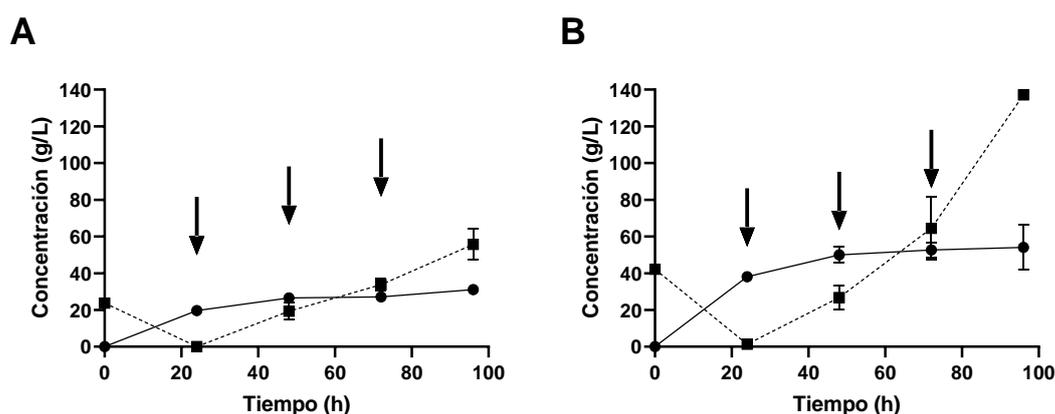


Figura 7: Ensayo en modalidad *fed-batch* de conversión de glicerol de *splitting* a DHA. A) *G. frateurii*, B) *G. oxydans*. DHA (círculo, línea continua), Glicerol (cuadrado, línea punteada). Los pulsos de glicerol se indican con flechas.

En el caso de *G. frateurii*, esto puede deberse a un fenómeno de inhibición por sustrato, habiéndose observado el mismo previamente en transformaciones con células en crecimiento por Dikshit y colaboradores [76]. Esta hipótesis fue comprobada con un ensayo de conversión de glicerol en presencia de 25 g/L de DHA inicial (Figura 8). La formación de producto en presencia de DHA inicial fue significativamente menor para *G. frateurii*, en comparación con la cantidad de producto obtenido partiendo de un medio suplementado únicamente con glicerol (Figura 8A).

Para *G. oxydans*, en el ensayo en modalidad *fed-batch* la producción de DHA aumentó desde los $38,1 \pm 0,1$ g/L hasta los $52,7 \pm 4,2$ g/L luego del tercer pulso de glicerol (Figura 7B). Esta cepa probó ser menos sensible a la inhibición por producto que *G. frateurii*, aunque se puede observar el efecto negativo de altas concentraciones de DHA en la conversión de glicerol (Figura 8B). Estos resultados indican que la conversión de glicerol por parte de *Gluconobacter* podría verse beneficiada por estrategias como la producción en continuo, pudiendo así remover la DHA generada y minimizando el efecto inhibitorio de dicho producto.

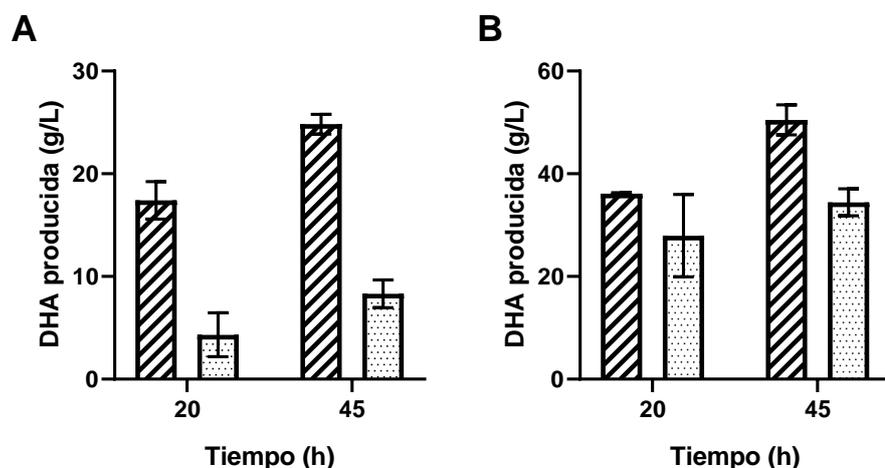


Figura 8: Producción de DHA por células en reposo de A) *G. frateurii* y B) *G. oxydans*, partiendo de glicerol de *splitting* (rayas) y glicerol de *splitting* en presencia de DHA (puntos). Las reacciones de *G. frateurii* partieron de 25g/L de glicerol de *splitting* o 25g/L DHA y 25 g/L de glicerol de *splitting*. Para el caso de *G. oxydans*, las reacciones partieron de 50 g/L de glicerol de *splitting* o 50 g/L de DHA y 50 g/L de glicerol de *splitting*.

Otra aproximación estudiada para intentar mejorar la productividad de DHA del proceso fue la permeabilización de la membrana de las bacterias. La permeabilización bacteriana es frecuentemente utilizada en casos en los que sustratos y/o productos presentan dificultades para atravesar la pared celular [28]. Como se mencionó anteriormente la síntesis de DHA en *Gluconobacter* es mediada por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH), una enzima dependiente de PQQ que se encuentra en la membrana citoplasmática de la bacteria, orientada hacia el espacio periplásmico [46], [77]. Es por esta razón que la permeabilización de la membrana podría potencialmente facilitar la entrada del glicerol y la liberación de la DHA producida por la enzima hacia el medio de reacción.

Las células en reposo de *G. oxydans* y *G. frateurii* fueron tratadas con EDTA y PEI, ambos conocidos permeabilizantes de la membrana externa de los Gram negativos [78]. El mecanismo de acción del EDTA radica en su capacidad de quelar cationes divalentes que se encuentran interactuando con los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias [79]. Por otro lado, la naturaleza policatiónica de la PEI permite una interacción con los LPS de membrana, generando una disrupción de su estructura [79], [80].

Los resultados obtenidos para ambos microorganismos no indican una mejora en las productividades (Figura 9). Posiblemente, el transporte de DHA y glicerol a través de la membrana externa de ambos

microorganismos no se encuentre restringido y por tanto no sea determinante en las productividades obtenidas en las condiciones estudiadas. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el protocolo de permeabilización no haya sido el adecuado. Sería conveniente confirmar la permeabilización de la membrana externa de las bacterias, por ejemplo, por microscopía electrónica [78].

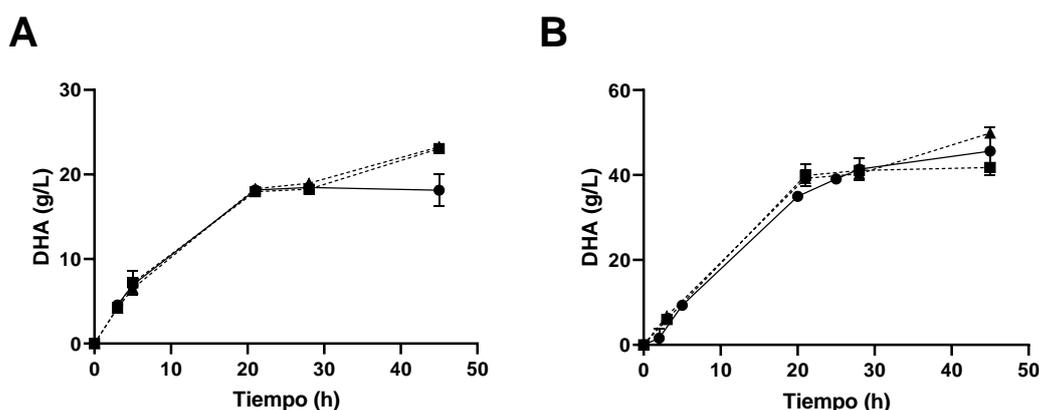


Figura 9: Producción de DHA a partir de glicerol de *splitting* por células en reposo de A) *G. frateurii* y B) *G. oxydans*, sin tratar con EDTA y PEI (círculo, línea continua), tratadas con 50 mM EDTA y 0,1% PEI (cuadrado, línea punteada) o tratadas con 50 mM EDTA y 0,5% PEI (triángulo, línea punteada).

Finalmente, se ensayó la posibilidad de reutilizar las células en sucesivas reacciones en *batch*. Para el caso de *G. frateurii* se observó una disminución significativa en la conversión de glicerol a DHA a partir del segundo uso, que continuó disminuyendo con los consecuentes usos. La producción de GA cae en su totalidad luego del primer uso (Figura 10). Con respecto a la producción de DHA por parte de *G. oxydans*, no se observó generación de producto incluso en el primer reuso de las células.

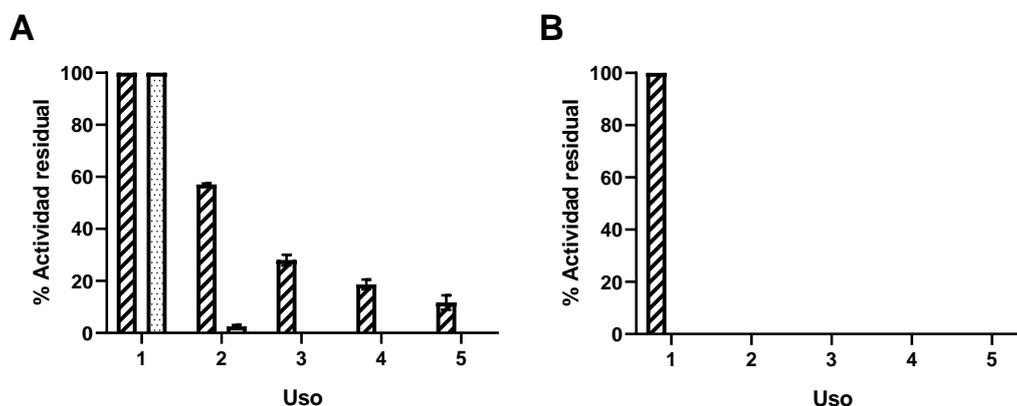


Figura 10: Usos sucesivos de células en reposo de las cepas en estudio en la conversión de glicerol de *splitting* a DHA y GA a 20 horas de reacción. A) *G. frateurii*. B) *G. oxydans*. DHA (rayas), GA (puntos).

Cabe destacar que aun cuando las estrategias ensayadas para mejorar la productividad de la bioconversión no han sido exitosas, las productividades obtenidas inicialmente fueron muy buenas (Tabla 1).

Tabla 1. Productividades obtenidas en la conversión de glicerol a DHA y GA por cepas de *Gluconobacter* en reposo.

Organismo	Glicerol	Productividad (g/Lh)		Referencia
		DHA	GA	
<i>G. oxydans</i> NBRC 14819	Puro	1,95	-	Este trabajo
	<i>Splitting</i>	1,50	-	Este trabajo
<i>G. frateurii</i> NBRC 103465	Puro	0,94	0,12	Este trabajo
	<i>Splitting</i>	0,95	0,02	Este trabajo
<i>G. oxydans</i> ZJB09113	Puro	2,17	-	[81]
<i>G. oxydans</i> M5AM	Puro	1,10	-	[82]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Crudo	0,27	-	[83]
<i>G. oxydans</i> NBRC 12528	Puro	1,94	-	[84]

De hecho, al mejor de nuestro conocimiento, de todos los reportes de biotransformaciones de glicerol a DHA con células en reposo de *Gluconobacter*, solo somos superados por Hu y colaboradores [81]. Sin embargo, su trabajo fue realizado a partir de glicerol puro en un reactor de 2 L con aireación, distinto de la aireación que se logra por agitación orbital en matraces de 250 mL. Estudios adicionales del efecto de la aireación o la agitación podrían mejorar aún más las productividades en las condiciones estudiadas.

En vista de estos resultados y los obtenidos en los ensayos de *fed-batch*, la inmovilización de los microorganismos resulta una opción interesante para mejorar las productividades de DHA. La misma protegería a los microorganismos del medio de reacción, facilitaría el reuso de los catalizadores y a la vez permitiría la implementación de sistemas en continuo, evitando así la inhibición por producto.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se logró determinar el mejor estadio de crecimiento para la colección del inóculo, la cantidad de células para llevar a cabo la inoculación del medio de reacción con la que se alcanza mejor productividad y el mejor pH inicial para la síntesis de DHA y GA con las tres cepas de *Gluconobacter* en estudio.

Se observó por HPLC que tanto *G. frateurii* como *Gluconobacter sp.* son capaces de producir tanto DHA como GA a partir de glicerol, mientras que *G. oxydans* solamente produce DHA. Estos resultados fueron confirmados por RMN. A su vez, los ensayos de RMN comprobaron que la DHA formada no se encuentra fosforilada y que en el medio de reacción probablemente se encuentre en equilibrio con su forma dimerizada.

Considerando las productividades obtenidas para cada cepa, se decidió descartar la cepa *Gluconobacter sp.* para el resto de los experimentos, ya que produce menos GA que *G. frateurii* y menos DHA que *G. oxydans*.

Tanto *G. frateurii* como *G. oxydans* son capaces de convertir el glicerol de *splitting* en los compuestos de interés. El sustrato fue analizado por RMN y se confirmó la presencia de metanol, ácidos grasos y en menor medida, acetato y etanol. La producción de DHA por ambas cepas se observó incambiada al modificar el glicerol puro por el glicerol de *splitting*, alcanzando buenas productividades, comparables a las reportadas previamente en la literatura. Sin embargo, se observó una disminución en la capacidad de producir GA por parte de *G. frateurii*, probablemente debido a un efecto inhibitorio del metanol presente en este sustrato, sobre la enzima mADH.

Buscando aumentar aún más las productividades, se investigó la conversión de glicerol en formato *fed-batch* y la permeabilización de la membrana celular de las células en reposo. Por su parte, la permeabilización con PEI y EDTA no tuvo ningún efecto en las conversiones de las células en reposo de ambas cepas. Durante los experimentos en formato *fed-batch*, se observó que tanto *G. frateurii* como *G. oxydans* presentan inhibición por producto. Por otro lado, los ensayos de reuso de las células en reposo revelaron que las células de *G. oxydans* no pueden ser utilizadas más de una vez en la conversión de glicerol a DHA. Por su parte, la producción de DHA por células de *G. frateurii* se mantuvo por al menos cinco usos, aunque la productividad cayó a menos del 50% a partir del tercer

uso y siguió descendiendo significativamente con los sucesivos usos. La producción de GA por parte del microorganismo cesó completamente luego de 2 usos. Los resultados obtenidos en esta sección sientan las bases para proponer condiciones de inmovilización y de bioconversión con cepas de *Gluconobacter* inmovilizadas.

CAPÍTULO 2:

Inmovilización de cepas de *Gluconobacter*

CAPÍTULO 2: Inmovilización de cepas de *Gluconobacter*

Introducción

Considerando las ventajas operacionales que acarrea la inmovilización de microorganismos, discutidas con anterioridad en la Introducción general de este trabajo, y los resultados obtenidos en los experimentos con células en reposo libres, se propuso inmovilizar las cepas de *Gluconobacter* en estudio.

Desde finales de la década de los '70 y hasta la actualidad, existen en la literatura un número de publicaciones que tratan sobre la inmovilización de bacterias de este género, con diversos objetivos. Casi en la totalidad de los casos las cepas utilizadas corresponden a la especie *Gluconobacter oxydans*. La inmovilización de *Gluconobacter* no ha sido solamente llevada a cabo para la síntesis de una serie de compuestos de interés biotecnológico, sino también para la preparación de biosensores y celdas de combustible microbianas[56], [85]–[88].

Inmovilización de Gluconobacter en biotransformaciones

Los primeros reportes de inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter* tuvieron como finalidad la mejora en los procesos de obtención de compuestos como la L-sorbozona, L-sorbosa, DHA, ácido glucónico y ácido 2-ceto-L-gulónico. En el año 1976, Martin y Perlman reportaron la síntesis de L-sorbozona a partir de L-sorbosa con *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 inmovilizado en un gel de poliacrilamida [85]. Ese mismo año publican un trabajo que involucró la co-inmovilización del microorganismo con una variedad de especies del género *Pseudomonas* para la obtención de ácido 2-ceto-L-gulónico, utilizando el mismo sistema de inmovilización [89]. Años después Yuan y colaboradores co-inmovilizaron *G. oxydans* y *Bacillus cereus* con el mismo fin, pero analizando una serie de soportes de inmovilización: poliacrilamida, CM celulosa, alginato, quitosano, agar y κ -carragenano. En el trabajo solo se presentan los resultados obtenidos con este último, ya que fue el que presentó mejores resultados en la conversión [90].

Con respecto a la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol, existen varios reportes de distintas cepas de *G. oxydans*, inmovilizadas en diversos soportes. En el año 1987 Stefanova y colaboradores inmovilizaron *Gluconobacter suboxydans* (análogo a ATCC 621) en poliacrilamida. En los años posteriores se publicaron una variedad de trabajos en los que el soporte de inmovilización fue el alginato de calcio [91]–[95]. Entre estos trabajos cabe destacar el realizado por Trifonov y

colaboradores en 1991, en donde se buscaron estrategias para mejorar la baja estabilidad operacional de los geles de alginato de calcio. Utilizando *Gluconobacter oxydans* NBIMCC 902 como catalizador, concluyeron que el agregado de poliacrilamida hidrazida al gel como agente entrecruzante, permitía su reutilización por un máximo de 80 ciclos [91]. Esfuerzos similares con el mismo fin fueron realizados por Wang y colaboradores combinando alginato y diatomita [94]. Por otro lado, en 1999 Kim y colaboradores co-inmovilizaron *Gluconobacter suboxydans* KCCM21182 con distintos *carriers* de oxígeno para mejorar las conversiones, siendo el n-dodecano el más eficiente. Esto se debió a que comprobaron que la inmovilización en alginato limita la difusión de oxígeno hacia las células [93]. Fidaleo y colaboradores también intentaron mejorar la difusión de oxígeno hacia los biocatalizadores en esta conversión. Su aproximación constó de la inmovilización de *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 en un sustrato de poliéster, recubierto de una película nanoporosa de látex. Con esta técnica reportaron altas velocidades de reacción pero acompañadas de una alta mortalidad celular durante el proceso de inmovilización [96].

La inmovilización de *Gluconobacter* para la síntesis de DHA a partir de glicerol es un tópico que ha sido investigado desde hace ya varios años. Los primeros reportes de inmovilización con este fin corresponden a principios de la década del '80. El grupo de Holst, Adlercreust y colaboradores reportó la inmovilización de *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 en alginato de calcio para esta conversión [97], [98]. Esta estrategia de inmovilización fue seleccionada también por otros autores para la conversión de glicerol a DHA, tanto por células enteras de este género, como por extracto celular inmovilizado generado a partir de un tratamiento con ultrasonido [49], [56], [99], [100]. Por otro lado, se ha reportado la inmovilización de *G. oxydans* en polivinil alcohol como único componente o en combinación con alginato [77], [101]. Este material no es tóxico y su producción a nivel industrial es económica. Otro soporte que ha sido investigado para inmovilizar *Gluconobacter* para la síntesis de DHA es la espuma de poliuretano, por su alta porosidad y fácil proceso de inmovilización. El grupo de Dikshit y colaboradores ha utilizado este soporte para inmovilizar *G. oxydans* MTCC 904, utilizando glicerol crudo como sustrato [47], [76], [83]. La utilización de pectato de calcio para inmovilizar *G. oxydans* ATCC 621 fue reportada en dos oportunidades por el grupo de Sturdik [102], [103]. Por otro lado, Hekmat y colaboradores llevaron a cabo la inmovilización de *G. oxydans* en un soporte novedoso, denominado *Ralu-rings*. Estos anillos de polipropileno hidrofílicos son durables a la vez que biocompatibles y pueden mejorar su capacidad de carga al ser recubiertos con una matriz

porosa de silicona [104], [105]. Otro soporte utilizado para la producción de DHA a partir de glicerol fue la cerámica porosa, reportado por Hu y colaboradores. Durante su trabajo inmovilizaron la cepa *G. oxydans* ZJB09113 en un reactor de columna con burbujeo, pudiendo utilizar el catalizador generado por al menos 12 ciclos sin presentar contaminación [106].

Existen además otras conversiones llevadas a cabo por bacterias del género *Gluconobacter* inmovilizadas, de las que existen pocos reportes. Algunas de ellas utilizan soportes previamente descritos, como el alginato de calcio. Distintas cepas de *Gluconobacter oxydans* fueron inmovilizadas en este soporte para catalizar la conversión de quinato a 3-dehidroshikimato, alcohol bencílico a benzaldehído y para la producción de vinagre a partir del fruto del árbol de yabuticaba [62], [107], [108]. Otros reportes utilizan polivinil alcohol solo o en combinación con alginato de calcio, para síntesis como la de ácido fenilacético a partir de 2-fenil etanol utilizando la tecnología LentiKats®, la síntesis de ácido glicólico a partir de etilenglicol y la síntesis de xilonato a partir de xilosa [86], [109], [110]. Cabe destacar dentro de estas conversiones, la utilización por algunos autores de soportes novedosos para bacterias de este género. En particular, Shiraishi y colaboradores emplearon monolito de cerámica con forma de panal para inmovilizar *Gluconobacter suboxydans* IF0 3290 con el fin de utilizarlo en un reactor aireado para la producción de ácido glucónico a partir de glucosa [111]. Por otro lado, Hu y colaboradores inmovilizaron *G. oxydans* ZJB16009 en partículas de rastrojo de maíz pretratadas con celulosa. Los inmovilizados fueron empacados en un reactor de columna con burbujeo, para la síntesis de 6-(N-Hidroxietil)-Amino-6-Desoxi- α -L-Sorbofuranosa partiendo de N-2-hidroxietil glucamina [112].

En ocasiones los reportes sobre inmovilización de cepas de *Gluconobacter* presentan productividades discretas en relación a sus contrapartes libres y problemas vinculados a su resistencia física o mecánica tales como distorsión de su morfología, o tamaños dispersos que limitan su reuso. Además, se ha demostrado que la naturaleza del soporte incide sobre el comportamiento metabólico de especies de *Gluconobacter* [113]. Por lo tanto, continúa siendo necesario el estudio de nuevas estrategias que mejoren los problemas y brinden alternativas a la inmovilización de *Gluconobacter* para bioconversiones más eficientes.

Resultados y discusión

Considerando los resultados obtenidos en la conversión de glicerol de *splitting* a DHA y GA por *Gluconobacter* descritos en el capítulo anterior, se procedió a evaluar distintas estrategias para su inmovilización. Como se mencionó anteriormente, la inmovilización de biocatalizadores presenta una variedad de ventajas operacionales que es interesante explorar para nuestra conversión. Las buenas productividades obtenidas, sumadas a los problemas detectados en relación a la inhibición por sustrato y producto, y la imposibilidad de su reuso, hace de las células de *Gluconobacter* grandes candidatas para mejorar su productividad a través de la inmovilización.

Inmovilización de especies de Gluconobacter en distintos soportes

La inmovilización de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevó a cabo en termogeles de agar y agarosa al 3% y en poliacrilamida al 20%, utilizando protocolos de inmovilización previamente descritos [11]. Para el caso de los termogeles de agar se obtuvieron perlas de $3,5 \pm 0,5$ mm de diámetro, mientras que la inmovilización en poliacrilamida resultó en cubos de $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ mm (Figura 11). Para el caso de las perlas obtenidas a partir de termogeles de agar y agarosa se ensayó además un paso adicional de incubación en una solución de glutaraldehído al 1,5%. Esta incubación con glutaraldehído se llevó a cabo con el objetivo de realizar un entrecruzamiento químico dentro de la propia matriz, y entre la matriz y el microorganismo. Este entrecruzamiento podría evitar potenciales pérdidas de los microorganismos al exterior y mejorar la estabilidad del biocatalizador.

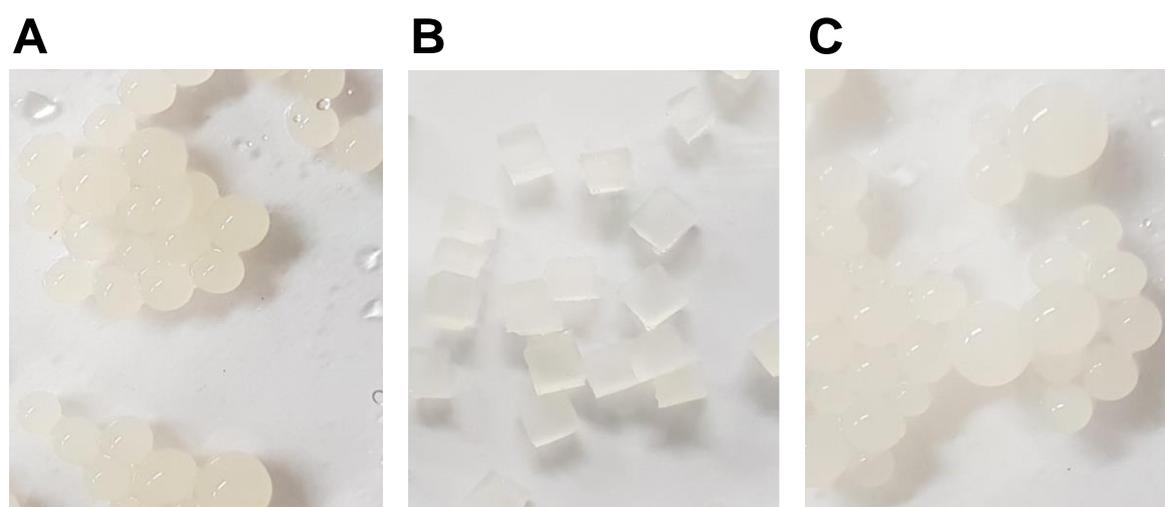


Figura 11: Preparados inmovilizados de *Gluconobacter* en A) agar, B) poliacrilamida, C) agarosa.

Para determinar si las células mantenían su viabilidad luego de la inmovilización, se prepararon los distintos inmovilizados en condiciones de esterilidad y se colocaron fracciones de los mismos sobre una placa de Petri con medio de glucosa sólido (Figura 12). Se realizaron además controles de esterilidad para todos los reactivos utilizados para preparar los inmovilizados. Muestras de las matrices en estado líquido, el tampón de lavado, el aceite y el hexano utilizado para lavar los preparados se colocaron en placas de Petri y se incubaron en una estufa a 30°C durante 48 horas, al igual que las muestras correspondientes a los preparados inmovilizados.

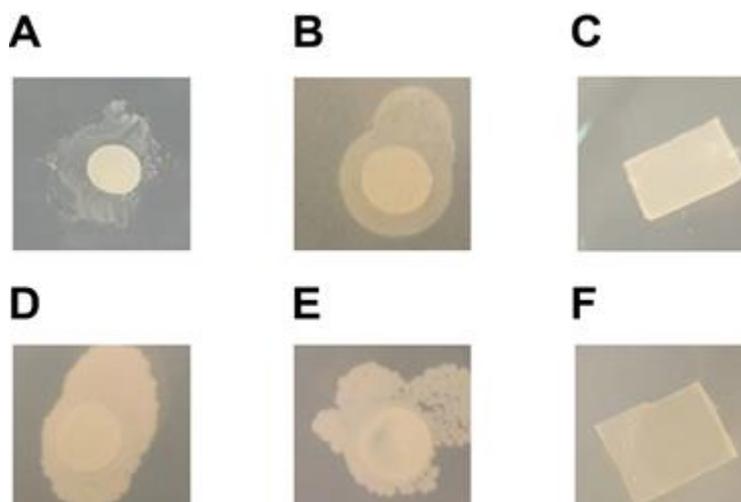


Figura 12: Ensayos de viabilidad de células de *Gluconobacter* inmovilizadas. A) *G. oxydans*, agar, B) *G. oxydans*, agarosa, C) *G. oxydans*, poliacrilamida, D) *G. frateurii*, agar, E) *G. frateurii*, agarosa, F) *G. frateurii*, poliacrilamida.

Luego de la incubación, para el caso de *G. oxydans* se observó un halo de bacterias rodeando los inmovilizados de agar y de agarosa (Figura 12A y B, respectivamente). Este resultado indica que sigue habiendo células viables en las perlas luego de ambos procesos de inmovilización. Sin embargo, tras la inmovilización en poliacrilamida, no se observa un halo de crecimiento bacteriano alrededor del inmovilizado (Figura 12C). Este resultado indica que las células de *G. oxydans* perdieron totalmente su viabilidad durante el proceso de inmovilización en este hidrogel. Considerando que la poliacrilamida ha sido reportada como soporte de inmovilización en un número considerable de trabajos que involucran *Gluconobacter*, es posible que las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso de inmovilización no fueran las adecuadas. La concentración utilizada de acrilamida (20%) puede haber sido muy elevada y, dada su naturaleza tóxica, puede haber resultado letal para las bacterias [114]. Los resultados obtenidos para *G. frateurii* son análogos a los obtenidos para *G. oxydans* (Figura 12D, E y F). En todos los casos, los controles de esterilidad de los reactivos no presentaron crecimiento.

Conversiones de glicerol de *splitting* con preparados inmovilizados de *Gluconobacter*

Los distintos inmovilizados fueron ensayados en la conversión de 50 g/L de glicerol de *splitting* a DHA y GA (Figura 13). Los termogeles de agar y agarosa sin tratar con glutaraldehído fueron los soportes que presentaron mejores transformaciones de glicerol de *splitting* a DHA para ambas cepas en 20 horas. Cabe destacar de todas formas que con los preparados inmovilizados de *G. frateurii* tratados con glutaraldehído no se detectó producción de DHA. Por el contrario, el único producto obtenido fue el GA, aunque en muy baja concentración, alcanzando poco más de un 1% de conversión. Es posible que la viabilidad de las bacterias en los inmovilizados tratados haya bajado, impactando en su productividad, ya que es sabido que el glutaraldehído en solución tiene efecto bactericida [115].

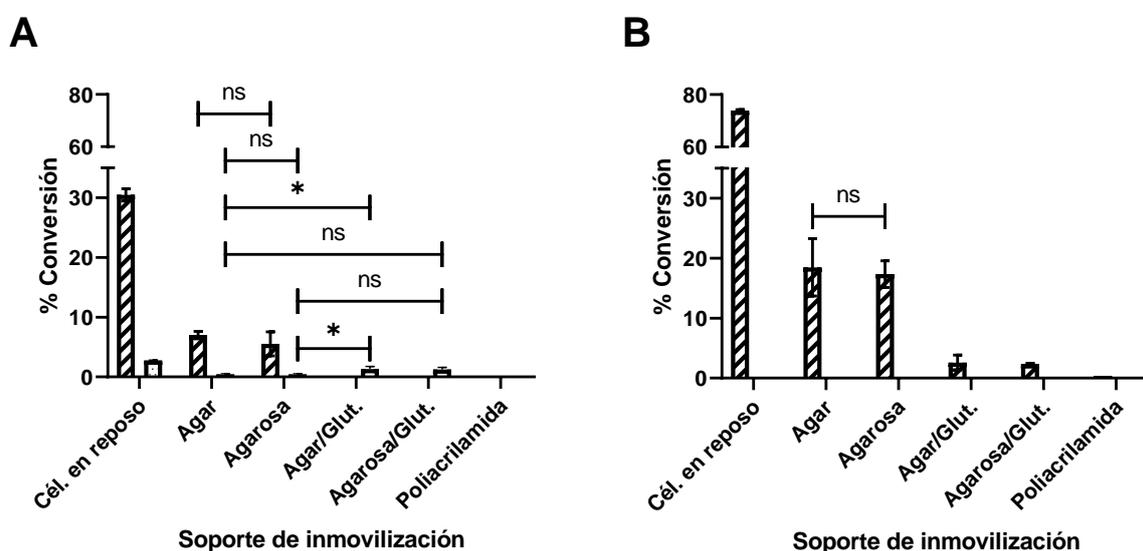


Figura 13: Producción de DHA (rayas) y GA (puntos) a partir de glicerol de *splitting* por A) *G. frateurii* y B) *G. oxydans* inmovilizados en distintos soportes. Diferencias significativas entre los valores obtenidos son representadas con asteriscos. * = $p < 0,0412$, ns = no se encontró diferencia significativa.

Considerando que estadísticamente no se observan diferencias significativas en la conversión de glicerol a los productos de interés por los inmovilizados en agar y agarosa de ambas cepas, se seleccionaron ambos soportes para los experimentos subsiguientes.

Se estudió la cinética de la reacción de producción de DHA y GA por los inmovilizados de *G. frateurii* y *G. oxydans* en agar y agarosa durante 315 horas (Figura 14). Partiendo de 50 g/L de glicerol de *splitting*, para el caso de *G. oxydans* se alcanzó una conversión del $91,7 \pm 0,1\%$ del glicerol inicial a

las 144 horas de reacción cuando el mismo fue inmovilizado en agar, obteniéndose al final de la reacción $50,6 \pm 1,9$ g/L de DHA (Figura 14A). Por otra parte, al inmovilizar *G. oxydans* en agarosa se obtuvieron conversiones similares, alcanzando un $87,8 \pm 0,1\%$ de conversión a las 144 horas de reacción. Luego de 315 horas, se obtuvieron $46,3 \pm 0,2$ g/L de DHA (Figura 14B).

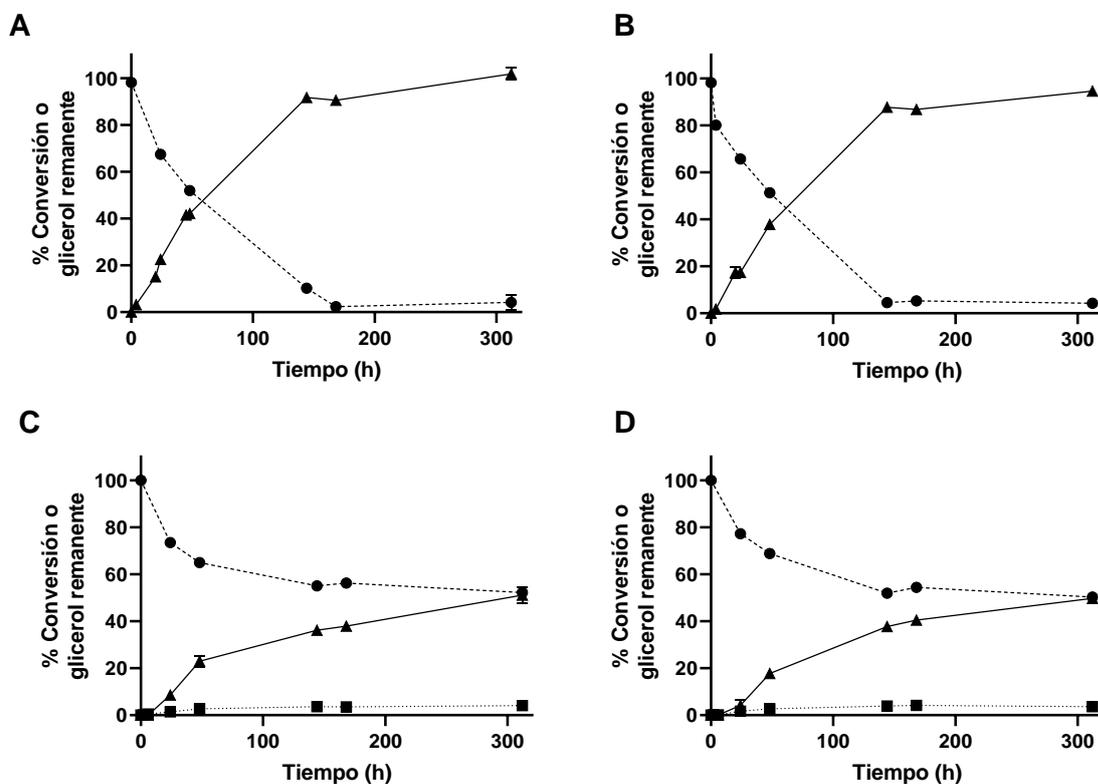


Figura 14: Cinética de producción de DHA y GA a partir de glicerol de *splitting* durante 315 horas por *G. oxydans* inmovilizado en agar (A) y agarosa (B) y *G. frateurii* inmovilizado en agar (C) y agarosa (D). DHA (línea continua, triángulos), GA (línea punteada, cuadrados), glicerol (línea discontinua, círculos).

Con respecto a los inmovilizados de *G. frateurii* en agar y agarosa, con ninguno de ellos se obtuvo una conversión completa del glicerol inicial a productos luego de 315 horas de reacción. Para el caso del agar, al final de la reacción se alcanzó una conversión total del $51,1 \pm 3,4\%$ del glicerol. Se obtuvieron $24,9 \pm 1,6$ g/L de DHA y $2,3 \pm 0,3$ g/L de GA (Figura 14C). Para el caso de *G. frateurii* inmovilizado en agarosa, la conversión de glicerol luego de 315 horas de reacción fue de un $49,7 \pm 0,1\%$, obteniéndose $20,9 \pm 4,7$ g/L de DHA y $2,1 \pm 4,7$ g/L de GA.

Se estudió además la reusabilidad de los inmovilizados de ambas cepas en agar y agarosa, en comparación con las células en reposo. Para esto se tuvo en cuenta la producción de DHA por parte de

las cepas, nuevamente partiendo de 50 g/L de glicerol de *splitting*. Como se mencionó con anterioridad, en el caso de *G. oxydans* se había observado que las células en reposo pierden totalmente la capacidad de convertir glicerol luego del primer uso (Figura 15A). Sin embargo, al inmovilizar las células en agar y agarosa (Figura 15B y C, respectivamente) se obtuvo en todos los casos al menos un 60% de actividad residual durante cinco usos consecutivos.

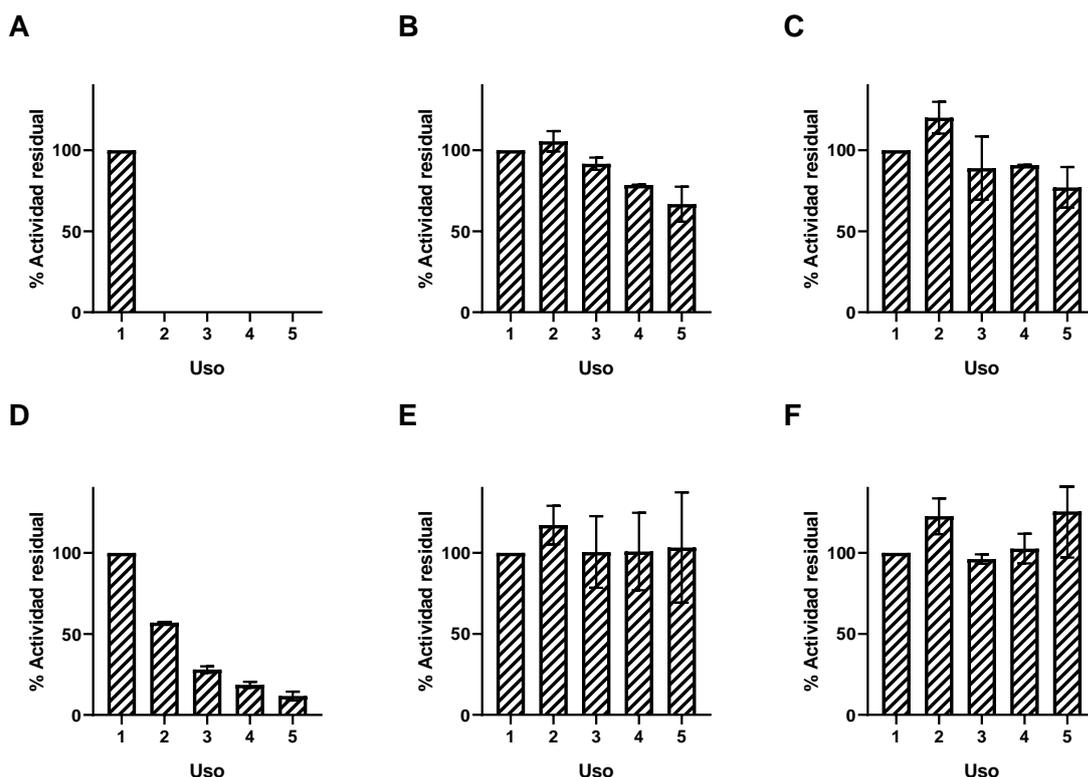


Figura 15: Actividad residual de producción de DHA a partir de glicerol de *splitting* por células en reposo e inmovilizadas en agar y agarosa de *G. frateurii* y *G. oxydans*. A) *G. oxydans*, células en reposo. B) *G. oxydans*, agar. C) *G. oxydans*, agarosa. D) *G. frateurii*, células en reposo. E) *G. frateurii*, agar. F) *G. frateurii*, agarosa.

Para el caso de *G. frateurii*, se había observado que la capacidad de producción de DHA de las células en reposo se mantenía durante 5 usos, pero caía significativamente con cada uno de ellos (Figura 15D). Se observó que al inmovilizar las células tanto en agar como en agarosa (Figura 15E y F, respectivamente) se obtuvo en todos los casos una actividad residual mayor al 90% luego de cinco usos consecutivos. Sin embargo, el análisis del GA demostró un descenso significativo durante los usos repetidos llegando a un 21% y 18% para los preparados en agar y agarosa respectivamente en el cuarto uso y ausencia de formación de GA en el quinto uso (datos no mostrados). Análisis posteriores

deberían continuar explorando nuevas estrategias de inmovilización y estabilización de esta cepa para la producción de GA, así como estrategias de mejora de sus conversiones en vista del interés del GA como producto biotecnológico. Aun cuando este experimento demuestra claramente el beneficio de la inmovilización en la reutilización de los catalizadores, serán necesarios experimentos adicionales para determinar la vida útil de los mismos y la máxima productividad acumulada posible.

Considerando que las productividades obtenidas con *G. frateurii* en la producción de GA a partir de glicerol de *splitting* no fueron buenas, se tomó la decisión de centrar nuestros esfuerzos únicamente en *G. oxydans*. Por otro lado, no habiendo encontrado diferencias significativas entre los inmovilizados en agar y en agarosa, se seleccionó el agar para los experimentos siguientes. Este soporte es más económico que la agarosa, lo que resulta interesante frente a una posible aplicación industrial.

Los experimentos anteriores con inmovilizados de *G. oxydans* en agar fueron realizados con concentraciones de glicerol de 50 g/L, una concentración seleccionada en base a experimentos de inhibición por sustrato realizados con células en reposo en nuestro laboratorio. La inmovilización puede afectar el reparto de sustratos y productos desde y hacia las perlas, y modificar por tanto la concentración efectiva de reactivos dentro de las mismas. Por esta razón se estudió la producción de DHA durante 285 horas partiendo de distintas concentraciones de glicerol de *splitting* (Figura 16). Se observó un efecto inhibitorio en concentraciones superiores a los 50 g/L. La concentración de 50 g/L fue la que presentó un mayor porcentaje de conversión a las 285 horas de reacción, brindando un producto con mayor pureza.

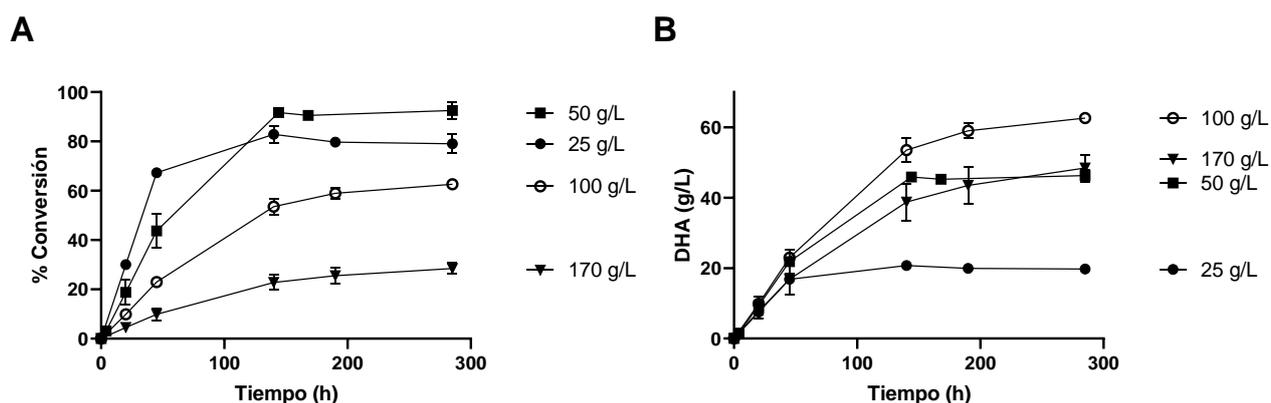


Figura 16: Producción de DHA por *G. oxydans* inmovilizado en agar, partiendo de distintas concentraciones de glicerol de *splitting*. A) % de conversión a DHA a partir de glicerol a lo largo del tiempo de reacción. B) Concentración de DHA obtenida a lo largo del tiempo de reacción.

Con el fin de descartar un efecto de los contaminantes en el experimento anterior, se realizaron estudios comparativos variando concentraciones de glicerol puro y de *splitting* en la conversión de DHA por células en reposo e inmobilizadas de *G. oxydans*. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 17.

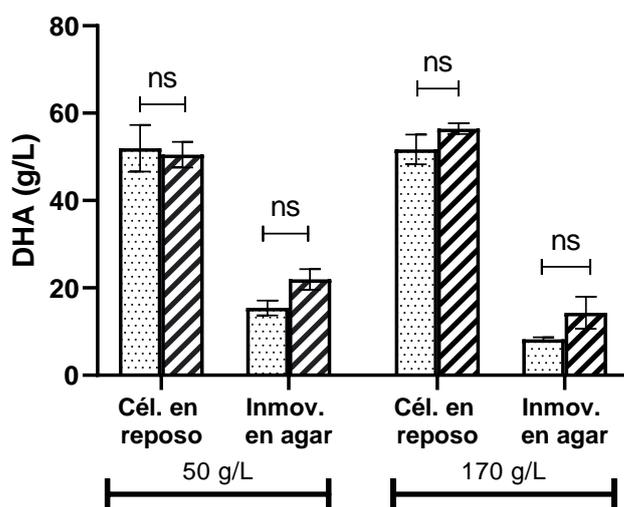


Figura 17: Producción de DHA luego de 45 horas por *G. oxydans* libre o inmobilizado en agar a distintas concentraciones de glicerol puro (puntos) o glicerol de *splitting* (rayas). ns = no se encontró diferencia significativa.

De acuerdo con lo observado, el efecto negativo sobre el avance de la reacción cuando se utilizan concentraciones de glicerol iguales o superiores a 100 g/L posiblemente se deba a un efecto inhibitorio del sustrato y del producto, tal como se observó para las cepas en reposo. Este efecto no está relacionado al aumento en la concentración de contaminantes (metanol y ácidos grasos) presentes en el glicerol de *splitting*.

Considerando que es posible que las bacterias atrapadas en las perlas de agar puedan ser liberadas al medio por los poros de la matriz, se llevó a cabo un experimento en tampón sin glicerol con *G. oxydans* inmobilizado en agar en condiciones de esterilidad. Los inmobilizados de *G. oxydans* se colocaron en un matraz con 30 mL del tampón y se incubaron a 30°C y 180 rpm. Se tomaron muestras del medio de reacción a lo largo del tiempo y se realizó un recuento en placa de las bacterias para determinar si existía un aumento que pudiese ser causado por un fenómeno de liberación (Figura 18).

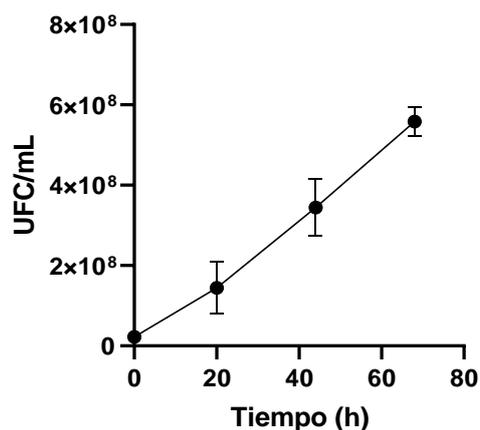


Figura 18: Conteo de células presentes en el medio a lo largo de la reacción con *G. oxydans* inmovilizado en agar en tampón sin glicerol agregado.

Se observó que a lo largo del tiempo de reacción existe un incremento de las UFC/mL en el medio. Este aumento puede estar explicado por la liberación de las bacterias desde las perlas de agar al mismo.

Para intentar disminuir el fenómeno de liberación de las células al medio, se probó recubrir las perlas de agar con sílica. Se repitió el ensayo de recuento en placa de UFC presentes el medio de reacción y no se observó crecimiento, pudiendo indicar que el agregado de la sílica impide la liberación de células al medio. Sin embargo, al ensayarse los inmovilizados recubiertos en sílica en una conversión de 50 g/L de glicerol de *splitting*, no se observó producción de DHA luego de 20 horas. Esto pudo deberse a que durante el recubrimiento con sílica de las perlas de agar, las bacterias hayan perdido su capacidad de conversión de glicerol. Para probar esta hipótesis, se prepararon perlas de agar con *G. oxydans* inmovilizado en su interior en esterilidad y fueron recubiertas de sílica. Las perlas fueron cortadas al medio con un bisturí estéril y se colocaron en una placa de Petri conteniendo medio de glucosa, de la misma forma que se detalló al principio de este capítulo. La placa se incubó durante 48 horas a 30°C.

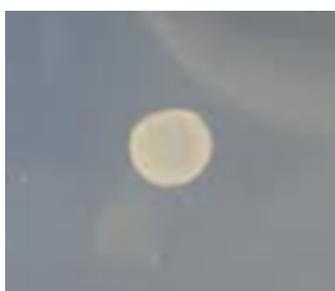


Figura 19: Estudio de viabilidad de *G. oxydans* inmovilizado en agar con recubrimiento de sílica.

Luego de incubar la placa en la estufa, no se observó el halo de crecimiento esperado alrededor de la perla de agar (Figura 19). Esto indica que el recubrimiento con sílica impactó negativamente en la viabilidad celular, lo que puede explicar la incapacidad de los inmovilizados de convertir el glicerol a DHA. Ensayos adicionales para evitar la liberación de células al medio continúan realizándose en nuestro laboratorio.

Con el fin de obtener mayores productividades de DHA a partir de inmovilizados de *G. oxydans*, se probó inmovilizar en agar pellets sonicados. Un reporte de Dikshit y colaboradores describe una mejora en la producción de DHA por *G. oxydans* MTCC 904 al ser sometido a sonicación [76]. En el trabajo antes mencionado, células libres e inmovilizadas en espuma de poliuretano de *G. oxydans* fueron sonicadas junto con el medio de fermentación, obteniéndose un aumento en el consumo de glicerol de entre el 60 y el 84% en todos los casos. Los autores reportan que este tratamiento no tuvo impacto en la morfología de las bacterias y que el aumento en la productividad se debe a cambios en la estructura secundaria de la enzima glicerol deshidrogenasa, producto del sonicado [76]

Nuestra aproximación consistió en sonicar los pellets bacterianos y mezclarlos con una solución de agar al 6% en partes iguales. Se realizó además un control con células sin sonicar. Los inmovilizados obtenidos se ensayaron en la conversión de 50 g/L de glicerol de *splitting* (Figura 20).

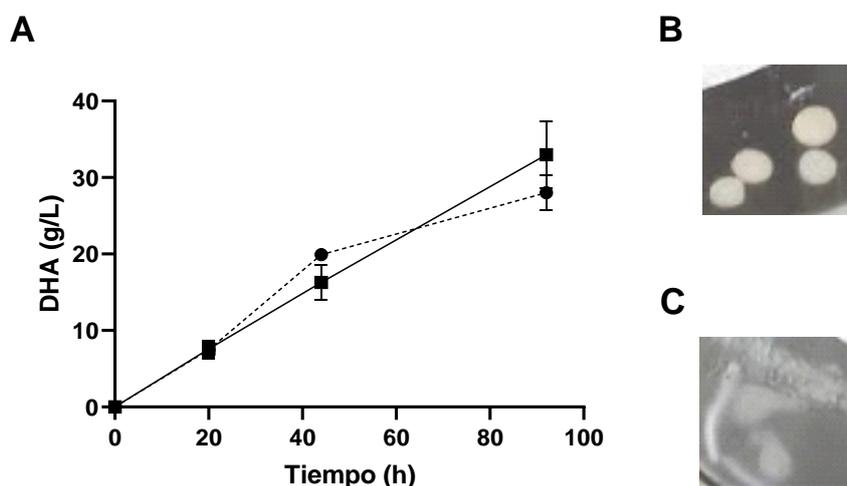


Figura 20: A) Producción de DHA a partir de glicerol de *splitting* por *G. oxydans* sonicado e inmovilizado en agar (línea punteada, círculos) o *G. oxydans* sin sonicar, inmovilizado en agar (línea continua, cuadrados). B) Sobrenadante de reacción de *G. oxydans* sin sonicar, inmovilizado en agar luego de 68 horas. C) Sobrenadante de reacción de *G. oxydans* sonicado, inmovilizado en agar luego de 68 horas.

En este caso, se observó que el sonicado no tuvo ningún impacto en la producción de DHA por parte de los inmovilizados, al menos durante las primeras 96 horas de conversión (Figura 20A). Sin embargo, al analizar los sobrenadantes de reacción, se observó un aumento significativo en la turbidez del sobrenadante correspondiente a los inmovilizados que contenían el pellet sonicado (Figura 20C) en comparación con el sobrenadante de los inmovilizados preparados a partir de un pellet sin sonicar (Figura 20B). Es probable que ese aumento en la turbidez se deba a debris celular generado por la ruptura de las células producto de la sonicación. Esta aparente ruptura celular no impacta en la conversión de glicerol.

A pesar de que esta estrategia para la mejora de la productividad no fue exitosa, los preparados obtenidos durante esta etapa del trabajo presentan productividades iguales o superiores a las obtenidas recientemente por otros autores en la conversión de glicerol crudo a DHA con preparados inmovilizados. (Tabla 2).

Tabla 2. Productividades obtenidas en la conversión de glicerol crudo a DHA y GA por cepas de *Gluconobacter* inmovilizadas.

Organismo	Soporte	Productividad (g/Lh)		Referencia
		DHA	GA	
<i>G. oxydans</i> NBRC 14819	Agar	0,32	-	Este trabajo
	Agarosa	0,28	-	Este trabajo
<i>G. frateurii</i> NBRC 103465	Agar	0,07	0,007	Este trabajo
	Agarosa	0,07	0,007	Este trabajo
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Espuma de poliuretano	0,28	-	[83]
<i>G. oxydans</i> ATCC 621	Alginato	0,16	-	[56]

Dikshit y Moholkar reportaron la inmovilización de *G. oxydans* MTCC 904 en espuma de poliuretano para la conversión de glicerol crudo a DHA partiendo de 20 g/L [83]. La productividad de DHA obtenida con estos preparados inmovilizados fue menor a la obtenida por los inmovilizados de *G. oxydans* preparados en agar presentados en este trabajo. Por otro lado, otro trabajo reciente de Stasiak-Rózańska y colaboradores reporta la inmovilización de *G. oxydans* ATCC 621 en una matriz de alginato [56]. En este caso, la productividad de DHA obtenida partiendo de 50 g/L de glicerol es menor a la alcanzada por nuestros dos preparados inmovilizados de *G. oxydans*.

Cabe destacar además que la preparación de inmovilizados de *Gluconobacter* en agar y agarosa para la conversión de glicerol de *splitting* a DHA no tiene precedentes en la literatura. A su vez, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer reporte de inmovilización de una cepa de *Gluconobacter* para la producción de GA.

Conclusiones

La inmovilización de ambas cepas de *Gluconobacter* en todos los soportes planteados se llevó a cabo de manera exitosa. En todos los casos se mantuvo la viabilidad celular luego del proceso de inmovilización, a excepción del caso de los inmovilizados en poliacrilamida. Es probable que en las condiciones del experimento la acrilamida haya resultado tóxica para las células.

Todos los preparados inmovilizados presentaron actividad, en mayor o menor medida, en la conversión de glicerol de *splitting* a DHA y GA, exceptuando aquellos preparados en poliacrilamida. Sin embargo, los mejores rendimientos en la conversión fueron alcanzados con los inmovilizados preparados en agar y agarosa, sin tratamiento con glutaraldehído, tanto para *G. frateurii* como para *G. oxydans*. En particular, los preparados inmovilizados de *G. oxydans* en agar y agarosa alcanzaron conversiones cuantitativas de 50 g/L de glicerol de *splitting* luego de 315 horas de reacción, mientras que en el caso de *G. frateurii* las máximas conversiones alcanzadas rondaron el 50%. A diferencia de las células en reposo libres, las células inmovilizadas pudieron ser reutilizadas hasta cinco veces, manteniendo porcentajes de actividad remanente altos, superiores al 60% en todos los casos.

Este trabajo constituye el primer reporte de *G. frateurii* inmovilizado para la producción de GA a partir de glicerol, empleando estrategias de inmovilización sin precedentes para esta cepa. Sin embargo, considerando las productividades obtenidas, es necesario seguir investigando posibilidades para la mejora de las mismas, así como también explorar nuevas estrategias de inmovilización. Además, resulta de importancia llevar a cabo un análisis del GA obtenido, que permita determinar cuál es el enantiómero formado durante la síntesis y calcular el exceso enantiomérico.

Por su parte, las productividades alcanzadas con los preparados inmovilizados de *G. oxydans* fueron muy buenas, por lo que en adelante serán el foco de este trabajo. Nuevamente, las estrategias de inmovilización en termogeles empleadas para esta cepa en particular no tienen precedentes en la literatura.

Tomando en consideración la posible aplicación industrial de la inmovilización de *G. oxydans* para la síntesis de DHA, el agar fue el soporte seleccionado para seguir adelante con los experimentos ya que el costo del mismo es menor al de la agarosa.

Se estudió la productividad del preparado inmovilizado frente a distintas concentraciones de glicerol de *splitting*. De esta forma se logró determinar la máxima concentración de glicerol a la cual se puede

obtener conversiones cuantitativas del sustrato a DHA, siendo la misma 50 g/L. Experimentos adicionales permitieron confirmar que las disminuciones en el porcentaje de conversión alcanzado para las concentraciones de glicerol por encima de 100 g/L no se deben a los contaminantes presentes en el glicerol de *splitting*, por lo que probablemente estén relacionados con efectos de inhibición por sustrato y producto.

El análisis del medio de reacción demostró la presencia de bacterias libres, cuyo número aumenta a lo largo de la reacción. Esto indica que existe una cierta liberación de las bacterias desde la matriz. Futuros experimentos deberían centrarse en este aumento del número de células presente en el medio de reacción, ya que las mismas podrían estarse liberando, o podrían estar creciendo. Los esfuerzos por evitar la pérdida de los catalizadores al medio por el agregado de un recubrimiento de sílica no fueron exitosos, ya que se perdió completamente la viabilidad de las células, acompañada de su capacidad de catalizar la oxidación del glicerol a DHA.

Los ensayos de sonicado de los pellets de *G. oxydans* con el fin de aumentar las productividades del compuesto de interés, obtuvieron resultados similares a los obtenidos con las células sin tratar en la conversión de glicerol de *splitting*. A su vez, los sobrenadantes de reacción de los inmovilizados preparados con pellets sonicados se muestran cada vez más turbios con el avance de la reacción. Esto puede ser indicativo de una posible liberación de debris celular desde el inmovilizado hacia el medio de reacción. Es posible que el sonicado haya tenido efectos variables en la morfología de las células, por lo que sería interesante su análisis por microscopía electrónica.

Los resultados obtenidos en este capítulo presentan un aporte significativo a la bibliografía relacionada con la inmovilización del género *Gluconobacter*, presentando estrategias que hasta el momento no habían sido utilizadas para las cepas en estudio. Las productividades obtenidas fueron a su vez superiores a las reportadas por otros autores en la conversión de glicerol crudo con cepas inmovilizadas de *Gluconobacter*. Estos resultados sientan las bases para futuros estudios de síntesis de DHA en continuo en reactores de lecho empacado o en reactores de celda agitada, utilizando estas estrategias de inmovilización.

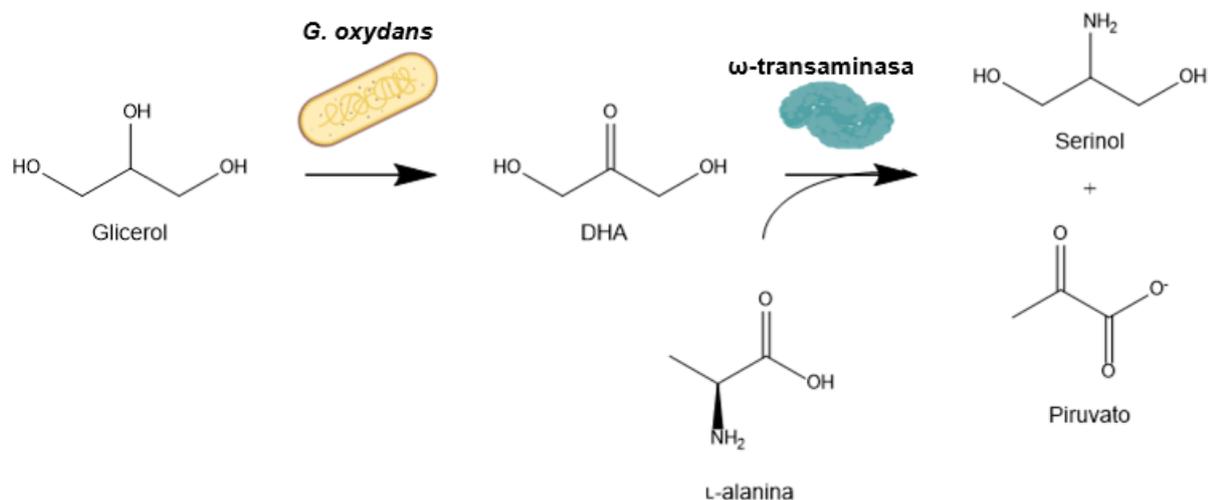
CAPÍTULO 3:

Cascada biocatalítica para la preparación de serinol y piruvato a partir de glicerol y L-alanina

CAPÍTULO 3: Cascada biocatalítica para la preparación de serinol y piruvato a partir de glicerol y L-alanina

Introducción

Considerando los buenos rendimientos obtenidos en la conversión de glicerol de *splitting* a DHA por parte de *G. oxydans* NBRC 14819, resulta interesante estudiar las posibilidades de obtener otros productos de alto valor agregado a partir de este compuesto. El uso de cascadas biocatalíticas es una tendencia en el área de la biocatálisis que explota la capacidad de diferentes catalizadores para trabajar de manera concertada, por ejemplo, en la síntesis de compuestos complejos o de moléculas simples a partir de sustratos de descarte industrial. En nuestro trabajo hemos estudiado el acoplamiento de un primer paso de transformación de glicerol a DHA, con la sucesiva aminación reductiva de la DHA en presencia de L-alanina como donador de amino. Esta reacción es catalizada por una transaminasa y genera como productos serinol y piruvato. El diseño de la cascada propuesta se observa en el Esquema 4.



Esquema 4: Cascada biosintética para la producción de piruvato y serinol a partir de glicerol con gasto de L-alanina.

A continuación, describiremos las propiedades de las transaminasas con las que hemos trabajado y los productos objetivo de la cascada propuesta.

Transaminasas

Las transaminasas (EC 2.6.1.X) son enzimas que catalizan la aminación asimétrica de cetonas, utilizando el cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP), desde un donador de amino a un aceptor [51], [116]. El PLP es regenerado luego de cada ciclo catalítico [117]. Generalmente la forma activa de estas enzimas es un homodímero, con su sitio activo ubicado en la interfase entre ambos monómeros. En el sitio activo se encuentran dos bolsillos de diferente tamaño, que determinan su especificidad [116]. En base a esto, las transaminasas se clasifican en α - y ω -transaminasas.

En el caso de las α -transaminasas, se requiere la presencia de un grupo ácido carboxílico en posición α al grupo amino o cetona para llevar a cabo la reacción de transferencia de grupos [37]. Por el contrario, las ω -transaminasas pueden transferir un grupo amino adyacente a un carbono primario que se encuentre al menos a un carbono de distancia del grupo carboxilo [118]. A su vez, este tipo de transaminasas puede aceptar como sustratos a otros compuestos que no posean grupos carboxilo, como aminas y cetonas [37].

Estas enzimas son catalizadores de interés industrial, con un gran potencial para la síntesis de aminas quirales [119]. En particular, son utilizadas actualmente para la producción de fármacos como la imagabalina, la sitagliptina, la norefedrina y la pseudoefedrina [117].

En este trabajo se estudiaron dos enzimas pertenecientes a este grupo, las ω -transaminasas Cv- ω TA de *Chromobacterium violaceum* y la Pf- ω TA de *Pseudomonas fluorescens*. Ambas enzimas fueron expresadas de forma recombinante en *E. coli* y cuentan con una cola de histidina en su extremo N-terminal.

La enzima Cv- ω TA (EC 2.6.1.62) fue cristalizada por Humble y colaboradores [120] y tiene una estructura homodimérica, con un peso molecular aproximado de 100 kDa (Figura 21). Esta enzima presenta, como se mencionó anteriormente, dos sitios activos en la interfase entre subunidades, compuestos por aminoácidos de ambas. Cada sitio activo presenta un sitio de unión a PLP y otro para la unión del sustrato [120].

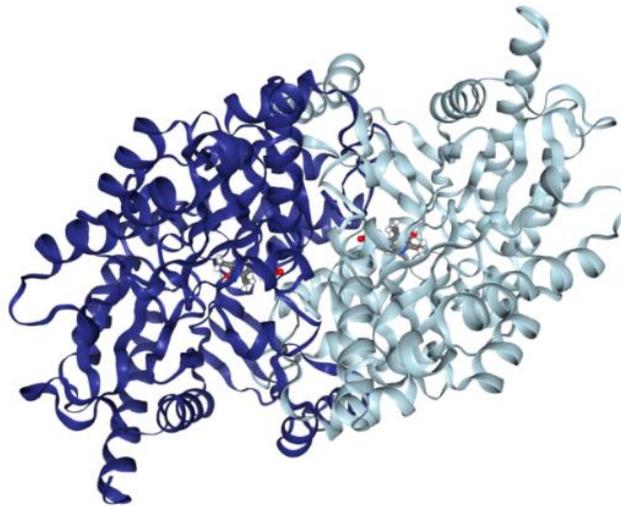


Figura 21: Estructura tridimensional de la enzima Cv- ω TA junto a su ligando PLP (PDB ID: 4A6T).

Por otro lado, la estructura cristalográfica de la enzima Pf- ω TA (2.6.1.113) fue elucidada recientemente por Roura Padrosa y colaboradores [121]. En ese trabajo, se determinó que la estructura de la misma consiste de un homotetrámero, con un peso molecular aproximado de 210 kDa (Figura 22). Nuevamente, el cofactor PLP se encuentra posicionado en la interfase entre dos subunidades, existiendo entonces cuatro sitios de unión a PLP por molécula.

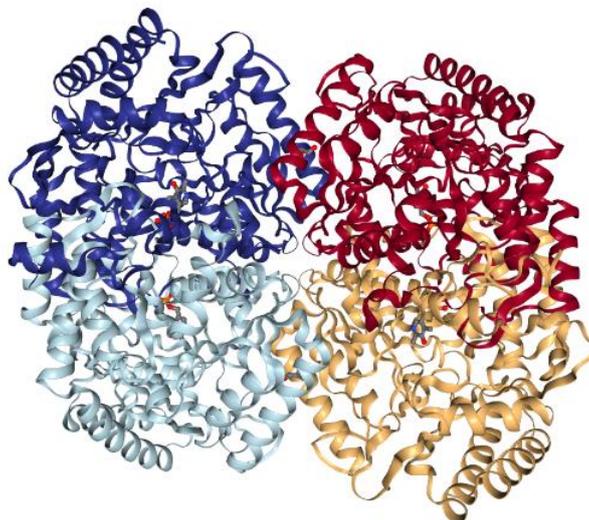


Figura 22: Estructura tridimensional de la enzima Pf- ω TA junto a su ligando PLP (PDB ID: 6S54).

A la hora de su aplicación, las enzimas ω -transaminasas presentan frecuentemente problemas relacionados a la inhibición por sustratos y productos, a la vez de ser poco termoestables [120].

Tomando esto en consideración, sumado a la naturaleza multimérica de las enzimas en estudio, es que resulta de especial interés llevar a cabo su inmovilización para la síntesis de serinol y piruvato a partir de DHA producida por *G. oxydans*.

Serinol

Como ya se mencionó al inicio de este capítulo, la reacción de aminación reductiva de la DHA con L-alanina utilizando una ω -transaminasa genera como productos serinol y piruvato. El serinol (2-amino-1,3-propanodiol, $C_3H_9NO_2$), es un amino alcohol proquiral, análogo estructural del aminoácido serina [116]. Este compuesto es estable, corrosivo, higroscópico y con buena solubilidad en agua. Su peso molecular es de 91,11 g/mol y sus puntos de fusión y ebullición son de 52-56°C y 115-116°C, respectivamente. En organismos eucariotas, derivados del serinol suelen participar en cascadas metabólicas como segundos mensajeros. Por otro lado, en algunos procariontes, el serinol actúa como intermediario durante la síntesis de toxinas [122].

El serinol encuentra usos en varias industrias, como la farmacéutica o la química, principalmente como bloque de construcción en reacciones de síntesis química [116]. Por ejemplo, los mono ésteres de serinol son compuestos quirales, que en algunos casos exhiben propiedades farmacológicas [116]. Es además un precursor muy común en la síntesis de varios compuestos químicos de interés industrial, como por ejemplo fármacos como el cloranfenicol, el fingolimod, principio activo de Gilenya® (Novartis), la epinefrina y la norepinefrina [123]. A su vez, derivados del serinol, como los α,ω -aminoalcoholes de cadena larga, suelen ser utilizados como fungicidas. Se ha reportado además una potencial función anti cáncer de moléculas de serinol N-acetilado, como el N-palmitoil-2-amino-1,3-propanodiol [122]. Es también precursor de agentes de contraste no iónicos para rayos X como el iopamidol [124].

La síntesis de serinol se puede llevar a cabo tanto por síntesis química convencional como por bioconversiones [124]. El primer reporte de síntesis de este compuesto data de 1897, por parte de Piloty y Ruff [123]. Este proceso involucraba la reducción de dihidroxiacetona oxima con amalgama de sodio en presencia de sulfato de aluminio. A partir de este primer proceso, a través de los años aparecieron varias patentes que describen protocolos para la síntesis de serinol [124]. Sin embargo, como ocurre en la síntesis de la mayoría de los aminoalcoholes, muchos de estos procesos necesitan precursores de origen petroquímico o requieren de la utilización de agentes químicos peligrosos

durante la síntesis [122]. Es por esta razón que la síntesis biotecnológica de serinol resulta una alternativa interesante, ya que se trata de una síntesis más verde.

Existen una variedad de aproximaciones para la síntesis biotecnológica del serinol y sus derivados, con varias patentes publicadas que involucran su preparación. En las mismas se describen tanto estrategias microbiológicas como el empleo de enzimas aisladas. En 1975, Nakazawa y colaboradores patentaron la síntesis de derivados de serinol a través del agregado de aldehídos a cultivos en crecimiento de *Brevibacterium helvolum*, *Candida humicola* y *Corynebacterium glycinophilum* [125]. A su vez, la síntesis de derivados como la esfingosina, la dihidroesfingosina o la fitoesfingosina se encuentran reportados por cepas mutantes de *Pichia cifferi* [122]. Por otro lado, Andreeßen y Steinbüchel reportaron la síntesis de serinol a partir de glicerol construyendo una ruta metabólica artificial que incluye la expresión heteróloga de la enzima DHA fosfato aminotransferasa/dihidrorhizobitoxina sintasa RtxA de *Bradyrhizobium elkanii* USD94 en *E. coli* [124]. También se encuentra reportada la producción de serinol catalizada por una amino alcohol deshidrogenasa (AADH). Itoh y colaboradores aislaron en el año 2000 una AADH dependiente de NAD⁺/NADH de *Streptomyces virginiae* IFO 12827. Esta enzima cataliza la deshidrogenación reversible del serinol en presencia de NAD⁺ para producir DHA, amonio y NADH. Sin embargo, es posible utilizarla para la reacción inversa de aminación reductiva de la DHA, para la obtención de serinol [126].

Piruvato

El ácido pirúvico (ácido α -cetopropanoico, C₃H₄O₃) o piruvato en su forma desprotonada, es el otro producto de la aminación reductiva de la DHA con L-alanina. Es un ácido incoloro con un peso molecular de 88,06 g/mol, es soluble en agua, etanol y dietiléter, y presenta puntos de fusión y ebullición de 12°C y 165°C, respectivamente. En las células, este ácido es un metabolito clave en varias rutas de síntesis, tanto anabólicas como catabólicas [127]. Interviene en rutas como la glucólisis, la gluconeogénesis y en el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, siendo precursor de la síntesis de acetil-CoA, acetato, lactato y aminoácidos ramificados [128].

A su vez, la demanda comercial del piruvato está en aumento ya que es además un importante bloque de construcción para la síntesis de químicos de alto valor agregado, solventes, aditivos alimentarios y fármacos [129], [130]. Es utilizado por ejemplo en la síntesis enzimática de aminoácidos como L-

triptófano, L-tirosina y L-3,4-dihidroxifenilalanina. A su vez, se ha comenzado a utilizar en la síntesis de biocombustibles de segunda generación como el isobutanol o el 3-metil-1-butanol [131]. Es empleado también como suplemento dietario ya que posee propiedades para el control del peso, aumento de la resistencia física, reducción del colesterol y presenta además efectos antioxidantes [128].

Actualmente, la mayoría del piruvato se obtiene por síntesis química convencional, pero existen varias alternativas biotecnológicas para su producción. La ruta de síntesis química más frecuentemente utilizada consiste en la deshidratación y subsecuente descarboxilación del tartrato [127]. Esta ruta está siendo implementada en la actualidad a escala industrial. De todas formas, este y otros métodos de síntesis química son costosos ya que requieren de mucha energía y del empleo de metales pesados. Estos requerimientos los hacen además dañinos para el medio ambiente y poco sustentables [131].

El piruvato también puede ser sintetizado de forma biotecnológica, ya sea por fermentación directa utilizando fuentes de carbono económicas, utilizando células en reposo o utilizando enzimas libres o inmovilizadas [132]. Con respecto a los procesos fermentativos, se han reportado varias cepas, tanto de bacterias como de levaduras, con la capacidad de producir piruvato en grandes cantidades. Algunos ejemplos son las especies *Saccharomyces cerevisiae* TAM, *Torulopsis glabrata* RS23 y TP19, *Trichosporon cutaneum* PD70 y *Yarrowia lipolytica* 374/4 [132]. Sin embargo, dada la posición central del piruvato en el metabolismo celular, la tarea de encontrar cepas microbianas con la capacidad de acumular este compuesto a través de aproximaciones de mutación y selección convencionales resulta dificultoso [132]. Es por esta razón que los investigadores han recurrido a técnicas de ADN recombinante para obtener microorganismos que puedan acumular grandes cantidades de piruvato, generalmente modificando el genoma de *E. coli* [127], [129], [130], [132]–[134]. Existen además reportes de la modificación del genoma de otros microorganismos con este fin, como las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Corynebacterium glutamicum* o las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Candida glabrata* [128], [131], [135]–[137]. La producción de piruvato por fermentación en general no alcanza altos rendimientos y dificulta su separación del medio de reacción, por lo que es preferible la utilización de células en reposo o enzimas.

Con respecto a las células en reposo, existen reportes de *Pseudomonas sp.* g31 con la capacidad de producir piruvato a partir de fumarato. Además, cepas utilizadas en fermentación directa, como *E. coli*

YYC202, pueden ser utilizadas como células en reposo. Esto mejora las productividades ya que la glucosa consumida por el microorganismo no es utilizada para la generación de biomasa [132].

La síntesis de piruvato ha sido llevada a cabo en distintas oportunidades utilizando enzimas como catalizadores. Entre ellas se encuentran la formaldehído deshidrogenasa, piruvato sintasa, glicolato oxidasa, tartrato deshidratasa, D-aminoácido oxidasa y D-hidroxiácido deshidratasa [132], [138], [139]. En particular, durante todas las reacciones de transaminación catalizadas por TAs que se utiliza el aminoácido L-alanina como donador de amino, se obtiene piruvato como co-producto [117], [140]. Este es el caso en nuestro trabajo, en el cual proponemos una cascada biosintética desde glicerol hacia piruvato y serinol, acoplando la bacteria *G. oxydans* con las ω -transaminasas mencionadas con anterioridad en esta Introducción.

Resultados y discusión

Nuestra propuesta busca encontrar una alternativa más verde a las síntesis tradicionales anteriormente mencionadas de serinol y piruvato, no solo por acoplamiento de biocatalizadores, sino también por el uso de los biocatalizadores implicados de manera inmovilizada. Las ventajas de la inmovilización de biocatalizadores fueron discutidas extensivamente en la Introducción general de esta Tesis. Así, abordamos en primera instancia la inmovilización de las enzimas Cv- ω TA y Pf- ω TA dependientes de PLP que, como se mencionó anteriormente, catalizan la formación de serinol y piruvato a partir de DHA y L-alanina.

Inmovilización de ω -transaminasas

Habiendo conseguido un catalizador inmovilizado de *G. oxydans* en agar con buenas características descrito en el capítulo anterior, se estudió la posibilidad de utilizar este mismo soporte para la inmovilización las ω -transaminasas en estudio. Se comenzaron los ensayos de inmovilización en agar con Cv- ω TA. En primera instancia, se llevó a cabo la sobre expresión de la enzima de forma recombinante en *E. coli* por agregado de IPTG. Posteriormente, las células fueron colectadas por centrifugación y el pellet obtenido fue sonificado en presencia de PLP para la obtención de un extracto crudo de Cv- ω TA. Cabe destacar la importancia de la presencia del cofactor PLP suplementando el tampón HEPES 25 mM pH 8,0 durante el sonificado para preservar la actividad de la enzima. A partir de este extracto se llevaron a cabo las preparaciones inmovilizadas descritas a continuación. Se probaron diferentes arquitecturas que contenían la enzima dentro del agar, así como condiciones en las que la enzima se encontraba inmovilizada en la superficie (Figura 23). Se utilizó el polímero PEI para inmovilizar las enzimas por adsorción iónica.

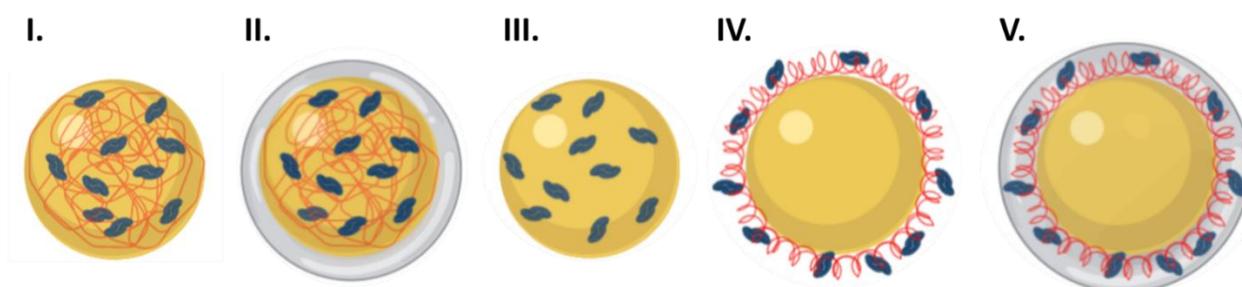


Figura 23: Estructura de las perlas: I. Mezcla de agar y PEI con la enzima Cv- ω TA inmovilizada por dentro, II. Mezcla de agar y PEI con la enzima Cv- ω TA inmovilizada por dentro, recubierta con sílica, III. Mezcla de agar y enzima Cv- ω TA, IV. Perla de agar recubierta con PEI con enzima Cv- ω TA inmovilizada en la superficie, V. Perla de agar recubierta con PEI con enzima Cv- ω TA inmovilizada en la superficie, recubierta con sílica. Agar (amarillo), PEI (rojo), Cv- ω TA (azul), sílica (gris).

La primera aproximación consistió en un preparado inmovilizado generado a partir de una solución de agar al 6% y PEI al 4%. Al mezclar partes iguales de esta solución y de extracto crudo se esperaba obtener perlas de agar al 3% y PEI al 2%, con la enzima atrapada por entrecruzamiento con el agar y por adsorción iónica con la PEI (Condición I). Adicionalmente, se buscó llevar a cabo un recubrimiento posterior con sílica (Condición II). Sin embargo, las perlas no pudieron ser formadas debido a la alta viscosidad de la solución obtenida, impidiendo su goteo en el aceite frío.

Otra de las aproximaciones para la inmovilización de Cv- ω TA consistió en mezclar directamente el extracto crudo de la enzima con la solución de agar al 6% (Condición III). En este caso se asumió un 100% de inmovilización. La última alternativa estudiada fue la preparación previa de perlas de agar al 3% vacías que posteriormente fueron incubadas con PEI. Luego de la incubación con PEI, las perlas resultantes fueron incubadas con el extracto crudo de Cv- ω TA para llevar a cabo la inmovilización por adsorción iónica (Condición IV). Finalmente, algunas de las perlas obtenidas por esta estrategia fueron recubiertas con sílica (Condición V). Las perlas de las condiciones IV y V presentaron un $86,7 \pm 5,0\%$ de inmovilización. Se midió la actividad de las perlas de las condiciones III, IV y V, y se observó que las últimas dos no presentaban actividad luego de 20 minutos de reacción. Con respecto a las perlas de la condición III, se observó que las mismas presentaban actividad, aunque muy baja ($0,12 \pm 0,09$ UI/mL de soporte).

Para determinar si la actividad observada en las perlas de la condición III se debía a enzima libre que se perdía por los poros del catalizador, se incubó una de estas perlas en un tampón con alta fuerza iónica durante 16 horas. Posteriormente se midió la actividad del sobrenadante y se analizó el mismo por electroforesis SDS-PAGE. Se repitió el procedimiento para las perlas de las condiciones IV y V. Al medir la actividad de los sobrenadantes de reacción, se observó que solo había actividad en el correspondiente a la perla de la condición III ($0,0186$ UI/mL de sobrenadante), por lo que se puede asumir que la enzima se está liberando al medio. Estos resultados se condicen con los obtenidos a partir del análisis de los sobrenadantes por SDS-PAGE, ya que en el único caso que se observó una banda correspondiente a la a la enzima fue en el carril en donde se sembró el sobrenadante correspondiente a la perla de la condición III (Figura 24, Carril III.). Estos resultados demuestran que Cv- ω TA no puede ser inmovilizada simplemente dentro de una matriz de agar ya que la enzima se libera por los poros de la matriz. Por otro lado, si bien la enzima puede ser inmovilizada exitosamente en perlas de

agar recubiertas con PEI, esta pierde toda su actividad. Por esta razón se decidió continuar los experimentos con otra transaminasa, la enzima Pf- ω TA.

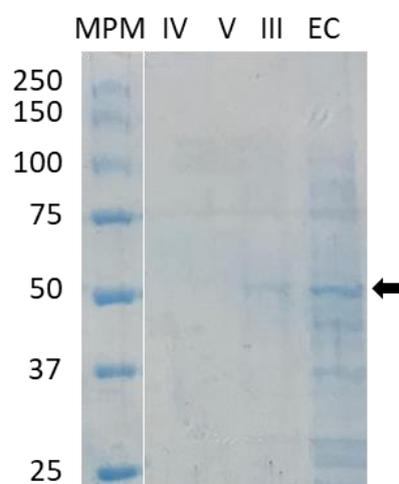


Figura 24: Electroforesis SDS-PAGE de los sobrenadantes de incubación de las perlas de agar con Cv- ω TA. MPM. Precision Plus Protein™, All Blue (250-10 KDa). IV. Sobrenadante de incubación de una perla de la condición IV, V. Sobrenadante de incubación de una perla de la condición V, III. Sobrenadante de incubación de una perla de la condición III, EC. Extracto crudo de *E. coli*. La flecha indica la proteína de interés, con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa por monómero.

Se replicaron los experimentos realizados con anterioridad para la enzima Cv- ω TA, inmovilizando la enzima Pf- ω TA en perlas de agar recubiertas de PEI y perlas de agar recubiertas con PEI y sílica (Figura 25).

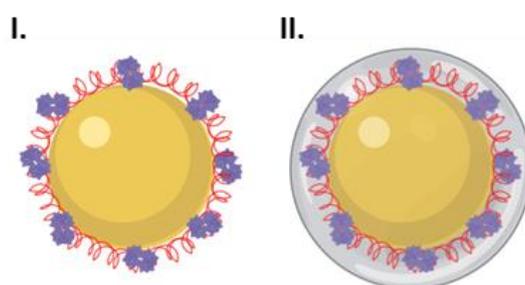


Figura 25: Estructura de las perlas: I. Perla de agar recubierta con PEI con enzima Pf- ω TA inmovilizada en la superficie, II. Perla de agar recubierta con PEI con enzima Pf- ω TA inmovilizada en la superficie, recubierta con sílica. Agar (amarillo), alginato (verde), PEI (rojo), Pf- ω TA (violeta), sílica (gris).

Se obtuvo un porcentaje de inmovilización del $74,9 \pm 0,1\%$. A una fracción de las perlas obtenidas se les agregó un recubrimiento con sílica. Se midió la actividad de ambos tipos de perlas con el fin de determinar si el recubrimiento con sílica tenía un efecto positivo en la actividad de la enzima. Se

observó que al recubrir la perla de agar con sílica su actividad disminuyó un 41,6% recuperándose solamente $1,1 \pm 0,2$ UI/mL de soporte.

Dado que la actividad expresada por la Pf- ω TA inmovilizada en perlas de agar es baja, se buscaron soportes alternativos para la inmovilización de esta enzima. Se ensayó entonces la inmovilización de Pf- ω TA por afinidad utilizando un soporte Agarosa-IDA-Co²⁺ y paralelamente se prepararon CLEAs de la enzima.

Para llevar a cabo estas preparaciones inmovilizadas, se expresó Pf- ω TA en *E. coli* con agregado de IPTG. Se colectaron las células por centrifugación y se sonicaron en presencia de PLP para obtener un extracto crudo conteniendo la enzima de interés. La unión de Pf- ω TA al soporte Agarosa-IDA-Co²⁺ procedió a través de una cola de histidina N-terminal presente en la enzima recombinante. Para llevar a cabo la inmovilización en este soporte, se ofrecieron 20 mL de extracto crudo de Pf- ω TA por cada gramo de soporte y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Para corroborar que esta incubación a 25 °C no tuviera efecto sobre la actividad enzimática se incubó una alícuota de extracto crudo a 25°C y otra se incubó en un baño de hielo, luego de 1 hora se midió su actividad. La actividad de la alícuota reservada en frío fue de $7,5 \pm 0,5$ UI/mL, mientras que la actividad de la alícuota que se mantuvo a 25°C fue de $7,7 \pm 1,0$ UI/mL. Esto indica que a 25°C no se observa un efecto negativo en la estabilidad de la enzima durante el proceso de inmovilización. Una vez culminado el proceso se separó el sobrenadante y se lavó el derivado inmovilizado obtenido con tampón HEPES, nuevamente suplementado con PLP para preservar la actividad de la enzima. Se obtuvieron inmovilizados de Pf- ω TA con una actividad de $23,1 \pm 3,0$ UI/g de Agarosa-IDA-Co²⁺. El porcentaje de inmovilización calculado fue de $83,0 \pm 1,3\%$, con un rendimiento de $19,3 \pm 0,4\%$.

Por otro lado, se prepararon los CLEAs de Pf- ω TA. Considerando la naturaleza tetramérica de la enzima, esta estrategia de inmovilización es particularmente ventajosa ya que muchas veces permite mantener la estructura cuaternaria de enzimas multiméricas. La preparación de estos inmovilizados consistió en un primer paso de mezclado de extracto crudo de Pf- ω TA con la proteína BSA. Posteriormente la mezcla fue precipitada con agregado de acetona. El entrecruzamiento fue llevado a cabo utilizando glutaraldehído. Luego de los lavados, se obtuvieron 12,8 g de CLEAs con una actividad de $5,1 \pm 0,1$ UI/g. Los CLEAs obtenidos presentaron consistencia de gel y una cierta dificultad para ser resuspendidos en solución acuosa.

Comparando los resultados de ambas estrategias de inmovilización, los mayores valores de UI/g de soporte fueron obtenidos con el soporte Agarosa-IDA-Co²⁺. Este soporte tiene además la ventaja de realizar una purificación parcial del extracto crudo, ya que solo pueden unirse a las mismas proteínas que presenten afinidad por cationes Co²⁺. Esto no ocurre con los CLEAs debido a que, durante la precipitación proteica con acetona, todas las proteínas presentes en el extracto crudo quedan formando parte de su estructura. En vista de estos resultados, se seleccionó el soporte Agarosa-IDA-Co²⁺ para seguir con los experimentos.

Se procedió a llevar a cabo la aminación reductiva de DHA (previamente producida por células en reposo de *G. oxydans*), utilizando la enzima Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺ en *batch*. La Figura 26 muestra los resultados del análisis de la reacción con el biocatalizador inmovilizado luego de 24 horas. Habiendo partido de 20 mM de DHA y 0,5 M de L-alanina, con el agregado de 4,2 UI totales de Pf- ω TA inmovilizada, al final de la reacción se logró detectar por HPLC una conversión a piruvato del 48,0 \pm 1,5%. Para ello se debió poner a punto la metodología de análisis de este producto y realizar una curva de calibración (Figura A1 y A2). El serinol no pudo ser detectado por esta técnica, aunque teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, se asume que se obtuvo una cantidad equimolar del mismo.

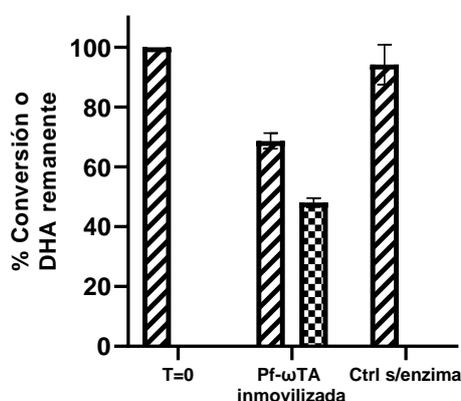


Figura 26: A) Producción de piruvato a partir de la aminación reductiva de la DHA en presencia de L-alanina, catalizada por la enzima Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺, luego de 24 horas de reacción. DHA (rayas diagonales), piruvato (cuadros).

Los resultados obtenidos en esta etapa indican que el catalizador preparado fue capaz de catalizar la aminación reductiva de la DHA con gasto de L-alanina (segundo paso de la cascada propuesta),

partiendo de DHA (producto generado durante el primer paso). Esto indica que ambos catalizadores son factibles de ser acoplados.

Acoplamiento de los biocatalizadores

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas asociados al diseño de cascadas es la incompatibilidad al combinar catalizadores. Estos problemas surgen debido a que muchas veces no todos los componentes pueden trabajar correctamente a un mismo pH, temperatura de reacción o en un mismo tampón de actividad [33]. En este caso, tanto *G. oxydans* como Pf- ω TA tienen la misma temperatura óptima de reacción (30°C). Sin embargo, es necesario comprobar si ambos catalizadores pueden operar en el mismo medio de reacción. Como las enzimas generalmente son más sensibles a los cambios en su entorno que las bacterias [8], se decidió probar el primer paso de la cascada catalítica propuesta en el tampón de actividad de la enzima.

Para ello, se estudió el impacto de los componentes de dicho tampón en la conversión de glicerol puro por células en reposo de *G. oxydans*. El tampón de actividad de la enzima contiene HEPES como agente tamponante (25 mM), PLP como cofactor de la enzima (1 mM) y L-alanina como donador de amino (0,5 M). En la Figura 27 se observa una comparación de la conversión de 50 g/L de glicerol puro, por parte de *G. oxydans* en reposo, en el tampón fosfato utilizado en los capítulos anteriores de esta Tesis y en el tampón de actividad de la enzima.

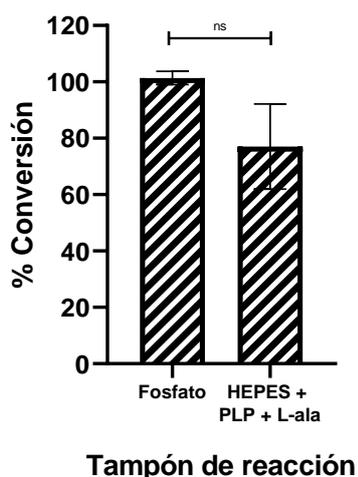


Figura 27: Producción de DHA por células en reposo de *G. oxydans* en presencia de los componentes del tampón de actividad de la enzima. ns = no se encontró diferencia significativa.

La conversión a DHA en el tampón fosfato fue cuantitativa luego de 24 horas. Por otro lado, la conversión de glicerol puro en presencia de HEPES, L-alanina y PLP alcanzó un $77,0 \pm 15,1\%$ en ese mismo tiempo. No se encontró una diferencia significativa entre estos dos resultados, lo que indica que la bioconversión no se ve afectada en presencia de los componentes del tampón de actividad de la enzima. Con estos resultados pudimos constatar que ambos pasos de la cascada catalítica pueden ser llevados a cabo en un mismo tampón de reacción.

Habiendo constatado que las células en reposo de *G. oxydans* pudieron convertir el glicerol a DHA en el tampón de actividad de la enzima Pf- ω TA, se llevó a cabo un ensayo de producción de serinol y piruvato en el que se acoplaron las células en reposo libres con la enzima inmovilizada (Figura 28). La reacción fue llevada a cabo en el tampón de actividad de la enzima, en modalidad *batch*.

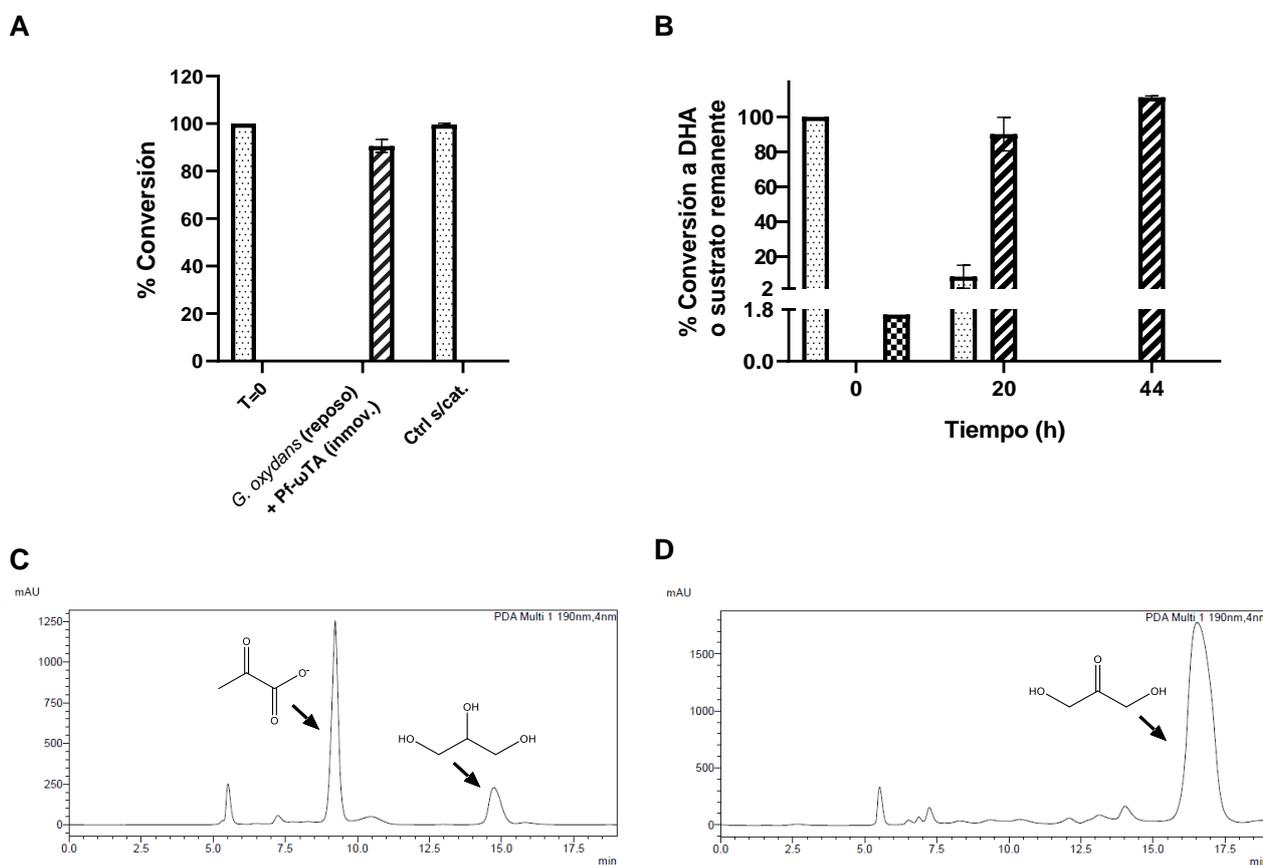


Figura 28: A) Acoplamiento de células en reposo libres de *G. oxydans* con Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺ para la producción de serinol y piruvato a partir de glicerol puro y L- alanina (24 horas). Glicerol (puntos), DHA (rayas transversales). B) Ensayo de consumo de piruvato por células en reposo libres de *G. oxydans* durante la conversión de glicerol a DHA. Glicerol (puntos), piruvato (cuadrados), DHA (rayas transversales). C) Cromatograma correspondiente al tiempo inicial de B). D) Cromatograma correspondiente al tiempo final de B).

Partiendo de 50 g/L de glicerol puro y 0,5 M de L-alanina, se agregaron 2 mg totales de *G. oxydans* y 20,4 UI totales de Pf- ω TA inmovilizada. Luego de 24 horas, se observó un consumo total del glicerol adicionado por parte de las células en reposo libres de *G. oxydans*. Sin embargo, no se logró detectar piruvato por HPLC (Figura 28A). Para confirmar que la ausencia de piruvato en el medio de reacción no hubiera estado relacionada a una pérdida de actividad de la enzima, se midió la actividad remanente de los inmovilizados de Pf- ω TA en Agarosa-IDA-Co²⁺ luego de la síntesis. El porcentaje de actividad remanente obtenido fue de $59,1 \pm 4,2\%$, por lo que se puede concluir que un porcentaje de la enzima se mantuvo activo durante toda la reacción.

Observando las concentraciones de glicerol puro consumido y DHA producida, existe una inconsistencia en el balance de masas de la reacción. Habiendo partido de $541,5 \pm 1,9$ mM de glicerol y considerando que el mismo fue consumido en su totalidad, se esperaba una conversión equimolar a DHA. Sin embargo, la concentración de DHA obtenida al final de la reacción fue de $489,6 \pm 14,7$ mM. Una posible explicación para esto puede estar relacionada con la presencia de *G. oxydans* en el medio de reacción, ya que el piruvato puede ser metabolizado por las bacterias para la producción de acetato [141]. Es probable que el déficit en el balance de masa observado se deba entonces a un consumo del piruvato producido, por parte de la bacteria.

Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo una conversión de 50 g/L de glicerol puro a DHA con un agregado de piruvato inicial de 0,7 g/L, utilizando células de *G. oxydans* en reposo en el mismo medio de reacción. Se observó que luego de 44 horas, tanto el glicerol como el piruvato habían sido consumidos totalmente y sólo se pudo detectar la presencia de DHA en el sobrenadante de reacción por HPLC (Figura 28B). Los cromatogramas correspondientes al tiempo inicial y tiempo final de la reacción se observan en las Figuras 28C y D, respectivamente.

Considerando entonces que la bacteria consume el piruvato formado, resulta necesario encontrar una técnica alternativa para la cuantificación de serinol en reacciones que incluyan tanto la bacteria como la enzima en formato *one-pot*. La acetilación del serinol permite su detección por GC. La técnica fue puesta a punto y se construyó una curva de calibración para futuras determinaciones de concentración del compuesto en medios de reacción (Figura A1 y A2). Este consumo de piruvato por parte de la bacteria puede ser potencialmente ventajoso en reacciones en formato *one-pot* debido a que provoca un desplazamiento de los equilibrios en la cascada hacia la producción de serinol. Sin embargo, como

este formato no permite la acumulación de piruvato en el medio de reacción, se deberá descartar esta estrategia para la síntesis de este compuesto. De todas formas, se pueden diseñar otros sistemas de operación con una aproximación secuencial que permitan la producción de piruvato a través de la cascada propuesta en este capítulo.

En las siguientes secciones se presentan dos sistemas para la síntesis de serinol y piruvato acoplando catalizadores inmovilizados de *G. oxydans* y Pf- ω TA.

Implementación de un sistema continuo para la producción de piruvato y serinol

Con el fin de poder obtener tanto piruvato como serinol a partir de glicerol y L-alanina en un sistema acoplado de *G. oxydans* y Pf- ω TA, se llevó a cabo el diseño de un prototipo de reactor para llevar a cabo la reacción en un sistema secuencial continuo. El mismo consistió en una bomba de jeringa y dos módulos tubulares en serie, en los que se colocaron *G. oxydans* inmovilizado en perlas de agar y Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺, por separado. Un esquema de dicho sistema se puede observar en la Figura 29. Esta aproximación permitiría que las dos reacciones acopladas de la cascada se dieran en módulos diferentes, por lo que el piruvato producido en el segundo módulo no podría ser consumido por *G. oxydans*.

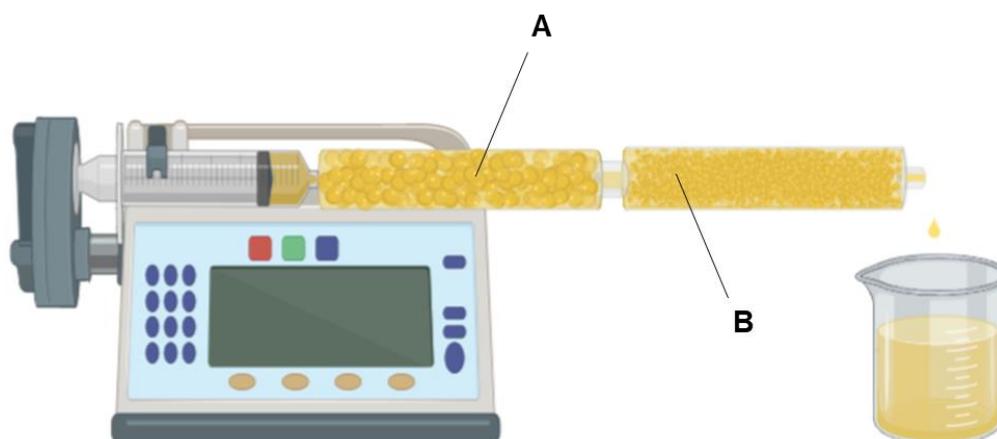


Figura 29: Sistema continuo para la producción de serinol y piruvato a partir de glicerol puro con gasto de L-alanina. A) Módulo conteniendo *G. oxydans* inmovilizado en agar. B) Módulo conteniendo Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺.

La bomba impulsó una solución conteniendo 25 g/L de glicerol puro a un flujo de 0,09 mL/min. Se aumentó la concentración de L-alanina en el medio (1,5 M) para estudiar su efecto en la conversión. Luego de equilibrada la columna del reactor por 24 horas, se analizó la formación de los productos de la reacción por HPLC. La concentración de glicerol medida en el percolado fue igual a la inicial y no

se logró detectar DHA. Por su parte, se midió la actividad remanente del inmovilizado de Pf- ω TA y se encontró que luego de 48 horas de reacción el $26,0 \pm 1,3\%$ de la enzima permanecía activa.

Una posible explicación que justifique la ausencia de formación de DHA por parte del microorganismo inmovilizado puede estar relacionada con la falta de oxígeno. Considerando el carácter de aerobio estricto de *G. oxydans*, es posible que la poca cantidad de oxígeno disuelto en el módulo A del sistema no haya permitido la oxidación del glicerol a DHA. De hecho, la dependencia del oxígeno en la producción de DHA por parte de *G. oxydans* se encuentra reportada por Adlercreutz y colaboradores, en experimentos llevados a cabo con el microorganismo inmovilizado en perlas de alginato [98]. En dicho trabajo, los autores reportan una mejora significativa en la productividad cuando el medio de reacción se encuentra saturado con oxígeno puro. Futuros esfuerzos deberán centrarse en mejorar la oxigenación del módulo A del reactor.

Implementación de un sistema *one-pot* para la producción de serinol

La co-inmovilización de biocatalizadores puede proporcionar ventajas catalíticas en las bioconversiones en cascadas, dada la proximidad física de los mismos. Por esta razón se llevó a cabo el diseño de un catalizador combinado que integra la enzima Pf- ω TA previamente inmovilizada en Agarosa-IDA- Co^{2+} en una matriz conteniendo *Gluconobacter*. Este tipo de arquitectura ha sido ensayado con otros biocatalizadores, pero hasta ahora nunca en el sistema propuesto en este trabajo. Una representación gráfica del catalizador diseñado se puede observar en la Figura 30.

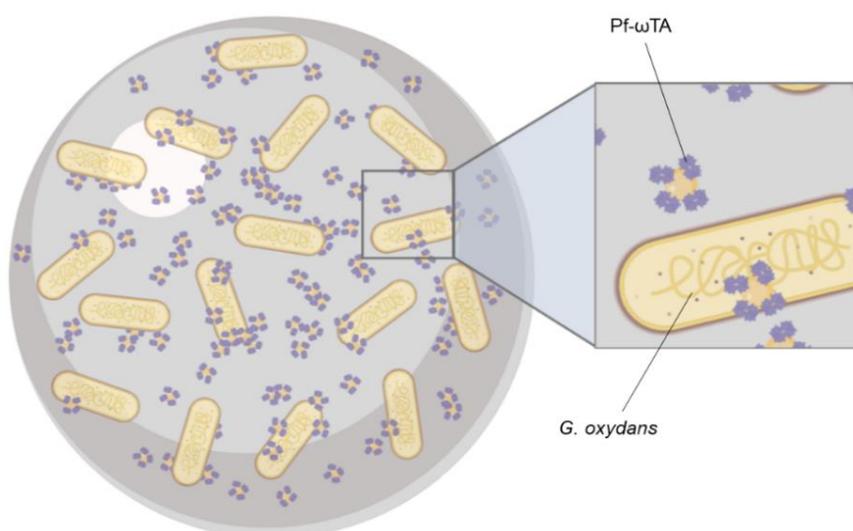


Figura 30: Representación gráfica del diseño para la co-inmovilización de *G. oxydans* y Pf- ω TA.

Considerando los buenos resultados obtenidos en el capítulo anterior con los preparados inmovilizados de *G. oxydans* en agar, se procedió a llevar a cabo la co-inmovilización de la enzima y el microorganismo, utilizando esta matriz. Al mezclar el pellet bacteriano con los inmovilizados de Pf- ω TA y el agar se generó una mezcla espesa, difícil de homogeneizar, que no pudo ser goteada en el aceite frío de manera eficiente. Considerando este resultado adverso, se buscaron matrices alternativas para llevar a cabo la co-inmovilización de los catalizadores.

Una matriz alternativa interesante es el alginato. Como se mencionó en la Introducción del capítulo anterior, esta matriz de inmovilización ha sido utilizada en repetidas ocasiones para inmovilizar *G. oxydans* para la producción de DHA, con buenos rendimientos [49], [97], [98], [100]. A su vez existen antecedentes de la preparación de catalizadores integrados que combinan células y enzimas, que utilizan alginato como matriz de inmovilización [142]–[146].

A diferencia de las perlas de agar, no se requiere calor para la preparación de las perlas de alginato. Esto es beneficioso considerando que las temperaturas cercanas a los 60°C necesarias para fundir el agar podrían afectar a la enzima durante la inmovilización. A su vez, la solución de alginato de sodio se mantiene líquida a 25°C hasta ser goteada en la solución de CaCl₂, lo que permitiría un mejor mezclado con el pellet de *G. oxydans* y la enzima Pf- ω TA previamente inmovilizada. Sin embargo, una desventaja que presenta esta matriz, razón por la cual no fue estudiada en el capítulo anterior, es su inestabilidad frente a iones fosfato. Durante el proceso de gelación por entrecruzamiento iónico utilizando CaCl₂, los cationes Ca²⁺ se unen a los bloques guluronato de las cadenas de alginato, que luego se unen entre sí formando el gel [147]. En presencia de iones fosfato, se genera una competencia con los cationes Ca²⁺, que desestabiliza la estructura del gel [147].

Antes de proceder a la co-inmovilización de *G. oxydans* y Pf- ω TA en alginato, se estudió la inmovilización del microorganismo por sí solo en esta matriz. La aproximación para el estudio del biocatalizador resultante fue igual a la descrita en el capítulo anterior para los preparados de agar y agarosa, pero con la diferencia que se utilizó glicerol puro como sustrato. Ante la imposibilidad de llevar a cabo las conversiones de *G. oxydans* inmovilizado en alginato en tampón fosfato, los experimentos presentados a continuación fueron llevados a cabo simplemente en agua destilada (Figura 31).

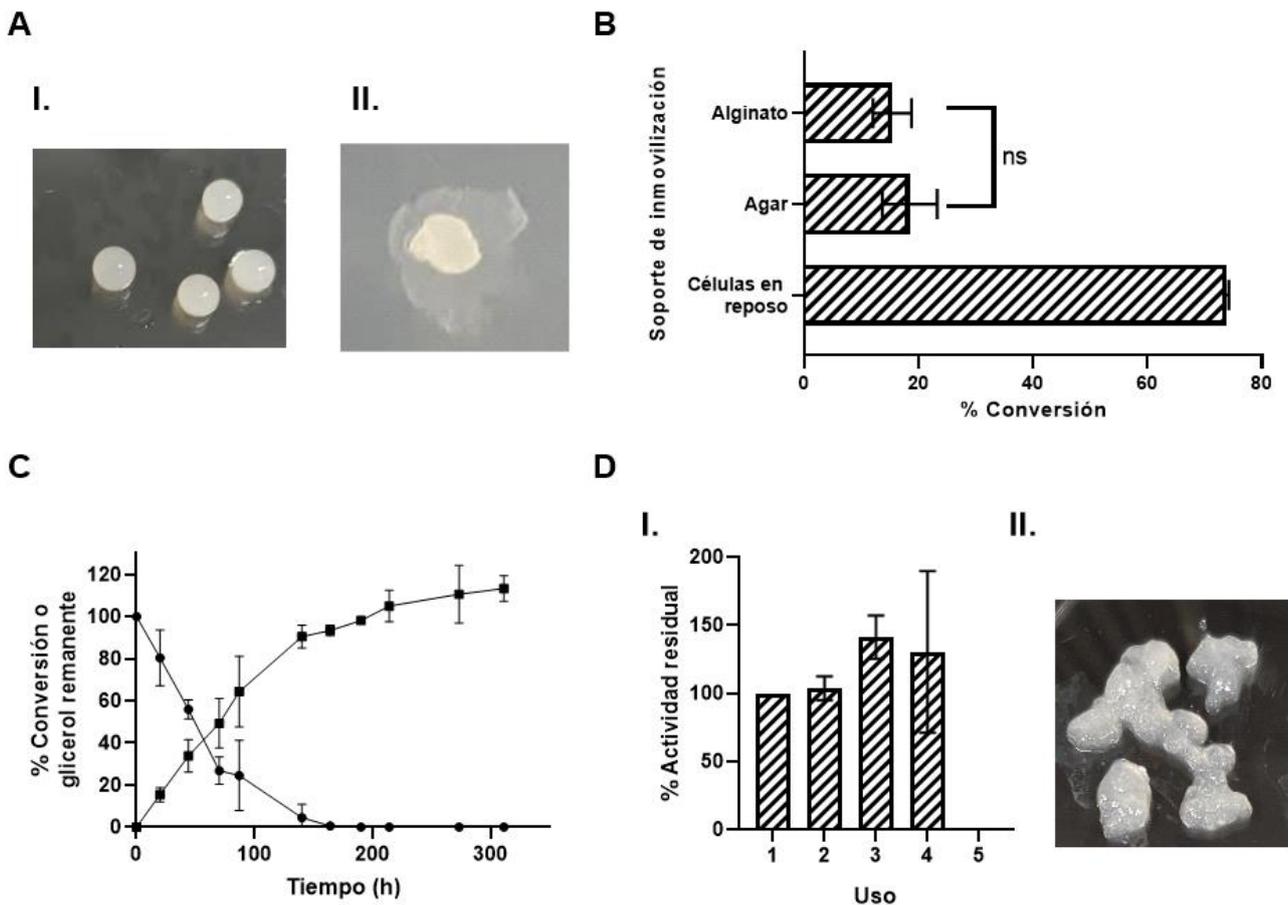


Figura 31: A) I. Preparados inmovilizados de *G. oxydans* en alginato. II. Ensayo de viabilidad células de *G. oxydans* inmovilizadas en alginato. B) Producción de DHA (rayas) por *G. oxydans* libre e inmovilizado en agar y alginato. ns = no se encontró diferencia significativa. C) Cinética de producción de DHA a partir de glicerol puro por *G. oxydans* inmovilizado en alginato. DHA (cuadrado), glicerol (círculo). D) I. Actividad residual de producción de DHA por *G. oxydans* inmovilizado en alginato. II. Inmovilizados en alginato de *G. oxydans* luego de 4 usos.

Las perlas resultantes presentaron una morfología similar a las previamente obtenidas utilizando agar como matriz, y se mantuvieron viables luego del proceso de inmovilización (Figura 31A). Su capacidad de producción de DHA en 20 horas fue comparable con la obtenida en el capítulo anterior con los preparados en agar (Figura 31B). Un estudio de la cinética de conversión de 50 g/L de glicerol con estos preparados mostró que se puede obtener una conversión cuantitativa a DHA luego de 315 horas (Figura 31C). La capacidad de reuso de los inmovilizados fue estudiada llevando a cabo reacciones sucesivas de producción de DHA de 20 horas de duración (Figura 31D I.). Se observó que la integridad de la matriz de inmovilización se fue deteriorando con cada uso, pudiendo llevar a cabo cuatro usos sucesivos antes de que se haya desintegrado por completo (Figura 31D II.) Se probó

además sonicar las bacterias previo a inmovilizarlas con el fin de intentar mejorar las productividades obtenidas. Los resultados fueron análogos a los descritos en el capítulo anterior para *G. oxydans* inmovilizado en agar, ya que nuevamente no se observan mejoras en las productividades y se observa contaminación del medio de reacción con debris celular (Datos no mostrados).

Habiendo caracterizado los inmovilizados de *G. oxydans* en alginato, se determinó que esta matriz de inmovilización puede ser potencialmente utilizada para preparar un inmovilizado combinado que contenga tanto *G. oxydans* como la enzima Pf- ω TA. La preparación de dicho catalizador inmovilizado comenzó con la inmovilización de la enzima Pf- ω TA en el soporte Agarosa-IDA-Co²⁺. Con el fin de obtener mayores actividades por gramo de soporte, se ofreció el doble de extracto crudo a 1 g de Agarosa-IDA-Co²⁺ en comparación con los protocolos previamente descritos. Se obtuvo de esta forma un derivado inmovilizado con una actividad de $74,4 \pm 20,5$ UI/g. El porcentaje de inmovilización fue de $51,1 \pm 0,3\%$ con un rendimiento de $25,2 \pm 2,4\%$.

Una vez obtenido el derivado inmovilizado de Pf- ω TA en el soporte Agarosa-IDA-Co²⁺, se procedió a preparar el inmovilizado combinado con el agregado de *G. oxydans*. Para ello se mezclaron 300 μ L de alginato al 3% con 0,5 g del derivado enzimático inmovilizado y 2 mg de peso seco de *G. oxydans*. La mezcla fue goteada en una solución de CaCl₂ para obtener las perlas de alginato. Las mismas presentaron una coloración amarillenta que se corresponde al PLP asociado a la enzima (Figura 32A).

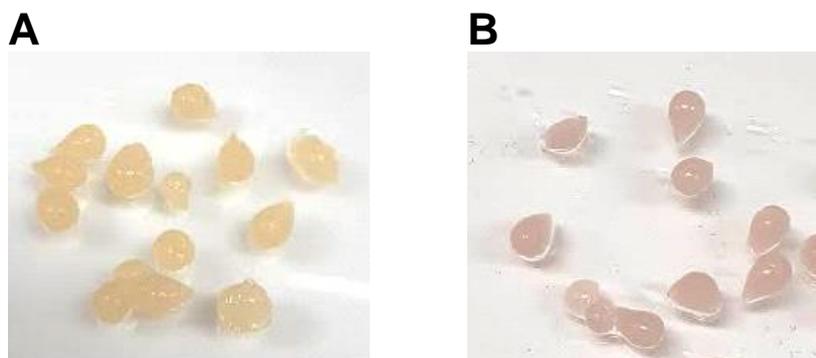


Figura 32: A) Inmovilizados combinados preparados en alginato de *G. oxydans* y Pf- ω TA inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺, previos a su utilización. B) Inmovilizados de A) luego de 44 horas de reacción.

Los nuevos inmovilizados fueron analizados por microscopía confocal. La microscopía de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para determinar la distribución de proteínas y cofactores [148]. El PLP presenta fluorescencia intrínseca, por lo que puede ser visualizado por esta técnica. En la Figura 33A se observa la fluorescencia del PLP, mientras que en la Figura 33B se observa

un corte del inmovilizado en alginato en el que se puede observar partículas correspondientes al soporte Agarosa-IDA-Co²⁺. La Figura 33C muestra una imagen superpuesta de ambas, que ubica espacialmente al PLP alrededor de las partículas de agarosa, donde se encuentra la enzima inmovilizada.

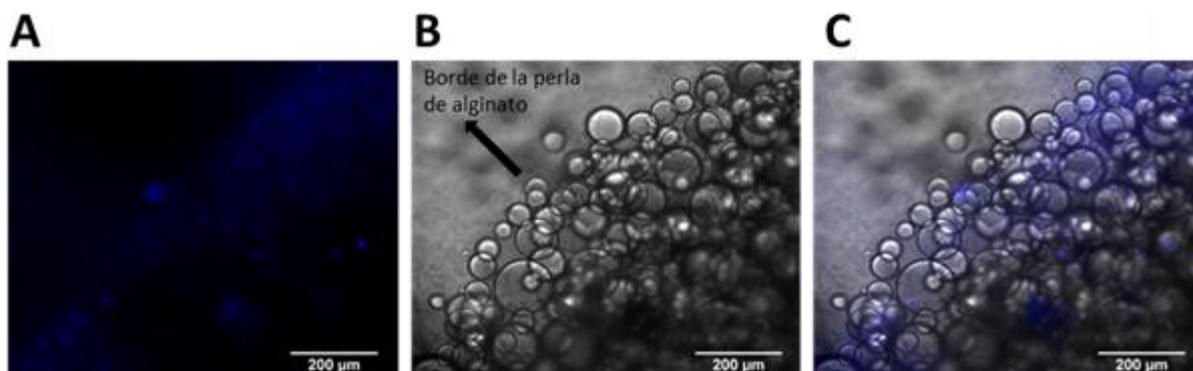


Figura 33: Microscopía confocal del preparado inmovilizado combinado en alginato de *G. oxydans* y Pf- ω TA previamente inmovilizada en Agarosa-IDA-Co²⁺. A) Fluorescencia del PLP presente en una sección de inmovilizado combinado. B) Visión de campo claro de una sección de inmovilizado combinado. C) Imagen superpuesta de A) y B).

Se llevó a cabo la reacción en cascada utilizando el inmovilizado combinado, partiendo de 50 g/L de glicerol puro, en el tampón de actividad de la enzima. Se tomaron muestras del avance de la reacción a las 20 y 44 horas (Figura 34).

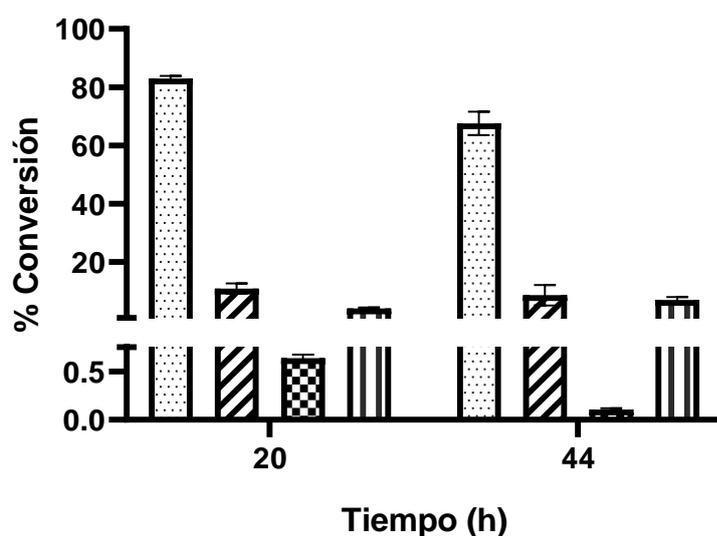


Figura 34: Conversión de glicerol puro a DHA, piruvato y serinol con gasto de L-alanina utilizando un catalizador combinado conteniendo *G. oxydans* y la enzima Pf- ω TA. Glicerol (puntos), DHA (líneas transversales), piruvato (cuadrados), serinol (líneas verticales).

A las 20 horas de reacción se observó producción de DHA por parte de *G. oxydans*, alcanzando una conversión del $10,8 \pm 1,8\%$. Por otro lado, a partir de la DHA obtenida y la L-alanina, se logró detectar por HPLC la formación de piruvato ($0,6 \pm 0,1\%$) y por GC-FID la formación de serinol ($4,1 \pm 0,3\%$). Esta diferencia observada en las cantidades de serinol y piruvato obtenidas se debe al fenómeno de consumo de piruvato por *G. oxydans* descrito anteriormente. A las 44 horas de reacción, el piruvato producido fue casi completamente metabolizado por la bacteria, por lo que solo se observa una conversión a este producto del $0,11 \pm 0,01\%$. Los cromatogramas correspondientes con estos resultados se observan en la Figura 35.

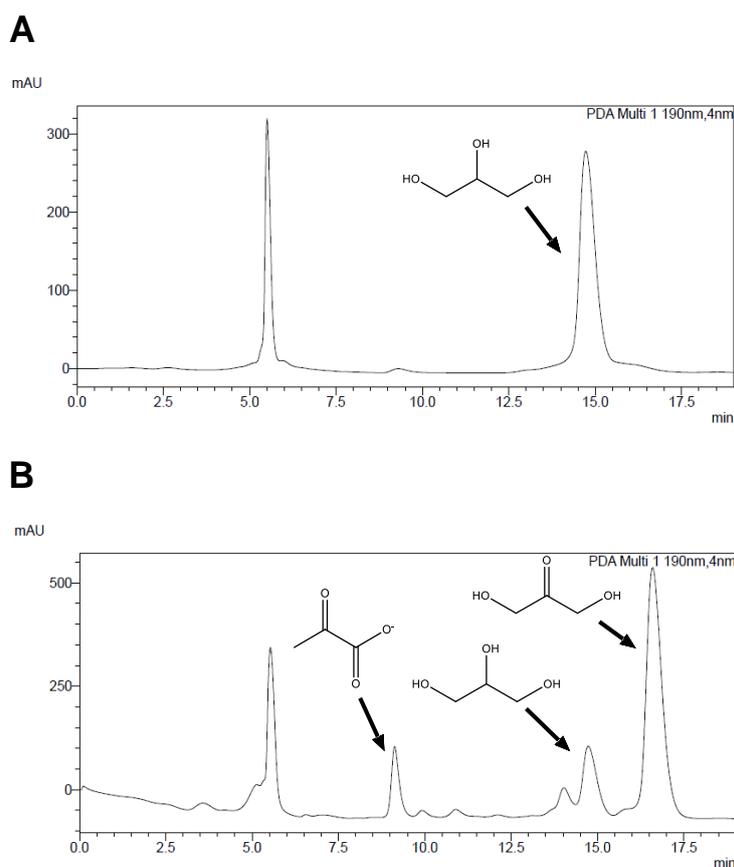


Figura 35: Análisis por HPLC de la conversión de glicerol puro a DHA, piruvato y serinol con gasto de L-alanina utilizando un catalizador combinado conteniendo *G. oxydans* y la enzima Pf- ω TA. A) Cromatograma correspondiente al tiempo inicial de la reacción. B) Cromatograma correspondiente al tiempo final de la reacción (44 horas).

Por otro lado, se observó un aumento en la producción de serinol a lo largo del tiempo de reacción, presentando a las 44 horas de reacción una conversión de $6,9 \pm 1,0\%$. Este valor se corresponde con una concentración de serinol de $38,9 \pm 5,7$ mM. El cromatograma del tiempo final de la reacción se puede observar en la Figura 36A.

Para confirmar la identidad del serinol, se realizó un análisis por espectrometría de masas del sobrenadante de reacción y se comparó el patrón obtenido con un estándar (Figuras 36C y B, respectivamente). Los resultados de este ensayo confirman la presencia de serinol en el medio de reacción.

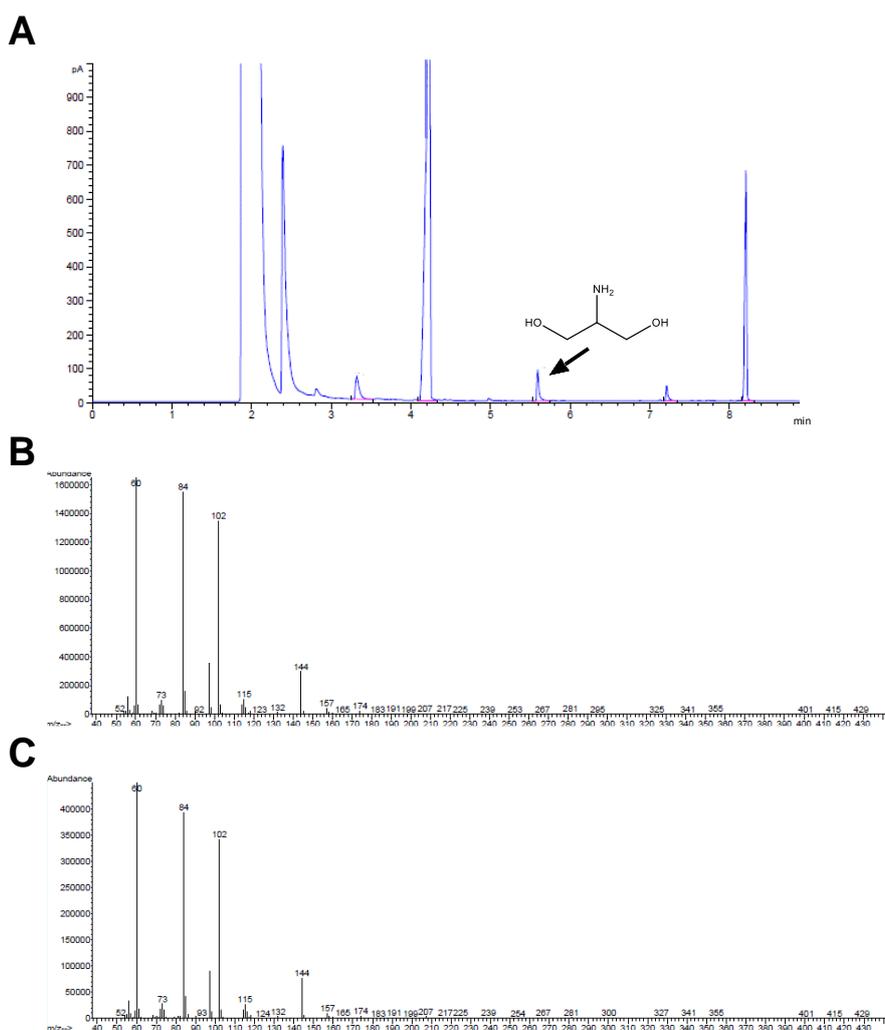


Figura 36: Análisis de la conversión de glicerol puro a DHA, piruvato y serinol con gasto de L-alanina utilizando un catalizador combinado conteniendo *G. oxydans* y la enzima Pf- ω TA. A) Cromatograma correspondiente al tiempo final de la reacción (GC-FID). B) Espectro de masas de un estándar de serinol. C) Espectro de masas del producto obtenido durante la reacción de conversión.

Se puede observar que luego de 44 horas de reacción las perlas de alginato mantienen su integridad, por lo que los componentes del tampón de actividad de la enzima y las condiciones de reacción no parecen impactar en la estructura de las mismas, ni en su capacidad de convertir los sustratos en

productos. Sin embargo, los estudios preliminares llevados a cabo con inmovilizados de *G. oxydans* en alginato mostraron que el reuso de esta matriz se ve limitado por la pérdida de integridad de la misma en los sucesivos usos. Futuros ensayos de reuso del catalizador combinado deberían llevarse a cabo, a la vez que parece resultar necesario el estudio de alternativas para mejorar la integridad de la matriz de alginato a la hora de inmovilizar. Luego de la reacción, los preparados inmovilizados perdieron la coloración amarilla que presentaban (Figura 32B). El PLP se encuentra unido a la enzima por una base de Schiff con una determinada constante de disociación, por lo que existe un equilibrio entre la forma libre y la forma asociada a la enzima [121]. Está reportado que la molécula de PLP se degrada fácilmente en presencia de luz [149]. Es posible que, durante la reacción, parte del PLP haya sido degradado, resultando en la pérdida de coloración de los preparados inmovilizados.

Existen pocos reportes de la síntesis biotecnológica del serinol. Se destaca entre ellos el trabajo de Andreeßen y Steinbüchel, en el que lograron obtener 36,2 mM de serinol, siendo hasta ahora el reporte en el que mayor concentración se había obtenido de este producto [124]. Cabe destacar, que los resultados obtenidos por Andreeßen y Steinbüchel utilizando una *E. coli* recombinante conteniendo el gen de la enzima DHA fosfato transaminasa/rhizobitoxina sintasa Rtx A, fueron obtenidos en formato *batch* en condiciones de crecimiento. Nuestros resultados son comparables con los del estudio previamente mencionado, con la ventaja de haber sido obtenidos a partir de una cascada inmovilizada, que incluye células en reposo. De esta forma se posibilita el reuso de los catalizadores, a la vez que se facilita el procesamiento *downstream* reduciendo la ocurrencia de reacciones secundarias. Tomando en consideración que los costos de procesamiento *downstream* generalmente alcanzan el 80% de los costos totales de un proceso, la obtención de un sobrenadante de reacción más puro supone una clara ventaja económica [123].

Como se mencionó con anterioridad, muchas veces el empleo de enzimas libres es preferido en el diseño de cascadas a la utilización de células enteras, principalmente por las posibles reacciones secundarias que el empleo de estas últimas puede llegar a implicar [9]. Sin embargo, muchas veces las células enteras superan a las enzimas en productividades y su costo es menor en comparación con el de enzimas y cofactores [33]. En el caso particular de nuestro diseño, el uso de células enteras de *Gluconobacter* se encuentra además justificado por varias razones. En primera instancia, la enzima glicerol deshidrogenasa, responsable de la oxidación del glicerol a DHA, es una proteína de membrana. Por esta razón, la misma es muy hidrofóbica, lo que la hace inestable en solución acuosa [99]. Al mantenerla dentro de la célula, permanece estable por más tiempo. A su vez, esta enzima es

dependiente del cofactor redox PQQ. Este cofactor acopla la oxidación del glicerol con la reducción de la ubiquinona, acoplando el sistema con la cadena respiratoria [63]. Al utilizar una célula entera, no es necesario el agregado de ninguno de estos cofactores para llevar a cabo la reacción de oxidación. Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio confirmaron por RMN que *G. oxydans* en reposo no produce cantidades significativas de otros productos diferentes a la DHA durante la conversión de glicerol, por lo que en este caso la ocurrencia de posibles reacciones secundarias ha probado no ser un problema.

Otra ventaja que presenta nuestra aproximación se relaciona al consumo del piruvato producido por la enzima por parte de la bacteria. Generalmente, las reacciones que involucran transaminasas son completamente reversibles y terminan alcanzando un equilibrio [117]. Por esta razón se han buscado estrategias para mejorar las productividades, como la utilización de un exceso de donador de amino económico, la remoción *in situ* del producto utilizando resinas o reacciones acopladas, la remoción de productos por volatilización o el acoplamiento de otros sistemas enzimáticos [117]. En este caso, la propia bacteria consume el piruvato generado, favoreciendo la formación de serinol por un desplazamiento en los equilibrios de la reacción. De esta forma, no solo se obtienen mejores rendimientos del producto, sino que posiblemente permita obtener un producto más puro.

Conclusiones

Durante este capítulo se estudió la posibilidad de implementar una cascada biocatalítica para la síntesis de serinol y piruvato a partir de glicerol. Para ello se buscó acoplar dos catalizadores, la bacteria *G. oxydans* y una enzima ω -transaminasa.

Se comenzó probando la inmovilización de las enzimas Cv- ω TA y Pf- ω TA en perlas de agar recubiertas del polímero PEI. Ambas enzimas fueron inmovilizadas de manera exitosa en el soporte, sin embargo, los inmovilizados de Cv- ω TA no presentaron actividad alguna luego de la inmovilización, por lo que esta enzima fue descartada para futuros ensayos. Por su parte, los inmovilizados de Pf- ω TA no presentaron actividades altas, tanto para los inmovilizados no recubiertos, como para los recubiertos con sílica.

Se ensayó la inmovilización de Pf- ω TA en un soporte de Agarosa-IDA-Co²⁺ y paralelamente se prepararon CLEAs de esta enzima. Ambas técnicas de inmovilización permitieron la preparación de catalizadores activos. El soporte con el que se obtuvo una mayor actividad/g fue Agarosa-IDA-Co²⁺, por lo que se seleccionó este soporte para llevar a cabo los experimentos siguientes. Los preparados obtenidos de Pf- ω TA fueron capaces de convertir la DHA producida por *G. oxydans* en reposo. Sin embargo, se observó que el piruvato producido durante la síntesis *one-pot* es consumido por la bacteria. Esto resulta ventajoso para desplazar los equilibrios hacia la síntesis de serinol, pero constituye un desafío para la síntesis de piruvato en formato *one-pot*.

La implementación de un sistema continuo para la producción de serinol y piruvato, consistiendo en dos módulos en serie conteniendo cada uno un catalizador inmovilizado, fue ensayada para poder sortear el problema del consumo de piruvato por parte de la bacteria. Sin embargo, no se logró obtener los productos objetivo. Un análisis del percolado obtenido mostró que falló el primer paso de la cascada, ya que el glicerol agregado no había sido oxidado a DHA por parte de *Gluconobacter*. Por su parte, el inmovilizado de Pf- ω TA retuvo un porcentaje de su actividad durante todo el ensayo. Es probable que la falta de oxígeno en el primer módulo del reactor no haya permitido la oxidación del glicerol a DHA, remarcando la importancia del oxígeno durante este primer paso catalítico. Futuras investigaciones deben centrarse en encontrar diseños de reactor que permitan la oxigenación del medio de reacción durante la conversión de glicerol a DHA por parte de *G. oxydans*, para la obtención de piruvato con esta cascada biocatalítica.

El alginato probó ser un soporte adecuado para la co-inmovilización de *G. oxydans* y la enzima Pf- ω TA. Las perlas de alginato conteniendo ambos catalizadores fueron ensayadas en la conversión de glicerol a serinol y piruvato con gasto de L-alanina de manera exitosa. Se logró constatar por HPLC la presencia de piruvato y por GC-MS la de serinol en el sobrenadante de reacción, indicando que la cascada inmovilizada funcionó correctamente.

La producción de serinol alcanzada ($38,9 \pm 5,7$ mM) se acerca a los valores obtenidos por Andreeßen y Steinbüchel, que lograron obtener 36,2 mM de este compuesto con una *E. coli* recombinante en crecimiento. Este último es el reporte en el que se había alcanzado la mayor concentración de serinol por síntesis biotecnológica hasta el momento.

Los resultados obtenidos en este capítulo presentan una alternativa novedosa para la síntesis biotecnológica de serinol y piruvato a partir de una cascada inmovilizada sin precedentes. Esta cascada combina la acción de un microorganismo y una enzima ω -transaminasa. Las productividades obtenidas de serinol probaron encontrarse entre las más altas reportadas para procesos de síntesis biotecnológica de este compuesto. Futuros esfuerzos deberán centrarse en conseguir el aumento de las productividades y llevar a cabo estudios de reuso, estabilidad y *leakage* del catalizador obtenido. A su vez, la cascada podrá ser ensayada utilizando glicerol de *splitting* como sustrato.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

Conclusiones generales y perspectivas futuras

El marco de esta Tesis se describió la síntesis de cuatro productos biotecnológicos de alto valor agregado a partir de glicerol: ácido glicérico, dihidroxiacetona, serinol y piruvato. Las síntesis fueron llevadas a cabo utilizando catalizadores inmovilizados.

En primera instancia se realizaron ensayos de conversión de glicerol puro, y posteriormente de *splitting*, a DHA y GA, con tres cepas distintas de *Gluconobacter*: *G. oxydans* NBRC 14819, *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 y *Gluconobacter sp.* NBRC 3259. Estos ensayos fueron llevados a cabo con células en reposo libres y permitieron establecer las condiciones para la producción de los compuestos de interés, para luego extrapolarlas a las conversiones con los catalizadores inmovilizados. La identidad de los compuestos producidos por *G. oxydans* y *G. frateurii* fue corroborada por RMN, justificando la utilización de estos catalizadores como células enteras en reposo, ya que se comprobó que la ocurrencia de reacciones secundarias no es significativa. Los resultados obtenidos en esta etapa reforzaron la necesidad de la inmovilización, ya que se observaron fenómenos de inhibición por producto, a la vez que se constató la imposibilidad de reutilizar las células en reposo. Sin embargo, cabe destacar que a lo mejor de nuestro conocimiento tenemos el mejor reporte de biosíntesis de GA por células de *G. frateurii* en reposo, partiendo tanto de glicerol puro como de *splitting*. A su vez, con *G. oxydans* en la conversión de DHA a partir de glicerol de *splitting*, obtuvimos productividades mayores o similares a las obtenidas con glicerol puro en reportes recientes. Se desarrolló por tanto una metodología de producción verde que facilita el procesamiento *downstream* por ausencia de subproductos.

Se llevó a cabo la inmovilización de *G. oxydans* y *G. frateurii* en una serie de soportes, obteniéndose varios catalizadores activos que mantienen la viabilidad de las células luego del proceso de inmovilización. La síntesis de DHA y GA a partir de glicerol de *splitting* con estos preparados inmovilizados se llevó a cabo de manera exitosa para ambas cepas y permitió el reuso de los catalizadores. Es de destacar que, entre las técnicas de inmovilización reportadas en el marco de esta Tesis, la inmovilización de las cepas de *Gluconobacter* en estudio en perlas de agar y agarosa no tiene precedentes en la literatura. La producción de GA por los catalizadores inmovilizados de *G. frateurii* no alcanzó altos rendimientos y el producto obtenido se encuentra en gran medida contaminado con DHA. Esta síntesis podría verse beneficiada de modificaciones a nivel génico de la cepa *G. frateurii*,

por ejemplo, la sobreexpresión la enzima mADH. Por otro lado, sería interesante estudiar el silenciamiento del gen de la enzima glicerol deshidrogenasa, para disminuir la contaminación con DHA.

Por su parte, la producción de DHA utilizando preparados inmovilizados en agar de *G. oxydans* presentó muy buenos resultados. Con esta estrategia se logró obtener conversiones cuantitativas de glicerol de *splitting* a DHA, con productividades que superan las obtenidas por reportes recientes de conversión de glicerol crudo que emplean otras técnicas de inmovilización. El siguiente paso será estudiar alternativas para disminuir el efecto del *leakage*, para lograr conseguir un producto libre de células. A su vez, se deberán llevar a cabo estudios para el escalado del proceso, así como el diseño de reactores que permitan procesos en continuo, tomando en consideración la importancia del oxígeno en esta conversión. Se deberán analizar estrategias para llevar a cabo el procesamiento *downstream* del sobrenadante de reacción, para la obtención de un producto puro y comercializable.

Para los estudios planteados con relación a una cascada catalítica de transformación de glicerol, se evaluaron dos ω -transaminasas obtenidas por recombinación en *E. coli* de distintos orígenes: Cv- ω TA (*Chromobacterium violaceum*) y Pf- ω TA (*Pseudomonas fluorescens*). Estudios preliminares de inmovilización de ambas enzimas mostraron un mejor rendimiento por parte de la enzima Pf- ω TA, por lo que fue la seleccionada para llevar a cabo el segundo paso de la cascada planteada. Se logró la inmovilización de esta enzima por adsorción iónica en perlas de agar recubiertas de PEI, por quelatos metálicos en un soporte comercial de agarosa (Agarosa-IDA-Co²⁺) y por entrecruzamiento, formando CLEAs junto con la proteína BSA. La preparación de CLEAs a partir de transaminasas no se encuentra aún reportada en la literatura, por lo que nuestros resultados constituyen el primer reporte en este sentido. El soporte que presentó mayor actividad fue el basado en agarosa, por lo que se seleccionó para experimentos subsiguientes.

Se diseñaron dos sistemas para el acoplamiento de los catalizadores de la cascada propuesta. En primer lugar, se planteó una síntesis secuencial llevada a cabo en un reactor en continuo que incluyó *G. oxydans* y Pf- ω TA inmovilizados por separado en distintos módulos. Con este diseño se buscó posibilitar la acumulación de piruvato en el medio de reacción, ya que se observó que en presencia de *G. oxydans* el mismo es metabolizado. Sin embargo, la implementación de este sistema no fue exitosa, probablemente en relación a la falta de oxígeno en el primer módulo del reactor que no permitió la oxidación del glicerol a DHA. Futuros esfuerzos deberán centrarse en aumentar la disponibilidad de

oxígeno dentro del reactor. Se logró además la preparación de un co-inmovilizado de *G. oxydans* y transaminasa por atrapamiento en perlas de alginato del microorganismo y la enzima previamente inmovilizada. Con el catalizador obtenido se logró llevar a cabo la síntesis de piruvato y serinol a partir de glicerol con el agregado de L-alanina exitosamente, constatándose la formación de piruvato por HPLC y la de serinol por GC. Los resultados obtenidos constituyen el primer reporte de acoplamiento de *G. oxydans* con la enzima Pf- ω TA para la obtención de piruvato y serinol a partir de glicerol. Además, la productividad de serinol alcanzada de $38,9 \pm 5,7$ mM es la más alta reportada para una síntesis biotecnológica de este compuesto. El diseño de la cascada aprovecha el consumo de piruvato por parte de la bacteria, ya que permite el desplazamiento de los equilibrios favoreciendo la síntesis de serinol. En adelante, el sistema diseñado podría ser probado con el sustrato más económico glicerol de *splitting*. Se podrían analizar también las posibilidades de reuso del mismo y su posible uso en sistemas continuos.

Los catalizadores inmovilizados obtenidos durante este trabajo de Tesis parecen factibles de ser utilizados a mayores escalas, ya sea en *batch* o en sistemas continuos. Esto resulta de especial interés para la industria, en particular la de los biocombustibles, ya que utiliza como sustrato su principal subproducto, el glicerol.

Para la financiación de esta Tesis, se contó con una beca de posgrado nacional (POS_NAC_2017_1_140229) y un proyecto FSE (FSE_1_2016_1_132115) otorgados por ANII.

Los estudios de conversión de glicerol de *splitting* por células en reposo libres de *G. frateurii* y *G. oxydans* fueron publicados en la revista *MicrobiologyOpen*, en el artículo "*Efficient glycerol transformation by resting Gluconobacter cells*" bajo la autoría de Erienne Jackson, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor [150].

Los resultados correspondientes a estudios de inmovilización se encuentran siendo recopilados para la preparación del trabajo "*Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol*" bajo la autoría de Magdalena Ripoll, Erienne Jackson y Lorena Betancor.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en el marco de esta Tesis fueron presentados en una serie de eventos de divulgación, tanto a nivel nacional como internacional:

- **Evento:** Biotrans 2017
País: Hungría
Título del poster: “*Crude glycerol revalorization in media-free biotransformations*”
Autores: Erienne Jackson*, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor

- **Evento:** ENAQUI 5 (2017)
País: Uruguay
Título del poster: “Estudios de conversión de glicerol por *Gluconobacter sp.* NBRC 3259”
Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor

- **Evento:** ENAQUI 5 (2017)
País: Uruguay
Título del poster: “Inmovilizados de *G. frateurii* para la bioconversión de glicerol”
Autores: Erienne Jackson*, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor

- **Evento:** 3rd Green & Sustainable Chemistry Conference (GREN) (2018)
País: Alemania
Título del poster: “*Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol*”
Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor

- **Evento:** CAETS 2018
País: Uruguay
Título del poster: “*Towards Biodiesel Biorefinery: Glycerol valorization using immobilized bacteria*”
Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor

- **Evento:** III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones / VIII Encuentro regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (SilaByB) (2018)

País: Argentina

Título del poster: “*Strategies to improve the conversion of crude glycerol with Gluconobacter strains*”

Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor
- **Evento:** III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones / VIII Encuentro regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (SilaByB) (2018)

País: Argentina

Título de la exposición oral: “*Crude glycerol transformation with immobilized G. oxydans in agar*”

Autores: Erienne Jackson*, Magdalena Ripoll y Lorena Betancor
- **Evento:** Biotrans 2019

País: Países Bajos

Título del poster: “*Microbial conversion of glycerol to dihydroxyacetone in water*”

Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor
- **Evento:** II Congreso Nacional de Biociencias 2019

País: Uruguay

Título del poster: “*Inmovilización de Gluconobacter oxydans para la producción de dihidroxiacetona a partir de glicerol crudo*”

Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson y Lorena Betancor
- **Evento:** ENAQUI 6 (2019)

País: Uruguay

Título del poster: “*Cascada biocatalítica para la síntesis de serinol y piruvato a partir de glicerol*”

Autores: Magdalena Ripoll*, Erienne Jackson, Susana Velasco-Lozano, Fernando López-Gallego y Lorena Betancor

Bibliografía

- [1] S. Maina, V. Kachrimanidou, y A. Koutinas, “A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization”, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 8, pp. 18–23, 2017.
- [2] K. Faber, “Introduction and background information” en *Biotransformations in Organic Chemistry*, 7ma ed., K. Faber, Ed. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–30, 2018.
- [3] I. Pervaiz, S. Ahmad, M. A. Madni, H. Ahmad, y F. H. Khaliq, “Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review)” *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, vol. 49, no. 5, pp. 435–449, 2013.
- [4] J. E. Leresche y H. P. Meyer, “Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist” *Org. Process Res. Dev.*, vol. 10, no. 3, pp. 572–580, 2006.
- [5] J. M. Woodley, “New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 21, pp. 22–26, 2020.
- [6] S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, y M. B. Ansorge-Schumacher, “Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 4, pp. 1517–1529, 2014.
- [7] R. A. Sheldon y S. Van Pelt, “Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how” *Chem. Soc. Rev.* vol. 42, no. 42, pp. 6223–6235, 2013.
- [8] S. E. Milner y A. R. Maguire, “Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis” *Arkivoc*, vol. 2012, no. 1, pp. 321–382, 2012.
- [9] E. Ricca, B. Brucher, y J. H. Schrittwieser, “Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives” *Adv. Synth. Catal.*, vol. 353, no. 13, pp. 2239–2262, 2011.

- [10] R. Cutlan, S. De Rose, M. N. Isupov, J. A. Littlechild, y N. J. Harmer, “Using enzyme cascades in biocatalysis: Highlight on transaminases and carboxylic acid reductases” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1868, no. 2, p. 140322, 2020.
- [11] J. A. Trelles y C. W. Rivero, “Whole Cell Entrapment Techniques” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 365–374, 2013.
- [12] P. Zajkoska, M. Rebroš, y M. Rosenberg, “Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 4, pp. 1441–1455, 2013.
- [13] C. C. C. R. de Carvalho, “Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry” *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2, pp. 250–263, 2017.
- [14] M. K. Julsing, D. Kuhn, A. Schmid, y B. Bühler, “Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 5, pp. 1109–1119, 2012.
- [15] J. M. Guisan, “New Opportunities for Immobilization of Enzymes” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 1–13, 2013.
- [16] B. Brena, P. González-Pombo, y F. Batista-Viera, “Immobilization of Enzymes: A Literature Survey,” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 15–31, 2013.
- [17] I. Eş, J. D. G. Vieira y A. C. Amaral, “Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 5, pp. 2065–2082, 2015.
- [18] M. Gungormusler-Yilmaz, N. Cicek, D. B. Levin y N. Azbar, “Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 36, no. 3, pp. 482–494, 2016.
- [19] J. D. Carballeira, M.A. Quezada, P. Hoyos, Y. Simeó, M.J. Hernaiz, A.R. Alcantara y J.V. Sinisterra, “Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 6, pp. 686–714, 2009.

- [20] S. Datta, L. R. Christena, y Y. R. S. Rajaram, “Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials” *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [21] L. Betancor y H. R. Luckarift, “Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis” *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 10, pp. 566–572, 2008.
- [22] K. Faber, “Special techniques” en *Biotransformations in Organic Chemistry*, 7ma ed., K. Faber, Ed. Cham: Springer International Publishing, pp. 315–406, 2018.
- [23] W. Böhmer, T. Knaus, A. Volkov, T. K. Slot, N. R. Shiju, K. Engelmark Cassimjee y F. G. Mutti, “Highly efficient production of chiral amines in batch and continuous flow by immobilized ω -transaminases on controlled porosity glass metal-ion affinity carrier” *J. Biotechnol.*, vol. 291, no. August 2018, pp. 52–60, 2019.
- [24] J. W. Wong, R. L. Albright, y N. H. L. Wang, “Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications” *Sep. Purif. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 49–106, 1991.
- [25] A. Sassolas, A. Hayat, y J. L. Marty, “Immobilization of Enzymes on Magnetic Beads Through Affinity Interactions” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 139–148, 2013.
- [26] E. Araya, P. Urrutia, O. Romero, A. Illanes, y L. Wilson, “Design of combined crosslinked enzyme aggregates (combi-CLEAs) of β -galactosidase and glucose isomerase for the one-pot production of fructose syrup from lactose” *Food Chem.*, vol. 288, no. February, pp. 102–107, 2019.
- [27] S. R. Sizemore, R. Nichols, R. Tatum, P. Atanassov, G. R. Johnson y H. R. Luckarift, “Immobilization of Whole Cells by Chemical Vapor Deposition of Silica” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 301–312, 2013.
- [28] R. León, P. Fernandes, H. M. Pinheiro y J. M. S. Cabral, “Whole-cell biocatalysis in organic media” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 23, no. 7–8, pp. 483–500, 1998.

- [29] P. Sánchez, R. M. Hernández, J. L. Pedraz y G. Orive, “Encapsulation of Cells in Alginate Gels,” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, 3ra ed., J. M. Guisan, Ed. Humana Press, pp. 313–325, 2013.
- [30] A. George, P. A. Shah y P. S. Shrivastav, “Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review” *Int. J. Pharm.*, vol. 561, no. March, pp. 244–264, 2019.
- [31] J. K. Guterl, D. Garbe, J. Carsten, F. Steffler, B. Sommer, S. Reiß, A. Philipp, M. Haack, B. Rühmann, A. Koltermann, U. Kettling, T. Brück y V. Sieber, “Cell-free metabolic engineering: Production of chemicals by minimized reaction cascades” *ChemSusChem*, vol. 5, no. 11, pp. 2165–2172, 2012.
- [32] F. S. Aalbers y M. W. Fraaije, “Enzyme Fusions in Biocatalysis: Coupling Reactions by Pairing Enzymes” *ChemBioChem*, vol. 20, no. 1, pp. 20–28, 2019.
- [33] J. M. Sperl y V. Sieber, “Multienzyme Cascade Reactions - Status and Recent Advances” *ACS Catal.*, vol. 8, no. 3, pp. 2385–2396, 2018.
- [34] Q. Zhang, Z. M. Wu, C. L. Hao, X. L. Tang, R. C. Zheng, y Y. G. Zheng, “Highly regio- and enantioselective synthesis of chiral intermediate for pregabalin using one-pot bienzymatic cascade of nitrilase and amidase,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 14, pp. 5617–5626, 2019.
- [35] S. Meng, J. Guo, Z. Li, K. Nie, H. Xu, T. Tan y L. Liu, “Enzymatic cascade biosynthesis reaction of musky macrolactones from fatty acids” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 131, no. June, p. 109417, 2019.
- [36] J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall y W. Kroutil, “Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules” *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 1, pp. 270–348, 2018.

- [37] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius y H. Yun, “Recent advances in ω -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines” *Catalysts*, vol. 8, no. 7, 2018.
- [38] M. Ayoub y A. Z. Abdullah, “Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 5, pp. 2671–2686, 2012.
- [39] Global Market Insights Inc., “Glycerol Market Size By Application (Personal Care, Polyether Polyol Applications, Alkyd Resins), By Source (Biodiesel, Fatty Alcohols, Fatty Acids), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Price Trend, Downstream Potential, Competitive Market Share &,” Global Market Insights, 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/glycerol-market-size>. [Consultado: 01-Mar-2017].
- [40] C. A. G. Quispe, C. J. R. Coronado y J. A. Carvalho, “Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 27, no. August 2016, pp. 475–493, 2013.
- [41] P. S. Kong, M. K. Aroua y W. M. A. W. Daud, “Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 63, pp. 533–555, Sep. 2016.
- [42] H. Habe, Y. Shimada, T. Yakushi, H. Hattori, Y. Ano, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, H. Yanagishita, K. Matsushita, y K. Sakaki, “Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 24, pp. 7760–7766, 2009.
- [43] F. Yang, M. a Hanna y R. Sun, “Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, no. 1, p. 13, 2012.
- [44] N. Vivek, R. Sindhu, A. Madhavan, A. J. Anju, E. Castro, V. Faraco, A. Pandey y P. Binod, “Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview” *Bioresour. Technol.*, vol. 239, pp. 507–517, 2017.

- [45] S. Veiga y J. Bussi, “Efficient Conversion of Glycerol to a H₂ Rich Gas Mixture by Steam Reforming over NiLaZr Catalysts,” *Top. Catal.*, vol. 59, no. 2–4, pp. 186–195, 2016.
- [46] S. Khanna, A. Goyal y V. S. Moholkar, “Microbial conversion of glycerol: Present status and future prospects” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 32, no. 3, pp. 235–262, 2012.
- [47] P. K. Dikshit y V. S. Moholkar, “Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904,” *Bioresour. Technol.*, vol. 216, pp. 948–957, 2016.
- [48] S. de la Morena, V. E. Santos y F. García-Ochoa, “Influence of oxygen transfer and uptake rates on dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in resting cells operation” *Biochem. Eng. J.*, vol. 147, no. February, pp. 20–28, 2019.
- [49] C. S. Black y G. R. Nair, “Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconacetobacter Xylinus* Cells” *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, vol. 4, no. 5, pp. 310–314, 2013.
- [50] U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes y J. M. Ward, “Substrate spectrum of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 41, no. 5, pp. 628–637, 2007.
- [51] A. I. Benítez-Mateos, M. L. Contente, S. Velasco-Lozano, F. Paradisi y F. López-Gallego, “Self-Sufficient Flow-Biocatalysis by Coimmobilization of Pyridoxal 5'-Phosphate and ω -Transaminases onto Porous Carriers” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 10, pp. 13151–13159, 2018.
- [52] R. Ciriminna, A. Fidalgo, L. M. Ilharco y M. Pagliaro, “Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct” *ChemistryOpen*, vol. 7, no. 3, pp. 233–236, 2018.
- [53] L. Stasiak-Rózańska y S. Błażejczak, “Acetic acid Bacteria - perspectives of Application in Biotechnology - a Review” *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 59, no. 1, pp. 17–23, 2009.
- [54] M. Brovotto, D. Gamemara, P. Saenz Méndez y G. A. Seoane, “C-C bond-forming lyases in organic synthesis, *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 7, pp. 4346–4403, 2011.

- [55] U. Deppenmeier, M. Hoffmeister y C. Prust, “Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter strains*” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 60, no. 3, pp. 233–242, 2003.
- [56] L. Stasiak-Rózańska, A. Berthold-Pluta y P. K. Dikshit, “Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from *Gluconobacter oxydans*” *Appl. Sci.*, vol. 8, no. 12, 2018.
- [57] H. L. Ohrem y F. Westmeier, “Microbial process for the preparation of dihydroxyacetone with recycling biomass” 5770411, 1998.
- [58] H. Habe, T. Fukuoka, D. Kitamoto y K. Sakaki, “Biotechnological production of D-Glyceric acid and its application” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 84, no. 3, pp. 445–452, 2009.
- [59] S. Sato, N. Morita, D. Kitamoto, T. Yakushi, K. Matsushita y H. Habe, “Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol” *AMB Express*, vol. 3, no. 1, p. 20, 2013.
- [60] A. Oliveira y V. S. Junior, “Study of bacteria *Gluconobacter sp.*: isolation, purification, phenotypic and molecular identification” *Ciência e Tecnol. Aliment.*, vol. 30, no. 1, pp. 106–112, 2010.
- [61] A. Gupta, V. K. Singh, G. N. Qazi y A. Kumar, “*Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 3, no. 3, pp. 445–456, 2001.
- [62] J. Wu, J. Le Wang, M. H. Li, J. P. Lin y D. Z. Wei, “Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 23, pp. 8936–8941, 2010.
- [63] K. Matsushita, H. Toyama y O. Adachi, “Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria” *Adv Microb Physiol.*, vol 36, pp. 247–301, 1994.
- [64] T. Ergön-Can, E. Erhan y Ö. F. Algur, “Poly(glycidyl methacrylate-co-3-thienylmethylmethacrylate) as an immobilization matrix for microbial glycerol biosensing based on *Gluconobacter oxydans*” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 56, pp. 432–437, 2015.

- [65] S. Sato, M. Umemura, H. Koike y H. Habe, “Draft Genome Sequence of *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, a Glyceric Acid-Producing Strain,” *Genome Announc.*, vol. 1, no. 4, pp. 3–4, 2013.
- [66] H. Zhang, L. Shi, J. Lin, M. Sun, y D. Wei, “Effective improvement of the activity of membrane-bound alcohol dehydrogenase by overexpression of adhS in *Gluconobacter oxydans*” *Biotechnol. Lett.*, vol. 38, no. 7, pp. 1131–1138, 2016.
- [67] N. K. Patel y S. N. Shah, “Biodiesel from Plant Oils” en *Food, Energy, and Water*, 1ra ed., S. Ahuja, Elsevier Inc, pp. 277–307, 2015.
- [68] F. Gossele, J. Swings, K. Kersters y J. De Ley, “Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of *Gluconobacter Asai* 1935 emend. mut. char. Asai, Iizuka, and Komagata 1964” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 33, no. 1, pp. 65–81, 1983.
- [69] H. Habe, Y. Shimada, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, H. Yanagishita y K. Sakaki, “Production of glyceric acid by *Gluconobacter sp.* NBRC3259 using raw glycerol” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 73, no. 8, pp. 1799–1805, 2009.
- [70] L. M. Mason y G. W. Claus, “Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii sp. nov.*, and *G. asaii sp. nov.*” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 39, no. 2, pp. 174–184, 1989.
- [71] B. K. Micales, J. L. Johnson y G. W. Claus, “Deoxyribonucleic Acid Homologies Among Organisms in the Genus *Gluconobacter*” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 35, no. May, pp. 79–85, 1985.
- [72] M. Ameyama y K. Kondô, “Carbohydrate metabolism by the acetic acid bacteria” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 31, no. 6, pp. 724–737, 1967.
- [73] P. K. Dikshit y V. S. Moholkar, “Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904” *Bioresour. Technol.*, vol. 216, no. 2016, pp. 1058–1065, 2016.

- [74] L. De Vuyst, R. Callewaert, y K. Crabbé, “Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions,” *Microbiology*, vol. 142, no. 4, pp. 817–827, 1996.
- [75] N. G. Ricapito, C. Ghobril, H. Zhang, M. W. Grinstaff y D. Putnam, “Synthetic biomaterials from metabolically derived synthons” *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 4, pp. 2664–2704, 2016.
- [76] P. K. Dikshit, G. J. Kharmawlong y V. S. Moholkar, “Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*” *Bioresour. Technol.*, vol. 256, pp. 302–311, 2018.
- [77] S. Wei, Q. Song y D. Wei, “Repeated Use of Immobilized *Gluconobacter oxydans* Cells for Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 37, no. 1, pp. 67–76, 2007.
- [78] M. Cánovas, T. Torroglosa y J. L. Iborra, “Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, no. 3, pp. 300–308, 2005.
- [79] M. Vaara, “Agents that increase the permeability of the outer membrane,” *Microbiol. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 395–411, 1992.
- [80] I. M. Helander, H. L. Alakomi, K. Latva-Kala y P. Koski, “Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria” *Microbiology*, vol. 143, no. 10, pp. 3193–3199, 1997.
- [81] Z. C. Hu, Y. G. Zheng, y Y. C. Shen, “Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 14, pp. 7177–7182, 2011.
- [82] M. Li, J. Wu, X. Liu, J. ping Lin, D. zhi Wei y H. Chen, “Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 21, pp. 8294–8299, 2010.

- [83] P. K. Dikshit y V. S. Moholkar, “Batch and Repeated-Batch Fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone Production from Waste Glycerol Using Free, Immobilized and Resting *Gluconobacter oxydans* Cells” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 10, no. 9, pp. 2455–2465, 2019.
- [84] H. Habe, T. Fukuoka, T. Morita, D. Kitamoto, T. Yakushi, K. Matsushita y K. Sakaki, “Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 7, pp. 1391–1395, 2010.
- [85] C. K. A. Martin y D. Perlman, “Conversion of L-sorbose to L-sorbosone by immobilized cells of *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 18, no. 2, pp. 217–237, 1976.
- [86] X. Zhou, J. Han y Y. Xu, “Electrodialytic bioproduction of xylonic acid in a bioreactor of supplied-oxygen intensification by using immobilized whole-cell *Gluconobacter oxydans* as biocatalyst” *Bioresour. Technol.*, vol. 282, no. 159, pp. 378–383, 2019.
- [87] M. Gordegir, S. Oz, I. Yezer, M. Buhur, B. Unal y D. O. Demirkol, “Cells-on-nanofibers: Effect of polyethyleneimine on hydrophobicity of poly- ϵ -caprolacton electrospun nanofibers and immobilization of bacteria” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 126, no. December 2018, pp. 24–31, 2019.
- [88] Y. Plekhanova, S. Tarasov, V. Kolesov, I. Kuznetsova, M. Signore, F. Quaranta y A. Reshetilov, “Effects of polymer matrices and carbon nanotubes on the generation of electric energy in a microbial fuel cell” *Membranes (Basel)*, vol. 8, no. 4, 2018.
- [89] C. K. A. Martin y D. Perlman, “Conversion of L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid by mixtures of immobilized cells of *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 and *Pseudomonas* species” *Eur. J. Appl. Microbiol.*, vol. 3, no. 2, pp. 91–95, 1976.
- [90] Z. Y. Yuan, D. Z. Wei, G. L. Yin y W. K. Yuan “Coimmobilization of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus cereus* for Bioconversion of 2-Keto-L-gulonic Acid” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 672, no. 1 *Enzyme Engine*, pp. 628–633, 1992.

- [91] A. Trifonov, S. Stefanova, H. Konstantinov e I. Tepavicharova, “Biochemical oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 28–29, no. 1, pp. 397–405, 1991.
- [92] Y. Park, E. Choi y S. K. Rhee, “Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate” *Biotechnol. Lett.*, vol. 16, no. 4, pp. 345–348, 1994.
- [93] H. J. Kim, J. H. Kim y C. S. Shin, “Conversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells co-immobilized with oxygen-carriers in alginate beads” *Process Biochem.*, vol. 35, no. 3–4, pp. 243–248, 1999.
- [94] X. Wang, J. Liu, G. Du, J. Zhou y J. Chen, “Efficient production of L-sorbose from D-sorbitol by whole cell immobilization of *Gluconobacter oxydans* WSH-003” *Biochem. Eng. J.*, vol. 77, pp. 171–176, 2013.
- [95] S. Xu, X. Wang, G. Du, J. Zhou y J. Chen, “Enhanced production of L-sorbose from D-sorbitol by improving the mRNA abundance of sorbitol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* WSH-003” *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [96] M. Fidaleo, S. Charaniya, C. Solheid, U. Diel, M. Laudon, H. Ge, L. E. Scriven y L. C. Flickinger, “A model system for increasing the intensity of whole-cell biocatalysis: Investigation of the rate of oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by thin bi-layer latex coatings of non-growing *Gluconobacter oxydans*” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 95, no. 3, pp. 446–458, 2006.
- [97] O. Holst, S. O. Enfors y B. Mattiasson, “Oxygenation of immobilized cells using hydrogen-peroxide; a model study of *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone” *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 64–68, 1982.
- [98] P. Adlercreutz, O. Holst y B. Mattiasson, “Characterization of *Gluconobacter oxydans* immobilized in calcium alginate” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–7, 1985.
- [99] L. Stasiak-Róžańska y S. Błażejczak, “Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria

Gluconobacter oxydans ATCC 621” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 235, no. 6, pp. 1125–1132, 2012.

- [100] L. Stasiak-Róžańska, S. Błażej, I. Gientka, A. Bzducha-Wróbel y E. Lipińska, “Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract” *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 27, pp. 44–48, 2017.
- [101] J. Raška, F. Skopal, K. Komers y J. Machek, “Kinetics of Glycerol Biotransformation to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconobacter oxydans* and Effect of Reaction Conditions” *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 72, no. 9, pp. 1269–1283, 2007.
- [102] M. Navrátil, J. Tkáč, J. Švitel, B. Danielsson y E. Šturdík, “Monitoring of the bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized *Gluconobacter oxydans* cell using thermometric flow injection analysis” *Process Biochem.*, vol. 36, no. 11, pp. 1045–1052, 2001.
- [103] J. Tkáč, M. Navrátil, E. Šturdík y P. Gemeiner, “Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, no. 4–5, pp. 383–388, 2001.
- [104] D. Hekmat, R. Bauer y J. Fricke, “Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 26, no. 2, pp. 109–116, 2003.
- [105] D. Hekmat, R. Bauer y V. Neff, “Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*” *Process Biochem.*, vol. 42, no. 1, pp. 71–76, 2007.
- [106] Z. Hu, S. Tian, L. Ruan y Y. Zheng, “Repeated biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* with glycerol- and urea-feeding strategy in a bubble column bioreactor,” *Bioresour. Technol.*, vol. 233, pp. 144–149, 2017.
- [107] O. Adachi, Y. Ano, E. Shinagawa, T. Yakushi y K. Matsushita, “Conversion of Quinate to 3-Dehydroshikimate by Ca-Alginate-Immobilized Membrane of *Gluconobacter oxydans* IFO

- 3244 and Subsequent Asymmetric Reduction of 3-Dehydroshikimate to Shikimate by Immobilized Cytoplasmic NADP-Shikimate Dehydrogenase,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 12, pp. 2438–2444, 2010.
- [108] D. R. Dias, M. S. Silva, A. C. de Souza, K. T. Magalhães-Guedes, F. S. de R. Ribeiro y R. F. Schwan, “Vinegar production from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) fruit using immobilized acetic acid bacteria” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 3, pp. 351–359, 2016.
- [109] M. Mihal’, I. Červeňanský, J. Markoš y M. Rebroš, “Bioproduction of phenylacetic acid in airlift reactor by immobilized *Gluconobacter oxydans*” *Chem. Pap.*, vol. 71, no. 1, pp. 103–118, 2017.
- [110] X. Hua, G. L. Du y Y. Xu, “Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer” *Bioresour. Technol.*, vol. 283, no. 159, pp. 326–331, 2019.
- [111] F. Shiraishi, K. Kawakami, S. Kono, A. Tamura, S. Tsuruta y K. Kusunoki, “Characterization of production of free gluconic acid by *Gluconobacter suboxydans* adsorbed on ceramic honeycomb monolith” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 33, no. 11, pp. 1413–1418, 1989.
- [112] Z. C. Hu, J. L. Bu, R. Y. Wang, X. Ke y Y. G. Zheng, “Enhanced Production of 6-(N-Hydroxyethyl)-Amino-6-Deoxy- α -L-Sorbofuranose by Immobilized *Gluconobacter oxydans* on Corn Stover with a pH Control Strategy in a Bubble Column Bioreactor” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 188, no. 2, pp. 297–309, 2019.
- [113] V. K. Truong, C. M. Bhadra, A. J. Christofferson, Y. Yarovsky, M. Al Kobaisi, C. J. Garvey, O. N. Ponamoreva, S. V. Alferov, V. A. Alferov, P. G. Tharushi Perera, D. H. K. K. Nguyen, R. Buividas, S. Juodkasis, R. J. Crawford y E. P. Ivanova, “Three-Dimensional Organization of Self-Encapsulating *Gluconobacter oxydans* Bacterial Cells” *ACS Omega*, vol. 2, no. 11, pp. 8099–8107, 2017.
- [114] J. Charoenpanich, “Removal of Acrylamide by Microorganisms” en *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*, 1ra ed., Y. B. Patil y P. Rao, Eds. Rijeka: InTech, pp. 99–119, 2013.

- [115] S. K. Sehmi, E. Allan, A. J. MacRobert y I. Parkin, “The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane” *MicrobiologyOpen*, vol. 5, no. 5, pp. 891–897, 2016.
- [116] I. C. R. Costa, R. O. M. A. de Souza y U. T. Bornscheuer, “Asymmetric synthesis of serinol-monoesters catalyzed by amine transaminases” *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 28, no. 9, pp. 1183–1187, 2017.
- [117] D. Deszcz, P. Affaticati, N. Ladkau, A. Gegel, J. M. Ward, H. C. Hailes y P. A. Dalby, “Single active-site mutants are sufficient to enhance serine:pyruvate α -transaminase activity in an ω -transaminase” *FEBS J.*, vol. 282, no. 13, pp. 2512–2526, 2015.
- [118] K. Faber, “Biocatalytic Applications” en *Biotransformations in Organic Chemistry*, 7ma ed., K. Faber, Ed. Cham: Springer International Publishing, pp. 31–314, 2018.
- [119] C. Iglesias, P. Panizza y S. Rodriguez Giordano, “Identification, expression and characterization of an R- ω -transaminase from *Capronia semiimmersa*” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5677–5687, 2017.
- [120] M. S. Humble, K. E. Cassimjee, M. Håkansson, Y. R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H. J. Federsel, P. Berglund y D. T. Logan, “Crystal structures of the *Chromobacterium violaceum* ω -transaminase reveal major structural rearrangements upon binding of coenzyme PLP” *FEBS J.*, vol. 279, no. 5, pp. 779–792, 2012.
- [121] D. Roura Padrosa, R. Alaux, P. Smith, I. Dreveny, F. López-Gallego y F. Paradisi, “Enhancing PLP-Binding Capacity of Class-III ω -Transaminase by Single Residue Substitution,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. October, pp. 1–13, 2019.
- [122] B. Andreeßen y A. Steinbüchel, “Serinol: Small molecule - big impact” *AMB Express*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2011.
- [123] U. Jost, B. Andreeßen, D. Michalik, A. Steinbüchel y U. Kragl, “Downstream processing of serinol from a glycerol-based fermentation broth and transfer to other amine containing molecules,” *Eng. Life Sci.*, vol. 17, no. 5, pp. 479–488, May 2017.

- [124] B. Andreeßen y A. Steinbüchel, “Biotechnological conversion of glycerol to 2-amino-1,3-propanediol (serinol) in recombinant *Escherichia coli*” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 1, pp. 357–365, 2012.
- [125] H. Nakazawa, H. Enei, K. Kubota y S. Okumura, “Biotechnological Method of Producing Serine and Serinol Derivatives” 3871958, 1975.
- [126] N. Itoh, C. Yachi y T. Kudome, “Determining a novel NAD⁺-dependent amine dehydrogenase with a broad substrate range from *Streptomyces virginiae* IFO 12827: purification and characterization” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 10, no. 1–3, pp. 281–290, 2000.
- [127] H. Akita, N. Nakashima y T. Hoshino, “Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*” *AMB Express*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, 2016.
- [128] N. Kataoka, A. S. Vangnai, T. Pongtharangkul, T. Yakushi, M. Wada, A. Yokota y K. Matsushita, “Engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a prototrophic pyruvate-producing strain: Characterization of a ramA-deficient mutant and its application for metabolic engineering” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 83, no. 2, pp. 372–380, 2019.
- [129] M. Yang, R. Chen, T. Mu, X. Zhang y J. Xing, “Switch on a more efficient pyruvate synthesis pathway based on transcriptome analysis and metabolic evolution,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 124, no. 5, pp. 523–527, 2017.
- [130] A. Y. Skorokhodova, A. Y. Gulevich y V. G. Debabov, “Engineering *Escherichia coli* for respiro-fermentative production of pyruvate from glucose under anoxic conditions” *J. Biotechnol.*, vol. 293, pp. 47–55, 2019.
- [131] B. Zhang, Y. Zhu, J. Zhang, D. Wang, L. Sun y J. Hong, “Engineered *Kluyveromyces marxianus* for pyruvate production at elevated temperature with simultaneous consumption of xylose and glucose” *Bioresour. Technol.*, vol. 224, pp. 553–562, 2017.
- [132] P. Xu, J. Qiu, C. Gao y C. Ma, “Biotechnological routes to pyruvate production” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, no. 3, pp. 169–175, 2008.

- [133] M. Yang y J. Xing, “Improvement of pyruvate production based on regulation of intracellular redox state in engineered *Escherichia coli*” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 22, no. 4, pp. 376–381, 2017.
- [134] M. Liu y Z. Cao, “Regulation of NADH Oxidase Expression via a Thermo-regulated Genetic Switch for Pyruvate Production in *Escherichia coli*” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 1, pp. 93–99, 2018.
- [135] A. Bignucolo, V. P. Appanna, S. C. Thomas, C. Auger, S. Han, A. Omri y V. D. Appanna, “Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: Enhanced production of pyruvate” *J. Biotechnol.*, vol. 167, no. 3, pp. 309–315, 2013.
- [136] X. Chen, Q. Luo, J. Liu y L. Liu, “Enhancement of Pyruvate Productivity in *Candida glabrata* by Deleting the CgADE13 Gene to Improve Acid Tolerance,” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 5, pp. 573–579, 2018.
- [137] Z. Luo, S. Liu, G. Du, S. Xu, J. Zhou y J. Chen, “Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by carrier engineering,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 2, pp. 473–482, 2018.
- [138] C. Gao, Z. Li, L. Zhang, C. Wang, K. Li, C. Ma y P. Xu, “An artificial enzymatic reaction cascade for a cell-free bio-system based on glycerol” *Green Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 804–807, 2015.
- [139] T. Ikeda, M. Yamamoto, H. Arai, D. Ohmori, M. Ishii y Y. Igarashi, “Enzymatic and electron paramagnetic resonance studies of anabolic pyruvate synthesis by pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus*” *FEBS J.*, vol. 277, no. 2, pp. 501–510, 2010.
- [140] X. Wu, M. Fei, Y. Chen, Z. Wang y Y. Chen, “Enzymatic synthesis of L-norephedrine by coupling recombinant pyruvate decarboxylase and ω -transaminase” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 17, pp. 7399–7408, 2014.
- [141] R. Sriram, J. Sun, J. Villanueva-Meyer, C. Mutch, J. De Los Santos, J. Peters, D. E. Korenchan, K. Neumann, M. Van Criekinge, J. Kurhanewicz, O. Rosenberg, D. Wilson y M. A. Ohliger,

- “Detection of Bacteria-Specific Metabolism Using Hyperpolarized [2-13C]Pyruvate” *ACS Infect. Dis.*, vol. 4, no. 5, pp. 797–805, 2018.
- [142] C. Aburto, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson y A. Illanes, “Co-immobilized β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 118, no. August, pp. 102–108, 2018.
- [143] C. R. Silva, T. C. Zangirolami, J. P. Rodrigues, K. Matugi, R. C. L. C. Giordano y R. C. L. C. Giordano, “An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 50, no. 1, pp. 35–42, 2012.
- [144] M. Kisieleska, “Ultrasonic stimulation of Co-Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells and β -Galactosidase Enzyme for enhanced Ethanol production from whey ultrafiltration permeate” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 21, no. 2, pp. 387–393, 2012.
- [145] B. Hahn-Hägerdal, “Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with β -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 27, no. 6, pp. 914–916, 1985.
- [146] M. A. Kiss, É. Sefanovits-Bányai, Á. Tóth y L. Boross, “Extractive synthesis of ethyl-oleate using alginate gel co-entrapped yeast cells and lipase enzyme” *Eng. Life Sci.*, vol. 4, no. 5, pp. 460–464, 2004.
- [147] K. Y. Lee y D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, 2012.
- [148] J. M. Bolivar, I. Eisl y B. Nidetzky, “Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts” *Catal. Today*, vol. 259, pp. 66–80, 2016.
- [149] S. Chen, J. C. Campillo-Brocal, P. Berglund y M. S. Humble, “Characterization of the stability of *Vibrio fluvialis* JS17 amine transaminase” *J. Biotechnol.*, vol. 282, pp. 10–17, 2018
- [150] E. Jackson, M. Ripoll y L. Betancor, “Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells” *MicrobiologyOpen*, vol. 8, no. 12, pp. 1–10, 2019.

Anexos

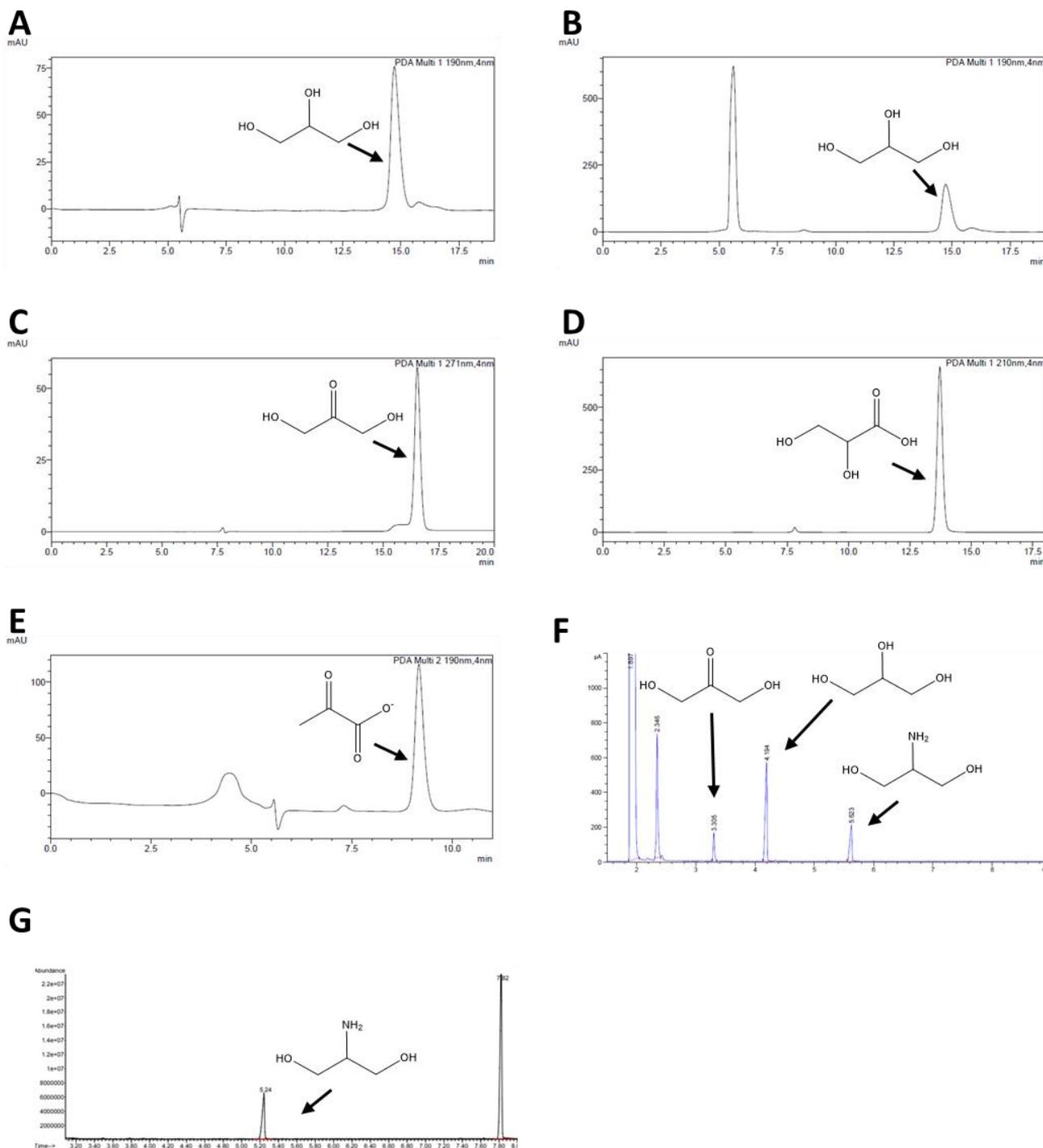


Figura A1: Cromatogramas de HPLC (A-E), GC-FID (F) y GC-MS (G) para A) Glicerol puro a 190 nm, $T_R = 14,7$ min, B) Glicerol de *splitting* a 190 nm, $T_R = 14,7$ min, C) DHA a 271 nm, $T_R = 16,7$ min, D) GA a 210 nm, $T_R = 13,7$ min y E) Piruvato a 190 nm, $T_R = 9,1$ min, F) DHA, $T_R = 3,3$ min; glicerol puro, $T_R = 4,2$ min y serinol, $T_R = 5,6$ min. G) Serinol, $T_R = 5,3$ min y eicosano, $T_R = 7,8$ min (estándar interno).

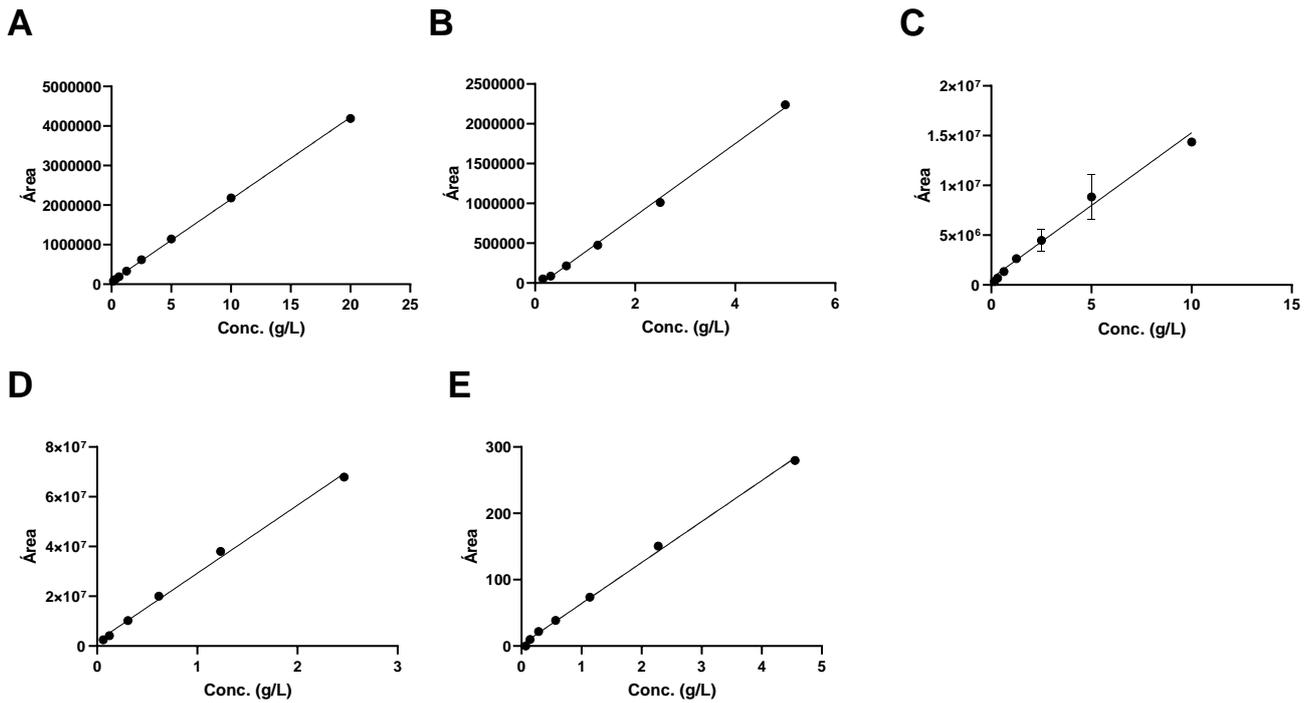


Figura A2: Curvas de calibración para cuantificación por HPLC (A-D) y GC (E). A) Curva estándar de Glicerol a 190 nm. Ecuación de la recta: $y = 207188x + 75343$. $R^2 = 0,99$. B) Curva estándar de DHA a 217 nm. Ecuación de la recta: $y = 453722x - 64691$. $R^2 = 0,99$. C) Curva estándar de GA a 210 nm. Ecuación de la recta: $y = 1438219,56x + 591542,02$. $R^2 = 0,99$. D) Curva estándar de piruvato a 190 nm. Ecuación de la recta: $y = 27338190x + 1910215$. $R^2 = 0,99$. E) Curva estándar de serinol. Ecuación de la recta: $y = 61,80x + 2,204$. $R^2 = 0,99$.

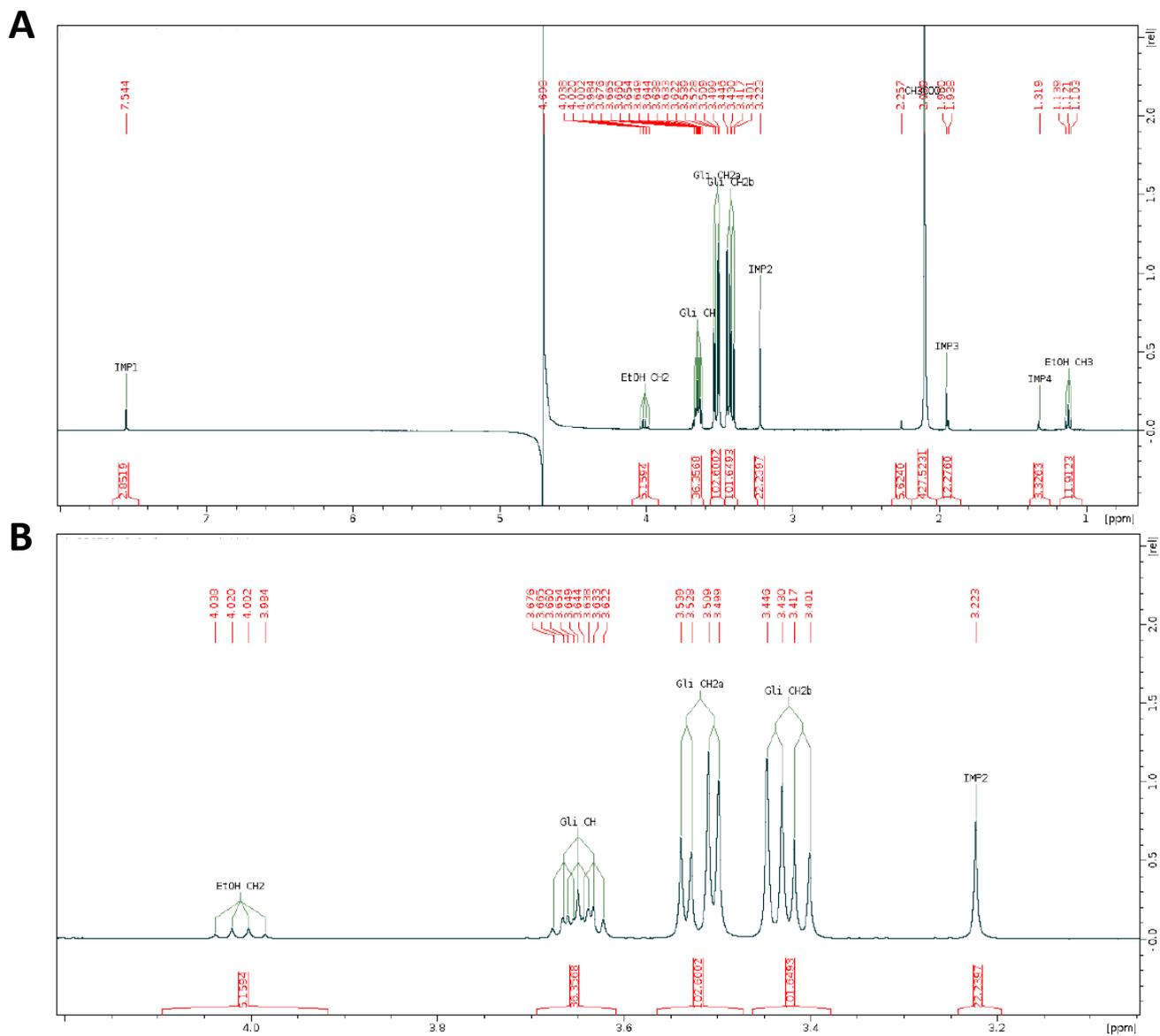


Figura A3: Análisis por ^1H -RMN del tiempo inicial de la reacción de conversión de glicerol de *splitting* por *G. frateurii*. A) Espectro ^1H -1D completo. B) Expansión del espectro ^1H -1D.

Asignaciones: Glicerol: 3,763 (tt, 4,4, 9,9Hz, 1H); 3,642 (dd, 4,4, 11,7Hz, 2H); 3,547 (dd, 6,5, 11,7Hz, 2H), metanol: 3,35 (s, 3H), acetato: 2,05 (s, 3H).

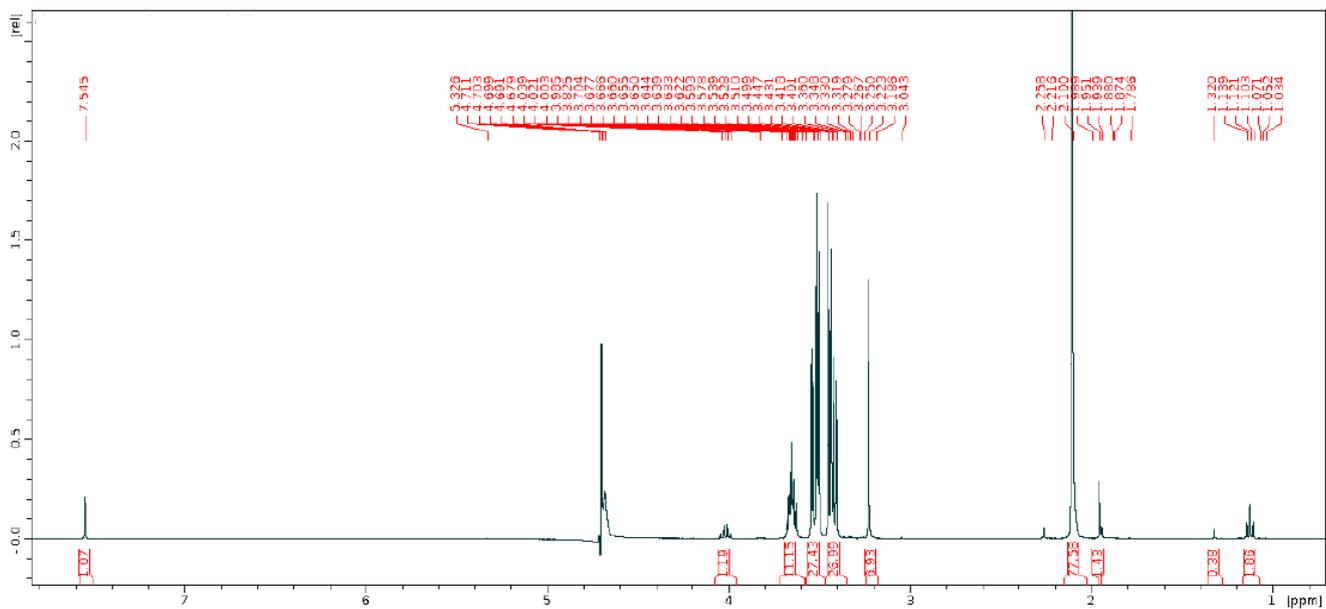


Figura A4: Análisis por ^1H -RMN del tiempo inicial de la reacción de conversión de glicerol de *splitting* por *G. oxydans*.

Asignaciones: Glicerol: 3,763 (tt, 4,4, 9,9Hz, 1H); 3,642 (dd, 4,4, 11,7Hz, 2H); 3,547 (dd, 6,5, 11,7Hz, 2H), metanol: 3,35 (s, 3H), acetato: 2,05 (s, 3H).

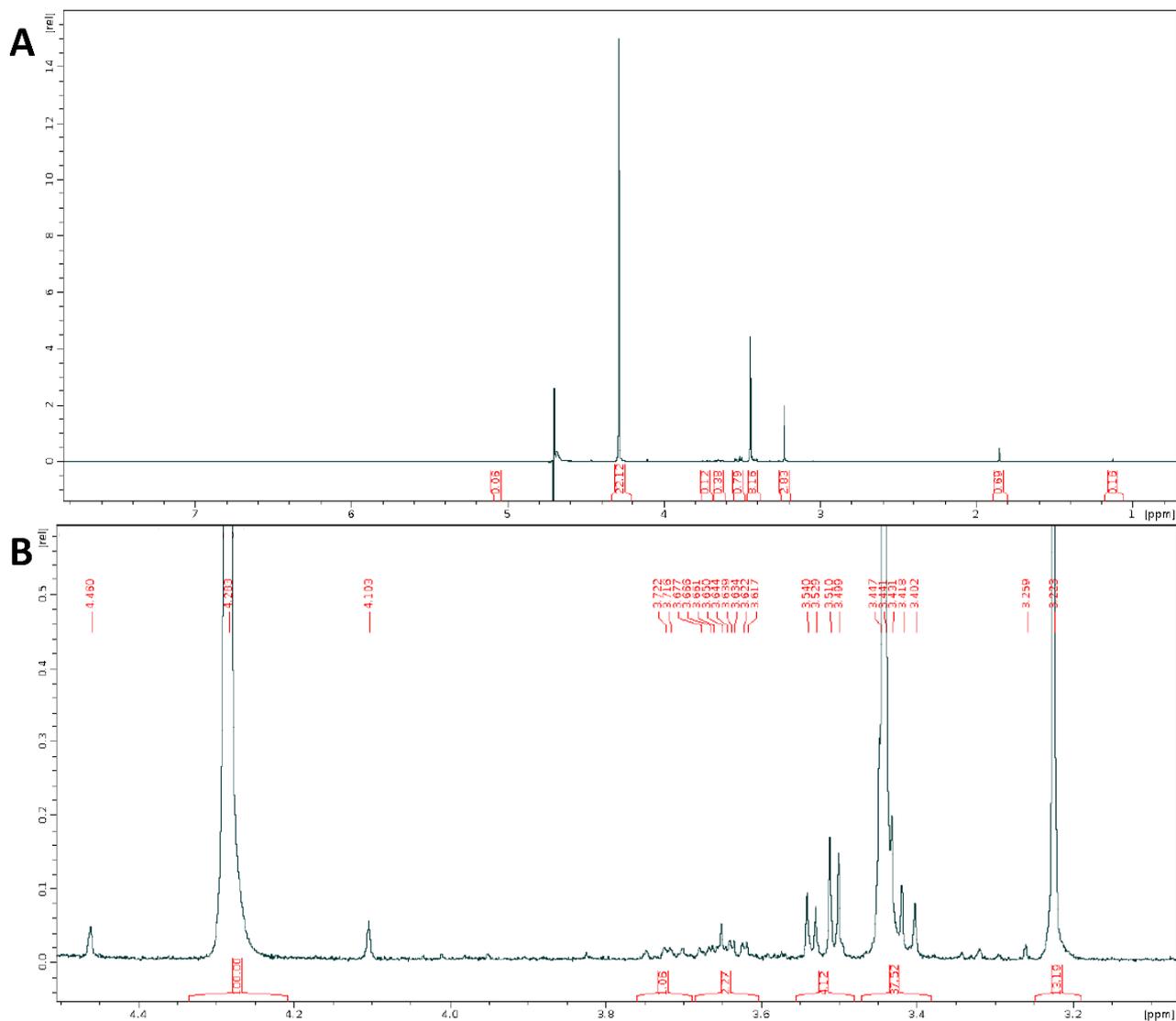


Figura A5: Análisis por ^1H -RMN del tiempo 45 hs de la reacción de conversión de glicerol de *splitting* por *G. oxydans*. A) Espectro ^1H -1D completo. B) Expansión del espectro ^1H -1D.

Asignaciones: DHA, 4,405 (s, 1H); 3,563 (s, 4H), Glicerol: 3,763 (tt, 4,4, 9,9Hz, 1H); 3,642 (dd, 4,4, 11,7Hz, 2H); 3,547 (dd, 6,5, 11,7Hz, 2H), metanol: 3,35 (s, 3H), acetato: 2,05 (s, 3H).

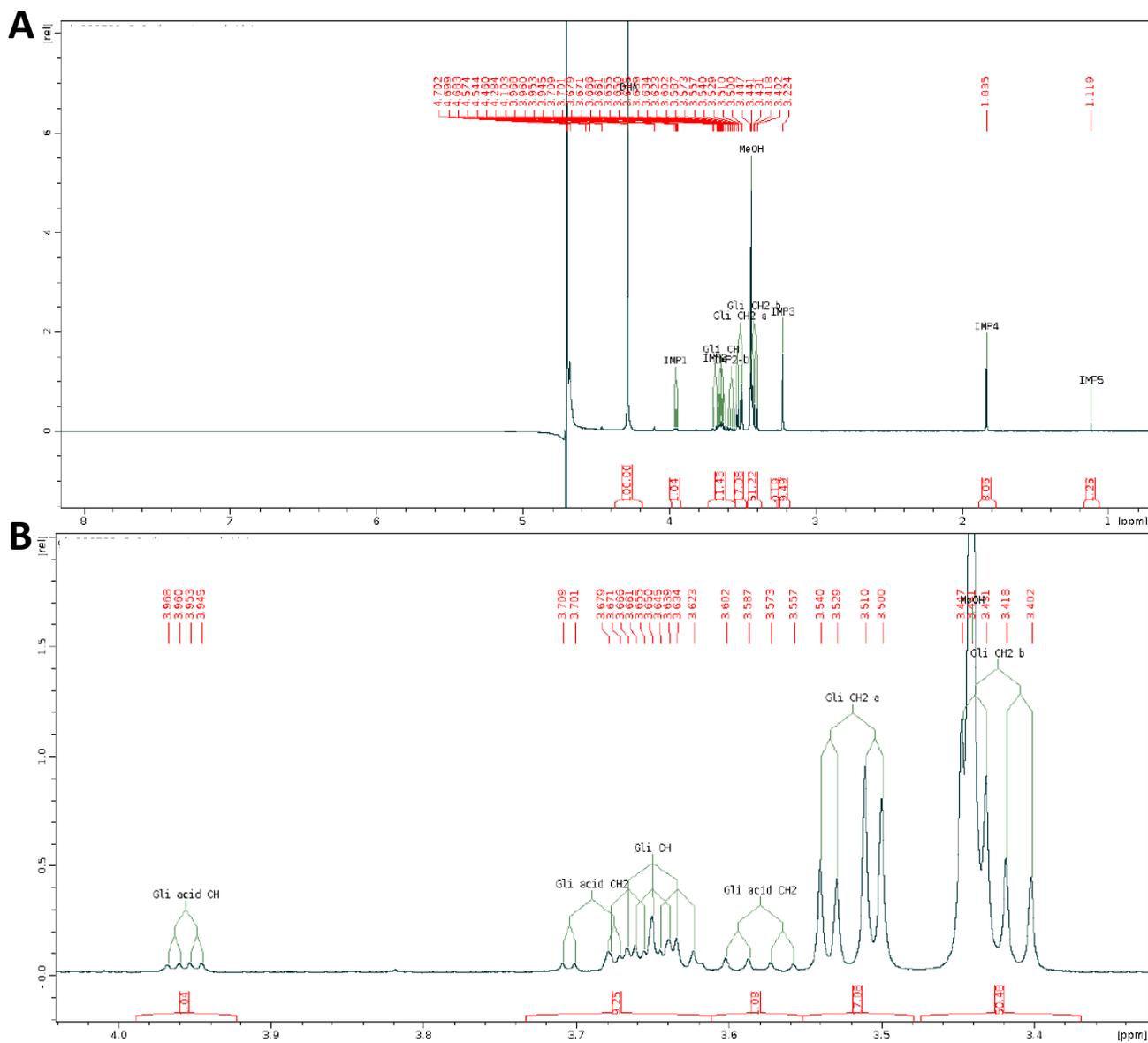


Figura A6: Análisis por ^1H -RMN del tiempo 45 hs de la reacción de conversión de glicerol de *splitting* por *G. frateurii*. A) Espectro ^1H -1D completo. B) Expansión del espectro ^1H -1D.

Asignaciones: DHA, 4,405 (s, 1H); 3,563 (s, 4H), Glicerol: 3,763 (tt, 4,4, 9,9Hz, 1H); 3,642 (dd, 4,4, 11,7Hz, 2H); 3,547 (dd, 6,5, 11,7Hz, 2H), GA: 4,139 (dd, 3,1, 5,7Hz, 1H); 3,823 (dd, 3,2, 11,9Hz, 1H); 3,734 (dd, 5,5, 11,7Hz, 1H), metanol: 3,35 (s, 3H), acetato: 2,05 (s, 3H).



ORIGINAL ARTICLE

Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells

Erienne Jackson | Magdalena Ripoll | Lorena Betancor

Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Lorena Betancor, Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, Montevideo, Uruguay. Email: betancor@ort.edu.uy

Funding information

Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Grant/Award Number: FSE 1_2016_132115

Abstract

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

KEYWORDS

biotransformation, dihydroxyacetone, *Gluconobacter*, glyceric acid, glycerol

1 | INTRODUCTION

Glycerol is a side product of fat and oil transesterification with alcohols in the production of biodiesel. This feedstock by-product contains varying amounts of contaminants such as salts, ashes, methanol, and fats with low levels of purity (60%–80%) that compromise its market value (Ayoub & Abdullah, 2012; Yang, Hanna, & Sun, 2012). The current glycerol production will exceed the demand in 2020 in more than 400% (Ayoub & Abdullah, 2012). Therefore, new processes able to convert glycerol into novel value-added products need to be developed to sustain the viability of the biofuel economy (Ayoub & Abdullah, 2012; Yang et al., 2012; Zhou, Shen, Wang, Sun, & Xiu, 2018). In this context, glycerol has been converted into high value-added products by both homogeneous and heterogeneous catalysis or through more sustainable methods using biocatalysts (Habe, Fukuoka, Kitamoto, Fukuoka, Kitamoto, & Sakaki, 2009a; Khanna, Goyal, & Moholkar, 2012; Yang et al., 2018). The vast majority of biocatalytic processes involve the microbial transformation

of glycerol under growing conditions using culture media in the reaction mixture (Andreeßen & Steinbüchel, 2012; Szymanowska-Powatowska & Biafas, 2014; Yang et al., 2018). Therefore, products are generated in complex media that complicates the downstream purification of the target chemical and therefore augment the economic demands of the biotransformation. In contrast, the use of nongrowing resuspended cells or resting cells could provide a number of operational advantages such as facilitating product separation (Julsing, Kuhn, Schmid, & Bühler, 2012) or avoid secondary reactions and undesired growth metabolites that could contaminate the system. However, for applied purposes the use of resting cells should counterbalance the loss in productivities that are often observed when compared with growing cells conversions. Therefore, the design of new strategies for the microbiological conversion of glycerol that address these limitations is not only appropriate but also necessary, and of fundamental and applied value.

The oxidative metabolism of glycerol generates glyceric acid (GA) and dihydroxyacetone (DHA) in *Gluconobacter* and *Acetobacter*

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2019 The Authors. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd.

species (Habe et al., 2009a; Khanna et al., 2012). Particularly, *Gluconobacter* catalyzes the oxidation of sugars and sugar alcohols, being large producers of both DHA and GA. DHA is a marketable chemical worth more than 250-fold the price of crude glycerol produced around the globe via biotechnological processes. It is broadly used as a precursor for the synthesis of fine chemicals in the chemical and pharmaceutical industry, and in cosmetic industry, DHA is an active component in sunless tanning products (Ciriminna, Fidalgo, Ilharco, & Pagliaro, 2018; Dikshit & Moholkar, 2016; Yang et al., 2012). The alternate oxidation product of glycerol, GA, has potential as a building block for many chemicals, and although it has a lesser demand in the industrial market, its market value is more than 1,000 times that of the DHA (Habe et al., 2009). Traditionally obtained by metal catalytic oxidation of glycerol, its biocatalytic production has recently emerged and literature is still piling up on process improvements that provide economic advantages of the biotechnological over the chemical production process.

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

2 | RESULTS AND DISCUSSION

2.1 | Conditions for pure glycerol conversions using resting cells

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

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

Overall, the results obtained for pure glycerol conversions with resting cells correlate with those of Khanna et al., 2012 and Sato, Morita, Fukuoka, Kitamoto, & Habe, 2015 that, differently from this work, used growing cells for pure glycerol transformation. Therefore, under the studied conditions, the bacterial behavior in

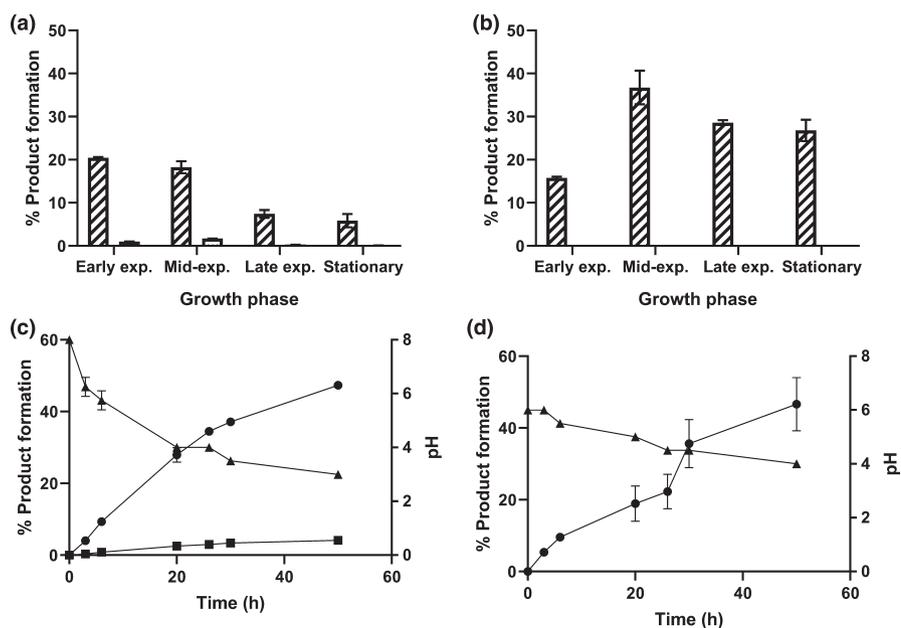


FIGURE 1 Pure glycerol bioconversion with *Gluconobacter* strains. GA (dots) and DHA (stripes) production after 20 hr by resting cells of *Gluconobacter frateurii* (a) and *Gluconobacter oxydans* (b) collected during different growth stages. Kinetics of DHA and GA production from pure glycerol with resting cells of *G. frateurii* (c) and *G. oxydans* (d). DHA (●), GA (■), pH (▲). Reactions were performed in 30 ml total volume at 30°C using 2 mg dry cell weight and 50 g/L initial glycerol concentration. Further conditions are described in Methods

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

pH is an important parameter to take into account in biotransformations as it directly affects the activity of the enzymes and consequently the microbial growth and metabolism (Shuler & Fikret, 2002). Therefore, the impact of the initial pH of the reaction medium was investigated using resting cells of *G. frateurii* and *G. oxydans* collected in the mid-exponential phase (Figure A1). Variations in the initial pH proved to have an impact in the production of DHA and GA by *G. frateurii*. The production of DHA and GA increased with initial pH, reaching a maximum of almost 50% conversion at 50 hr at pH 8.0. For *G. oxydans*, however, it was observed that at an initial pH 6.0 led to a higher conversion of DHA $46.6 \pm 7.4\%$ after 50 hr of reaction with no significant production of GA. pHs of maximum conversions for both strains were selected for further experiments.

A 10-fold increase in the inoculum had a significant impact in the glycerol conversion for both *Gluconobacter* strains. After 50 hr, the production of GA by resting cells of *G. frateurii* increased from $4.1 \pm 0.2\%$ to $9.1 \pm 0.1\%$. However, the production of DHA decreased slightly from $44.7 \pm 4.1\%$ to $38.1 \pm 2.2\%$. For *G. oxydans*, the increase in the production of DHA was significant, as a 100% conversion to this product was achieved after 50 hr.

As previously described, initial glycerol concentration in the reaction media affects the production of DHA and GA (Black & Nair, 2013; Habe et al., 2010, 2009). To test a possible substrate/product inhibition effect, several initial concentrations of pure glycerol were evaluated (Figure 2). For *G. frateurii*, a change in the ratio of products associated with increasing initial concentrations of glycerol was observed. The substrate or product concentrations may affect the rate of conversion of the enzymes involved in the biotransformation. GA production improved significantly at higher initial concentrations of glycerol, while DHA production decreased (Figure 2a).

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

2.2 | Crude glycerol conversion using resting cells

Conversion kinetics were studied in the selected conditions, using crude glycerol as substrate (Figure 3). A lower conversion to DHA and GA was found for *G. frateurii* using crude glycerol when compared to pure glycerol after 45 hr of reaction. Another notorious difference in production was the lower GA to DHA ratio produced using crude glycerol as a substrate. This low GA productivity may be associated with the presence of methanol from crude glycerol, which has an inhibitory effect on the enzyme mADH, responsible for the production of GA in *Gluconobacter* (Figure 3a). This result correlates

with Sato et al. that reported a decrease in the productivity of GA in the presence of methanol by the same strain of *G. frateurii* used in this study, and improved it by removal of the alcohol from the reaction medium (Habe et al., 2009; Sato et al., 2013).

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

Samples of the biotransformations were analyzed by ^1H NMR spectroscopy in order to confirm and identify the major components in the starting reaction and the final components of the reaction after 24 hr (Figure A2). The analysis of ^1H -1D spectrum of the starting reaction media shows two major components, glycerol and methanol, together with minor amounts of fatty acids. This result confirms the usual components in crude glycerol obtained as a by-product of the biodiesel industry.

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

2.3 | Process intensification for conversion of crude glycerol

The potential reuse of resting cells was evaluated in the conversion of 50 g/L of crude glycerol. *G. frateurii* maintained its capacity to convert glycerol to DHA after 5 uses. However, productivities decreased gradually throughout the experiment reaching 11.7% conversions after the fifth use (Figure 4). DHA production by reused resting cells of *G. oxydans* could not be achieved since the capacity to convert glycerol was completely lost after the first use (Figure 4). The differences in resistance to repeated batch conversions of the strains might be explained better by the ability of the metabolic machinery to withstand cell death or enzyme inactivation, or support cofactor regeneration.

We have also studied the possibility of using the cells in a fed-batch process. A slight increase in the amount of DHA produced was obtained for both *G. frateurii* and *G. oxydans* after the first addition of substrate (24 hr) which were 25 g/L for *G. frateurii* and 50 g/L for *G. oxydans* (Figure 5). Successive additions of the substrate did not translate into accompanying product formation. In the case of *G. frateurii*, product inhibition could be the main cause of this behavior as observed before for growing cells transformation of glycerol

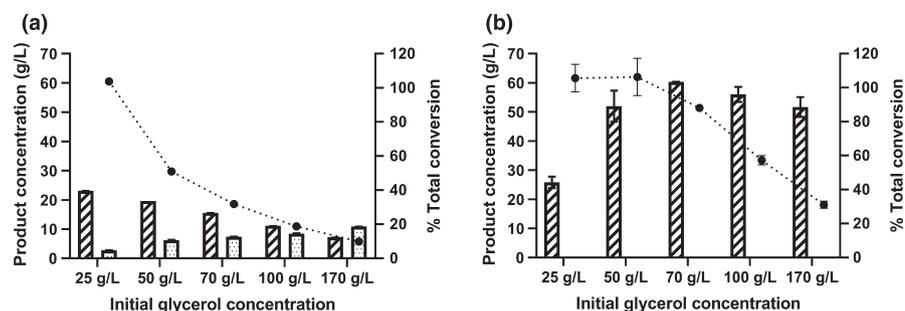


FIGURE 2 DHA and GA production after 45 hr starting from different glycerol concentrations. *Gluconobacter frateurii* (a), *Gluconobacter oxydans* (b). % Conversion (dotted line), DHA (stripes), GA (dots). Reactions were performed in 30 ml total volume at 30°C using 20 mg dry cell weight. Further conditions are described in Methods

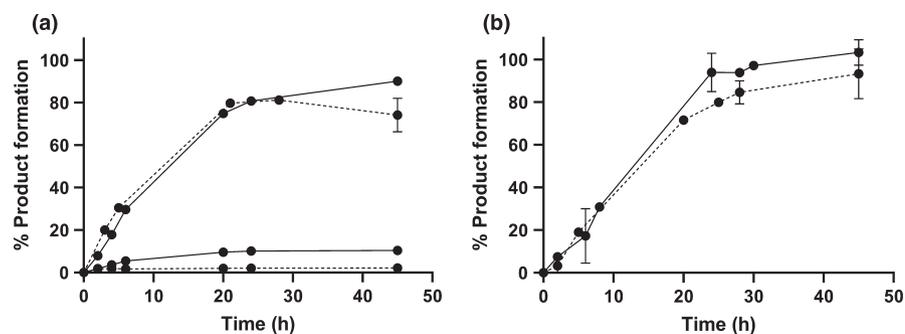


FIGURE 3 DHA and GA production after 45 hr starting from crude and pure glycerol. (a) (*Gluconobacter frateurii*), (b) (*Gluconobacter oxydans*). Products from pure glycerol (full line), products from crude glycerol (dotted line). DHA (●), GA (■), glycerol (▲)

(Dikshit, Kharmawlong, & Moholkar, 2018). This hypothesis was also supported by results obtained in glycerol conversions initiated with DHA in the reaction media (Figure A3). Product formation in the presence of DHA was significantly decreased for *G. frateurii* strain. For *G. oxydans*, DHA increased from 38.1 ± 0.1 g/L to 52.7 ± 4.2 g/L after the third glycerol spike (Figure 5b). This strain seems to be less sensitive to product inhibition than *G. frateurii* when in suspension.

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

Further strategies were studied to increase product formation while improving or maintaining the costs of the process. The approach involved the permeabilization of bacterial membrane. The biochemical pathway of DHA synthesis is mediated by a FAD and pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound glycerol dehydrogenase enzyme (GDH) that incompletely oxidizes glycerol to DHA and in turn accumulates it outside the cell. However, the active site of the GDH has been described to be oriented toward the periplasm (Khanna et al., 2012), and therefore, permeabilization strategies might facilitate glycerol and DHA transport to and from the bacterial periplasm. Resting cells of *G. frateurii* and *G. oxydans* were treated with EDTA and PEI, both well-known gram-negative outer membrane permeabilizers (Cánovas, Torroglosa, & Iborra, 2005). EDTA is a chelating agent that removes divalent cations interacting with lipopolysaccharides (LPS) present in the outer membrane, while the polycationic nature of the polymer PEI provokes an interaction with said LPS and causes a disruption of the outer membrane structure (Helander, Alakomi, Latva-Kala, & Koski, 1997; Vaara, 1992). No differences were observed for treated and nontreated cells nor in rates or final productivities in the bioconversions which might imply a poorly

restricted transport of both glycerol and DHA through the outer bacterial membrane of both strains.

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

A series of transformations were carried out in which we simplified the composition of the reaction media. Neither the KH_2PO_4 or K_2HPO_4 , nor the MgSO_4 proved necessary for the conversion as even when crude glycerol was offered in water to the cells, the amount of product obtained after 20 hr did not vary (Figure A4). This is the first report on a resting cell transformation of glycerol to DHA performed solely in water.

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

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

Apart from a sole report from Hu et al (Hu, Zheng, & Shen, 2011) where pure glycerol is biotransformed by *G. oxydans* ZJB09113, reports on the use of resting cells of *G. oxydans* starting from crude glycerol have not yet been explored. In the aforementioned work,

FIGURE 4 Reuses of resting cells of *Gluconobacter frateurii* (a) and *Gluconobacter oxydans* (b) in the conversion of crude glycerol to DHA and GA. DHA (stripes), GA (dots). Reactions were performed in 30 ml total volume at 30°C using 20 mg dry cell weight. Each use cycle was after 20 hr. Further conditions are described in Methods

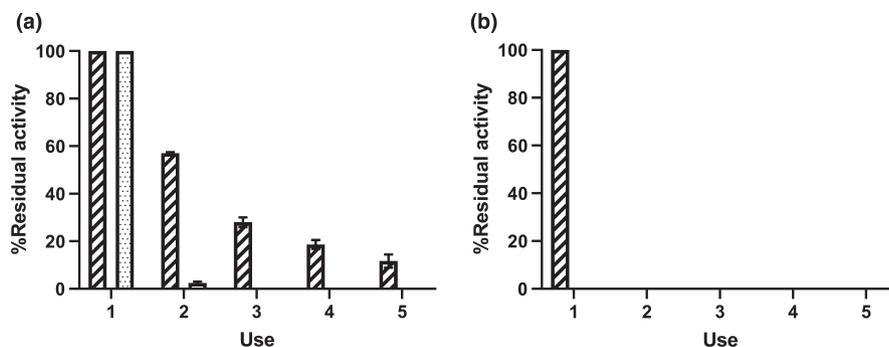
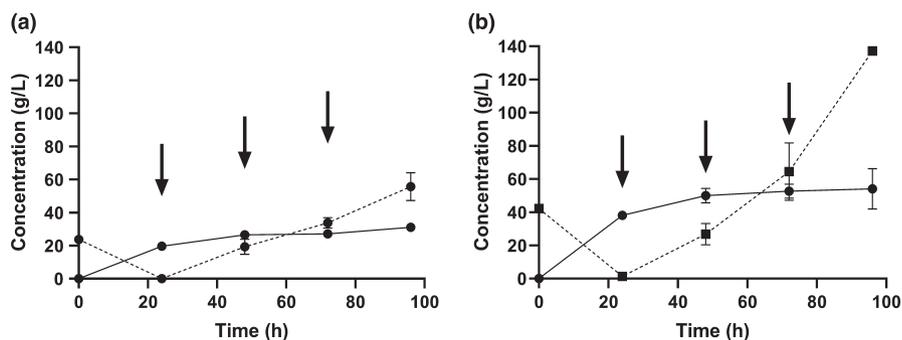


FIGURE 5 Fed-batch conversion of crude glycerol using resting cells of *Gluconobacter frateurii* (a) and *Gluconobacter oxydans* (b). DHA (full line), glycerol (dashed line), and glycerol applications (arrows) were 25 g/L in (a) and 50 g/L in (b)



a productivity of 2.16 g/L.h was achieved for DHA using pure glycerol in a fed-batch airlift reactor. Herein, the productivity reached 1.91 g/L.h for pure glycerol and 2.07 g/L.h for the unprecedented conversion of crude glycerol with resting cells of *G. oxydans* in water. Moreover, an additional advantage of the conversions described in this work lays in the amount of biocatalyst used in the reactions as it was 15 times less than that used by Hu et al (0.67 g/L in this work compared to 10 g/L).

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

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

3 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.1 | Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. Crude glycerol, product of the splitting process (water <12%, ashes <7%, glycerol 70%–80%,

lipids <1%, methanol <5%, chlorides <3%), was donated by Alcoholes del Uruguay (ALUR).

3.2 | Growth curve analysis

Freeze-dried strains of *G. frateurii* NBRC 103,465 and *G. oxydans* NBRC 14819 were obtained from the National Institute of Technology and Evaluation (NITE). 1-L flasks containing 250 ml of glycerol medium (glycerol 100 g/L, peptone 9 g/L, yeast extract 1 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6.0) were inoculated with 250 μl of *G. frateurii* NBRC 103465 preculture ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ value of 3) or with 2.5 ml of *G. oxydans* NBRC 14819 preculture ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ value of 0.6) and incubated for 76 hr at 30°C and 180 rpm. $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was measured periodically, and a correlation with dry cell weight (g/L) was established by constructing a graphic model ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ vs. dry cell weight). The protocol for dry cell weight measurements was adapted from Black and Nair (Black & Nair, 2013).

3.3 | Inoculum preparation for glycerol conversion

250 ml cultures were incubated at 30°C and 180 rpm. The volume needed to obtain a required amount of dry weight of cells was then centrifuged for 15 min at 2,800g. The bacterial pellet was washed with 30 mM phosphate buffer (NaH_2PO_4 4.14 g/L, K_2HPO_4 5.23 g/L, pH 7.0) to remove the growth medium and was centrifuged at 2,800g for 15 min, discarding the supernatant.

3.4 | Glycerol conversion to GA and DHA

All conversions of glycerol by resting cells were carried out in 30 ml volume of reaction medium supplemented with pure or crude glycerol

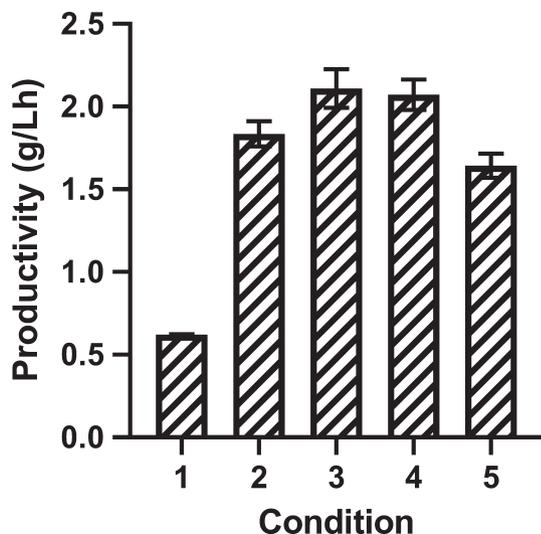


FIGURE 6 DHA production intensification using *Gluconobacter oxydans* as a catalyst and crude glycerol as substrate. (1) Starting conditions (glycerol 50 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6 in distilled water, 2 mg of dry cell weight), (2) 10-fold inoculum increase (20 mg of dry cell weight) conditions as in 1, (3) reaction media without salts, (4) use of regular water as reaction media, and (5) decrease in final total volume (20 mg of dry cell weight, 100 g/L glycerol in 15 ml regular water). All the reactions were performed at 30°C

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

3.4.1 | Conversions using resting cells from different growth stages

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

3.4.2 | Effect of initial pH in the conversion

Different initial pH values for the reaction media were evaluated (3.0, 4.0, 6.0, 7.0, and 8.0). Each reaction was inoculated with 2 mg of dry cell weight, obtained from a culture with an $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ value of 1. The reactions were carried out for 50 hr in duplicates, starting from 50 g/L of glycerol.

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

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

3.5 | HPLC analysis

Each sample was centrifuged at 13,000g for 15 min to remove the bacterial pellet. The supernatant was dissolved 5 times in mQ water and filtered with a 0.22- μm polyvinylpyrrolidone (PVP)-treated filter for HPLC analysis. Samples were analyzed using a Shimadzu Nexera X2 HPLC, with a diode array detector. An Aminex[®] HPX-87C 300 \times 7.8 mm from Bio-Rad was used with a 4 \times 3.0 mm Carbo-H cartridge precolumn from Phenomenex. 5 mM sulfuric acid was used as the mobile phase. Detection was carried out at 70°C following 210 nm for GA, 271 nm for DHA, and 190 nm for glycerol with a flow rate of 0.6 ml/min for 20 min. Injection volume was 20 μl . Calibration curves were constructed for GA, DHA, and glycerol with solutions of 0.15, 0.30, 0.60, 1.25, 2.50, 5.00, and 10.00 g/L. Samples were analyzed using Shimadzu's LabSolutions software.

3.6 | NMR analysis

NMR data were acquired in a Bruker Avance Neo operating at a 1 H frequency of 400.13 MHz, using a spectral window of 6.25 KHz, a 90° pulse width of 14 μs , acquisition time of 3 s, and a relaxation delay of 2 s. Water suppression was accomplished through presaturation during the relaxation delay. Typically, 16 scans were acquired for each sample. Raw FID data were processed using software package TopSpin 4.0.2 using an exponential window of 0.3 Hz and 65,536 points. Samples were prepared by dissolving 50 μl of sample into 540 μl of D_2O and were transferred to a 5-mm NMR tube.

ACKNOWLEDGMENTS

EJ and MR would like to thank PEDECIBA Química and the National Research and Innovation Agency (ANII) from Uruguay. This work was supported by ANII [FSE 1_2016_132115].

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EJ investigated the study, contributed to methodology and visualization, and wrote the original draft of the manuscript. MR investigated the study, visualized the data, and wrote the original draft of the manuscript. LB conceived the study, acquired the funding, and wrote, edited, and reviewed the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data are provided in full in the results section of this paper.

ETHICAL APPROVAL

None required.

ORCID

Lorena Betancor  <https://orcid.org/0000-0002-0569-0499>

REFERENCES

- Andreeßen, B., & Steinbüchel, A. (2012). Biotechnological conversion of glycerol to 2-amino-1,3-propanediol (serinol) in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*, 357–365. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3364-6>
- Ayoub, M., & Abdullah, A. Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*, 2671–2686. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.054>
- Black, C. S., & Nair, G. R. (2013). Bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconacetobacter xylinus* cells. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, *4*, 310–314. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2013.V4.316>
- Cánovas, M., Torroglosa, T., & Iborra, J. L. (2005). Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzyme and Microbial Technology*, *37*, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.023>
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2018). Dihydroxyacetone: An updated insight into an important bioproduct. *ChemistryOpen*, *7*, 233–236. <https://doi.org/10.1002/open.20170201>
- De Vuyst, L., Callewaert, R., & Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, *142*, 817–827. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-817>
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2003). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*, 233–242.
- Dikshit, P. K., Kharmawlong, G. J., & Moholkar, V. S. (2018). Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, *256*, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.024>
- Dikshit, P. K., & Moholkar, V. S. (2016). Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. *Bioresource Technology*, *216*, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.100>
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., & Sakaki, K. (2009a). Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*, 445–452. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2124-3>
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., & Sakaki, K. (2009b). Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*, 1033–1039. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1737-2>
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., ... Sakaki, K. (2009). Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*, 1799–1805.
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., ... Sakaki, K. (2010). Use of a *Gluconobacter frateurii* mutant to prevent dihydroxyacetone accumulation during glyceric acid production from glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 2330–2332.
- Habe, H., Shimada, Y., Yakushi, T., Hattori, H., Ano, Y., Fukuoka, T., ... Sakaki, K. (2009). Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Applied and Environment Microbiology*, *75*, 7760–7766. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-09>
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., & Koski, P. (1997). Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology*, *143*, 3193–3199. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3193>
- Hu, Z. C., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, *102*, 7177–7182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.078>
- Julsing, M. K., Kuhn, D., Schmid, A., & Bühler, B. (2012). Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*, 1109–1119. <https://doi.org/10.1002/bit.24404>
- Khanna, S., Goyal, A., & Moholkar, V. S. (2012). Microbial conversion of glycerol: Present status and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, *32*, 235–262. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.604839>
- Poljungreed, I., & Boonyarattanakalin, S. (2017). Dihydroxyacetone production by *Gluconobacter frateurii* in a minimum medium using fed-batch fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *92*(10), 2635–2641.
- Poljungreed, I., & Boonyarattanakalin, S. (2018). Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only. *Letters in Applied Microbiology*, *67*, 39–46.
- Sato, S., Kitamoto, D., & Habe, H. (2014). Chemical mutagenesis of *Gluconobacter frateurii* to construct methanol-resistant mutants showing glyceric acid production from methanol-containing glycerol. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *117*, 197–199. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.004>
- Sato, S., Morita, N., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., & Habe, H. (2013). Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. *AMB Express*, *3*, 20. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-20>
- Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kitamoto, D., & Habe, H. (2015). Microbial resolution of D-glyceric acid for L-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *119*, 554–557. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.016>
- Shuler, M. L., & Fikret, K. (2002). How cells grow. In P. Guerrieri (Ed.), *Bioprocess engineering basic concepts* (2nd edn, pp. 169–170). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Szymanowska-Powałowska, D., & Białaś, W. (2014). Scale-up of anaerobic 1, 3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol. *BMC Microbiology*, *14*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-45>
- Tanamool, V., Hongsachart, P., & Soemphol, W. (2018). Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by a potential acetic acid bacteria. *Sains Malaysiana*, *47*, 481–488. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4703-07>
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, *56*, 395–411.
- Yang, B., Liang, S., Liu, H., Liu, J., Cui, Z., & Wen, J. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. *Bioresource Technology*, *267*, 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.082>
- Yang, F., Hanna, M. A., & Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, *5*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>
- Zhou, J. J., Shen, J. T., Wang, X. L., Sun, Y. Q., & Xiu, Z. L. (2018). Stability and oscillatory behavior of microbial consortium in continuous conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 8291–8305. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9244-6>

Zhou, X., Zhou, X., Xu, Y., & Yu, S. (2016). Improving the production yield and productivity of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol fermentation using *Gluconobacter oxydans* NL71 in a compressed oxygen supply-sealed and stirred tank reactor (COS-SSTR). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 1315–1318. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1595-8>

How to cite this article: Jackson E, Ripoll M, Betancor L. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. *MicrobiologyOpen*. 2019;00:e926. <https://doi.org/10.1002/mbo3.926>

APPENDIX

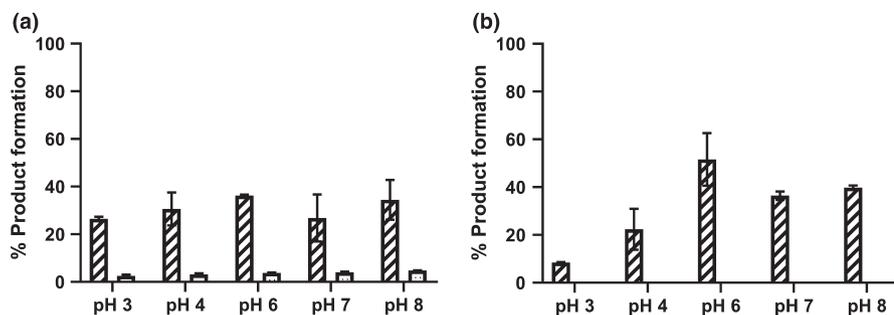


FIGURE A1 Effect of initial pH of the reaction medium in the conversion of glycerol to GA (a) and DHA (b) by resting cells of *Gluconobacter frateurii* (a) and *Gluconobacter oxydans* (b)

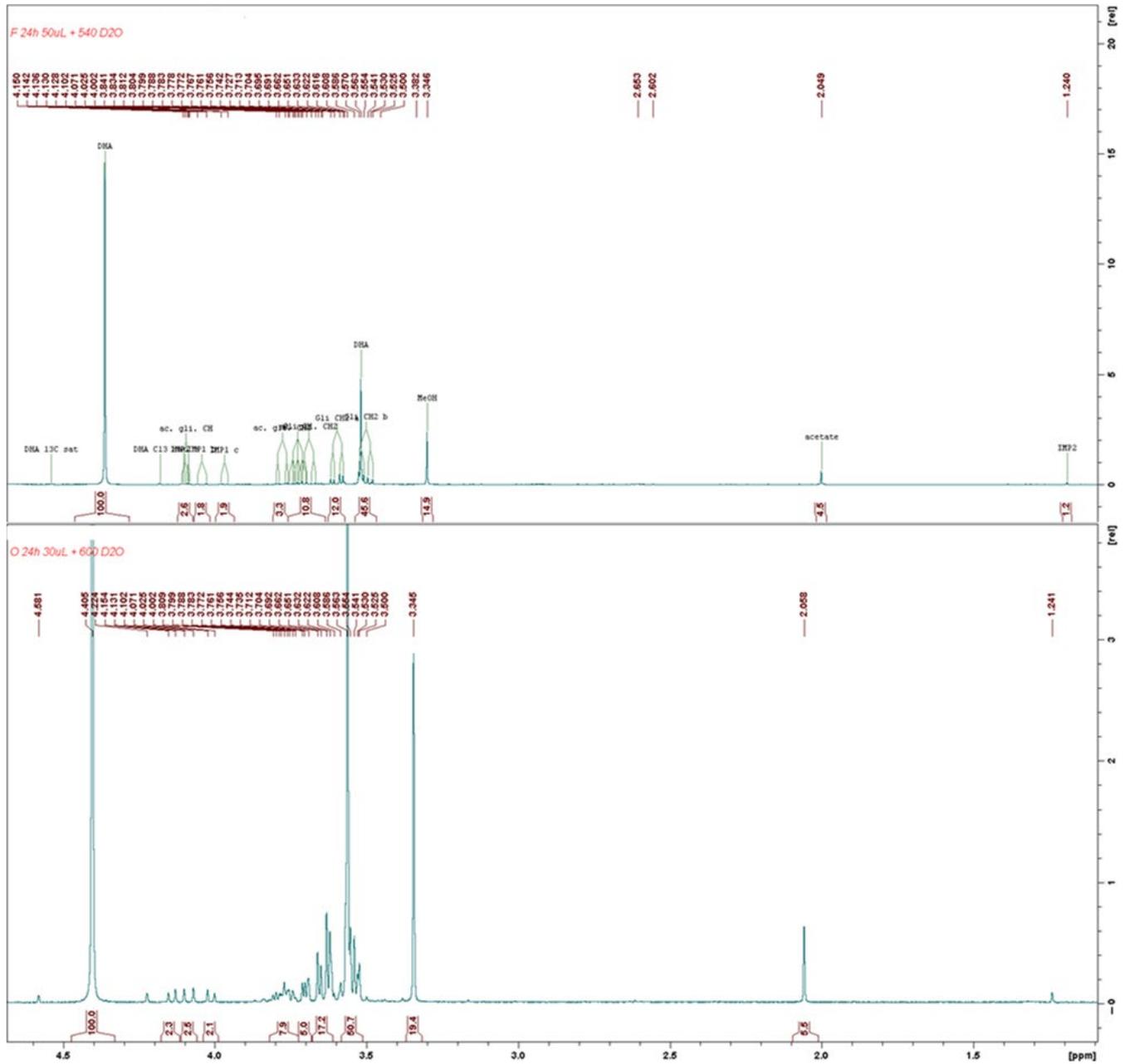


FIGURE A2 ¹H NMR spectroscopy analysis of bioconversion endpoint (24 h). (a) Spectra of glycerol conversion with *Gluconobacter oxydans*. (b) Spectra of glycerol conversion with *Gluconobacter frateurii*. NMR spectral assignments: DHA: 4.405 (s, 1H); 3.563 (s, 4H). Glycerol: 3.763 (tt, 4.4, 9.9Hz, 1H); 3.642 (dd, 4.4, 11.7Hz, 2H); 3.547 (dd, 6.5, 11.7Hz, 2H). Glyceric acid: 4.139 (dd, 3.1, 5.7Hz, 1H); 3.823 (dd, 3.2, 11.9Hz, 1H); 3.734 (dd, 5.5, 11.7Hz, 1H). Methanol: 3.35 (s, 3H). Acetate: 2.05 (s, 3H)

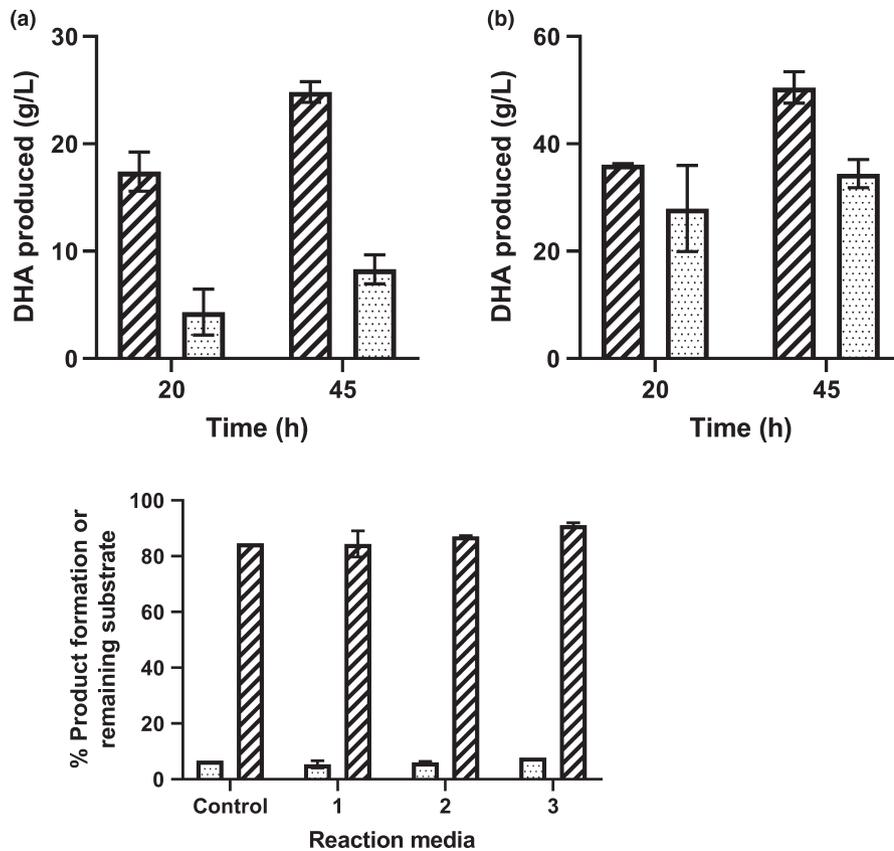


FIGURE A3 DHA production using resting cells of *Gluconobacter frateurii* (a) and *Gluconobacter oxydans* (b), starting from crude glycerol (▨) and crude glycerol in the presence of DHA (▩). Reactions for *G. frateurii* were started with 25g/L glycerol or 25g/L DHA and 25 g/L de glycerol. In the case of *G. oxydans*, reactions were started with 50 g/L or 50 g/L of DHA and 50g/L of glycerol

FIGURE A4 DHA production using resting cells of *Gluconobacter oxydans* in different reaction media. DHA (▩), glycerol (▨). Control (distilled water, glycerol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 (distilled water and glycerol), 2 (distilled water, glycerol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 3 (distilled water, glycerol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4). Reactions were started with 50 g/L and analyzed after 20 hr