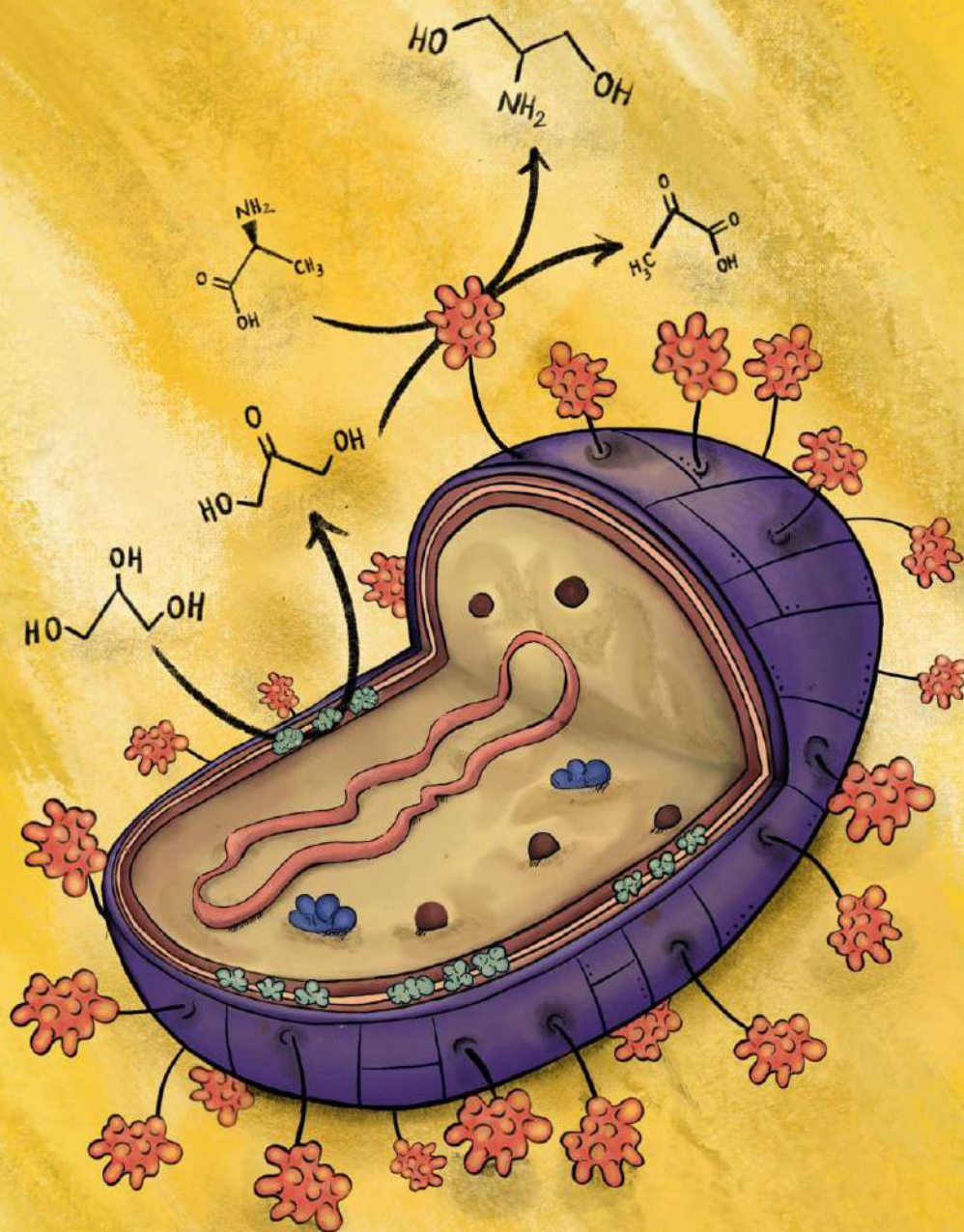


Estrategias no tradicionales de inmovilización para la obtención de biocatalizadores basados en cepas de *Gluconobacter*

MSc. Magdalena Ripoll



Directora: Dra. Lorena Betancor
Co-Director: Dr. Leonardo Ríos-Solís
Director académico: Dr. David González

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



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Estrategias no tradicionales de inmovilización para la obtención de biocatalizadores basados en cepas de

Gluconobacter

MSc. Magdalena Ripoll

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Octubre 2024

Estrategias no tradicionales de inmovilización para la obtención de biocatalizadores basados en cepas de *Gluconobacter*

Tribunal:

Dra. Lorena Wilson

Dra. Paula González

Dr. César Iglesias

Dra. Lorena Betancor, Directora

Dr. Leonardo Ríos-Solís, Co-Director

Dr. David González, Director Académico

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi Directora de Tesis, la Dra. Lorena Betancor, por abrirme las puertas de su laboratorio en 2016, y desde entonces haberme acompañado en toda mi formación como investigadora. Sus aportes y apoyo constante fueron invaluable durante este proceso.

A mi Co-Director, el Dr. Leonardo Ríos-Solís por sus valiosos aportes relacionados a la modificación genética de microorganismos por técnicas basadas en CRISPR, y por recibirme en su laboratorio en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad de Edimburgo (Reino Unido). A su grupo de investigación, especialmente al Dr. Koray Malci, el Dr. Néstor Jonguitud-Borrego, y el MSc. Jordy Lerma-Escalera, por su apoyo durante el diseño y desarrollo de experimentos para la modificación genética de *Gfr*, resultados que se ven plasmados en el Capítulo 2 de este trabajo.

A mi Director Académico, el Dr. David González, por sus valiosos aportes durante el desarrollo de esta Tesis.

Al MSc. Carlos Sanguinetti por su gran apoyo desde el comienzo de mi carrera académica, y por darme un lugar en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Ana Paula Mulet y la Ing. Malena Dalies por su buena disposición y apoyo en la realización de las actividades relacionadas con la modificación genética de *Gluconobacter*, reflejadas en el Capítulo 2 del manuscrito.

Al Dr. Fernando López-Gallego y a su grupo de investigación, especialmente a la MSc. Maialen Iturralde, el Dr. Daniel Grajales-Hernández, el Dr. Alejandro Herrera-Orrego y la Dra. Nicolette Czarniewicz por recibirme en el Laboratorio de Biocatálisis Heterogénea del Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CIC BiomaGUNE) en San Sebastián (España). Los resultados de biotransformaciones de glicerol y sus derivados por *Gox* obtenidos durante esta estancia son parte integral de los Capítulos 1 y 4 de esta Tesis.

A la Dra. Natalia Ferraz y a su grupo de investigación, especialmente al Dr. Carlos Palo-Nieto, por recibirme en su laboratorio en el Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la Universidad de Uppsala, en Uppsala (Suecia). La colaboración surgida de esta breve estancia dio lugar a un nuevo material de inmovilización con potencial de aplicación en *Gluconobacter*, resultados que forman parte de la sección “Perspectivas futuras” de este trabajo.

Al Dr. Simone Dimartino y el Dr. Rafael Galindo-Rodríguez del Instituto de Bioingeniería de la Universidad de Edimburgo por el diseño y preparación de los soportes de inmovilización obtenidos por impresión 3D. Los

resultados obtenidos de su implementación forman parte del Capítulo 3 y de la sección “Perspectivas futuras” de este trabajo.

A la Dra. Valeria Grazú del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón en Zaragoza (España), y a su grupo de investigación, por su ayuda con los análisis por SEM de varios preparados inmovilizados descritos en el Capítulo 3 de esta Tesis.

Al Dr. Eduardo Méndez y el Dr. Pablo Fagúndez del Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Uruguay), por su ayuda en los análisis de nanopartículas por DLS, potencial zeta y FTIR, que forman parte del Capítulo 4 de este manuscrito.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología y del Grupo de Tecnología de Proteínas, especialmente a la Dra. Erienne Jackson, la MSc. Florencia Pirotti y al Lic. Nicolás Soriano, por su apoyo incondicional durante estos años.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme una beca de doctorado para poder llevar a cabo mis estudios y financiar mis estancias en la Universidad de Edimburgo y en el CIC BiomaGUNE.

A la Universidad ORT Uruguay y a PEDECIBA Química por el apoyo financiero recibido para mis estancias en la Universidad de Edimburgo y en el CIC BiomaGUNE, y la participación en diversos eventos de divulgación científica.

Al programa Erasmus+ ICM por el apoyo financiero para mi visita a la Universidad de Uppsala.

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

Estrategias no tradicionales de inmovilización para la obtención de biocatalizadores basados en cepas de *Gluconobacter*

MSc. Magdalena Ripoll

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

Directora: Dra. Lorena Betancor

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

Co-Director: Dr. Leonardo Ríos-Solís

(Department of Biochemical Engineering, Faculty of Engineering Sciences, University College London)

Director Académico: Dr. David González

(Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Facultad de Química, Udelar)

Resumen

El objetivo general de esta Tesis fue profundizar en el estudio del potencial de cepas inmovilizadas de *Gluconobacter* como biocatalizadores en la obtención de compuestos de interés industrial. Se planteó la hipótesis de que estrategias no tradicionales de inmovilización mejorarían significativamente la aplicabilidad industrial de las cepas de *Gluconobacter*, permitiendo una producción eficiente de compuestos a partir de glicerol y sus derivados. En particular, se esperaba que las cepas mutantes de *Gluconobacter* y su inmovilización en soportes no convencionales mejoraran la producción de ácido glicérico (AG) y otros compuestos, mientras que la implementación de cascadas biocatalíticas integradas permitieran la síntesis efectiva de productos aminados.

Se realizó un análisis sobre la capacidad de oxidación de *Gluconobacter oxydans* (Gox) en derivados de glicerol con el objetivo de obtener cetonas útiles para la síntesis de compuestos aminados. Se logró mejorar la producción de AG utilizando células en reposo de *Gluconobacter frateurii* (Gfr), desarrollando una metodología económica que también serviría como control para futuras reacciones con preparaciones inmovilizadas. Los resultados

obtenidos demostraron un notable potencial de las cepas Gox y Gfr para la obtención de compuestos oxidados a partir de glicerol, con la producción de dos cetonas nuevas, 1-etoxi-3-hidroxipropan-2-ona (EHA) y 1-hidroxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ona (3FHA), y la capacidad de obtención de AG por células en reposo utilizando solamente agua.

Asimismo, se utilizaron técnicas de modificación genética racional para generar mutantes de *Gluconobacter*, obteniéndose cepas fluorescentes de Gfr y Gox que expresan la proteína mCherry, lo que resultó fundamental para el estudio de la arquitectura de preparaciones inmovilizadas. Además, se abordó el desarrollo de un mutante de Gfr capaz de producir únicamente AG a partir de glicerol sin la acumulación del coproducto dihidroxiacetona (DHA) utilizando herramientas CRISPR. Esto sienta un antecedente sin precedentes en la modificación genética de esta cepa utilizando este abordaje.

Se evaluaron diversas técnicas no tradicionales de inmovilización en *Gluconobacter*, incluyendo el atrapamiento en matrices híbridas de polímeros orgánicos y materiales nanoparticulados, la integración con nanomateriales silíceos, la generación de cubiertas unicelulares y la unión a materiales obtenidos por impresión 3D. Los resultados subrayaron la importancia de la inmovilización como estrategia de estabilización de este biocatalizador, y de seleccionar adecuadamente la matriz de inmovilización para mejorar los resultados en las biotransformaciones.

Finalmente, se diseñó e implementó una estrategia innovadora de co-inmovilización para combinar biocatalizadores enzimáticos con cepas de *Gluconobacter*, permitiendo la realización de una cascada en formato *1-Pot* para la preparación de serinol. En un abordaje inédito, esta estrategia utilizó esporas artificiales decoradas con una transaminasa inmovilizada por colas de histidina en la superficie bacteriana. Asimismo, se utilizó una nueva estrategia de funcionalización sobre nanopartículas de sílica biomimética para la inmovilización de la transaminasa. Este inmovilizado se logró acoplar en una reacción en *2-Pot* en conjunto con Gox, donde el etil gliceril eter (EGE) fue oxidado a EHA, siendo luego modificado por aminación reductiva para obtener 2-Amino-3-etoxipropan-1-ol (2A3EP). Este compuesto es una amina quiral con potencial en síntesis de fármacos, que nunca había sido sintetizado utilizando esta estrategia.

Los resultados de esta Tesis Doctoral no solo avanzaron el conocimiento sobre el comportamiento de *Gluconobacter* como biocatalizador, sino que también contribuyeron a la biocatálisis y las biotransformaciones en general, con nuevas estrategias de mejora de procesos biosintéticos y biocatalizadores. Los estudios realizados han abierto varias nuevas líneas de investigación, que continúan siendo exploradas para expandir las aplicaciones y mejorar las reacciones biocatalíticas de *Gluconobacter*.

Non-traditional immobilization strategies for the development of biocatalysts based on *Gluconobacter* strains

MSc. Magdalena Ripoll

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

Director: Dr. Lorena Betancor

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

Co-Director: Dr. Leonardo Ríos-Solís

(Department of Biochemical Engineering, Faculty of Engineering Sciences, University College London)

Academic Director: Dr. David González

(Laboratorio de Biotransformaciones, Facultad de Química, Udelar)

Abstract

The overall objective of this thesis was to further explore the potential of immobilized *Gluconobacter* strains as biocatalysts for the production of compounds of industrial interest. The hypothesis proposed was that non-traditional immobilization strategies would significantly enhance the industrial applicability of *Gluconobacter* strains, enabling the efficient production of compounds from glycerol and its derivatives. Specifically, it was anticipated that mutant strains of *Gluconobacter* immobilized on unconventional supports would improve the production of glyceric acid (AG) and other compounds, while the implementation of integrated biocatalytic cascades would allow for the effective synthesis of aminated products.

An analysis was conducted on the oxidation capacity of *Gluconobacter oxydans* (Gox) on glycerol derivatives with the aim of obtaining ketones useful for the synthesis of aminated compounds. The production of AG was

successfully enhanced using resting cells of *Gluconobacter frateurii* (Gfr), developing a cost-effective methodology that also served as a control for future reactions with immobilized preparations. The results demonstrated a notable potential of the Gox and Gfr strains for producing oxidized compounds from glycerol, including the production of two new ketones, 1-ethoxy-3-hydroxypropan-2-one (EHA) and 1-hydroxy-3-(2,2,2-trifluoroethoxy)propan-2-one (3FHA), as well as the ability to obtain AG from resting cells using only water.

Furthermore, rational genetic modification techniques were used to generate *Gluconobacter* mutants, resulting in fluorescent Gfr and Gox strains expressing the mCherry protein, which was crucial for studying the architecture of immobilized preparations. Additionally, a mutant Gfr strain capable of producing only AG from glycerol without accumulating the by-product dihydroxyacetone (DHA) was attempted using CRISPR tools. This represents an unprecedented milestone in the genetic modification of this strain using this approach.

Various non-traditional immobilization techniques for *Gluconobacter* were evaluated, including entrapment in hybrid matrices of organic polymers and nanoparticulated materials, integration with siliceous nanomaterials, single-cell encapsulation, and attachment to materials obtained by 3D printing. The results underscored the importance of immobilization as a stabilization strategy for this biocatalyst and the need to carefully select the immobilization matrix to improve biotransformation outcomes.

Finally, an innovative co-immobilization strategy was designed and implemented to combine enzymatic biocatalysts with *Gluconobacter* strains, enabling a *1-Pot* cascade reaction for the preparation of serinol. In an unprecedented approach, this strategy utilized artificial spores decorated with a histidine-tagged transaminase immobilized on the bacterial surface. Additionally, a new functionalization strategy on biomimetic silica nanoparticles was employed for transaminase immobilization. This immobilized enzyme was successfully coupled in a *2-Pot* reaction together with Gox, where ethyl glycerol ether (EGE) was oxidized to EHA, followed by reductive amination to obtain 2-Amino-3-ethoxypropan-1-ol (2A3EP). This compound is a chiral amine with potential in drug synthesis, and it had never been synthesized using this strategy before.

The results of this Doctoral Thesis not only advanced the understanding of *Gluconobacter* as a biocatalyst, but also contributed to biocatalysis and biotransformation in general, with new strategies for improving biosynthetic processes and biocatalysts. The studies conducted have opened several new lines of research that are being further explored to expand applications and enhance biocatalytic reactions of *Gluconobacter*.

Índice

Agradecimientos	iii
Resumen.....	v
Abstract	vii
Índice.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
Introducción general.....	2
Objetivos.....	30
CAPÍTULO 1: Oxidación de glicerol y derivados por células en reposo de cepas de <i>Gluconobacter</i>	32
1.1. Introducción	32
1.2. Materiales y métodos	42
1.3. Resultados y discusión	46
1.4. Conclusiones parciales	62
CAPÍTULO 2: Modificación genética de cepas de <i>Gluconobacter</i>	64
2.1. Introducción	64
2.2. Materiales y métodos	76
2.3. Resultados y discusión	86
2.4. Conclusiones parciales	118
CAPÍTULO 3: Inmovilización de cepas de <i>Gluconobacter</i> en matrices no tradicionales.....	120
3.1. Introducción	120

3.2.	Materiales y métodos	135
3.3.	Resultados y discusión	143
3.4.	Conclusiones parciales	180
CAPÍTULO 4: <i>Gluconobacter</i> como herramienta en cascadas biocatalíticas		185
4.1.	Introducción	185
4.2.	Materiales y métodos	189
4.3.	Resultados y discusión	195
4.4.	Conclusiones parciales	220
Perspectivas futuras		223
Conclusiones generales.....		241
Anexos		244
Bibliografía		350

Lista de abreviaturas

Compuestos químicos

- 1,2,4-BT: 1,2,4-Butanotriol
- 1,3-PDO: 1,3-Propanodiol
- 2A3EP: 2-Amino-3-etoxipropan-1-ol
- 2-KM: 2-Ketomioinositol
- 3-DHS: 3-Deshidroshikimato
- 3FGE: 3-Fluoroetil gliceril éter, 3-(2,2,2-trifluoroetoxipropano-1,2-diol)
- 3FHA: 1-Hidroxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ona
- 5-KF: 5-Ketofructosa
- 6-NSL: 6-(N-hidroxietil) amino-6-desoxi-L-sorbofuranosa
- A2,5-DKG: Ácido 2,5-diketoglucónico
- A2-KG: Ácido 2-keto-D-glucónico
- A2-KLG: Ácido 2-keto-L-gulónico
- A3,4-DHB: Ácido 3,4-dihidroxi-butírico
- A3-HP: Ácido 3-hidroxipropiónico
- A4-HB: Ácido 4-hidroxibutírico
- A5-HV: Ácido 5-hidroxivalérico
- A5-KG: Ácido 5-ketoglucónico
- A6-HC: Ácido 6-hidroxicaproico
- A6-HH: Ácido 6-hidroxi-hexanoico
- AHMFC: Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico
- AG: Ácido glicérico
- BCA: Ácido bicinconínico
- CoQ10: Coenzima Q10
- DHA: Dihidroxiacetona
- EGE: Etil gliceril éter, 3-etoxipropano-1,2-diol
- EHA: 1-Etoxi-3-hidroxipropan-2-ona
- FAD: Flavina adenina dinucleótido
- FEA: Feniletilamina
- IDA: Ácido iminodiacético
- IMS: Isomaltomegalosacárido
- IPTG: isopropil-beta-D-tio-galactopiranosido

- MCD: Molibdopterina citosina dinucleótido
- NHEG: N-2-hidroxietil glucamina
- PEI: Polietilenimina
- PLP: Piridoxal 5'-fosfato
- PQQ: Pirroloquinolina quinona
- PVA: Alcohol polivinílico
- PVP: Polivinil pirrolidona
- TA: Ácido tánico
- TAFE: Polímero de ácido tánico y hierro
- TEOS: Tetraetil ortosilicato
- TMOS: Tetrametil ortosilicato

Enzimas

- DHQasa: 3-DHQ deshidratasa tipo I
- m2KGDH: 2-Keto-D-gluconato deshidrogenasa de membrana
- mADH: Alcohol deshidrogenasa de membrana
- mALDH: Aldehído deshidrogenasa de membrana
- mArDH: Arabitol deshidrogenasa de membrana
- mFDH: Fructosa deshidrogenasa de membrana
- mGADH: D-Gluconato deshidrogenasa de membrana
- mGDH: Glicerol deshidrogenasa de membrana, nombre alternativo para la enzima mPDHP
- mGluDH: Glucosa deshidrogenasa de membrana
- mIDH: Inositol deshidrogenasa de membrana
- mPDHP: Polioli deshidrogenasa principal de membrana, también llamada glicerol deshidrogenasa de membrana (mGDH) o sorbitol deshidrogenasa de membrana (mSIDH)
- mQDH: Quinato deshidrogenasa de membrana
- mSDH: L-Sorbosa deshidrogenasa de membrana
- mSIDH: Sorbitol deshidrogenasa de membrana, nombre alternativo para la enzima mPDHP
- mSNDH: L-Sorbosona deshidrogenasa de membrana
- PfATA: Transaminasa de *Pseudomonas fluorescens*

Técnicas analíticas

- FTIR: del inglés *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

- GC-FID: del inglés *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*, cromatografía de gases con detección por ionización de llama
- GC-MS: del inglés *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
- HPLC: del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución
- PCR: del inglés *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- SEM: del inglés *Scanning Electron Microscopy*, microscopía electrónica de barrido
- STEM: del inglés *Scanning Transmission Electron Microscopy*, microscopía electrónica de transmisión de barrido
- STEM-EDS: del inglés *Scanning Transmission Electron Microscopy - Energy Dispersive Spectroscopy*, microscopía electrónica de transmisión de barrido acoplada a espectroscopía de dispersión de energía
- STEM-HAADF: del inglés *Scanning Transmission Electron Microscopy - High-Angle Annular Dark Field*, microscopía electrónica de transmisión de barrido con campo oscuro anular de alto ángulo
- TEM: del inglés *Transmission Electron Microscopy*, microscopía electrónica de transmisión
- XPS: del inglés *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

Microorganismos

- Gfr: *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465
- Gox: *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819

Equipos

- RID: del inglés *Refractive Index Detector*, detector de índice de refracción (utilizado para HPLC)
- RBR: del inglés *Rotating Bed Reactor*, reactor de lecho rotatorio
- PDA: del inglés *PhotoDiode Array*, detector de arreglo de diodos (utilizado para HPLC)
- SOS-BR: del inglés *Sealed Oxygen Stirred Bioreactor*, reactor agitado de oxígeno presurizado

Otros

- 1-Pot: Modalidad de cascada biocatalítica llevada a cabo en un solo recipiente
- 2-Pot: Modalidad de cascada biocatalítica llevada a cabo en dos recipientes distintos
- A4M1: Soporte de inmovilización híbrido compuesto por 4% alginato y 1% MT
- A4M4: Soporte de inmovilización híbrido compuesto por 4% alginato y 4% MT
- A4S1: Soporte de inmovilización híbrido compuesto por 4% alginato y 1% SiNPs
- A4S4: Soporte de inmovilización híbrido compuesto por 4% alginato y 4% SiNPs
- BAA: Bacterias del ácido acético

- BSA: Seroalbúmina bovina
- CDH: Corte(s) doble hebra
- CLEAs: del inglés *Cross-linked enzyme aggregates*, agregados de enzimas entrecruzados
- CLCAs: del inglés *Cross-linked cell aggregates*, agregados de células entrecruzadas
- CRISPR: del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
- CRISPRi: del inglés *CRISPR interference*, CRISPR interferencia
- CNF: Fibras nanocelulósicas
- dCas: Nucleasa Cas “muerta”, incapaz de generar cortes en el ADN
- DO_{600 nm}: Densidad óptica medida a 600 nm
- Ee: Exceso enantiomérico
- gARN: ARN guía
- kb: kilobases
- kDa: kilo Dalton
- KO: del inglés *knock out*, silenciamiento de un gen
- LPS: Lipopolisacáridos de membrana
- MT: Arcilla montmorillonita
- nCas: Nickasa Cas, solo genera cortes simple hebra
- nt: nucleótido/s
- PAM: del inglés *Protospacer Adjacent Motif*, motivo adyacente protoespaciador
- pb: par/es de bases
- PDB: del inglés *Protein Data Bank*
- RBS: del inglés *Ribosome Binding Site*, sitio de unión al ribosoma.
- rpm: revoluciones por minuto
- sgARN: ARN de guía simple
- SiNPs: Nanopartículas de sílica
- SiNPsTAFE: Nanopartículas de sílica recubiertas con el polímero TAFE
- TALENs: del inglés *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción
- T_{Ret}: Tiempo de retención (aplicado a técnicas cromatográficas)
- UFC: Unidades formadoras de colonia
- vvm: volumen de gas por volumen de tiempo por minuto
- ZFNs: del inglés *Zinc Finger Nucleases*, nucleasas de dedos de zinc

Introducción general

Introducción general

La biocatálisis

La biocatálisis permite la obtención de una gran variedad de productos químicos debido al constante desarrollo de nuevos procesos y biocatalizadores¹. Definida como el uso de catalizadores de base biológica para realizar conversiones químicas²⁻⁴, esta alternativa a los procesos químicos convencionales es una de las claves para una química más verde y sostenible. El aumento global de la población ocurrido en los últimos años ha impactado directamente en la economía, aumentando la demanda de alimentos, combustibles y productos químicos. Para hacer frente a esta demanda cada vez mayor, es necesario llevar a cabo una mayor explotación de los recursos naturales. Dada la disponibilidad limitada de ciertos recursos y la necesidad de garantizar su utilización de forma responsable, la industria química se ha visto obligada a abordar estas preocupaciones, repensando los procesos productivos y disminuyendo su impacto ambiental⁵. Es por esta razón que a principios del siglo XXI el interés de la comunidad científica por la biocatálisis aumentó de manera exponencial, lo que se ve reflejado en el aumento en el número de publicaciones anual relacionado a esta temática (Figura 1). En la actualidad esta disciplina se mantiene consolidada, incorporando desde hace 10 años un número casi sostenido de publicaciones que supera las 1500 al año.

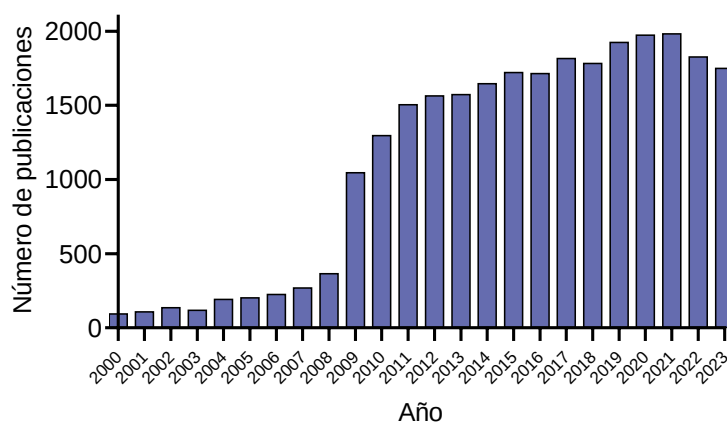


Figura 1. Número de publicaciones científicas por año relacionadas con el término “biocatálisis” en el siglo XXI. Fuente: Scopus.

Existen dos grandes tipos de catalizadores biológicos que son empleados en las reacciones biocatalíticas industriales, las enzimas libres y las células enteras. Las enzimas son proteínas catalizadoras biocompatibles y biodegradables que se encuentran naturalmente dentro de los organismos vivos⁶. Su potencial como alternativas verdes a los catalizadores químicos queda evidenciado en la gran variedad de reacciones químicas que pueden catalizar: de tipo redox, pericíclicas, sustituciones, adiciones, eliminaciones y rearrreglos⁷. Estos eficientes catalizadores permiten llevar a cabo reacciones entre 10^8 y 10^{10} veces más rápidas que sus pares no catalizados,

a la vez que presentan una alta selectividad que los hace biocatalizadores ideales para aplicaciones de química fina⁸. Esta última característica les permite distinguir entre grupos químicos, regiones moleculares y diferentes enantiómeros, lo que muchas veces posibilita la disminución en los pasos sintéticos necesarios para la obtención de moléculas complejas⁹. Gracias a esta alta selectividad, es posible eliminar pasos de protección y desprotección que en numerosos procesos químicos son indispensables. Otra característica atractiva de estos biocatalizadores está relacionada a sus condiciones de operación. En general, las enzimas trabajan en condiciones acuosas, valores de pH cercanos a la neutralidad y temperaturas moderadas, lo que se traduce en procesos productivos con menor impacto ambiental y reducido gasto energético⁶. En contraste, los procesos químicos a menudo se llevan a cabo a altas temperaturas y presiones, lo que aumenta sus requerimientos energéticos, a la vez que utilizan solventes y catalizadores con metales pesados que pueden ser costosos y altamente contaminantes¹⁰. Adicionalmente, las condiciones de operación comunes de una gran variedad de enzimas las hace candidatas ideales para su uso en reacciones en cascada. Dada su relevancia, las cascadas biocatalíticas serán abordadas más en profundidad en la siguiente sección de esta introducción.

No obstante, el uso de enzimas libres en biocatálisis presenta una serie de desafíos. Problemas asociados a la baja estabilidad de las enzimas fuera de sus condiciones óptimas de operación limitan su aplicabilidad⁸. Su uso en solución no solo las hace más propensas a la desnaturalización, sino que también dificulta su separación, lo que disminuye su reusabilidad⁶. Adicionalmente, el posible requerimiento de cofactores y los costos asociados a los procesos de purificación de las mismas puede encarecer significativamente su implementación¹¹.

Alternativamente, células enteras de origen microbiano, animal o vegetal también pueden ser utilizadas como biocatalizadores^{12,13}. En cualquier caso, las mismas actúan como reservorio de las enzimas que finalmente catalizan la reacción deseada, por lo que el uso de células enteras comparte las ventajas asociadas con el uso de enzimas que fueron mencionadas anteriormente. Las células microbianas son los catalizadores de célula entera más relevantes para la biocatálisis ya que su crecimiento y manipulación genética suelen ser sencillos, por lo que en adelante, las referencias a catalizadores de célula entera se centrarán en células de este tipo. Generalmente, una célula microbiana en suspensión es más resistente a los cambios en su entorno que una enzima en solución, lo que disminuye el riesgo de inactivación y facilita su separación y reutilización¹⁴. Asimismo, los microorganismos pueden catalizar fácilmente reacciones en cascada, ya que varias enzimas de una misma vía metabólica, tanto natural como artificial, pueden coexistir dentro de la célula¹⁵. La suplementación con cofactores exógenos puede ser evitada, ya que la propia célula los produce y recicla¹⁶. Estas ventajas, junto con los bajos costos de producción de estos catalizadores, contribuyen a la generación de bioprocesos más económicos¹⁴.

Los procesos biocatalíticos que involucran células enteras de origen microbiano pueden ser llevados a cabo por células en crecimiento o en reposo¹⁷. La producción de compuestos con células en crecimiento presenta generalmente altas productividades, pero está asociada a un procesamiento *downstream* más complejo⁸. Dado que la producción del compuesto de interés acompaña la proliferación del microorganismo, tanto los

componentes del medio de crecimiento como los metabolitos celulares producidos se presentan como contaminantes¹⁸. Por el contrario, los procesos que involucran células en reposo se componen de dos fases. La primera involucra el crecimiento del biocatalizador, mientras que la segunda es dedicada exclusivamente a la producción del compuesto objetivo y generalmente se da en un medio de reacción limpio que facilita su posterior separación¹⁹. Esto es posible ya que la reacción de interés es llevada a cabo por células que se encuentran metabólicamente activas pero no en crecimiento¹⁸. El uso de este tipo de células otorga versatilidad al diseño del proceso productivo, ya que permite seleccionar las condiciones óptimas para la obtención de producto, independientemente de las condiciones óptimas para el crecimiento de la biomasa¹⁹. Adicionalmente, el uso de células en reposo facilita la producción de compuestos tóxicos que podrían inhibir el crecimiento celular, dado que la generación de biomasa ocurre en una fase previa a la producción del compuesto objetivo.

Como queda evidenciado, la versatilidad y aplicabilidad de los catalizadores biológicos hace de la biocatálisis una disciplina en constante crecimiento que amplía sus horizontes año a año con la síntesis de nuevas moléculas de relevancia. Sin embargo, la implementación de los biocatalizadores a grandes escalas se ve muchas veces limitada por factores relacionados con sus condiciones de operación, generando cuellos de botella que dificultan su eficiencia y viabilidad económica. En aras de mejorar su aplicabilidad, se ha buscado desarrollar tecnologías facilitadoras que permitan sortear estos desafíos. A continuación, se presentarán algunos de estos desafíos y sus principales soluciones tecnológicas.

Principales desafíos de la biocatálisis y sus soluciones tecnológicas

La investigación a nivel de laboratorio del uso de biocatalizadores en reacciones de síntesis de moléculas de relevancia es vasta y se encuentra en constante crecimiento (Figura 1). Sin embargo, el traslado de estos procesos a escalas industriales muchas veces resulta desafiante. La aplicabilidad de los procesos biocatalíticos a esta escala, requiere del abordaje una serie de desafíos que permitan mejorar sus rendimientos. Entre estos desafíos, se encuentran principalmente el desarrollo de biocatalizadores altamente activos, robustos y estables, la prevención de su inactivación bajo las condiciones adversas de aplicación industrial, y la optimización de la ingeniería de los procesos, para maximizar la eficiencia y selectividad de los mismos^{1,20,21}.

Estos diferentes cuellos de botella pueden ser abordados a nivel tecnológico desde la mejora de los biocatalizadores o desde la optimización de las condiciones operativas. En los últimos años, varios autores de prominencia en el campo de la biocatálisis y la química verde han identificado una serie de tecnologías que se presentan como soluciones a estas problemáticas comunes^{1,17,20}. Entre ellas se destacan el desarrollo de nuevos biocatalizadores, la inmovilización, la implementación de cascadas biocatalíticas y el uso de biorreactores con propiedades mejoradas. A continuación, se presentarán en mayor profundidad estas tecnologías facilitadoras que, desde el punto de vista de la mejora de los biocatalizadores o la mejora de las condiciones de reacción, contribuyen al desarrollo de la biocatálisis como herramienta industrial.

Tecnologías facilitadoras para el desarrollo y mejora de biocatalizadores

Entre las principales tecnologías disponibles para la mejora de biocatalizadores se destaca la modificación genética, y la inmovilización. La ingeniería genética permite no solo obtener catalizadores de célula entera con propiedades mejoradas, sino que permite la obtención de organismos productores de enzimas de relevancia industrial, más estables y con mayor aplicabilidad. Por su parte, la inmovilización es una de las técnicas más relevantes de estabilización de catalizadores, facilitando además su reutilización y separación. En las siguientes secciones se profundizará en la aplicación de dichas técnicas y su potencial para la obtención de nuevos y mejores biocatalizadores.

- Ingeniería genética aplicada a biocatalizadores

La ingeniería genética de biocatalizadores de célula entera o de bacterias productoras de enzimas de relevancia industrial es una de las principales fuentes de mejora de los procesos biocatalíticos. La versatilidad de este abordaje facilita no solamente la obtención de biocatalizadores más activos y estables, sino que permite ampliar significativamente la variedad de productos obtenidos a partir de estos, permitiendo la generación de nuevas enzimas o la reconfiguración del metabolismo de las células. Un compendio de ejemplos de aplicabilidad de distintos tipos de modificación genética como herramienta para la mejora de biocatalizadores, junto con sus principales implicancias en los procesos biocatalíticos, se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Posibles aplicaciones de la ingeniería genética en la mejora de biocatalizadores de célula entera o enzimas aisladas. Adaptado de Mulet *et al.*²².

Modificación genética	Tipo de modificación	Efecto	Posibles implicancias en los procesos biocatalíticos
Adición de un cassette de expresión para una nueva proteína o enzima	Modificación con plásmido de expresión o modificación permanente del genoma	Generación de un mutante que expresa una nueva proteína o enzima	Generación de mutantes para obtener nuevos productos de relevancia industrial Mejora de una biotransformación por el agregado de una proteína o enzima que aumenta la formación de un compuesto de interés
Cambio de un promotor natural por uno más fuerte	Modificación permanente del genoma	Aumento en la expresión de una proteína o enzima	Producción aumentada del compuesto de interés
Cambio de un promotor natural por uno más débil	Modificación permanente del genoma	Disminución en la expresión de una proteína o enzima	En casos que no se puede realizar un <i>Knock out</i> (KO) a un determinado gen, disminución en la producción de compuestos cuyas vías compiten con la del producto de interés
Adición de un cassette expresión con un promotor inducible	Modificación con plásmido de expresión o modificación permanente del genoma	Expresión inducible de una proteína o enzima	En casos en los que un producto es tóxico, permite la generación de biomasa previo a la inducción de la producción del compuesto En la obtención de proteínas o enzimas recombinantes, permite generar biomasa, previo a la inducción de la expresión proteica

Tabla 1. Posibles aplicaciones de la ingeniería genética en la mejora de biocatalizadores de célula entera o enzimas aisladas. Adaptado de Mulet *et al.*²². **(Continuación)**

Modificación genética	Tipo de modificación	Efecto	Posibles implicancias en los procesos biocatalíticos
Modificación de la secuencia nucleotídica de una proteína o enzima para reemplazar aminoácidos	Modificación con plásmido de expresión o modificación permanente del genoma	Modificación en la secuencia aminoacídica con potencial modificación de la estructura tridimensional de una proteína o enzima	Aumento en la actividad enzimática
			Modificación en el <i>scope</i> de sustrato de una enzima, aumentando la cantidad de productos que se puede obtener o aumentando la especificidad de la misma para evitar productos indeseados
			Aumento en la estabilidad de la enzima o proteína, facilitando su reutilización y permitiendo tiempos de operación más largos
Adición de <i>linkers</i> entre proteínas o enzimas	Modificación con plásmido de expresión o modificación permanente del genoma	Generación de proteínas de fusión	Facilitación de la inmovilización mediante la adición de regiones ricas en ciertos aminoácidos (<i>clusters</i>) que permitan su unión al soporte por características como su hidrofobicidad o carga
			Obtención de proteínas quiméricas que mejoran la distribución espacial de los dominios enzimáticos que las componen, facilitando la obtención de producto
			Para casos en los que la proteína de fusión es fluorescente, facilita el estudio de su localización y caracterización
Adición de un <i>tag</i> a una proteína o enzima	Modificación con plásmido de expresión o modificación permanente del genoma	Generación de una proteína marcada	Dependiendo del <i>tag</i> utilizado, se facilita el estudio de su localización y/ purificación
Generación del KO de un gen	Modificación permanente en el genoma	Generación de una cepa mutante que no expresa una cierta proteína o enzima	Disminución en la producción de un cierto compuesto

Entre las distintas estrategias de modificación genética de microorganismos se encuentran las de tipo aleatorio y las llamadas “rationales”. Las de tipo aleatorio generan mutaciones al azar, como la evolución adaptativa o la mutagénesis inducida por radiación. Por otro lado, las de tipo racional involucran por ejemplo sistemas de expresión con plásmidos o sistemas de edición permanente del genoma, como las técnicas basadas en CRISPR.

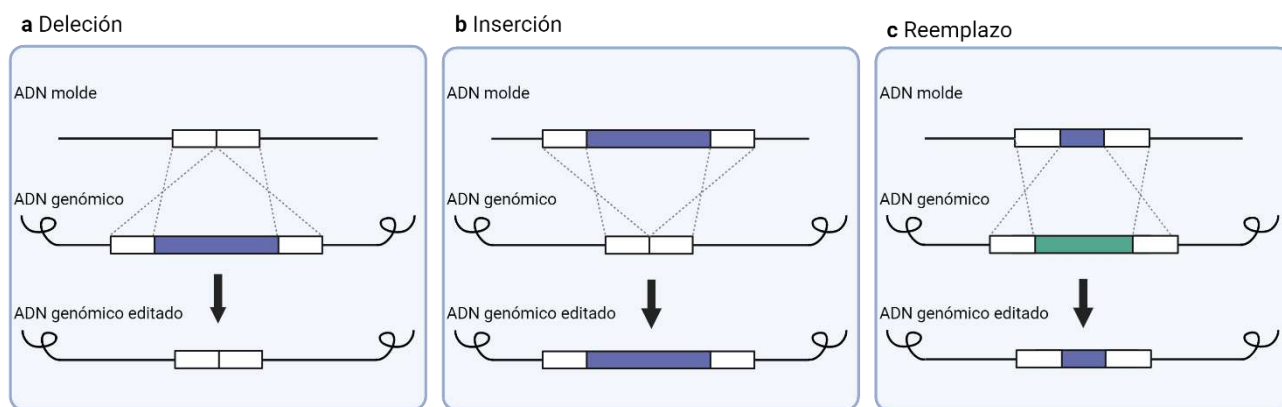
Las técnicas de mutagénesis aleatoria resultan ventajosas para mejorar biocatalizadores de célula entera en organismos no modelo, ya que no requieren un conocimiento profundo de sus genomas para obtener mutantes con fenotipos mejorados²³. Adicionalmente, su sencilla implementación permite construir fácilmente grandes

bibliotecas de mutantes. Por estos motivos, estas técnicas se presentan como una gran herramienta para generar cepas con un alto rendimiento productivo. Estos procesos exponen al microorganismo a un ambiente desfavorable, obligándolo a generar mutaciones para adaptarse mejor a las condiciones en las que se cultiva, o inducen mutaciones a partir de los efectos de la radiación en los ácidos nucleicos. De esta manera, no solamente es posible obtener catalizadores de célula entera con propiedades mejoradas, sino que los mutantes obtenidos pueden ser fuentes de enzimas modificadas, que potencialmente pueden ser aplicadas en reacciones fuera de la célula. Sin embargo, aunque sencillas de implementar, este tipo de técnicas suelen demandar tiempos experimentales prolongados, a la vez que requieren de metodologías de cribado de alto rendimiento debido a la gran cantidad de mutantes generados²⁴.

En contraste, las herramientas de ingeniería genética permiten el diseño racional de nuevas cepas bacterianas para su utilización como catalizadores de célula entera o como fábricas productoras de enzimas. A diferencia de la mutagénesis aleatoria, la ingeniería genética racional facilita la obtención de cepas mutantes en menos tiempo y elimina, como se mencionó anteriormente, la necesidad de métodos de cribado de alto rendimiento. Los sistemas de expresión basados en plásmidos son la forma más popular de modificación genética racional para huéspedes procariotas y levaduras, debido a que generalmente se presentan como una alternativa relativamente sencilla para su manipulación genética. Este tipo de modificaciones es especialmente relevante para la expresión heteróloga de enzimas, empleando como huéspedes cepas específicas de microorganismos modelo, como *E. coli* o *S. cerevisiae*, que aseguran una producción eficiente de biocatalizadores de orígenes variados.

Sin embargo, en el contexto de la generación de biocatalizadores de célula entera, el uso de plásmidos trae consigo ciertas desventajas. Ejemplos de estas son la alta carga metabólica asociada al mantenimiento de los plásmidos y la necesidad de utilizar antibióticos como marcadores de selección en las reacciones, entre otras. Por estas razones, la industria biotecnológica se ve impulsada a la generación de cepas mutantes libres de plásmidos, a través de la modificación permanente de su genoma²⁵.

La modificación genómica de microorganismos puede llevarse a cabo mediante una variedad de técnicas de edición, las cuales pueden clasificarse en dos grupos en función de su dependencia de la reparación por recombinación homóloga²⁶. Entre las técnicas exclusivamente dependientes de la ocurrencia de eventos de recombinación homóloga con más relevancia se encuentra el reemplazo de genes (o intercambio alélico), basado en la integración de plásmidos no replicativos, o el método de *Recombineering*, basado en el uso de recombinasas para mejorar la eficiencia de la recombinación homóloga. Este tipo de técnicas permiten una variedad de operaciones genómicas, basadas en la delección, inserción y reemplazo de secuencias de ADN (Esquema 1).



Esquema 1. Posibilidades de edición genómica con técnicas basadas en eventos de reparación por recombinación homóloga. a) Delección de una región genómica. b) Inserción de una secuencia de ADN dentro del cromosoma sin pérdida de ADN genómico. c) Reemplazo de una región genómica con otra secuencia de ADN. Recuadro violeta: gen de interés. Recuadro blanco: secuencia homóloga. Recuadro verde: secuencia reemplazada. Adaptado de Mulet *et al.*²².

Por otro lado, existen otras técnicas de modificación genómica que pueden o no valerse de eventos de recombinación homóloga²⁶. Por ejemplo, las técnicas de edición basadas en CRISPR, que serán exploradas en el Capítulo 2 de esta Tesis, pueden generar modificaciones genéticas a través de cortes en el ADN que pueden ser reparados por distintas vías. La reparación de estos cortes puede darse por recombinación homóloga, utilizando una secuencia molde de reparación, o a través de mecanismos alternativos que no requieren de un molde, generando modificaciones aleatorias. Esto es también válido para otras técnicas de edición basada en nucleasas, como el caso de la aplicación de TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) o ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*)²⁷. Sin embargo, con la popularización de las técnicas basadas en CRISPR, el uso de nucleasas Cas ha suplantado casi en su totalidad a estas dos aproximaciones, debido su diseño e implementación más sencillos.

Finalmente, existen técnicas de modificación genómica que no se basan en la reparación por recombinación homóloga, por ejemplo, la transposición. Los transposones permiten la integración de fragmentos de ADN de forma aleatoria en el genoma del huésped²⁶. Esta estrategia es comúnmente utilizada para generar librerías de mutantes con inserciones en distintas posiciones, seleccionando posteriormente en favor de un fenotipo en particular.

La aplicación de una o varias de las tecnologías de modificación genética antes mencionadas permiten el desarrollo de biocatalizadores con un diseño preciso, que permite su adaptación a las condiciones de aplicación industrial.

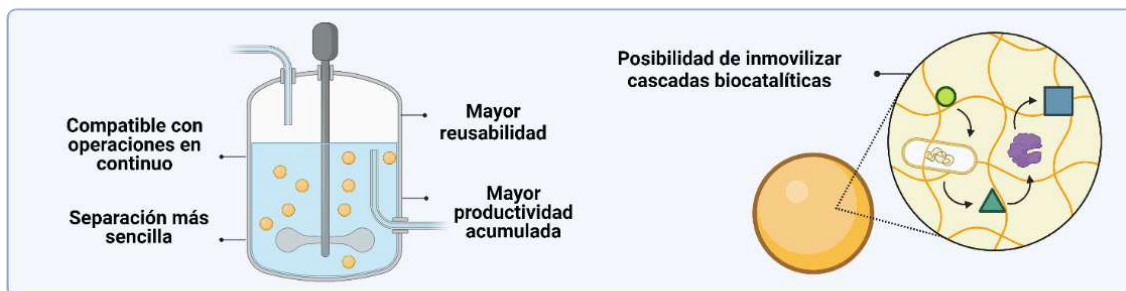
- Estrategias de inmovilización de biocatalizadores

Entre las limitantes que a menudo se presentan en el desarrollo de biocatalizadores, se destacan su baja estabilidad operacional y sus limitadas capacidades de reutilización²⁸. En lo que respecta a la estabilidad, el uso de catalizadores libres a nivel industrial se enfrenta a una serie de problemáticas. Por ejemplo, los altos esfuerzos de corte generados impactan en la integridad de los biocatalizadores e indirectamente sobre su función. A su vez, las condiciones de operación son generalmente distintas a las observadas en sus contextos biológicos, lo que también puede afectar negativamente la integridad del biocatalizador. Esto es especialmente cierto en el caso de las enzimas libres, cuyas estructuras terciarias y cuaternarias son significativamente lábiles, pero también aplica al caso de las células libres. Esta problemática está directamente asociada a la baja reusabilidad, ya que la pérdida de actividad de un biocatalizador imposibilita completamente su utilización en otro ciclo productivo. Sin embargo, no solo la estabilidad se presenta como limitante a la hora de reutilizar un biocatalizador libre. Su recuperación del medio de reacción es muchas veces desafiante, requiriendo de complejos procesos de filtración y centrifugación de grandes volúmenes, lo que dispara significativamente los costos de producción.

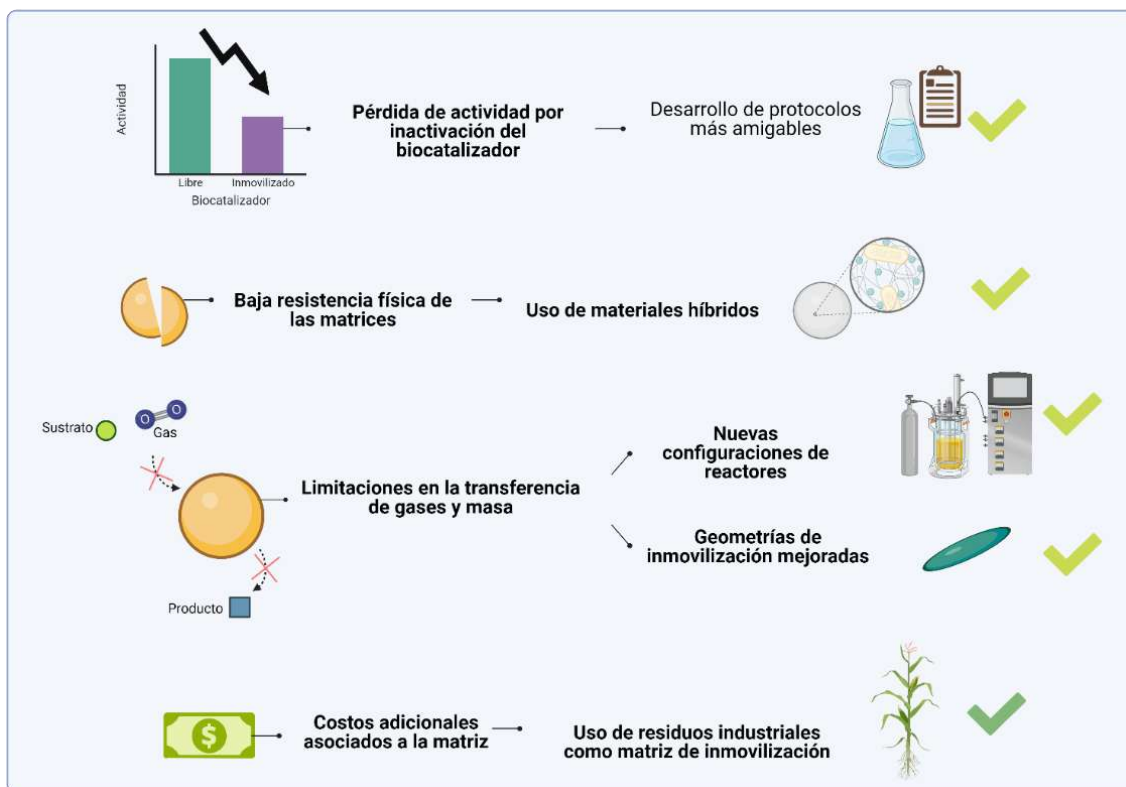
La inmovilización de biocatalizadores surge como una estrategia que permite aumentar la estabilidad de los mismos, a la vez que facilita su recuperación y subsecuente reutilización. Esta implica el confinamiento físico de un biocatalizador en una cierta región del espacio, con la retención de su actividad catalítica y la posibilidad de ser utilizado de manera continua y repetida²⁹. Producto del aumento en la estabilidad y reusabilidad, los biocatalizadores inmovilizados generalmente alcanzan además mejores productividades acumuladas que sus pares libres. Esta serie de ventajas (Esquema 2a), se acompaña además de la posibilidad de llevar a cabo la co-inmovilización de distintos biocatalizadores, lo que facilita la implementación de cascadas biocatalíticas. Además de las ventajas ya mencionadas, la inmovilización de los biocatalizadores que conforman una cascada biocatalítica presenta como beneficio un aumento en la proximidad de los mismos, lo que facilita el flujo de intermediarios hacia el producto final. Las cascadas biocatalíticas serán analizadas con mayor profundidad en la siguiente sección.

En contraposición, a menudo la inmovilización presenta una serie de desafíos que afectan la productividad y aplicabilidad de los preparados obtenidos (Esquema 2b). Sin embargo, dado que las ventajas aportadas por la inmovilización de biocatalizadores son altamente atractivas para el desarrollo de procesos industriales, se han buscado activamente soluciones para superar estos desafíos.

a Principales ventajas asociadas a la inmovilización



b Desafíos asociados (y potenciales soluciones)



Esquema 2. Ventajas (a) y desafíos de la inmovilización de biocatalizadores, junto a sus potenciales soluciones tecnológicas (b). Adaptado de Ripoll *et al.*³⁶.

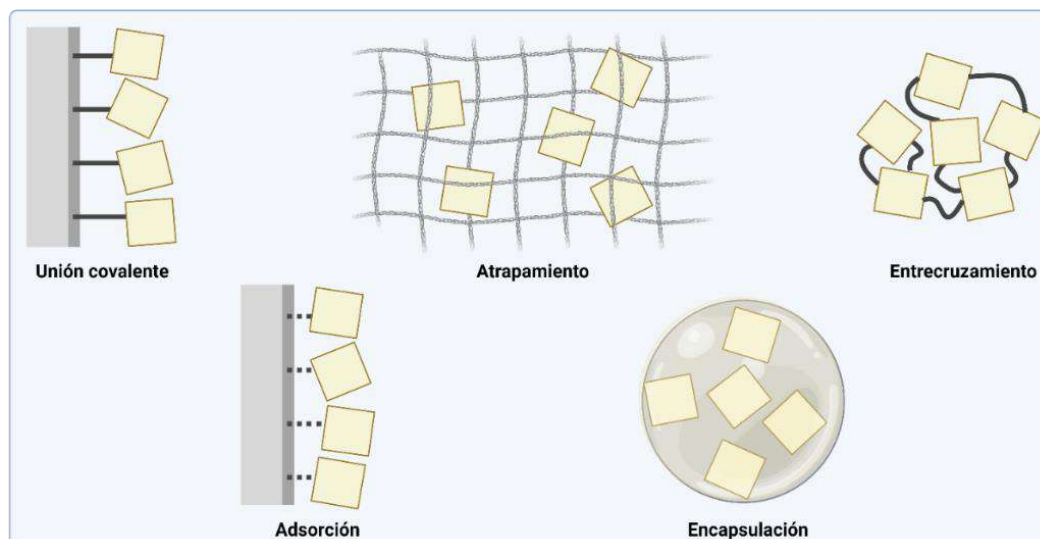
Uno de los principales problemas asociados con la inmovilización es la pérdida de actividad del catalizador luego del proceso. Esta pérdida de actividad puede estar asociada a daños en la estructura del mismo causados por las condiciones de inmovilización, o por la aparición de restricciones difusionales relacionadas a la incorporación de la matriz. Para mitigar los efectos de la inmovilización sobre la estructura de los biocatalizadores, numerosos protocolos han sido desarrollados con la finalidad de llevar a cabo el proceso en condiciones más propicias para el biocatalizador, permitiendo disminuir la pérdida de actividad³⁰. Por ejemplo, protocolos como la inmovilización de enzimas por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética (SiNPs)³¹. Este protocolo procede en condiciones suaves de pH y temperatura, lo que favorece a la conservación de la actividad enzimática. Por otro lado, la disminución del efecto de las restricciones difusionales ha sido abordada desde distintas perspectivas.

Por ejemplo, distintos tipos de reactores han sido utilizados para mejorar la transferencia de gases y masa hacia el interior de las preparaciones inmovilizadas, concepto que se explorará más adelante en esta Introducción. Alternativamente, se han diseñado diversas arquitecturas para las preparaciones inmovilizadas con el objetivo de minimizar las restricciones difusionales³²⁻³⁴. Un ejemplo de esto es la preparación de inmovilizados con forma lenticular, también conocidos como “*Lentikats*”. Este tipo de preparados posee una geometría que facilita la transferencia de masa y gases hacia y desde los biocatalizadores, y ha sido utilizada exitosamente tanto para la inmovilización de enzimas aisladas³⁵ como de células enteras³².

Otra problemática común en la preparación de biocatalizadores inmovilizados es la baja resistencia física de algunas matrices de inmovilización frecuentemente utilizadas, como por ejemplo los hidrogeles, afectando tanto las productividades como la retención de los biocatalizadores en el preparado. La mejora de las propiedades físicas de las matrices de inmovilización puede ser llevada a cabo a través de la generación de matrices híbridas, con el agregado de componentes que mejoren por ejemplo la dureza y durabilidad de los preparados^{37,38}. A modo de ejemplo, la combinación de hidrogeles a base de alginato con materiales silíceos resulta en la obtención de matrices altamente resistentes, que son adecuadas para la inmovilización de bacterias³⁹ y enzimas⁴⁰.

Finalmente, el costo de la matriz se presenta como otra limitante de la aplicación de biocatalizadores inmovilizados. El agregado de una estrategia de inmovilización frecuentemente encarece los procesos productivos, por lo que resulta de especial interés encontrar matrices de inmovilización económicas. Por ejemplo, se han utilizado desechos industriales como el rastrojo de maíz y sus derivados para la inmovilización de biocatalizadores, logrando abaratar los costos finales del proceso^{41,42}.

Una elección cuidadosa del enfoque metodológico y los materiales es crucial para la preparación de biocatalizadores inmovilizados eficientes⁴³⁻⁴⁵. Entre las estrategias de inmovilización más frecuentes se encuentran la unión covalente, la adsorción, el atrapamiento, la encapsulación, y el entrecruzamiento⁴⁶ (Esquema 3).



Esquema 3. Estrategias de uso frecuente para la inmovilización de biocatalizadores. Estas aproximaciones pueden ser utilizadas tanto para la inmovilización de enzimas aisladas como de células enteras.

La inmovilización por unión covalente requiere de la formación de este tipo de interacciones entre el biocatalizador y la matriz. Estas uniones son fuertes por lo que aseguran una alta retención del biocatalizador, pero su irreversibilidad generalmente limita el reciclaje de la matriz. La adsorción por su parte implica la unión del biocatalizador a la matriz a través de interacciones débiles como por ejemplo interacciones iónicas o hidrofóbicas. En este caso es necesario cuidar las condiciones de operación para evitar la pérdida de catalizador al medio, aunque la capacidad de remover el catalizador de la matriz facilita el reciclaje de la misma.

Las estrategias como el atrapamiento y la encapsulación implican la formación de una estructura que recubre al biocatalizador y lo mantiene separado del medio de reacción. La principal diferencia entre estas estrategias radica en la arquitectura de los preparados obtenidos. Mientras que en el atrapamiento el biocatalizador se encuentra confinado dentro de una malla constituida por la matriz de inmovilización, la encapsulación refiere simplemente a la formación de una barrera entre el biocatalizador y el medio de reacción⁴⁷.

Finalmente, las estrategias de entrecruzamiento no requieren la utilización de una matriz preexistente, ya que los preparados inmovilizados se generan a través de interacciones generadas entre los mismos biocatalizadores. Las mismas son generadas por la adición de agentes entrecruzantes que permiten la formación de enlaces covalentes que generan el agregado del biocatalizador y lo heterogeinizan. Los productos resultantes en este caso son los llamados *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs) o *Cross-Linked Cell Aggregates* (CLCAs), dependiendo de si se tratan de agregados de enzimas o de células enteras, respectivamente.

En cuanto a los materiales utilizados como matrices de inmovilización de biocatalizadores, la selección debe considerar condiciones del bioproceso como el pH, temperatura, agitación o aditivos, ya que estos factores

pueden influir en el rendimiento de los materiales⁴⁸. Además, el biocatalizador puede verse influenciado por la naturaleza de la matriz de inmovilización, cambiando así sus propiedades biológicas⁴⁹. Adicionalmente, los parámetros físicos como el tamaño de los poros o la superficie total impactan directamente la cantidad total de biocatalizador inmovilizado, así como la partición de sustratos y productos que afectan la productividad de las reacciones biocatalíticas. Una matriz de inmovilización ideal debe ser durable, estable, económica, inerte, de fácil funcionalización, biocompatible y resistente al ataque microbiano.

Los materiales utilizados para la inmovilización de biocatalizadores son numerosos, existiendo una gran variedad de matrices comerciales disponibles, así como de protocolos de preparación y modificación de otras tantas que pueden ser llevados a cabo a nivel de laboratorio. Estas matrices pueden ser clasificadas por su origen, existiendo las de tipo inorgánico y orgánico. Las matrices inorgánicas incluyen vidrio sinterizado, cerámica, materiales a base de carbono, diatomita y cuarzo. Alternativamente, las matrices orgánicas pueden ser naturales, como el colágeno, el agar, la agarosa, la celulosa, el quitosano y el alginato, o sintéticas como la acrilamida, el poliuretano y alcohol polivinílico (PVA)⁵⁰.

Con la aparición sostenida de nuevos procesos biocatalíticos y los notorios beneficios que la inmovilización ofrece en términos de estabilidad, reusabilidad y productividad, el desarrollo de nuevas matrices y técnicas de inmovilización se ha convertido en una línea de investigación clave. La búsqueda de matrices más eficientes, económicas y sostenibles, junto con la optimización de los procedimientos de inmovilización, no solo permite ampliar el rango de aplicaciones industriales de los biocatalizadores, sino que también contribuye a la viabilidad económica de estos procesos.

Tecnologías facilitadoras basadas en la ingeniería de la reacción

Otra aproximación para potenciar las reacciones biocatalizadas consiste en mejorar la ingeniería de la reacción. Este tipo de mejoras no involucran al biocatalizador *per se*, sino que se enfocan en ajustar las condiciones en las que se realiza la reacción para obtener mejores rendimientos. Un ejemplo de esto es la implementación de cascadas biocatalíticas, en la que se combina más de un biocatalizador para obtener de forma eficiente una variedad de compuestos. Este tipo de cascadas permiten disminuir los tiempos de procesamiento y los descartes, posibilitando una reducción en los costos operativos¹. Alternativamente, la selección de reactores específicos que potencien las capacidades de los biocatalizadores permite incrementos tanto en los rendimientos y en la estabilidad operacional, como en las posibilidades de reutilización en varios ciclos consecutivos. A continuación se desarrollan estas distintas aproximaciones, junto con sus ventajas y potencialidades.

- Implementación de cascadas biocatalíticas

Las cascadas biocatalíticas se definen como el uso de una combinación de catalizadores de origen biológico que actúan de forma secuencial y concertada para obtener un producto de interés⁹. La implementación de las mismas es una poderosa herramienta para el desarrollo de moléculas complejas a partir de otras más sencillas, obteniendo así diversos fármacos, fragancias, edulcorantes artificiales o precursores de polímeros, entre otros⁵¹⁻⁵⁴.

La implementación de este tipo de cascadas presenta una serie de ventajas. En general el empleo de catalizadores de origen biológico tiene como ventaja que estos frecuentemente comparten condiciones operativas, como ser medios acuosos, y pHs y temperaturas suaves⁵². Esto los hace más compatibles entre sí y facilita el diseño de la cascada. Otra ventaja inherente al uso de biocatalizadores es su alta especificidad, disminuyendo así la ocurrencia de reacciones secundarias⁵⁵. Cada tipo de cascada tiene además beneficios característicos que lo hacen más atractivo para una determinada aplicación.

Existen varios tipos de cascadas biocatalíticas, combinando tanto enzimas como células enteras, e incluso las llamadas quimioenzimáticas, que combinan biocatalizadores con catalizadores químicos^{52,56,57}. En esta sección se hará foco únicamente en aquellas compuestas íntegramente por biocatalizadores, ya que este tipo de cascadas se utilizarán posteriormente en este trabajo para la síntesis de compuestos de interés farmacéutico.

En la literatura, se pueden encontrar distintas clasificaciones aplicables a estos variados tipos de cascadas biocatalíticas, basadas en los biocatalizadores implicados y en sus mecanismos de funcionamiento (Esquema 4). Tomando en consideración el origen de sus componentes, las cascadas de tipo natural son aquellas que ya existen dentro de los organismos, mientras que las cascadas artificiales son aquellas que combinan biocatalizadores de distintos orígenes (Esquema 4a). También se consideran artificiales aquellas cascadas que emplean enzimas obtenidas por ingeniería genética⁵². Estos dos tipos de cascadas pueden proceder tanto *in vivo* como *in vitro*⁵¹ (Esquema 4b). Las cascadas de tipo *in vivo* se dan dentro de una célula que expresa las enzimas involucradas en la misma, mientras que las *in vitro* se dan en condiciones no fisiológicas, generalmente con enzimas aisladas o combinaciones de enzimas aisladas con células enteras^{52,58}.

Desde el punto de vista de la implementación de las cascadas *in vivo* o *in vitro*, existen una variedad de ventajas y desventajas asociadas con ambos formatos. En el caso de las cascadas *in vivo* se destaca la ventaja de prescindir completamente de procesos de purificación de las enzimas implicadas en la cascada, ya que las mismas son expresadas por el organismo que las contiene⁵⁵. A su vez, el agregado de cofactores o de sistemas de regeneración de cofactores es muchas veces innecesario ya que la propia célula los produce y recicla⁵². La proximidad espacial de los biocatalizadores dada por la compartimentación de los mismos dentro de la célula también resulta un beneficio de la implementación de cascadas *in vivo*. Sin embargo, es frecuente la ocurrencia de reacciones

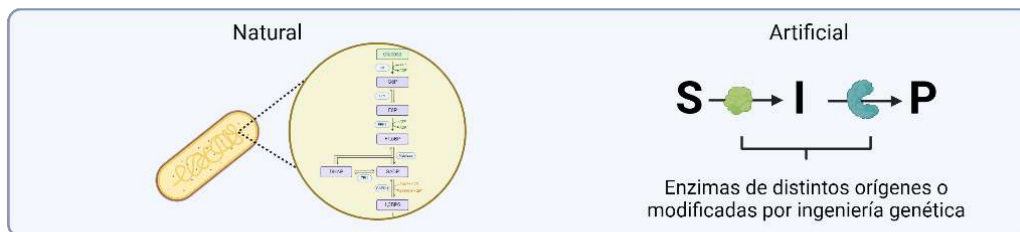
secundarias producto del metabolismo del huésped que pueden tener implicancias negativas en la obtención del compuesto de interés⁵⁶. Asimismo, limitantes asociadas a la toxicidad de ciertos intermediarios o la dificultad de entrada y salida de sustratos y productos hacia y desde el interior celular también pueden impactar en la productividad de la cascada⁵².

En contraste, el uso de cascadas *in vitro* permite un mayor control de los parámetros operativos y facilita la síntesis de compuestos tóxicos que, en un sistema celular, dañarían a la célula huésped⁵⁵. Además, implementar reacciones con un elevado número de enzimas es más sencillo, ya que no es necesario realizar múltiples modificaciones genéticas en la célula huésped. No obstante, el uso de enzimas aisladas en cascadas *in vitro* generalmente requiere de procesos de purificación que pueden ser costosos, lo que aumenta los gastos operativos y encarece los procesos productivos⁵².

Por otro lado, las cascadas pueden ser clasificadas por su topología (Esquema 4c). Generalmente se clasifican en cascadas lineales, paralelas, ortogonales y cíclicas^{52,56}. Las lineales son las más comúnmente utilizadas y están constituidas por reacciones consecutivas para la obtención de un producto en particular. Por otro lado, las cascadas paralelas son aquellas que combinan dos reacciones que comparten un cofactor, y ambos productos resultan de interés. Las llamadas cascadas ortogonales son aquellas en las cuales se agrega una enzima adicional que puede ser utilizada para reciclar un cofactor (en este caso el producto obtenido de esta reacción secundaria no es de interés) o para remover subproductos o intermediarios indeseados. Finalmente, las cascadas cíclicas son aquellas en las cuales uno de los productos es convertido nuevamente en uno de los sustratos iniciales. Este tipo de cascadas es utilizado para beneficiar la producción de uno de los productos frente a la de otro.

Las cascadas también pueden clasificarse como de tipo “1-Pot” o “Multi-Pot”, dependiendo de la forma en que se llevan a cabo las reacciones (Esquema 4d). En las cascadas 1-Pot, todas las reacciones ocurren en un solo recipiente, lo que simplifica el proceso al eliminar por completo los pasos de aislamiento de intermediarios. Esto no solo disminuye la complejidad del procedimiento global, sino que también reduce el número de pasos intermedios de procesamiento⁵⁶. Además, en este formato, se minimiza la ocurrencia de reacciones energéticamente desfavorables o reversibles, ya que los intermediarios generados son fácilmente captados por el siguiente biocatalizador, favoreciendo la formación del producto final^{52,56}.

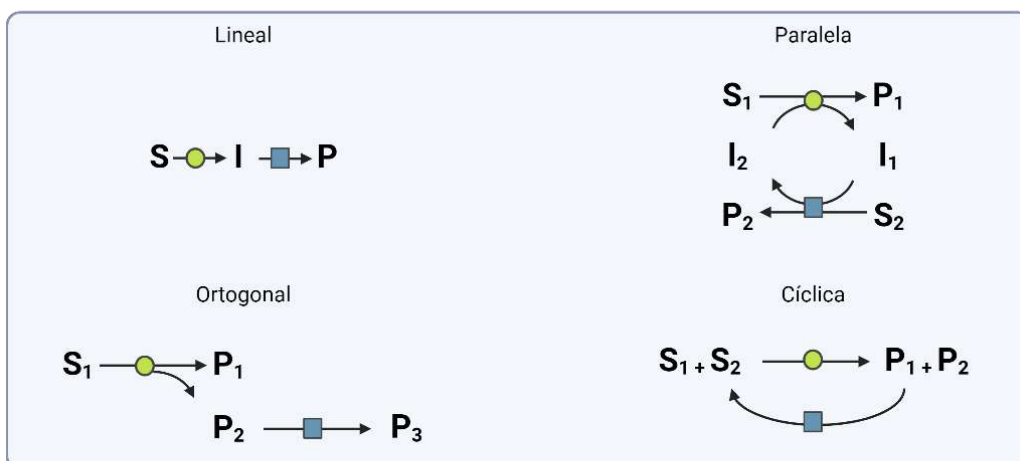
a Por origen de los biocatalizadores



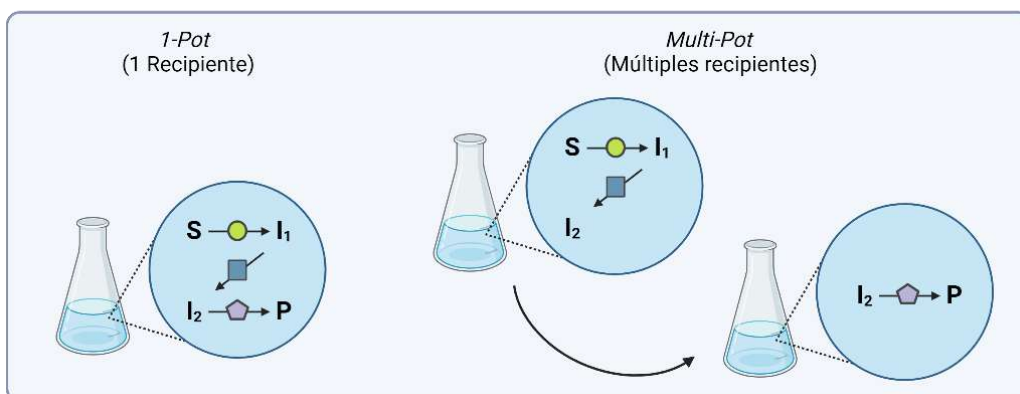
b Por entorno



c Por topología



d Por cantidad de recipientes



Esquema 4. Clasificación de cascadas biocatalíticas, considerando el origen de los biocatalizadores (b), el entorno en el que se producen las reacciones (b), su topología (c), o la cantidad de recipientes en los que son implementadas (d). S: Sustrato. I: Intermediario. P: Producto.

Por otro lado, en las cascadas *Multi-Pot*, las reacciones se llevan a cabo en pasos secuenciales, donde el sobrenadante de una reacción se utiliza como sustrato para la siguiente, en otro recipiente. Aunque este enfoque puede requerir un ajuste de las condiciones experimentales y/o la adición de un catalizador a la mezcla reactiva, hay situaciones en las que separar las cascadas en distintos recipientes resulta beneficioso. Por ejemplo, si los parámetros operativos óptimos de uno de los biocatalizadores difieren significativamente de los del siguiente, la separación de la secuencia de reacciones puede ser ventajosa.

Como se mencionó anteriormente, la selección del tipo de cascada a implementar dependerá de un conjunto variado de factores que aseguren una buena productividad del compuesto de interés. Estos factores son principalmente el tipo o tipos de biocatalizador a utilizar, las condiciones óptimas de operación de los mismos, y las características de los intermediarios y productos finales de la reacción.

Las cascadas biocatalíticas ofrecen un enfoque sumamente eficiente para la síntesis de compuestos complejos a partir de precursores simples, destacándose por su capacidad para reducir intermediarios y mejorar la selectividad del proceso. La versatilidad de las cascadas, y su flexibilidad para adaptarse a diversas condiciones operativas, permiten su implementación en una amplia gama de aplicaciones industriales. Aunque cada tipo de cascada presenta ventajas y desafíos particulares, la selección cuidadosa de las condiciones y catalizadores asegura una elevada productividad y viabilidad económica. A medida que la biotecnología avanza, el desarrollo de nuevas estrategias y la optimización de estas rutas catalíticas seguirá impulsando su adopción en industrias clave, consolidando su rol en la producción sostenible de productos de alto valor añadido.

- Selección del biorreactor

En el escalado de las reacciones biocatalizadas, una correcta selección del biorreactor a utilizar puede impactar significativamente en su productividad⁵⁹. La naturaleza de los biocatalizadores, ya sean células enteras o enzimas aisladas, genera una serie de requerimientos que deben ser satisfechos para asegurar un buen desempeño por parte de los mismos. Entre estos requerimientos se encuentra, por ejemplo, la generación de una buena transferencia de masas y gases, con especial énfasis en la aireación en el caso de reacciones biocatalizadas por microorganismos aerobios. Por ejemplo, distintos tipos de biorreactores y modos de operación han sido diseñados para asegurar una buena aireación.

Otro requerimiento importante es la disminución de efectos de corte que afecten la estabilidad de los biocatalizadores. Aunque también aplicable a las células enteras, esto es especialmente relevante para las enzimas, cuya estructura tridimensional es altamente lábil. En este entendido, como se mencionó anteriormente, es frecuente que los biocatalizadores se sometan a inmovilización. Esto permite mejorar su estabilidad operacional, además de otorgar una serie de ventajas añadidas, exploradas previamente en esta Introducción. Consecuentemente, el uso de biocatalizadores heterogéneos requiere de biorreactores con ciertas características

que permitan su operación y mejoren su desempeño. Por ejemplo, el diseño de estos biorreactores no solamente debe tener en cuenta la estabilidad del biocatalizador *per se*, sino también la del soporte de inmovilización, lo que requiere del desarrollo de biorreactores especializados⁶⁰.

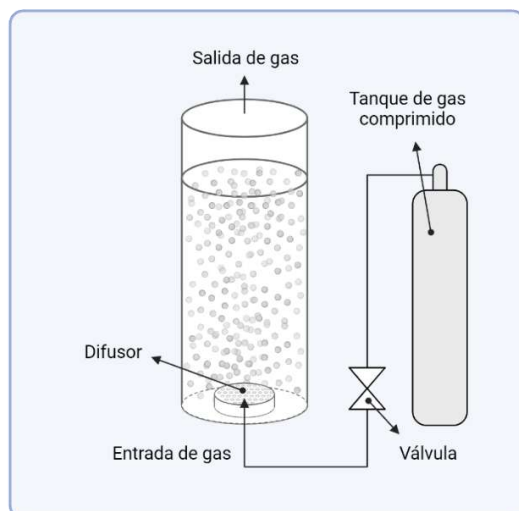
A continuación, se presentarán una selección de ejemplos de biorreactores cuya implementación permite mejorar las condiciones operativas de reacciones biocatalizadas. Debido al alcance de esta Tesis, lejos de ser una exposición exhaustiva de ejemplos, se buscará enfatizar especialmente en tipos de biorreactor que aportan ventajas operativas a reacciones llevadas a cabo por reacciones catalizadas por microorganismos enteros libres o biocatalizadores inmovilizados.

Entre los distintos tipos de reactores que son frecuentemente utilizados para reacciones con células enteras, que presentan características que permiten su mejor rendimiento, se encuentran los biorreactores de columna de burbujas, los de tipo “*airlift*”, y los reactores de oxígeno comprimido (Esquema 5a, b y c).

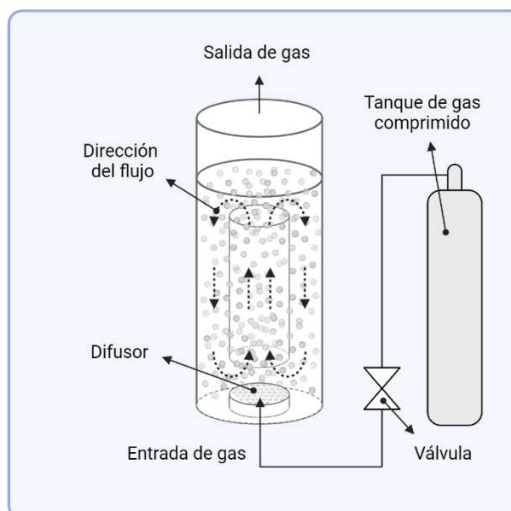
Los biorreactores de columna de burbujas tienen una estructura muy simple y no cuentan con agitación mecánica. Tanto la aireación como la agitación se logran mediante burbujeo de gas⁶¹ (Esquema 5a). Se presentan como una opción de bajo costo y bajo consumo de energía, con especial aplicación en bioconversiones con microorganismos aerobios obligados. Esta tecnología es una alternativa sencilla a los reactores más complejos, ya que permite una alta circulación de fluidos, además de presentar una buena transferencia de masa y calor, con un menor esfuerzo de corte. Esta última característica hace que este tipo de reactores también sea adecuado para preparaciones inmovilizadas, ya que estos bajos esfuerzos de corte permiten la preservación de las matrices de inmovilización.

Por otro lado, los reactores tipo “*airlift*” se agitan neumáticamente, por lo que la aireación no solo proporciona oxígeno, sino que también es responsable de generar la mezcla dentro del reactor. Se diferencian de las columnas de burbujas por el hecho de que en los reactores tipo “*airlift*” se genera circulación de líquido dentro del reactor, además de la generada por el flujo de burbujas⁶¹. Una representación esquemática de un reactor de tubo concéntrico se observa en el Esquema 5b.

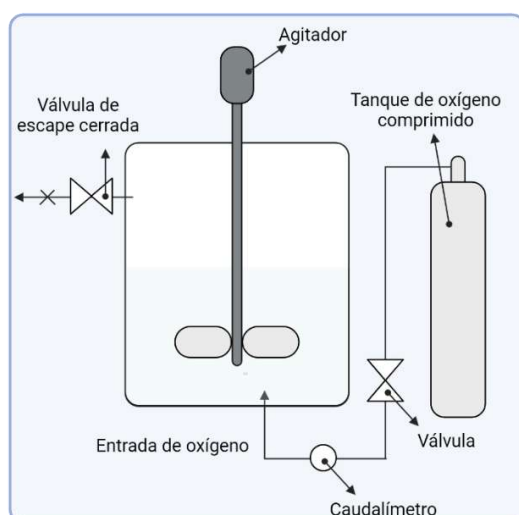
a Biorreactor de columna de burbujas



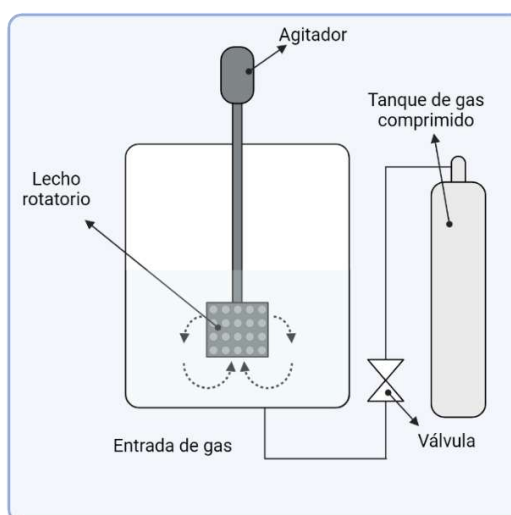
b Biorreactor de tipo "airlift"



c Biorreactor de oxígeno comprimido



d Biorreactor de lecho rotatorio



Esquema 5. Tipos de biorreactores utilizados para potenciar las reacciones biocatalizadas. a) Biorreactor de columna de burbujas. b) Biorreactor de tipo "airlift", formato tubo concéntrico. c) Biorreactor de oxígeno comprimido. d) Biorreactor de lecho rotatorio. Adaptado de Ripoll et al.³⁶.

Otro tipo de biorreactor que presenta relevancia en biotransformaciones que involucran microorganismos aerobios es el de oxígeno comprimido, también llamado SOS-BR por sus siglas en inglés (*Sealed Oxygen Stirred Bioreactor*) (Esquema 5c). Las reacciones con aerobios obligados requieren ambientes con alta concentración de oxígeno que, la mayoría de las veces, no se pueden alcanzar simplemente suministrando aire a un reactor. Reemplazar el aire con oxígeno puro es la manera más sencilla de lograr un ambiente enriquecido con oxígeno⁶². Sin embargo, debido al elevado costo del oxígeno, esta estrategia se vuelve inviable cuando se trabaja con sistemas abiertos. Alternativamente, el uso de biorreactores de oxígeno comprimido para estas biotransformaciones permite ambientes enriquecidos con oxígeno a altas presiones parciales, lo que resulta en una alta tasa de utilización del oxígeno a una fracción del costo⁶². Además, los biorreactores de oxígeno

comprimido eliminan la necesidad de agentes antiespumantes debido a las altas presiones alcanzadas dentro del recipiente, lo que facilita la recolección de productos finales más puros⁶³. En esta misma línea, se ha observado que las altas presiones generadas en el interior de estos reactores favorecen la transferencia de masa en preparados inmovilizados, lo que puede favorecer los rendimientos productivos⁶².

Por otro lado, también en el contexto de las biotransformaciones catalizadas por biocatalizadores inmovilizados, ya sean enzimas aisladas o células enteras, los reactores de lecho rotatorio (Esquema 5d) ofrecen una serie de ventajas importantes^{64,65}. Este tipo de reactores están especialmente diseñados para prevenir la desintegración de las matrices de inmovilización mediante su retención dentro del lecho rotatorio, minimizando así la formación de *debris*. Además de aumentar las velocidades de agitación sin comprometer la integridad estructural de las matrices, lo que facilita la transferencia de masa, estos reactores permiten una separación más sencilla del medio de reacción. Dado que las partículas inmovilizadas permanecen confinadas en el lecho, es más fácil recuperar los biocatalizadores al final del proceso, evitando la necesidad de pasos adicionales de filtración o centrifugación. Esto no solo mejora la eficiencia del proceso, sino que también reduce los costos asociados a la separación y recuperación de biocatalizadores. Asimismo, el aumento en la estabilidad operativa de las enzimas o células inmovilizadas contribuyen a prolongar la vida útil del sistema y a disminuir la frecuencia de sustitución de las matrices. Como resultado, los reactores de lecho rotatorio representan una opción atractiva para procesos a escala industrial, donde la durabilidad y eficiencia son factores clave.

La selección adecuada del tipo de reactor es fundamental para maximizar la eficiencia y productividad en procesos biocatalíticos. Los distintos tipos de reactores ofrecen soluciones específicas para mejorar la transferencia de masa, aireación y estabilidad de los biocatalizadores. Estos avances permiten optimizar tanto el rendimiento de las reacciones como la separación de los componentes al final del proceso, lo que resulta en una mayor eficiencia y viabilidad para su aplicación a escala industrial.

La disponibilidad de la batería de estrategias facilitadoras discutidas en las secciones anteriores constituye uno de los principales motores para el desarrollo de nuevos y mejores bioprocesos. Los continuos avances tecnológicos experimentados año a año en estas áreas, simplifican cada vez más la traslación de los procesos biocatalíticos desde el laboratorio hacia el ámbito industrial.

***Gluconobacter* como biocatalizador**

En los últimos años, el interés en las bacterias del género *Gluconobacter* ha ido en aumento (Figura 2). Las mismas son ampliamente estudiadas por su versatilidad, ya que su utilización va desde la preparación de bebidas fermentadas^{66,67}, hasta la elaboración de biosensores^{68,69}, celdas de combustible microbianas con distintas aplicaciones^{70,71} o su implementación como biocatalizadores⁷². Como la mayoría de las bacterias del ácido acético (BAA), las cepas de *Gluconobacter* son actores importantes en el área de las biotransformaciones con células

enteras⁷³, explotando su capacidad única para oxidar de forma incompleta azúcares y alcoholes. Este hecho no solamente se ve reflejado en el aumento anual casi sostenido observado en las publicaciones científicas relacionadas (Figura 2a), sino en el incremento de patentes creadas a partir de aplicaciones de este género bacteriano, lo que subraya su alta relevancia a nivel industrial (Figura 2b).

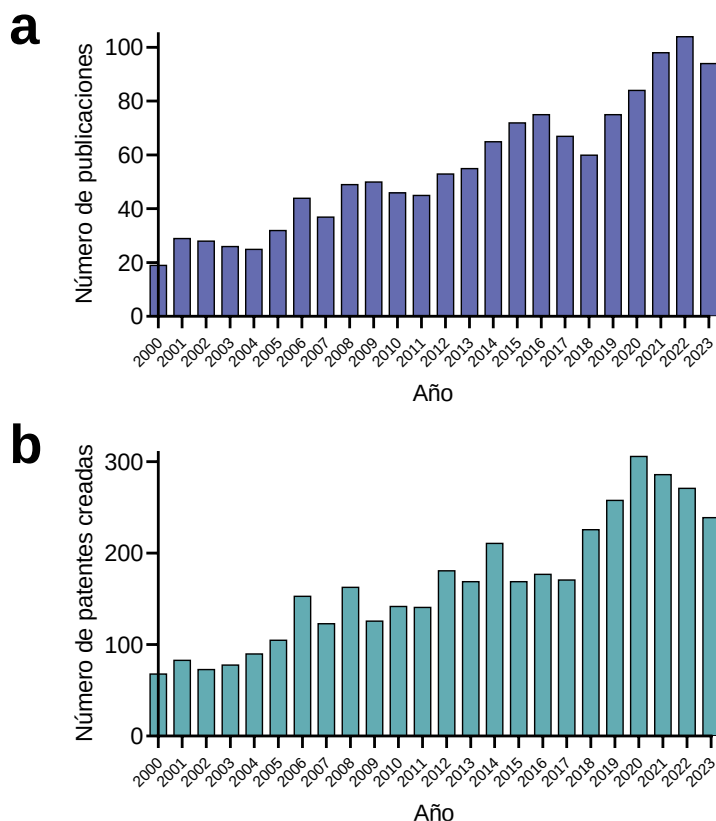


Figura 2. Número de publicaciones científicas (a) y patentes creadas (b) relacionadas con el término “*Gluconobacter*” en el Siglo XXI. Fuentes: Scopus (publicaciones científicas) y Google Patents (patentes).

Gluconobacter es un grupo de microorganismos no modelo, aerobios estrictos, Gram negativos, cuya temperatura óptima ronda los 30 °C y su pH óptimo se encuentra entre 5,5 y 6,0⁷⁴. Como característica principal, transversal a todas las BAA, estos microorganismos poseen una serie de enzimas deshidrogenasas ancladas en su membrana interna que les permite oxidar una variedad de azúcares y azúcares alcoholes. La oxidación incompleta de estos compuestos, denominada fermentación oxidativa, está acoplada a la cadena respiratoria, permitiendo la obtención de energía⁷³. Estas enzimas de membrana poseen su sitio activo orientado al espacio periplásmico, por lo que es en ese compartimento celular donde se lleva a cabo la generación de los productos oxidados, sin necesidad de que ingresen al citoplasma⁷⁵. Sumado a esto, las bacterias liberan estos productos al medio de reacción, lo que las posiciona como excelentes candidatas para su uso en biocatálisis. Una visión más profunda del metabolismo de las bacterias del género *Gluconobacter* y el rol de las deshidrogenasas de membrana se presenta en la introducción del Capítulo 1 de esta Tesis.

Dadas las características anteriormente mencionadas, estos microorganismos son utilizados como biocatalizadores en reacciones de oxidación para la obtención de productos de alta relevancia industrial. Entre ellos se encuentran el vinagre⁷⁶, los precursores de la vitamina C L-sorbosa y ácido 2-keto-L-gulónico (A2-KLG)⁷⁷, el principio activo dihidroxiacetona (DHA)⁷⁸, utilizado en la industria dermocosmética, y la molécula 6-(N-hidroxietil)amino-6-desoxi-L-sorbofuranosa (6-NSL), utilizada para la producción del fármaco antidiabético Miglitol⁷⁹.

Las reacciones de oxidación catalizadas por *Gluconobacter* a menudo tienen la ventaja adicional de una selectividad exquisita^{80,81}, lo que atrae más interés para su estudio y exploración de futuras aplicaciones. Las particulares características de estas bacterias y su versatilidad han impulsado un gran número de investigaciones para avanzar en el conocimiento sobre su manipulación y estabilización genética para aprovechar su potencial en toda su extensión^{82,83}. En particular, en los últimos años se ha visto un aumento significativo en la riqueza de productos generados a través de biotransformaciones de *Gluconobacter* (Figura 3, Tabla 2).

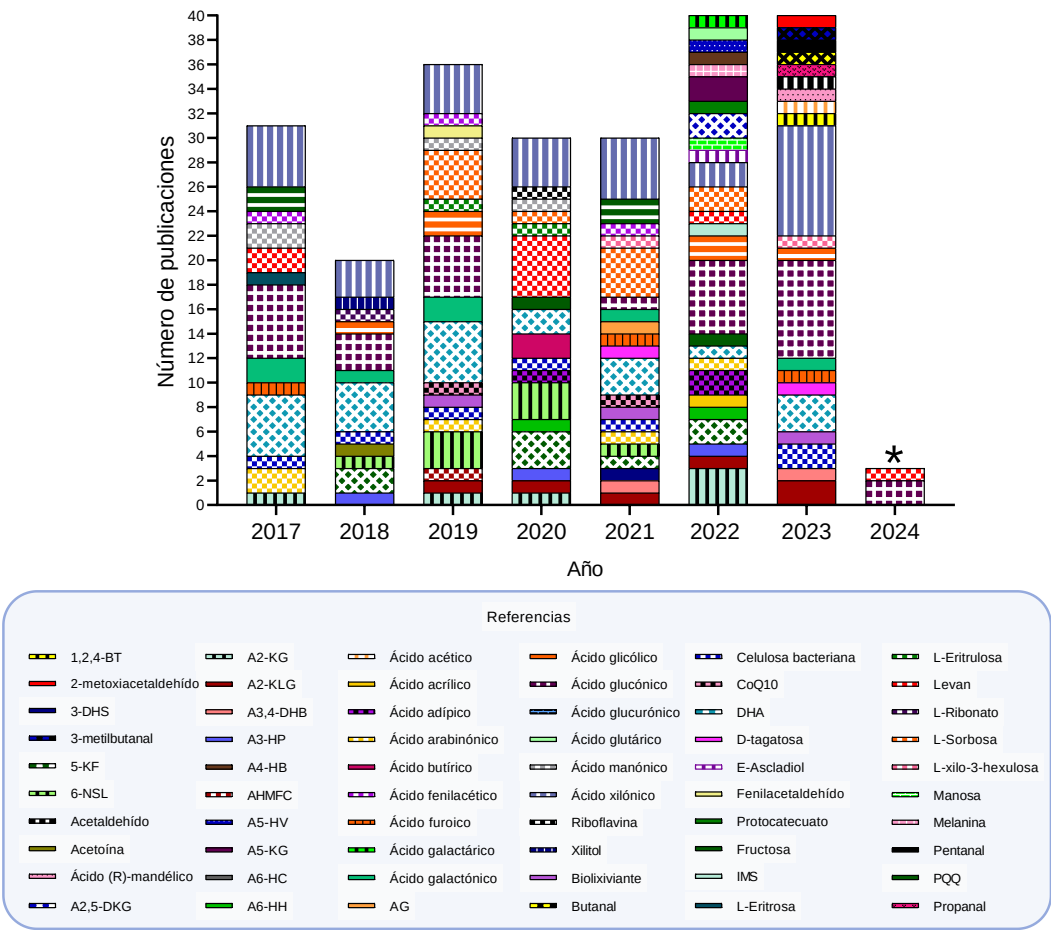


Figura 3. Variedad de productos obtenidos por biotransformaciones utilizando *Gluconobacter* en los últimos años. Imagen actualizada, basada en Ripoll et al. 2023³⁶. El significado de los acrónimos utilizados se destalla en la sección “Abreviaturas” y en la Tabla 2.

Tabla 2. Productos obtenidos mediante biotransformación utilizando cepas de *Gluconobacter* como catalizadores en los últimos años (enero 2017 a marzo 2024). Versión actualizada de la Tabla 1 de Ripoll *et al.* 2023³⁶.

Producto	Sustrato	Enzima(s) involucradas en la biotransformación	Observaciones	Ref.
1,2,4- butanotriol (1,2,4-BT)	D-xilosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (xilosa a ácido xilónico), xilonato deshidratasa (ácido xilónico a 2-keto-3-deoxi-xilonato), Descarboxilasa (2-keto-3-deoxi-xilonato a 3,4-dihidroxibutanal), reductasa (3,4-dihidroxibutanal a 1,2,4-BT)	Precursor de fármacos anticancerígenos y antivirales, así como del plastificante 1,2,4-butanotriol trinitrato.	84
2-metoxi acetaldehído	2-metoxietanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (2-metoxietanol a 2-metoxiacetaldehído)	Intermediario en la producción de tetrahidroisquinolinas y triptolinas.	85
3-deshidroshikimato (3-DHS)	Quinato	Quinato deshidrogenasa (mQDH) (quinato a 3-deshidroquinato), 3-DHQ deshidratasa tipo I (DHQasa) (3- deshidroquinato a 3-DHS)	Intermediario clave para la síntesis de varios compuestos (ej: el fármaco antiviral osetamivir).	86
3-metilbutanal	Alcohol isoamílico	mADH (alcohol isoamílico a 2-metilbutanal)	Intermediario en la producción de tetrahidroisquinolinas y triptolinas.	85
5-ketofructosa (5-KF)	Sacarosa o fructosa	Sacarasa (sacarosa a fructosa y galactosa) y fructosa deshidrogenasa (mFDH) (fructosa a 5-KF)	Edulcorante no nutritivo.	25,87–93
6-(N-hidroxietyl) amino-6-desoxi-L-sorbofuranosa (6-NSL)	N-2-hidroxietyl glucamina (NHEG)	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (NHEG a 6-NSL)	Precursor del Miglitol (medicamento antidiabético).	42,79,81,94–98
Acetaldehído	Etanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (etanol a acetaldehído)	Intermediario en la síntesis de vinagre (ácido acético) o tetrahidroisquinolinas y triptolinas.	85
Acetoína	2,3-butanodiol	ND	Bloque de síntesis química utilizado en cosmética y farmacia, potenciador del sabor.	99
Ácido (R)-mandélico	R-1-fenil-1,2-etanodiol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (R-1-fenil-1,2-etanodiol a R-mandelaldehído), Aldehído deshidrogenasa (mAlDH) (R-mandelaldehído a ácido (R)-mandélico)	bloque de síntesis de antitumorales, agentes contra la obesidad, antibióticos y materiales quiroópticos.	100
Ácido 2,5-diketoglucónico (A2,5-DKG)	Glucosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (glucosa a ácido glucónico), gluconato-2-deshidrogenasa (ácido glucónico a A2-KG); m2KGADH (2- keto-gluconato deshidrogenasa) (A2-KG a A2,5-DKG)	Precursor de la vitamina C.	101–103
Ácido 2-keto-D-glucónico (A2-KG)	Glucosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (glucosa a ácido glucónico), Gluconato deshidrogenasa (mGADH) (ácido glucónico a A2-KG)	Aditivo alimentario, detergente, revelador fotográfico, precursor de vitamina C e isovitamina C.	104–108
Ácido 2-keto-L-gulónico (A2-KLG)	D-sorbitol o L-sorbosa	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (sorbitol a L-sorbosa), L-sorbosa deshidrogenasa (mSDH) (L-sorbosa a L-sorbose) y L-sorbose deshidrogenasa (mSNDH) (L-sorbose a A2-KLG)	Precursor de la vitamina C.	77,109–113
Ácido 3,4-dihidroxibutírico (A3,4-DHB)	3,4-dihidroxibutanal	Aldehído deshidrogenasa (mAlDH) (3,4-dihidroxibutanal a A3,4-DHB)	Bloque de síntesis química	84,114
Ácido 3-hidroxiopropiónico (A3-HP)	1,3-propanodiol (1,3-PDO)	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (1,3-PDO a 3-hidroxiopropionaldehído), Aldehído deshidrogenasa (mAlDH) (3-hidroxiopropionaldehído a A3-HP)	Bloque de síntesis química.	62,115,116

Tabla 2. Productos obtenidos mediante biotransformación utilizando cepas de *Gluconobacter* como catalizadores en los últimos años (enero 2017 a marzo 2024). Versión actualizada de la Tabla 1 de Ripoll *et al.* 2023³⁶. **(Continuación)**

Producto	Sustrato	Enzima(s) involucradas en la biotransformación	Observaciones	Ref.
Ácido 4-hidroxibutírico (A4-HB)	1,4 butilenglicol	ND	Bloque de síntesis para química fina.	116
Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico (AHMFC)	5-Hidroximetilfurfural	Deshidrogenasa de membrana desconocida (5-hidroximetilfurfural a AHMFC)	Bloque de construcción para biocombustibles, disolventes y polímeros.	80
Ácido 5-hidroxiavalérico (A5-HV)	1,5 pentilenglicol	ND	Bloque de síntesis para química fina.	116
Ácido 5-ketoglucónico (A5-KG)	Glucosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (glucosa a ácido glucónico), Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (ácido glucónico a A5-KG)	Precursor del ácido L-tartárico (compuesto de relevancia industrial).	101,108,117
Ácido 6-hidroxicaproico (A6-HC)	1,6-hexilenglicol	ND	Bloque de síntesis para química fina.	116
Ácido 6-hidroxihexanoico (A6-HH)	1,6-hexanodiol (1,6-HD)	ND	Bloque de síntesis química.	116,118
Ácido acético	etanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (etanol a acetaldehído), Aldehído deshidrogenasa (mAIDH) (acetaldehído a ácido acético)	Principal componente del vinagre, posee propiedades medicinales, antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas y antihiperlipémicas	119
Ácido acrílico	1,3-PDO	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (1,3-PDO a 3-hidroxipropionaldehído), 3-hidroxiacil-(ACP) deshidratasa y 3-hidroxidecanoil-(ACP) deshidratasa (3-hidroxipropionaldehído a acroleína), aldehído deshidrogenasa (mAIDH) (acroleína a ácido acrílico)	Bloque de síntesis química utilizado en polímeros superabsorbentes, plásticos, cauchos sintéticos, fibras, recubrimientos, adhesivos, acabados de cuero y detergentes.	120
Ácido adípico	1,6-HD	ND	Bloque de síntesis química.	116,118,121
Ácido arabinónico	Arabinosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (arabinosa a ácido arabinónico)	Precursor de la eritrosa y el eritritol, utilizado para producir polímeros, cementos compuestos, materiales de procesamiento de semiconductores, y cosméticos. Se puede utilizar para aplicaciones médicas.	104,122-125
Ácido butírico	Butanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (butanol a ácido butírico)	Materia prima sintética utilizada en los campos de la alimentación, la medicina y la agricultura.	126,127
Ácido fenilacético	2-Feniletanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (2-feniletanol a fenilacetaldehído), aldehído deshidrogenasa (mAIDH) (fenilacetaldehído a ácido fenilacético)	Compuesto aromático utilizado en la industria alimentaria y cosmética.	32,128,129
Ácido furoico	Furfural	ND	Se utiliza como materia prima en las industrias de resinas, plásticos, alimentos, farmacéutica y perfumería.	130-132
Ácido galactárico	Ácido galacturónico	ND	Precursor de varios polímeros y sustituto del ácido glucárico.	133
Ácido galactónico	Galactosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (galactosa a ácido galactónico)	Se utiliza en la industria farmacéutica y cosmética, y como acidificante en alimentos.	104,122,123, 134-136

Tabla 2. Productos obtenidos mediante biotransformación utilizando cepas de *Gluconobacter* como catalizadores en los últimos años (enero 2017 a marzo 2024). Versión actualizada de la Tabla 1 de Ripoll *et al.* 2023³⁶. **(Continuación)**

Producto	Sustrato	Enzima(s) involucradas en la biotransformación	Observaciones	Ref.
Ácido glicérico (AG)	Glicerol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (glicerol a gliceraldehído) y aldehído deshidrogenasa (mALDH) (gliceraldehído a AG)	Bloque de síntesis química con actividad biológica probada. Se puede utilizar para la producción de tensioactivos y bioplásticos.	37,137,138
Ácido glicólico	Etilenglicol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (etilenglicol a ácido glicólico)	Se utiliza en la producción de productos químicos como adhesivos, en la limpieza de metales, como aditivo para colorantes. Precursor del ácido poliglicólico y del ácido poli (láctico-co-glicólico).	116,139–143
Ácido glucónico	Glucosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (glucosa a ácido glucónico)	Se utiliza en las industrias láctea, de bebidas y textil. Se utiliza además en la limpieza de metales, lavado de platos, detergentes para ropa, productos para la salud y cosméticos. Además, se emplea como edulcorante artificial y agente antibacteriano.	104,108,122,123,144–168
Ácido glucurónico	glucosa	ND	Presente en la kombucha, precursor del compuesto anticáncer ácido D-sacárico 1,4 lactona ¹⁶⁹ .	160
Ácido glutárico	A5-HV	ND	Bloque de síntesis para química fina.	116
Ácido manónico	Manosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (manosa a ácido manónico)	Se utiliza como producto químico, quelante, dispersante, y retardante para pozos de petróleo.	104,122,123,170
Ácido xilónico	Xilosa	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (xilosa a ácido xilónico)	Bloque de síntesis química con aplicaciones como reductor de agua en cemento, precursor del 1,4-butanodiol, 1,2,4-BT y 3,4-dihidroxibutirato. Utilizado en la industria alimentaria como acidificante.	62,63,104,114,122–124,132,158,162,166,167,171–190
Biolixivante (medio gastado ácido)	Azúcares	Glucosa deshidrogenasa (mGluDH) (azúcares a ácidos orgánicos)	Se utiliza para la biolixiviación, para la recuperación de tierras raras.	191–193
Butanal	1-butanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (1-butanol a butanal)	Intermediario en la producción de tetrahidroisoquinolinas y triptolinas.	85
Celulosa bacteriana	Glucosa	Glucokinasa (Glucosa a Glucosa-6-fosfato (G6P)), fosfoglucomutasa (G6P a glucosa-1-fosfato (G1P)), UDPG-pirofosforilasa (G1P a UDP-glucosa (UDPG)), celulosa sintasa (polimerización de celulosa a partir de UDP-glucosa) ¹⁹⁴	Biomaterial con aplicaciones industriales en la industria alimentaria y biomédica.	195–201
Coenzima Q10 (CoQ10)	-	Múltiples enzimas	Se utiliza en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardíacas, cáncer, diabetes y enfermedades de Alzheimer y Parkinson.	202,203

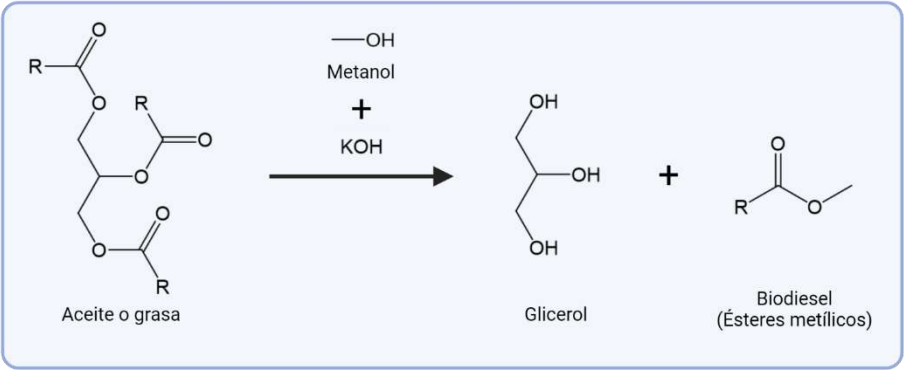
Tabla 2. Productos obtenidos mediante biotransformación utilizando cepas de *Gluconobacter* como catalizadores en los últimos años (enero 2017 a marzo 2024). Versión actualizada de la Tabla 1 de Ripoll *et al.* 2023³⁶. **(Continuación)**

Producto	Sustrato	Enzima(s) involucradas en la biotransformación	Observaciones	Ref.
Dihidroxiacetona (DHA)	Glicerol	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (glicerol a DHA)	Aditivo para lociones de bronceado sin sol.	33,37,58,78, 132,138,162, 204-219
D-tagatosa	Galactitol	Deshidrogenasa de membrana dependiente de PQQ desconocida (galactitol a D-tagatosa)	Azúcar raro.	220,221
E-Ascladiol	Patulina	Deshidrogenasas GOX0525 y GOX1899 dependientes de NADH (Patulina a E-Ascladiol)	Compuesto no tóxico para humanos obtenido a partir de la toxina Patulina. Por sus funcionalidades puede ser útil para síntesis química.	222
Fenilacetaldéhid	2-feniletanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (2-feniletanol a fenilacetaldéhid)	Compuesto aromático utilizado en las industrias alimentaria y cosmética.	129
Fructosa	Sacarosa o manosa	Invertasa (sacarosa fructosa) o Manosa deshidrogenasa de membrana (manosa a fructosa)	Precursor del edulcorante no nutritivo 5-KF.	89,223
Isomaltomegalosacárido (IMS)	Maltodextrina	Dextrano dextrinasa (DDasa) (Maltodextrina a IMS)	Mejora la solubilidad en agua de los compuestos lipofílicos.	224
L-eritrosa	Eritritol	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (eritritol a L-eritrusa), L-ribosa isomerasa citoplasmática (L-RI) (L-eritrusa a L-eritrosa)	Aldotetrosa poco frecuente con diversas actividades farmacológicas.	225
L-eritrusa	Eritritol	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (eritritol a L-eritrusa)	Se utiliza como ingrediente en lociones de bronceado sin sol.	62,226
Levan	Fructosa	Levansucrasa (fructosa a levan)	Polisacárido utilizado en la industria alimentaria.	227-235
L-ribonato	L-ribosa	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) (L-ribosa a L-ribonolactona, hidrolizada espontáneamente a L-ribonato)	Nuevo producto obtenido a partir de la oxidación con la poliol deshidrogenasa mayor.	236
L-sorbosa	D-sorbitol	Poliol deshidrogenasa principal (mPDHP) o GoSIDH (especial, dependiente de NADP+)	Precursor de la vitamina C.	148,237-246
L-xilo-3-hexulosa	Galactitol	Deshidrogenasa de membrana dependiente de PQQ desconocida (galactitol a L-xilo-3-hexulosa)	Azúcar raro.	220,221
Manosa	Fructosa	D-manosa isomerasa de membrana (fructosa a manosa)	Compuesto de alto valor para las industrias alimentaria y farmacéutica ²⁴⁷ .	223
Melanina	L-DOPA (no confirmado)	ND	Utilizada en tratamiento de enfermedades. Propiedades de intercambiador catiónico.	248
Pentanal	1-pentanol	Alcohol deshidrogenasa (mADH) (1-pentanol a pentanal)	Intermediario en la producción de tetrahidroisoquinolinas y triptolinas.	85
Pirroloquinolina quinona (PQQ)	Péptido PqqA	Vía biosintética compleja compuesta por varias enzimas (codificadas por el grupo de genes <i>pqqABCDEFG</i>)	Cofactor redox, su sal sódica se utiliza como suplemento dietético.	249-252
Propanal	1-propanol	Alcohol deshidrogenasa mADH (1-propanol a propanal)	Intermediario en la producción de tetrahidroisoquinolinas y triptolinas.	85

Tabla 2. Productos obtenidos mediante biotransformación utilizando cepas de *Gluconobacter* como catalizadores en los últimos años (enero 2017 a marzo 2024). Versión actualizada de la Tabla 1 de Ripoll *et al.* 2023³⁶. **(Continuación)**

Producto	Sustrato	Enzima(s) involucradas en la biotransformación	Observaciones	Ref.
Protocatecuato	Quinato	Quinato deshidrogenasa (mQDH) (quinato a 3-deshidroquinato), Deshidroquinato dehidratasa (3-deshidroquinato a 3-DHS), Dehidroshikimato dehidratasa (3-DHS a Protocatecuato)	Compuesto con propiedades antioxidantes y precursor del ácido mucónico.	253
Riboflavina	-	Múltiples enzimas	Vitamina (B2) soluble en agua utilizada como aditivo alimentario o en productos farmacéuticos.	254
Xilitol	D-arabitol	D-arabitol deshidrogenasa de membrana (mArDH) (D-arabitol a L-xilulosa), xilitol deshidrogenasa NAD-dependiente (XDH) (L-xilulosa a xilitol)	Alcohol de azúcar pentahidroxilado con aplicaciones en las industrias alimenticia y farmacéutica.	255

En particular, la conversión de glicerol a DHA y AG mediante cepas de *Gluconobacter* es una de las biotransformaciones que ha despertado mayor interés en los últimos años, como lo evidencian las numerosas publicaciones recientes sobre el tema^{137,213,214,216}. Este interés se debe principalmente a tres factores: la creciente demanda de DHA en la industria cosmética, el elevado valor y potencial de aplicación del AG, y principalmente, el gran excedente de glicerol generado por la industria de biocombustibles. Este último, un subproducto inevitable de la producción de biodiésel (Esquema 6), plantea importantes desafíos medioambientales debido a su potencial contaminante. Con el auge de las energías renovables y el consecuente crecimiento de la industria del biodiésel, la cantidad de glicerol crudo producido ha aumentado considerablemente, lo que ha incentivado la búsqueda de soluciones que permitan valorizar este subproducto y reducir su impacto ambiental.



Esquema 6. Síntesis química de biodiesel (ésteres metílicos) a partir de aceites o grasas y metanol. El catalizador empleado en la reacción es generalmente KOH. Como subproducto, se obtiene el glicerol crudo en una relación 10:1 (g/g).

La biotransformación de este subproducto en compuestos de mayor valor agregado a través de biotransformaciones ofrece una alternativa sostenible para reducir el impacto ambiental de la producción de biodiésel, al tiempo que facilita la creación de una biorefinería, mejorando la rentabilidad económica de la

industria. Es por estos motivos que nuestro grupo de investigación se ha centrado en su estudio, y que durante este trabajo será utilizada como biotransformación modelo para una variedad de estrategias biocatalíticas.

Durante esta Tesis Doctoral se buscó ampliar el conocimiento en el campo de la biocatálisis mediante el estudio de la aplicación de dos cepas de *Gluconobacter* con potencial uso industrial.

Nuestra hipótesis se basó en la premisa de que el empleo de estrategias no tradicionales de inmovilización podría mejorar o facilitar las bioconversiones catalizadas por *Gluconobacter*.

Entendemos por estrategias no tradicionales aquellas innovadoras y sin precedentes en su aplicación a este género bacteriano, incluyendo el uso de nuevos materiales, la modificación de la superficie celular y el diseño de arquitecturas que integren múltiples biocatalizadores. Nuestro enfoque fue potenciar las posibilidades de aplicación de *Gluconobacter* en biotransformaciones y contribuir al desarrollo de estrategias extensibles a otros biocatalizadores microbianos o sistemas mixtos.

En este trabajo de Tesis, los nuevos inmovilizados se aplicaron a variedad de bioconversiones. En esta búsqueda de nuevas y mejores biotransformaciones catalizadas por *Gluconobacter*, se implementaron distintas estrategias para mejorar sus características a través de modificaciones genéticas, acoplamiento con distintos catalizadores y desafío con sustratos novedosos que en el futuro se pudieran trasladar al uso biocatalizadores inmovilizados.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis es facilitar la aplicación de cepas de *Gluconobacter* como biocatalizadores mediante el estudio de estrategias no tradicionales de inmovilización.

Objetivos específicos

- **Establecer condiciones para la producción de distintos compuestos a partir de glicerol y sus derivados, con distintas cepas de *Gluconobacter* en reposo:** Se ensayarán las células de Gox en reposo para la oxidación de moléculas derivadas del glicerol. Adicionalmente, se estudiará la oxidación por células en reposo de Gfr para la producción de AG y DHA, estableciendo condiciones que favorezcan la producción del primero. Estos ensayos serán altamente relevantes para sentar las bases para los siguientes experimentos de inmovilización.
- **Generar cepas mutantes de *Gluconobacter* que faciliten el estudio de preparados inmovilizados y presenten mejores características para la producción de AG:** Se realizarán modificaciones genéticas en Gox y Gfr para obtener cepas fluorescentes que faciliten el estudio de preparaciones inmovilizadas. Se buscará además implementar técnicas de modificación genética de Gfr basadas en CRISPR para la obtención de una cepa que produzca únicamente AG a partir de glicerol.
- **Inmovilizar cepas de *Gluconobacter* en soportes no tradicionales y estudiar sus propiedades:** Se explorarán materiales no convencionales para la inmovilización de *Gluconobacter*. Se estudiará cómo la inmovilización afecta su capacidad de conversión de glicerol, su estabilidad y su reutilización en ciclos de producción sucesivos.
- **Implementar cascadas biocatalíticas que combinen biocatalizadores enzimáticos con cepas de *Gluconobacter* para la obtención de productos aminados a partir de glicerol y sus derivados:** Se diseñarán procesos en los que se combinen catalizadores enzimáticos basados en transaminasas con las cepas de *Gluconobacter* para llevar a cabo reacciones secuenciales. El objetivo será generar productos aminados de interés a partir de glicerol y sus derivados, explorando su potencial de acoplamiento.

CAPÍTULO 1:

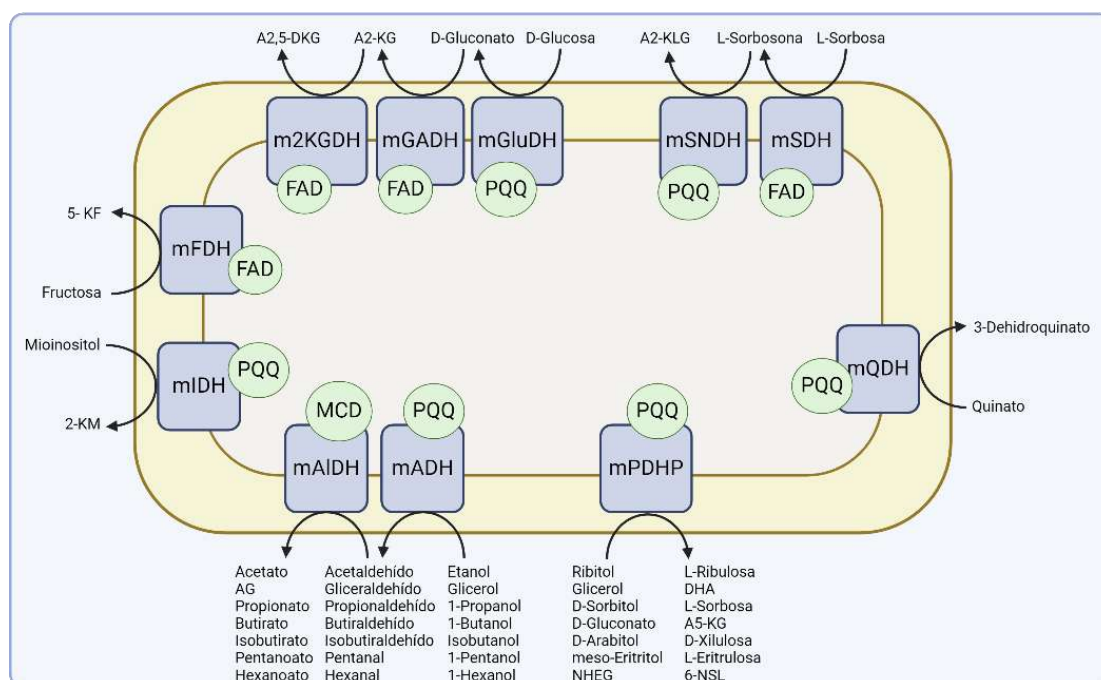
Oxidación de glicerol y derivados por células en reposo de cepas de *Gluconobacter*

CAPÍTULO 1: Oxidación de glicerol y derivados por células en reposo de cepas de *Gluconobacter*

1.1. Introducción

El metabolismo de *Gluconobacter* y el rol de las deshidrogenasas de membrana como ventaja para su uso como biocatalizador

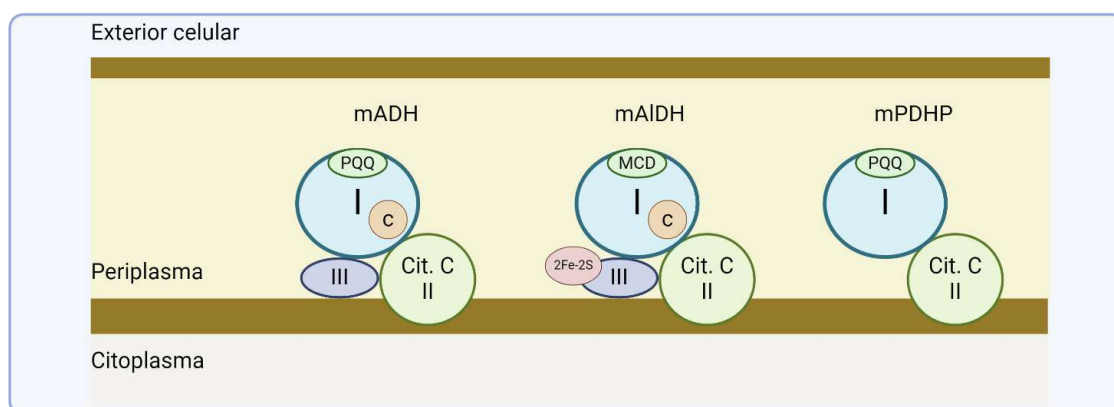
Las bacterias del género *Gluconobacter* poseen un metabolismo energético inusual, lo que les confiere características interesantes para su explotación como biocatalizadores. Dentro de este género bacteriano la mayoría de las especies presentan algunas rutas metabólicas centrales incompletas, tales como la glucólisis y el ciclo de Krebs, encargadas de la oxidación completa de carbohidratos hacia CO₂ y agua^{256,257}. Por otro lado, estas bacterias tienen la capacidad de llevar a cabo la oxidación incompleta de carbohidratos en su periplasma, con una consecuente producción de energía a través de lo que se conoce como “fermentación oxidativa”¹⁵⁹. Esta es llevada a cabo por una serie de deshidrogenasas de membrana (Esquema 7), mencionadas brevemente en la Introducción general de esta Tesis, que se encuentran ancladas en la membrana interna de estas bacterias⁷⁵.



Esquema 7. Deshidrogenasas de membrana presentes en bacterias del género *Gluconobacter*. mPDHP: Poliol deshidrogenasa principal. mADH: Alcohol deshidrogenasa. mAIDH: Aldehído deshidrogenasa. mIDH: Inositol deshidrogenasa. mFDH: Fructosa Deshidrogenasa. mQDH: Quinato deshidrogenasa. mSDH: L-Sorbose deshidrogenasa. mSNDH: L-Sorbose deshidrogenasa. mGluDH: Glucosa deshidrogenasa. mGADH: D-Gluconato deshidrogenasa. m2KGDH: 2-Keto-D-gluconato deshidrogenasa. PQQ: Pirroloquinolina quinona. FAD: Flavina adenina dinucleótido. MCD: Molibdopterina citosina dinucleótido. Adaptado a partir de Qin *et al.*⁷³ y He *et al.*⁷⁵.

La fermentación oxidativa está acoplada a la cadena respiratoria, ya que estas enzimas transfieren equivalentes de reducción a ubiquinonas, que se reducen a ubiquinol. El ubiquinol luego transfiere electrones al oxígeno molecular a través de las oxidasas terminales, también ubicadas en la membrana⁷³.

Con respecto a la estructura de estas enzimas, la mayoría está constituida por dos o tres subunidades diferentes, y requieren de distintos tipos de cofactores como el PQQ, el FAD y el MCD para llevar a cabo la oxidación de los sustratos⁷³. Como ejemplos relevantes de deshidrogenasas de membrana se encuentran la alcohol deshidrogenasa (mADH), la aldehído deshidrogenasa (mAIDH) y la poliol deshidrogenasa principal (mPDHP), también conocida como glicerol deshidrogenasa o sorbitol deshidrogenasa. Las tres enzimas se encuentran involucradas en la oxidación de glicerol hacia DHA y AG en las bacterias del género *Gluconobacter* (Esquema 8).



Esquema 8. Ejemplos de estructura de tres deshidrogenasas de membrana en *Gluconobacter*. mADH: Alcohol deshidrogenasa. mAIDH: Aldehído deshidrogenasa. mPDHP: Poliol deshidrogenasa principal. PQQ: Pirroloquinolina quinona. MCD: Molibdopterina citosina dinucleótido. I: Subunidad mayor. II: Subunidad mediana. III: Subunidad menor. c: Sitio de unión para grupos hemo c. 2Fe-2S: Sitio de unión para clusters 2Fe-2S. Adaptado a partir de He *et al.*⁷⁵ y Adachi *et al.*²⁵⁸.

La enzima mADH cataliza la oxidación de alcoholes para obtener aldehídos, y en ocasiones, sus ácidos correspondientes⁷⁵, aunque en el caso particular del gliceraldehído obtenido a partir de la oxidación de glicerol, es la enzima mAIDH la responsable de la formación de AG¹³⁷. En este género de bacterias, la mADH suele ser heterotrimérica, presentando una subunidad mayor que se encarga de catalizar la oxidación del sustrato, que contiene sitios de unión para el cofactor PQQ y para los grupos hemo C (subunidad I); y una subunidad mediana de tipo citocromo c, con tres uniones a grupos hemo c que se encarga de reducir la ubiquinona a ubiquinol (subunidad II)²⁵⁸. Adicionalmente, la enzima posee una tercera subunidad pequeña que parece intervenir en la unión de la estructura enzimática a la membrana y hacer las veces de chaperona molecular (subunidad III)¹³⁷. La estructura tridimensional de esta enzima en *G. oxydans* 621H ha sido elucidada recientemente por Adachi *et al.*²⁵⁸ y depositada en el repositorio del *Protein Data Bank* (PDB) (Figura 4a).

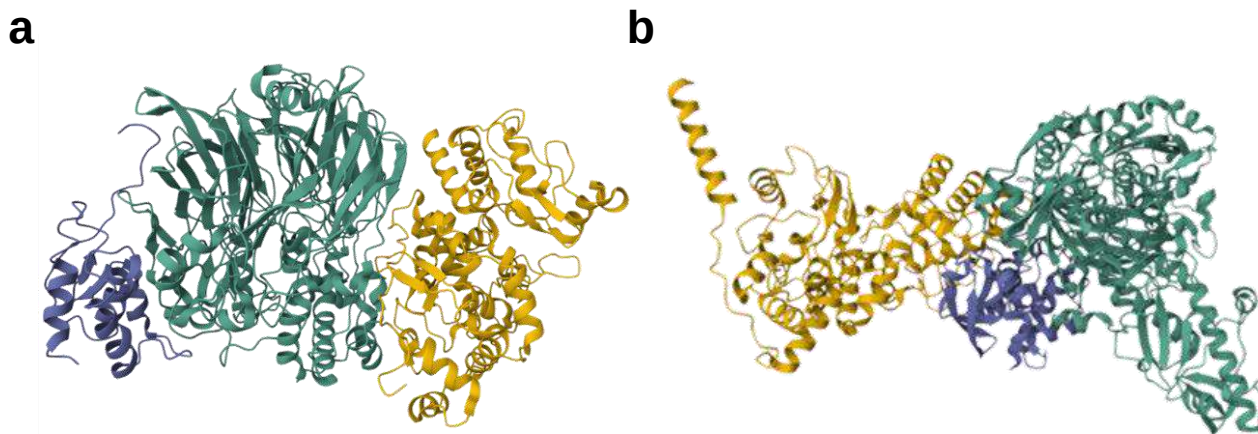


Figura 4. Estructuras tridimensionales de las enzimas mADH y mALDH de *G. oxydans* 621H. a) mADH (PDB:8GY2). Verde: subunidad I, deshidrogenasa. Amarillo: subunidad II, Citocromo C. Violeta: subunidad III. b) mALDH (PDB: 8GY3). Verde: subunidad I, deshidrogenasa. Amarillo: subunidad II, Citocromo C. Violeta: subunidad III. Estructuras depositadas por Adachi *et al.*²⁵⁸ en el repositorio PDB.

La enzima mALDH es la responsable de la oxidación de aldehídos para convertirlos en sus respectivos ácidos. Es generalmente un heterotrímero con una subunidad mayor con unión al cofactor MCD que corresponde al dominio deshidrogenasa (subunidad I), una subunidad mediana citocromo C con unión a tres grupos hemo c (subunidad II), y una subunidad pequeña con dos *clusters* [2Fe-2S] como grupos prostéticos^{75,258}. La estructura tridimensional de esta enzima en *G. oxydans* 621H también ha sido elucidada recientemente por Adachi *et al.*²⁵⁸ (Figura 4b).

Por otro lado, la enzima mPDHP, suele presentarse como un heterodímero en las especies de *Gluconobacter*. La misma es capaz de oxidar una gran variedad de sustratos a través de su subunidad mayor (subunidad I), responsable de la catálisis, empleando PQQ como cofactor. La subunidad pequeña por su parte parece actuar como chaperona molecular y estar asociada al anclaje de la estructura en la membrana (subunidad II)⁷⁵. Hasta el momento no hay disponibles en PDB estructuras tridimensionales de esta enzima para ninguna especie de *Gluconobacter*. Sin embargo, existen modelos predictivos de *AlphaFold*, como el reportado recientemente por Xu *et al.*²²¹ (Figura 5).



Figura 5. Estructura tridimensional de la enzima mPDHP de *G. oxydans* 621H obtenida por predicción utilizando el programa *AlphaFold*. Verde: subunidad I, deshidrogenasa. Amarillo: subunidad II. Imagen obtenida a partir de la estructura propuesta por de Xu *et al.*²²¹.

La estructura de estas enzimas, su localización en la membrana interna, y la orientación de su sitio activo posibilitan la oxidación de múltiples sustratos sin la necesidad de que ingresen al citoplasma. Adicionalmente, los numerosos productos obtenidos a partir de las reacciones de oxidación de estas enzimas deshidrogenasas son liberados al medio, eliminando la necesidad de romper las células para obtenerlos. Como consecuencia de este peculiar metabolismo, las bacterias del género *Gluconobacter* suelen presentar bajos rendimientos de biomasa, pero altas productividades de compuestos generados por las deshidrogenasas de membrana, dada su elevada actividad catalítica⁷³. En esta característica radica su atractivo como biocatalizadores de célula entera para su aplicación a nivel industrial.

La obtención de compuestos de relevancia industrial utilizando bacterias del género *Gluconobacter* presenta antecedentes de la utilización de células en crecimiento, así como también de células en reposo⁷². La capacidad de estas bacterias de liberar los productos oxidados al medio de reacción, y las ventajas del empleo de células en reposo en lo que respecta al uso de medios de reacción más limpios ha cristalizado en la publicación de numerosos ejemplos de aplicación de esta tecnología. En consecuencia, la siguiente sección de esta introducción será dedicada a un análisis del estado del arte de las biotransformaciones de diversos sustratos por células en reposo de especies de *Gluconobacter*.

Antecedentes de utilización de células en reposo de *Gluconobacter* como biocatalizadores

La gran variedad de compuestos que han podido ser obtenidos a través de biotransformaciones con bacterias del género *Gluconobacter* ya ha sido abordada a grandes rasgos en la Introducción general de esta Tesis. Sin embargo,

en esta sección se abordarán particularmente aquellos productos obtenidos a partir de biotransformaciones que emplean células en reposo como biocatalizadores, así como sus ventajas asociadas.

En los últimos 10 años, se han obtenido diversos productos a partir de reacciones catalizadas por células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* (Tabla 3). Estos productos son muy variados, existiendo ejemplos de la producción de ácidos con potencial en síntesis química¹¹⁶, además de los compuestos DHA¹³⁸ y L-eritrosulosa²²⁶ utilizados en cosmética, los endulzantes 5-KF⁹⁰ y xilitol²⁵⁹, y el precursor del fármaco antidiabético Miglitol, 6-NSL⁷⁹.

Tabla 3. Productos obtenidos utilizando células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* en los últimos años.

Producto	Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Productividad (g/L.h)	Conc. obtenida (g/L)	Medio de reacción	Condiciones de operación	Ref.
5-KF	<i>G. frateurii</i> CHM 43	4,16	50	Tampón acetato 100 mM, pH 5,0, suplementado con 50 g/L de D-manitol	Volumen 1 mL, 96 g/L de peso húmedo de células, Temperatura 25 °C, agitación 150 rpm	90
	<i>G. oxydans</i> fdh mutante de <i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR	SD	8,7	Tampón fosfato de potasio 40 mM, pH 6,0 suplementado con fructosa 9 g/L	Volumen 500 mL, 30 °C, agitación 200 rpm	88
6-NSL	<i>G. oxydans</i> /AB-PQQ-VHb (<i>G. oxydans</i> H-8 mutante)	5,5 $\pm$ 0,5	87,5 $\pm$ 5,9	90,0 g/L NHEG, 2,5 g/L MgSO ₄ , pH 5,0	Volumen 3 L en reactor de 5L. 4 g/L de peso seco de células, 15 °C, agitación 400 rpm y aireación 2 vvm	79
	<i>G. oxydans</i> H-8 (mutante de <i>G. oxydans</i> ZJB-605)	1,8	64,3 $\pm$ 2,2	70 g/L NHEG, 2,5 g/L MgSO ₄ , pH 5,0	Volumen 50 mL en matraces <i>baffleados</i> de 500 mL, 4 g/L de peso seco de células, 15 °C, agitación 180 rpm	97
	<i>G. oxydans</i> ZJB-605	0,89	48,9 $\pm$ 2,5	60 g/L NHEG y MgCl ₂ .6H ₂ O 20 mM, pH 5,0	Volumen 2 L en reactor de 5 L, 4 g/L de peso seco de células, 15 °C, agitación 400 rpm, aireación 2,0 vvm	95
	<i>G. oxydans</i> /pBB-sldAB, mutante de <i>G. oxydans</i> ZJB-605	1,6	184,28 g/L luego de 3 lotes con las mismas células	75 g/L NHEG, 20mM MgCl ₂ .6H ₂ O, pH 5,0	6,03 g/L de peso seco de células, 15°C, agitación 180 rpm	81
	<i>G. oxydans</i> ZJB16009 mutante de <i>G. oxydans</i> ZJB-605	1,5	53,6	Tampón 100 mM Tris– HCl (pH 5,0) y 60 g/L NHEG	4,02 g/L de peso seco de células, reactor de 5 L, 15 °C, agitación 400 rpm y aireación 2,0 vvm	94
A2-KG	<i>G. oxydans</i> _tufB_ga2dh mutante de <i>G. oxydans</i> DSM2003	10,07	453,3	480 g/L Ácido glucónico, pH 5,8*	60 g/L peso húmedo células, reactor de 7 L con volumen de 1,5 L. 30 °C, agitación 600 rpm y oxígeno 1 L/min	260

Tabla 3. Productos obtenidos utilizando células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* en los últimos años. (Continuación)

Producto	Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Productividad (g/L.h)	Conc. obtenida (g/L)	Medio de reacción	Condiciones de operación	Ref.
A3-HP	<i>G. oxydans</i> DSM 50049	2,4	11,4	10,0 g/L 1,3-PDO, pH 5,5*	Reactor de 3 L con volumen 1L, modo <i>batch</i> , 3,25 g/L de peso seco de células, 28 °C, pH 5,5, agitación 800 rpm y aireación 1 L/min	261
	<i>G. oxydans</i> NL71	1,73	83,2	5 g/L extracto de levadura, y 0,5 g/L MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L K ₂ HPO ₄ , y 5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,3-PDO**	Reactor de 3L, volumen 1L, concentración de bacterias equivalente a DO _{600 nm} = 2, presión de oxígeno mantenida en 0,03 - 0,05 MPa, 30 °C, 500 rpm	116
A4-HB	<i>G. oxydans</i> NL71	1,96	94,3	5 g/L extracto de levadura, y 0,5 g/L MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L K ₂ HPO ₄ , y 5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,4-butilenglicol**	Reactor de 3 L, volumen 1L, concentración de bacterias equivalente a DO _{600 nm} = 2, presión de oxígeno mantenida en 0,03 - 0,05 MPa, 30 °C, 500 rpm	116
A5-HV	<i>G. oxydans</i> NL71	2,1	102,3	5 g/L extracto de levadura, y 0,5 g/L MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L K ₂ HPO ₄ , y 5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 pulsos de 1,5-pentilenglicol	Reactor de 3L, volumen 1L, presión de oxígeno mantenida en 0,03 - 0,05 MPa, 30 °C, 500 rpm, pH mantenido en 5,5	116
A6-HC	<i>G. oxydans</i> NL71	1,01	48,8	5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L K ₂ HPO ₄ , y 5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7,0, 3 pulsos de aprox. 20 g/L de 1,6-hexilenglicol	Reactor de 3L, volumen 1L, concentración de bacterias equivalente a DO _{600 nm} = 10, presión de oxígeno mantenida en 0,03 - 0,05 MPa, 30 °C, 500 rpm, pH mantenido en 7,0	116
Ácido adípico	<i>G. oxydans</i> DSM50049	0,49	37	Tampón fosfato de sodio 100 mM, suplementado con 10 g/L de 1,6-hexanodiol, inicialmente pH 7,0, mantenido entre 5 y 5,5. 4 pulsos de 5 g/L de 1,6-hexanodiol cada uno	5,4 g/L de peso seco de células. Reactor de 3L con volumen 1L. 30 °C, 70% oxígeno disuelto, <i>fed-batch</i> .	121
Ácido celobiónico	<i>G. frateurii</i> NBRC3285	0,03 (valor aproximado)	0,9 (valor aproximado)	Tampón acetato 100 mM, pH 5,5 suplementado con 27,8 mM de celobiosa	27 °C, agitación	262
AG	<i>G. oxydans</i> ATCC 621	0,03 (valor aproximado)	0,52 (valor aproximado)	Tampón acetato 20 mM, 30 g/L glicerol, 500 mL	Reactor 1 L, volumen 500 mL, 0,5 g/L de células, 30 °C, agitación 560 rpm, aireación 0,5 L/min	212
	<i>G. frateurii</i> NBRC103465	0,24 ± 0,01	10,9 ± 0,1	glicerol 170 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,9 g/L, K ₂ HPO ₄ 0,1 g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g/L, pH 8,0	Matraz 250 mL, volumen 30 mL, 30 °C, agitación 180 rpm, 0,67 g/L de peso seco de células	138

Tabla 3. Productos obtenidos utilizando células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* en los últimos años. (Continuación)

Producto	Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Productividad (g/L.h)	Conc. obtenida (g/L)	Medio de reacción	Condiciones de operación	Ref.
Ácido galactárico	<i>G. oxydans</i> NL71	0,04	2,6	15 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L de K ₂ HPO ₄ , y 2 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ . 5 g/L de ácido galacturónico, tratado por electrodiálisis	Reactor de 3 L con volumen 1 L, 10 g/L de células, 30 °C, agitación 500 rpm, presión de oxígeno mantenida entre 0,03 y 0,05 MPa	133
Ácido glicólico	<i>G. oxydans</i> -adhABS mutante de <i>G. oxydans</i> DSM 2003	1,6	73,3	Tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 6,0, suplementado con 40 g/L de etilenglicol	Reactor 7 L, volumen 2 L, 20 g/L de peso húmedo de bacterias, 28 °C, agitación 600 rpm, pH controlado en 5,5	263
	<i>G. oxydans</i> NL71	1,6	75,3	5 g/L extracto de levadura, y 0,5 g/L MgSO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 2 g/L K ₂ HPO ₄ , y 5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , etilenglicol**	Reactor de 3L, volumen 1L, concentración de bacterias equivalente a DO _{600 nm} = 2, presión de oxígeno mantenida en 0,03 - 0,05 MPa, 30 °C, 500 rpm	116
AHMFC	<i>G. oxydans</i> DSM 50049	1,9	44,6	Tampón fosfato 100 mM, pH 7,0, 31,5 g/L de HMF con un pulso de 12 g/L de HMF a las 6 horas	Reactor de 0,5 L con volumen 250 mL, aireación 1 vvm, 30 °C, agitación 500 rpm	80
Ácido lactobiónico	<i>G. frateurii</i> NBRC3285	2,4	179 (valor aproximado)	30% lactosa y cantidad equimolar de CaCO ₃ , pH 7,3	0,45 U/mL de células en reposo, agitación 240 oscilaciones/min, 27 °C	262
DHA	<i>G. oxydans</i> ATCC 621	2,4	24,3	Tampón acetato 20 mM, pH 5,5 suplementado con 25 g/L de glicerol	Matraz de 250 mL, volumen 50 mL, 30°C, agitación 400 rpm	214
	<i>G. oxydans</i> MTCC 904	0,2	47,9	Tampón acetato 50 mM, pH 5,0, 20 g/L de glicerol crudo inicial y luego tres pulsos más de 20 g/L	5 g/L de bacterias, 30 °C, agitación 150 rpm	210
	<i>G. oxydans</i> ATCC 621	1,3	23,4	Tampón acetato 20 mM suplementado con 30 g/L glicerol	Reactor 1 L, volumen 500 mL, 0,5 g/L de células, 30 °C, agitación 560 rpm, aireación 0,5 L/min	212
	<i>G. oxydans</i> NBRC14819	1,9 ± 0,2	45,7 ± 4,4	glicerol 50 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,9 g/L, K ₂ HPO ₄ 0,1 g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g/L, pH 6,0	Matraz 250 mL, volumen 30 mL, 30 °C, agitación 180 rpm, 0,67 g/L de peso seco de células	138

Tabla 3. Productos obtenidos utilizando células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* en los últimos años. (Continuación)

Producto	Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Productividad (g/L.h)	Conc. obtenida (g/L)	Medio de reacción	Condiciones de operación	Ref.
DHA	<i>G. frateurii</i> NBRC103465	0,8 ± 0,1	19,6 ± 0,2	glicerol 25 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,9 g/L, K ₂ HPO ₄ 0,1 g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g/L, pH 8,0	Matraz 250 mL, volumen 30 mL, 30 °C, agitación 180 rpm, 0,67 g/L de peso seco de células	138
	<i>G. oxydans</i> NBRC14819	2,06	41,3	glicerol 50 g/L en agua	Matraz 250 mL, volumen 30 mL, 30 °C, agitación 180 rpm, 0,67 g/L de peso seco de células	138
L-Eritrulosa	<i>G. oxydans</i> 621HΔupp BP.8	10	242	1 g/L KH ₂ PO ₄ , 1,6g/L Na ₂ HPO ₄ , 1,4g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g/L CaCl ₂ ·2H ₂ O, pH 6,0, 242 g/L mesoeritritol	Volumen 0,7 L, 30 °C, aireación 2 vvm, oxígeno disuelto mantenido en 20% por la agitación (500-1200 rpm), 2,8 g/L de peso seco de células	226
Xilitol	<i>G. oxydans</i> CGMCC 1.49	0,72	28,8	D-xilulosa 30 g/L, 30 g/L D-glucosa, CaCO ₃ 20 g/L, 0,6 mM NADH y 2% etanol (v/v)	Matraz 1 L, volumen 200 mL, 100 g/L de <i>G. oxydans</i> y 100 g/L de <i>E. coli</i> BL21-xdh, 30 °C, agitación 200 rpm	259

*No se especifica si se utilizó un tampón o solamente una solución acuosa del sustrato. ** No especifica concentración inicial.

Existen una serie de ventajas en la aplicación de células en reposo de bacterias del género *Gluconobacter* como biocatalizadores. La combinación de esta promisorio estrategia biocatalítica con la capacidad de las especies de *Gluconobacter* de liberar los productos al medio facilita la obtención de medios de reacción más limpios, que requieren un menor procesamiento *downstream*. Entre los ejemplos presentes en la literatura se encuentran reportes de medios de reacción exclusivamente compuestos por sustratos y sales con efecto tamponante^{94,212}, o en algunos casos con el añadido de fuentes de nitrógeno o cofactores que puedan mejorar la actividad de las células^{116,259}. Inclusive, nuestro grupo de investigación demostró la capacidad de células en reposo de *G. oxydans* NBRC14819 de oxidar el glicerol utilizando simplemente una solución acuosa del sustrato como medio de reacción¹³⁸. Dado que a nivel industrial los costos relacionados al procesamiento *downstream* pueden llegar a representar hasta un 80% del costo total del proceso²⁶⁴, la utilización de células en reposo de *Gluconobacter* ayuda en el desarrollo de procesos productivos más económicos.

Otra ventaja subyacente de la utilización de células en reposo de *Gluconobacter* es la capacidad de obtener productos de interés a partir de sustratos tóxicos, como es el caso del NHEG en la producción de 6-NSL⁸¹. Mientras que la producción en crecimiento de este compuesto se ve significativamente afectada por el sustrato de la reacción, la producción con células en reposo se presenta como alternativa ya que la generación de biomasa para la reacción se puede dar en ausencia del sustrato en una etapa anterior. Asimismo, el estado metabólico de las

células en reposo permite obtener compuestos que, en condiciones de crecimiento, podrían ser asimilados por las propias células, lo que reduciría la productividad del proceso. Un ejemplo claro es la producción de L-eritrosa por células en reposo de una cepa mutante de *G. oxydans*, que, a diferencia de las mismas células en crecimiento, no consumen el producto de oxidación generado a partir del meso-eritritol²²⁶. Estos ejemplos evidencian la potencialidad de las células en reposo de llevar a cabo algunas reacciones de forma más eficiente que sus pares en crecimiento, facilitando la obtención de productos de relevancia industrial.

Con respecto a la escala de aplicación de estos procesos, cabe destacar que mientras que el potencial de muchas de estas biotransformaciones no ha sido aún evaluado en grandes volúmenes, existen numerosos reportes de su aplicación en reactores a escala de laboratorio^{116,212,226,260,261}. Los buenos resultados obtenidos a escala de laboratorio sugieren que este enfoque de biotransformación podría tener altas probabilidades de ser implementado en procesos productivos a nivel industrial. Sin embargo, se requiere más investigación para alcanzar una maduración tecnológica adecuada. Por ello, la comunidad científica sigue explorando alternativas para proponer nuevas o mejores biotransformaciones de células en reposo.

Las cepas de *Gluconobacter* más utilizadas como catalizadores en reposo suelen ser cepas salvajes y mutantes de la especie *G. oxydans* (Tabla 3), aunque también existen reportes de la utilización de cepas de la especie *G. frateurii*. Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación tiene experiencia en la utilización de las cepas *G. oxydans* NBRC 14819 (Gox) y *G. frateurii* NBRC103465 (Gfr) para la oxidación de glicerol a partir de sus células en reposo. En un trabajo anterior, demostramos la capacidad de células en reposo de producir los compuestos DHA y AG a partir de glicerol puro y crudo en medios limpios como un tampón fosfato o incluso agua¹³⁸. Sin embargo, el potencial de aplicabilidad de estas bacterias aún no se ha estudiado completamente. Para el caso de la cepa Gox, una buena productora de DHA a partir de glicerol, resulta pertinente el estudio de su capacidad de oxidación de compuestos derivados de este sustrato. La obtención de cetonas a partir de derivados de glicerol resulta de gran valor, ya que estos compuestos son sustratos para la obtención de aminas quirales altamente demandadas en la industrias farmacéutica y química²⁶⁵⁻²⁶⁷. Por otro lado, el valor de mercado del AG, un compuesto quiral con buenas perspectivas de aplicación²⁶⁸, resulta altamente elevado debido a que no existe un proceso industrial que permita su obtención de forma económica, limitando significativamente su estudio. Aun cuando la capacidad de células en reposo de Gfr de producir este compuesto quedó demostrada, la concentración de AG obtenido en las condiciones ensayadas ($10,9 \pm 0,1$ g/L) no superó la reportada por Habe *et al.* en crecimiento ($136,5$ g/L)²⁶⁹. Continuar con el estudio de un proceso de producción de este compuesto a partir de glicerol utilizando células en reposo de Gfr continúa siendo relevante, especialmente la búsqueda de condiciones de operación que permitan la obtención de concentraciones más elevadas de este compuesto.

En este capítulo de la Tesis se llevará a cabo un estudio de la capacidad de oxidación por parte de Gox de derivados de glicerol, con la finalidad de obtener cetonas que puedan ser utilizadas para la síntesis de aminas quirales. Asimismo, se buscará mejorar la productividad de AG con células en reposo de Gfr, con el

objetivo de desarrollar una metodología económica para la obtención de este compuesto. Los resultados a obtener serán fundamentales para utilizar de referencia en la posterior evaluación de preparados inmovilizados.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas *Gluconobacter oxydans* NBRC14819 (Gox) y *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 (Gfr) se obtuvieron del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) (Tokio, Japón). Las mismas fueron mantenidas en placas de medio de glucosa-agar (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) a 30 °C.

1.2.2. Reactivos generales

La glucosa, K_2HPO_4 y el glicerol fueron de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). La peptona fue de *PanReac AppliChem* (Barcelona, España). El extracto de levadura y el agar fueron de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el acetonitrilo fueron de *J.T. Baker* (Pensilvania, Estados Unidos). El KH_2PO_4 fue de *Macron Chemicals* (Pensilvania, EE. UU.). El H_2SO_4 y el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares de AG y DHA, el metil imidazol, el anhídrido acético, el diclorometano, el eicosano, el MgSO_4 anhidro y la polivinil pirrolidona (PVP) fueron de *Sigma-Aldrich* (Misuri, EE. UU.). Los derivados sintéticos de glicerol (Tabla 4) fueron proporcionados por el Dr. Fernando López-Gallego.

1.2.3. Preparación de inóculos bacterianos

Se realizaron precultivos de Gox y Gfr en 3 mL en medio de glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,5) a 30 °C y 180 rpm durante 16 h. Se inocularon cultivos de 250 mL con 6 mL de precultivo de Gox o Gfr y se incubaron a 30 °C y 200 rpm en matraces de 1 L que contenían medio de cultivo de glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0). Al alcanzar un valor de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 1, se centrifugó un volumen correspondiente a 20 mg de peso seco de células durante 15 minutos a 5000 rpm y 4 °C. Las curvas de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ vs peso seco se pueden observar en la Figura A1. El pellet bacteriano se lavó con agua destilada para eliminar los residuos del medio de crecimiento y finalmente se centrifugó a 5.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos nuevamente, desechando el sobrenadante. Los pellets bacterianos se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Para los ensayos realizados con 2 mg de células, los pellets fueron resuspendidos en 1 mL de agua destilada y se tomaron 100 μL de la suspensión para inocular las reacciones.

1.2.4. Conversión de glicerol y sus derivados por células en reposo

Las reacciones de conversión de glicerol y sus derivados (Tabla 4) por células en reposo de Gox fueron llevadas a cabo inicialmente en tubos de 5 mL con 1 mL de reacción. El medio de reacción fue agua suplementada con 250 mM de glicerol o sus derivados. El inóculo fue de 0,7 mg de peso seco de células. La reacción fue incubada a 30 °C

y 200 rpm por 24 h. Al finalizar la reacción se tomó una muestra y se procedió a su análisis por GC-FID. El estudio de la cinética de conversión de glicerol, etil gliceril éter (EGE) y 3-fluoroetil gliceril éter (3FGE) por células en reposo de Gox fueron llevadas a cabo en matraces de 25 mL con 3 mL de volumen de reacción. El medio de reacción fue agua suplementada con 250 mM de cada sustrato. El inóculo fue de 2 mg de peso seco de células. La reacción fue incubada a 30 °C y 200 rpm por 56 h. Se tomaron muestras periódicamente a lo largo de la reacción y se procedió a su análisis por GC-FID. Las muestras de tiempo final de cada reacción fueron además analizadas por GC-FID utilizando una columna quiral.

Las reacciones de conversión de glicerol por Gfr fueron llevadas a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL. El medio de reacción fue agua suplementada con glicerol (50-250 g/L). El inóculo fue de 20 mg de peso seco de células. La reacción fue incubada a 30 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras periódicamente a lo largo de la reacción que fueron posteriormente analizadas por HPLC.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo al menos por duplicado.

1.2.5. Preparación general de muestras para análisis por GC

Se colocaron 30 µL de la muestra en un tubo de 1,5 mL y se mezclaron con 30 µL de metil imidazol y 225 µL de anhídrido acético. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 300 µL de agua para detener la reacción, seguido de la adición de 300 µL de diclorometano con 2 mM de eicosano (patrón interno) para extraer los compuestos derivatizados. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex durante 30 s y se centrifugó a 15.000 g durante 1 min. La fase inferior (orgánica) se retiró y se colocó en otro tubo que contenía sulfato de magnesio para secar el solvente. A continuación, la fase orgánica se agitó vigorosamente en un vórtex y se centrifugó a 15.000 g durante 2 min, y la fase líquida se transfirió a un cono de vidrio de 150 µL insertado en un vial de vidrio para su posterior análisis por GC.

1.2.6. Análisis por GC-FID convencional

Las muestras preparadas como se ha descrito anteriormente se analizaron mediante GC empleando un sistema *Agilent 8890* de *Agilent* (California, EE. UU.) utilizando una columna de metilpolisiloxano (5%-fenil) (*Agilent, J&W HP-5 30 m × 0,32 mm × 25 µm*), helio como gas portador y equipado con un FID. Las temperaturas del inyector y del detector FID fueron de 280 y 300 °C, respectivamente. La separación de los compuestos se realizó mediante el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial 60 °C, mantenida 2 min, dos rampas, primero a 160 °C a una velocidad de 10 °C 1/min y finalmente a 240 °C a una velocidad de 20 °C 1/min. Los tiempos de retención de los derivados de glicerol y sus productos de oxidación fueron determinados de acuerdo a lo reportado por Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰. Se prepararon curvas de calibración de glicerol ($T_{Ret} = 10,2$ min), DHA ($T_{Ret} = 8,03$ min), EGE ($T_{Ret} = 8,9$ min), EHA ($T_{Ret} = 6,7$ min), 3FGE ($T_{Ret} = 8,2$ min) con concentraciones entre 0,78 y 550 mM, dependiendo de cada compuesto (Figura A2). La determinación del tiempo de retención del producto de oxidación 3FHA ($T_{Ret} = 5,9$

min) se basó en los resultados reportados por Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰. El patrón interno eicosano presentó un $T_{Ret} = 16,2$ min.

1.2.7. Análisis por GC-MS

La cuantificación se llevó a cabo en un sistema de cromatografía de gases *Agilent 7890* de *Agilent* (California, EE. UU.) usando una columna de (5%-fenil)-metilpolisiloxano (*Agilent, J&W HP-5 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm*) con 1 mL/min de flujo de columna constante, equipado con un detector cuadrupolo de triple eje. La temperatura de la entrada fue de 280°C, las temperaturas de la fuente de MS y del cuadrupolo de MS fueron de 250 y 180°C, respectivamente. La temperatura de la línea de transferencia al detector (MSD) fue de 300 °C. La separación de compuestos se realizó mediante dos rampas de temperatura secuenciales: la temperatura inicial (60 °C) se mantuvo durante 2 min y se aumentó progresivamente hasta 160 °C a razón de 10 °C/min. Luego, la temperatura de la columna se aumentó a 20 °C min⁻¹ durante 4 min hasta 240 °C y se mantuvo durante 4 min. Se analizó un estándar de EHA para poder comparar el patrón de masas con los productos de la reacción. Para el caso del producto de oxidación del 3FGE no se contaba con un estándar, por lo que se elucidó la estructura a partir del patrón de masas obtenido.

1.2.8. Análisis GC-FID quiral

La cromatografía quiral se realizó con un sistema *Agilent 8890* de *Agilent* (California, EE. UU.), utilizando una columna de β-ciclodextrina en poli SPB-35 (fase fenil 35%/65% dimetilsiloxano (columna capilar BETA DEX TM 120, 30 m × 25 mm × 0,25 μm). La separación de los compuestos se realizó mediante la siguiente rampa de temperatura: temperatura inicial 60 °C, dos rampas, primero a 150 °C a una velocidad de 2 °C min⁻¹, y finalmente a 200 °C a una velocidad de 20 °C min⁻¹. La determinación del tiempo de retención de los enantiómeros S-EGE ($T_{Ret} = 34,98$ min), R-EGE ($T_{Ret} = 35,12$ min) , S- 3FGE ($T_{Ret} = 32,04$ min) y R-3FGE ($T_{Ret} = 32,25$ min) se basó en los resultados reportados por Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰.

1.2.9. Preparación general de muestras para análisis por HPLC

Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, cada muestra se filtró con un filtro de 0,22 μm tratado con PVP al 2%. La muestra filtrada se colocó en un vial de vidrio para su posterior análisis por HPLC.

1.2.10. Análisis por HPLC convencional

La producción de AG y DHA, junto al consumo de glicerol se analizó utilizando un equipo de HPLC *Shimadzu Nexera X2* (Kioto, Japón), con un detector de arreglo de diodos (PDA) y un detector de índice de refracción (RID). La columna utilizada fue una *Rezex RHM-Monosaccharide H⁺ (8%)* (California, EE.UU.). La fase móvil fue ácido

sulfúrico 5 mM : Acetonitrilo (70:30). La detección se realizó a 70 °C con un flujo de 0,6 mL/min durante 19 minutos, midiendo a 210 nm para AG y 271 nm para DHA utilizando el detector PDA. Para el glicerol se utilizó el detector RID. Los tiempos de retención registrados fueron: AG ($T_{Ret} = 11,7$ min), DHA ($T_{Ret} = 13,4$ min) y glicerol ($T_{Ret} = 14,6$ min). Las muestras se inyectaron utilizando un volumen de 20 μ L. Se construyeron curvas de calibración para AG (0,13-16,6 g/L), DHA (0,5-50 g/L) y glicerol (0,50-50 g/L) (Figura A3). Las muestras se analizaron utilizando el programa *LabSolutions* de Shimadzu (Kioto, Japón).

1.2.11. Análisis por HPLC quiral

La separación de los enantiómeros a partir de muestras racémicas de DL-AG fue llevada a cabo con una columna *CHIRALPAK MA(+)* de *Daicel Corporation* (Osaka, Japón) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La fase móvil utilizada fue CuSO_4 2 mM, el flujo fue de 0,5 mL/min y la temperatura de la separación se mantuvo en 25 °C. El volumen fue 2 o 10 μ L dependiendo del ensayo y el tiempo de análisis fue de 10 min. Se prepararon curvas de calibración a partir de soluciones estándar de D-AG, L-AG y DL-AG, en un rango de concentraciones de entre 7,4 y 0,125 mM. Los tiempos de retención registrados para cada enantiómero fueron: L-AG ($T_{Ret} = 7,14$ min) y D-AG ($T_{Ret} = 7,46$ min).

Para el análisis del DL-AG obtenido por biotransformación de glicerol utilizando células en reposo de Gfr se realizó una cromatografía semi-preparativa previa, utilizando el mismo protocolo detallado anteriormente en la sección “1.2.10. Análisis por HPLC convencional”.

El cálculo del exceso enantiomérico (ee) fue llevado a cabo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ee\% = \frac{\text{Conc. enantiómero más abundante (mM)} - \text{Conc. enantiómero menos abundante (mM)}}{\text{Conc. enantiómero más abundante (mM)} + \text{Conc. enantiómero menos abundante (mM)}} \times 100$$

1.3. Resultados y discusión

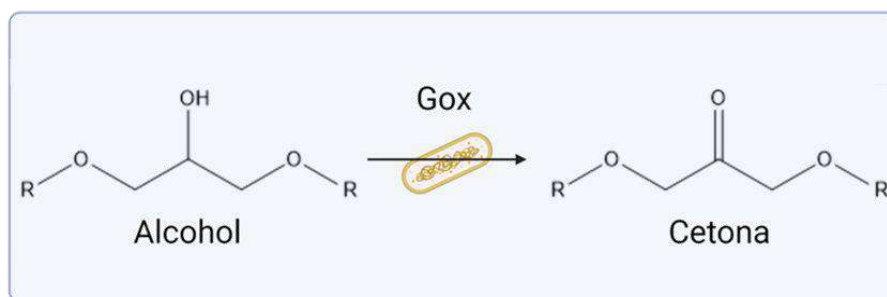
El alto potencial de oxidación de glicerol para la obtención de los compuestos AG y DHA por células en reposo de Gox y Gfr fue demostrado anteriormente por nuestro grupo de investigación¹³⁸. Cada una de estas cepas presenta particularidades que las hacen interesantes, como la capacidad de Gox de oxidar el glicerol únicamente a DHA sin producción de AG, y la característica de Gfr de ser una de las mejores cepas productoras de este último compuesto²⁶⁹.

A continuación se presentarán resultados de experimentos llevados a cabo por células en reposo de Gox y Gfr. En el caso de Gox, los esfuerzos se centraron en estudiar la potencialidad de esta cepa para oxidar compuestos derivados del glicerol, generando productos con grupos cetona que resultan precursores interesantes para la obtención de moléculas quirales aminadas. Por otro lado, en base a los prometedores resultados obtenidos previamente en la producción de AG por células en reposo de Gfr, se buscó continuar estableciendo parámetros operacionales para mejorar la producción de este compuesto.

Oxidación de derivados de glicerol por Gox

El glicerol es uno de los sustratos naturales de la enzima mPDHP, que, como se mencionó anteriormente, también es responsable de la oxidación de otros polioles, como el sorbitol. Desde una perspectiva biotecnológica, la promiscuidad natural de esta enzima resulta particularmente interesante, ya que podría permitir la generación de nuevos compuestos a partir de sustratos sintéticos. Además, la batería de deshidrogenasas de membrana presente en Gox amplía aún más el espectro de sustratos oxidables por esta bacteria, lo que incrementa el potencial de obtener compuestos novedosos. Con la finalidad de explorar estas posibilidades, en el marco de esta Tesis se llevó a cabo una estancia en el Laboratorio de Biocatálisis Heterogénea del CIC biomaGUNE (San Sebastián, España), liderado por el Dr. Fernando López-Gallego.

Partiendo de conocimientos previos adquiridos para la conversión de glicerol en DHA con la cepa Gox, se procedió a estudiar la capacidad de esta cepa para catalizar la oxidación de moléculas derivadas de glicerol, obtenidas por síntesis química. Estas moléculas poseen estructuras similares al glicerol, pero con modificaciones a nivel de los grupos OH posicionados en los carbonos primarios de la molécula (Esquema 9).



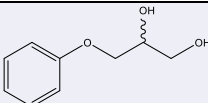
Esquema 9. Oxidación esperada para derivados de glicerol por Gox. R = H para el sustrato natural glicerol, junto a su producto DHA. Las estructuras detalladas de los sustratos ensayados se observan en la Tabla 4.

Se llevaron a cabo reacciones de conversión en agua, con el agregado de 250 mM de cada uno de los sustratos a ensayar, utilizando células en reposo de Gox. Los ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de agitación (200 rpm) y temperatura (30 °C) durante 24 horas. Al finalizar la reacción, se llevó a cabo un análisis cualitativo por GC-FID para detectar la aparición de productos oxidados a partir de los sustratos sintéticos. La identificación de nuevos picos, correspondientes a los productos oxidados, se basó en el trabajo previo de Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰, quienes reportaron la oxidación de los mismos sustratos utilizando catalizadores enzimáticos. En la Tabla 4 se observan las estructuras de los sustratos estudiados junto con la de los productos de oxidación que pudieron ser obtenidos a través de Gox en las condiciones ensayadas.

Tabla 4. Estudio la capacidad de Gox para oxidar sustratos sintéticos derivados de glicerol.

Sustrato		Producto	
Nombre	Estructura molecular	Nombre	Estructura molecular
Glicerol		Dihidroxiacetona (DHA)	
3-metoxipropano-1,2-diol		-	-
1,3-dimetoxipropano-2-ol		-	-
3-etoxipropano-1,2-diol (EGE)		1-etoxi-3-hidroxiopropan-2-ona (EHA)	
1,3-dimetoxipropano-2-ol		-	-
3-propoxipropano-1,2-diol		-	-
3-isopropoxipropan-1,2-diol		-	-
3-(2,2,2-trifluoroetoxipropano-1,2-diol) (3FGE)		1-hidroxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ona (3FHA)	
3-butoxipropano-1,2-diol		-	-

Tabla 4. Estudio la capacidad de Gox para oxidar sustratos sintéticos derivados de glicerol. (Continuación)

Sustrato		Producto	
Nombre	Estructura molecular	Nombre	Estructura molecular
3-fenoxipropano-1,2-diol		-	-

Los resultados obtenidos demostraron una preferencia de Gox a tomar únicamente los sustratos EGE y 3FGE. Con el fin de estudiar la cinética de conversión de EGE y 3FGE en sus respectivas cetonas (EHA y 3FHA), se llevaron a cabo reacciones de conversión de 250 mM de cada sustrato, tomando muestras a distintos tiempos (Figura 6). Como control también se llevó a cabo una reacción de conversión de glicerol a DHA, uno de los productos naturales de la bacteria.

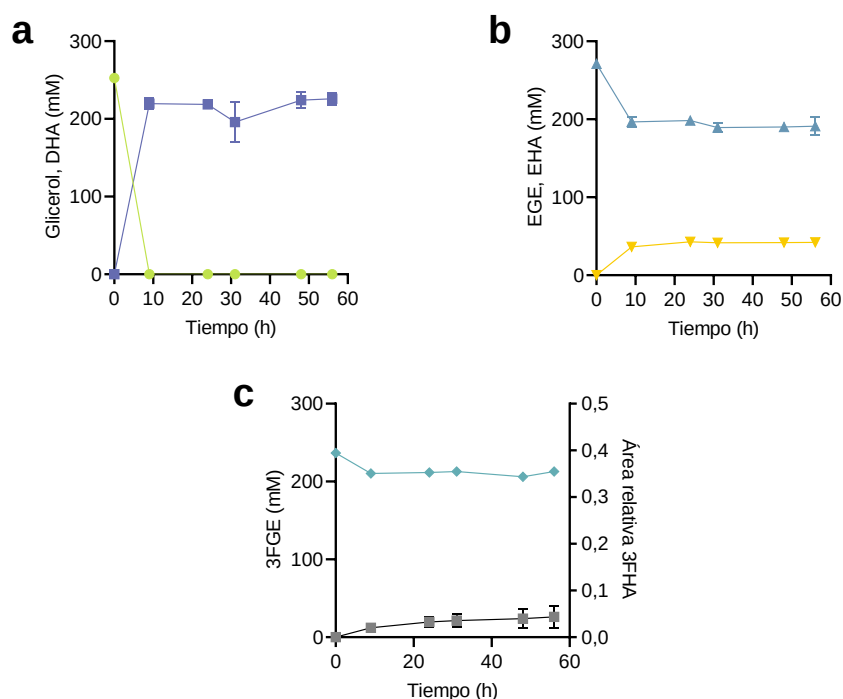


Figura 6. Biotransformación de glicerol y sus derivados por células en reposo de Gox. a) Biotransformación de glicerol a DHA. Glicerol (círculo verde). DHA (cuadrado violeta). b) Biotransformación de EGE a EHA. EGE (triángulo azul). EHA (triángulo invertido amarillo). c) Biotransformación de 3FGE a 3FHA. 3FGE (rombo azul claro). 3FHA (cuadrado gris). Dado que no se contaba con un estándar de 3FHA, se muestra la cinética de formación de producto en base a su área detectada por GC-FID.

En todos los casos, se observó que alrededor de las 9 horas de reacción se obtuvo la máxima producción de las cetonas, alcanzando rendimientos de conversión (%) distintos para cada sustrato. En el caso del sustrato natural de la enzima, el glicerol, la conversión fue cuantitativa. Al final de la reacción, no se logró detectar glicerol remanente por GC-FID (Figura A4a). La producción de DHA en este caso fue de $225,8 \pm 7,6$ mM, lo que se

corresponde a una conversión del 100%. Este resultado demuestra una vez más la gran capacidad de las células en reposo de Gox como productoras de este compuesto de interés industrial.

Para el caso del sustrato sintético EGE, la reacción también se detuvo cerca de las 9 horas de reacción, obteniendo al final de la reacción $42,1 \pm 0,9$ mM de EHA, correspondiéndose con una conversión del $15,6 \pm 0,5$ % (Figura 6b). Es importante señalar que, dado que la muestra correspondiente a las 9 h fue la primera en ser tomada, no se puede determinar con precisión en qué momento se detuvo la reacción. A las 56 horas de reacción puede observarse tanto el producto como el sustrato en la mezcla de reacción en el análisis llevado a cabo por GC-FID (Figura A4b). Para confirmar la identidad del producto obtenido, se realizó adicionalmente un análisis de la muestra del tiempo final de reacción por GC-MS y se comparó el patrón de masas obtenido con el de un estándar de EHA (Figura 7).

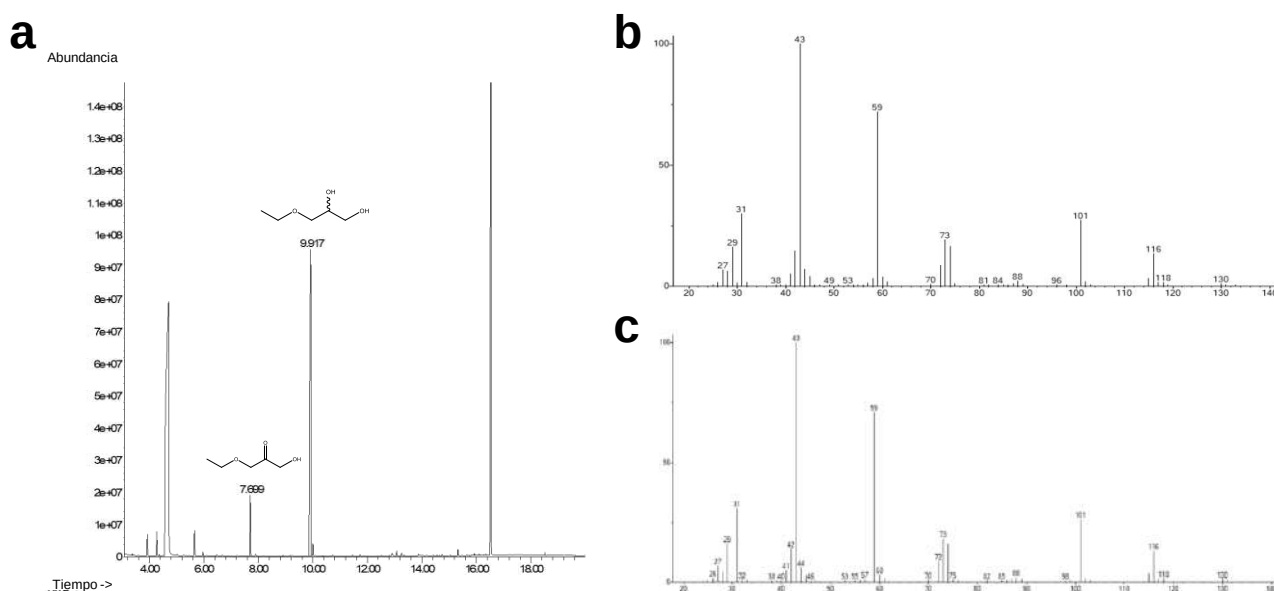


Figura 7. Análisis por GC-MS del tiempo final de la reacción (T= 56 h) de oxidación de EGE por células en reposo de Gox. a) Cromatograma obtenido para la muestra de reacción. b) Espectro de masas de un estándar de EHA. c) Espectro de masas del pico correspondiente al producto de la reacción.

La comparación de los espectros de masas del estándar de EHA y el del producto obtenido permitió demostrar que este último se corresponde con la cetona esperada. Tomando en consideración que el sustrato EGE es quiral, y que se ofreció una muestra racémica en la reacción, es posible que la bacteria tenga preferencia por uno de sus enantiómeros sobre el otro. Esta preferencia puede limitar la capacidad de conversión del biocatalizador, aunque puede resultar interesante para llevar a cabo procesos de desracemización. En estos procesos se puede obtener un enantiómero puro a partir de una mezcla racémica, a través de la conversión enantioselectiva de uno de ellos en otro compuesto, facilitando su posterior separación²⁷⁰. Para determinar si Gox presenta una preferencia de sustrato sobre el compuesto en estudio, se llevó a cabo un análisis cualitativo del consumo de los enantiómeros

R y S del EGE durante la reacción. En la Figura 8 se pueden observar los cromatogramas correspondientes al inicio de la reacción (T=0 h) y al final de la reacción (T=56 h).

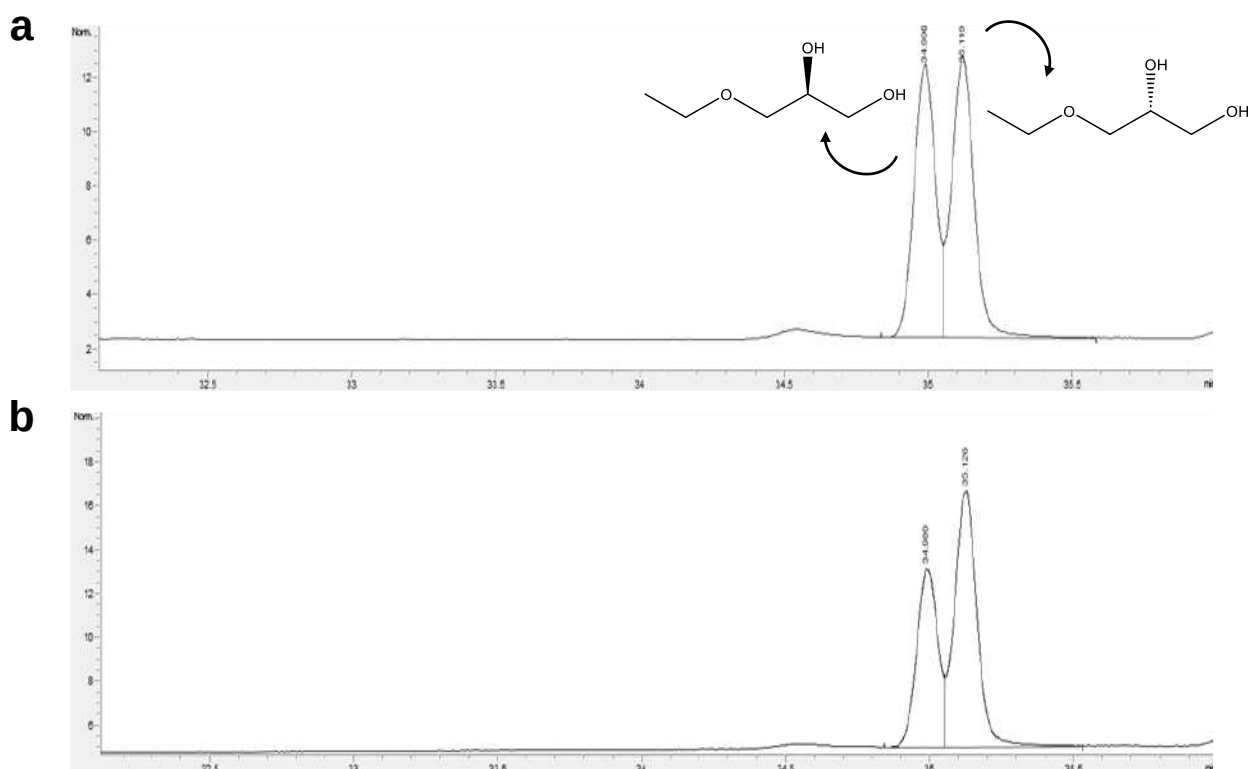


Figura 8. Estudio de preferencia de sustrato de Gox hacia los enantiómeros S ($T_{\text{Ret}} = 34,98$ min) y R ($T_{\text{Ret}} = 35,12$ min) del sustrato EGE. a) Tiempo inicial de la reacción (T= 0 h). b) Tiempo final de la reacción (T= 56 h). Los tiempos de retención de cada enantiómero fueron determinados de acuerdo a lo reportado por Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰.

El análisis de los cromatogramas muestra un cambio en la composición enantiomérica observado, concordante con una preferencia marcada de la bacteria por el enantiómero S del sustrato EGE. En el entendido que solo uno de los enantiómeros del EGE es sustrato para la misma, se podría ajustar el porcentaje de conversión obtenido, considerando que en la mezcla racémica presentada en la reacción solo contaba con 125 mM del S-EGE. Esto duplica el porcentaje de conversión obtenido, que alcanza el $31,2 \pm 0,9\%$.

Por su parte, la oxidación del sustrato 3FGE fue la que presentó rendimientos más bajos (Figura 6c). Dado que no se contaba con un estándar de la cetona 3FHA, no se pudo cuantificar la concentración de producto obtenida. Sin embargo, se estudió el aumento del área relativa observada por GC-FID para poder elucidar la cinética de aparición de este producto. Al igual que con el sustrato EGE, la reacción muestra una marcada desaceleración que ocurre luego de las 9 horas de reacción. Nuevamente, cabe destacar que al ser esta la primer toma de muestra, no es posible determinar en qué momento se detuvo la reacción de manera exacta. En base al consumo de sustrato observado se puede llevar a cabo una estimación de la concentración de 3FHA obtenida luego de 56 h de $23,8 \pm$

0,5 mM. Este valor se correspondería a una conversión del $10,1 \pm 0,2\%$. El análisis por GC-FID de una muestra tomada al final de la reacción muestra un gran remanente de sustrato, que se condice con la baja conversión alcanzada (Figura A4c). Para confirmar la identidad del producto obtenido se analizó esta muestra por GC-MS (Figura 9).

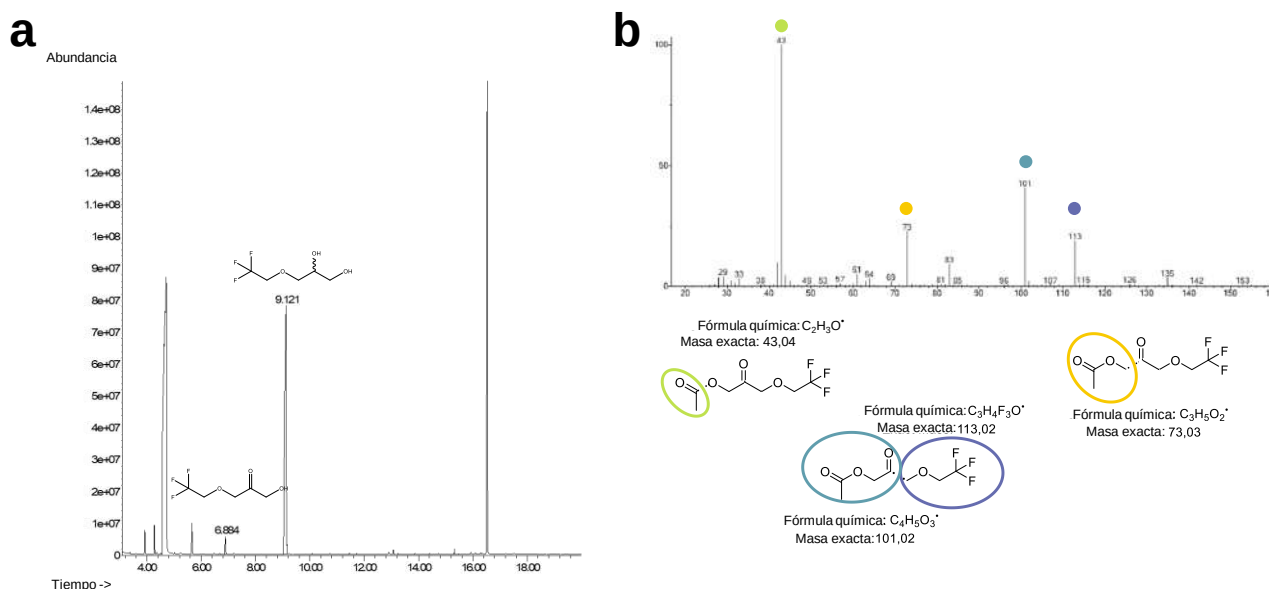


Figura 9. Análisis por GC-MS del tiempo final de la reacción (T= 56 h) de oxidación de 3FGE por células en reposo de Gox. a) Cromatograma obtenido para la muestra de reacción. b) Espectro de masas del pico correspondiente al producto de la reacción. c) Estructuras asociadas a los fragmentos mayoritarios encontrados.

Considerando que para el caso del producto 3FHA no se contaba con un estándar se debió llevar a cabo un análisis del espectro de masas obtenido para el compuesto. Para esto se buscó asociar las señales mayoritarias con las masas esperadas del fraccionamiento de la molécula de 3FHA acetilada. La adición del grupo acetilo se debe a la derivatización realizada para su análisis por GC. Como se observa en la Figura 9b, existen 4 picos mayoritarios asociados a masas moleculares de 43, 73, 101 y 113. Los mismos pudieron ser adjudicados exitosamente a distintos fragmentos pertenecientes a la molécula de 3FHA, confirmando la identidad del producto obtenido. Adicionalmente, dado que el sustrato 3FGE también presenta quiralidad, se estudió de forma cualitativa la preferencia de sustrato de la bacteria, respecto de sus enantiómeros (Figura 10).

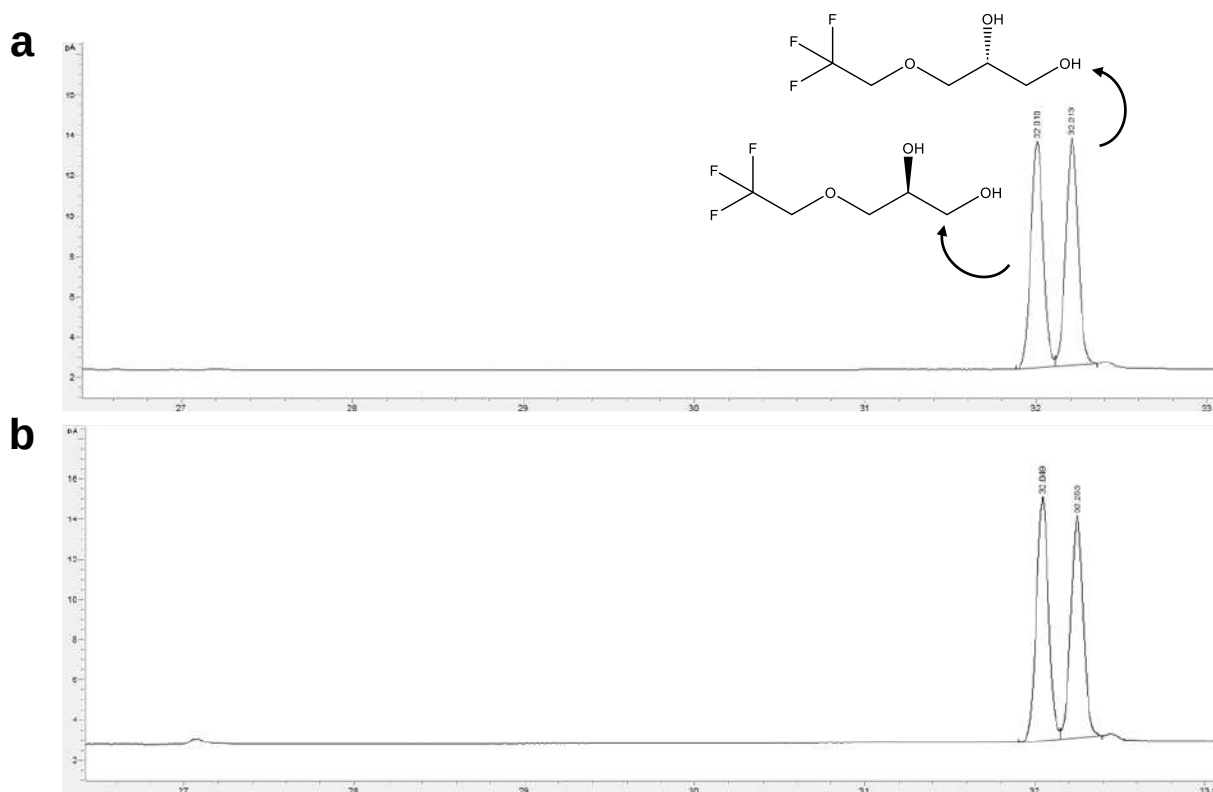


Figura 10. Estudio de preferencia de sustrato de Gox hacia los enantiómeros S ($T_{\text{Ret}} = 32,04$ min) y R ($T_{\text{Ret}} = 32,25$ min) del sustrato 3FGE. a) Tiempo inicial de la reacción ($T = 0$ h). b) Tiempo final de la reacción ($T = 56$ h). Los tiempos de retención de cada enantiómero fueron determinados de acuerdo a lo reportado por Grajales-Hernández *et al.*²⁷⁰.

A las 56 horas de reacción se puede observar un cambio en la composición enantiomérica observado en la mezcla de reacción, debido al consumo del enantiómero R por la bacteria. Nuevamente, en el entendido de que solo el enantiómero R fuera sustrato para la bacteria, el porcentaje de conversión pasaría a ser del $20,2 \pm 0,4\%$.

Del análisis de la conversión de todos los sustratos ensayados, se puede observar que en las condiciones del experimento las células en reposo parecen solamente mostrar la máxima actividad en las primeras 9 horas, aunque debido al protocolo de toma de muestras no se puede determinar el tiempo exacto en el que la conversión se detiene. Esto ocurre independientemente del sustrato al que sean sometidas y para concentraciones similares de sustrato se alcanzan rendimientos diferentes. Una posible explicación para este efecto podría estar relacionada con el desgaste estructural del biocatalizador o a efectos de toxicidad de los productos y sustratos, lo cual podría evidenciarse mediante ensayos de reutilización de las células. La reusabilidad limitada de las células de Gox fue observada previamente por nuestro grupo de investigación en la conversión de glicerol de crudo de *splitting*¹³⁸. Resultaría de interés llevar a cabo experimentos incorporando células frescas al medio de reacción luego de las 9 horas, para evaluar si la limitante para alcanzar conversiones más altas es el desgaste del biocatalizador. En tal caso, las biotransformaciones de EGE y 3FGE podrían verse beneficiadas por el uso de estrategias de estabilización del mismo, como puede ser la inmovilización.

Los resultados obtenidos durante esta etapa no permiten identificar con precisión cuál es la enzima responsable de la oxidación de los sustratos EGE y 3FGE. Sin embargo, se pueden hacer algunas observaciones. Dada su similitud estructural con el glicerol, es probable que, si son sustratos, los compuestos EGE y 3FGE sean oxidados por la enzima mPDHP. Bajo esta suposición, y al observar las conversiones diferenciales para cada sustrato, se podría inferir que el aumento en el tamaño del grupo éter con respecto al grupo OH del glicerol dificulta la catálisis. En la molécula de EGE, el grupo éter contiene un grupo etilo, que presenta un mayor volumen. Por otro lado, los bajos rendimientos obtenidos para la conversión de 3FGE podrían indicar que la presencia de los tres átomos de flúor en el grupo éter de la molécula impacta negativamente en la reacción. Esto puede deberse no solamente a su tamaño más voluminoso, sino también al carácter parcialmente iónico de los enlaces C-F, resultado de la alta electronegatividad del flúor. Esta polaridad en el enlace podría interferir con la correcta ubicación del sustrato en el sitio activo de la enzima, afectando así su capacidad de oxidación.

Sin embargo, interesantemente, la preferencia de enantiómeros observada por parte de la bacteria fue diferencial para los dos sustratos. Mientras que para el sustrato EGE el enantiómero preferido fue el S, en el caso del 3FGE el enantiómero preferido fue el R. Este resultado podría ser un indicio de que la oxidación de estas moléculas no estaría siendo llevada a cabo por la misma enzima. Dada la gran diversidad de deshidrogenasas presentes en la membrana de Gox, esta posibilidad es altamente plausible.

Para determinar si la enzima responsable de la oxidación de EGE y 3FGE es la mPDHP, o si uno o ambos compuestos están siendo oxidados por otras deshidrogenasas de membrana, se podrían realizar ensayos de *docking* o dinámica molecular. Estos estudios pueden utilizar modelos estructurales disponibles de estas enzimas, como los proporcionados por los repositorios PDB y *AlphaFold*. Estos estudios permitirían analizar las interacciones entre los sustratos y los aminoácidos de los sitios activos de las diversas enzimas potenciales, permitiendo determinar si la mPDHP, u otra deshidrogenasa, es responsable de la oxidación de EGE y 3FGE. Asimismo, estos estudios no solo servirían para confirmar la hipótesis planteada, sino también para identificar otros sustratos potenciales de estas enzimas y analizar la posible limitación de algunas de ellas en la conversión de los compuestos examinados.

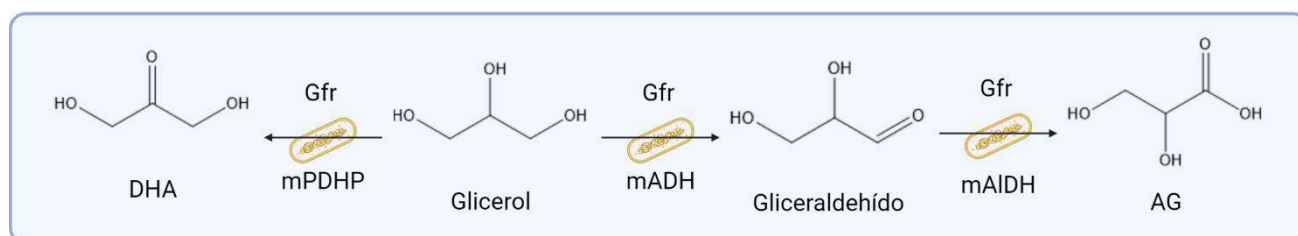
A modo complementario, sería útil realizar ensayos de inactivación génica (KO) de los genes que codifican para las posibles deshidrogenasas implicadas. La ausencia de productos oxidados en los ensayos con mutantes KO proporcionaría evidencia sólida sobre el rol de estas enzimas en la oxidación de EGE y 3FGE.

La producción de EHA y 3FHA por células en reposo de *Gluconobacter* no había sido reportada hasta el momento, por lo que los resultados obtenidos suman a la gran variedad de productos que pueden ser obtenidos por biocatálisis utilizando estas bacterias. Como se mencionó anteriormente, este tipo de cetonas resulta de especial interés debido a su potencial como bloque de construcción para la obtención de moléculas con aminas quirales,

altamente demandadas en la industria farmacéutica. La producción de moléculas de este tipo a partir de los compuestos anteriormente mencionados será abordada en el Capítulo 4 de esta Tesis.

Oxidación de glicerol a AG por células en reposo de Gfr

El alto valor comercial del AG y su potencialidad como bloque de síntesis química lo hacen un compuesto atractivo para su obtención a partir de glicerol²⁶⁸. Como se mencionó anteriormente, la falta de procesos industriales para la producción de este compuesto en grandes cantidades resulta un cuello de botella para la investigación de sus potenciales aplicaciones. En este sentido, el estudio de la producción de AG con células en reposo de Gfr merece especial atención, ya que constituye una alternativa interesante para alcanzar un procedimiento escalable con altas productividades. Como se mencionó anteriormente, esta bacteria está descrita como una de las mejores productoras de AG a partir de glicerol, obteniendo además DHA como co-producto²⁶⁹ (Esquema 10).



Esquema 10. Oxidación de glicerol por Gfr. mPDHP: Poliol deshidrogenasa principal. mADH: Alcohol deshidrogenasa. mAIDH: Aldehído deshidrogenasa.

Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación no solamente confirmaron la posibilidad de aplicar esta cepa como biocatalizador en la producción de AG con células en reposo, sino que permitieron identificar ciertos parámetros de interés para incrementar los rendimientos productivos¹³⁸. Sin embargo, aún queda espacio para mejorar la aplicación de esta tecnología. Con este fin, durante este trabajo de Tesis se profundizó en el desarrollo de la conversión de AG con células en reposo de Gfr. Parámetros obtenidos en estos experimentos anteriores, como la fase de crecimiento para colectar las células en reposo (mitad de fase exponencial) y la concentración de células a utilizar a en las conversiones (670 mg/L), fueron tomados como base para los experimentos que se presentan a continuación.

Con respecto a la concentración inicial de glicerol a utilizar, el estudio previo abarcó un rango de concentraciones desde 25 g/L hasta 170 g/L, donde se midió la producción a tiempo final de los productos de oxidación del glicerol luego de 45 h¹³⁸. Se observó que, a mayores concentraciones de glicerol, la producción de AG aumenta mientras que la de DHA disminuye. La mayor concentración de AG ($10,9 \pm 0,1$ g/L) se obtuvo con la concentración 170 g/L, acompañada de una producción de DHA de $7,2 \pm 0,1$ g/L. Estos resultados fueron obtenidos con células en reposo utilizando como medio un tampón fosfato de potasio con el agregado de una sal de magnesio (KH_2PO_4 0,9 g/L,

K_2HPO_4 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, pH 8,0), y aun cuando se utilizaron como base, en este trabajo se plantea la simplificación del medio de reacción utilizando solamente agua.

Se planteó aumentar aún más la concentración de glicerol de partida, con la finalidad de comprobar si de esta forma se puede obtener una mayor concentración de AG. A su vez se buscó estudiar la cinética de conversión de los compuestos para identificar, por ejemplo, posibles efectos de inhibición por sustrato o producto, a la vez de identificar las máximas conversiones que pueden ser alcanzadas en las distintas condiciones.

Se llevaron a cabo conversiones con concentraciones de glicerol de 50 g/L hasta 250 g/L. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 200 rpm a lo largo de 72 h (Figura 11).

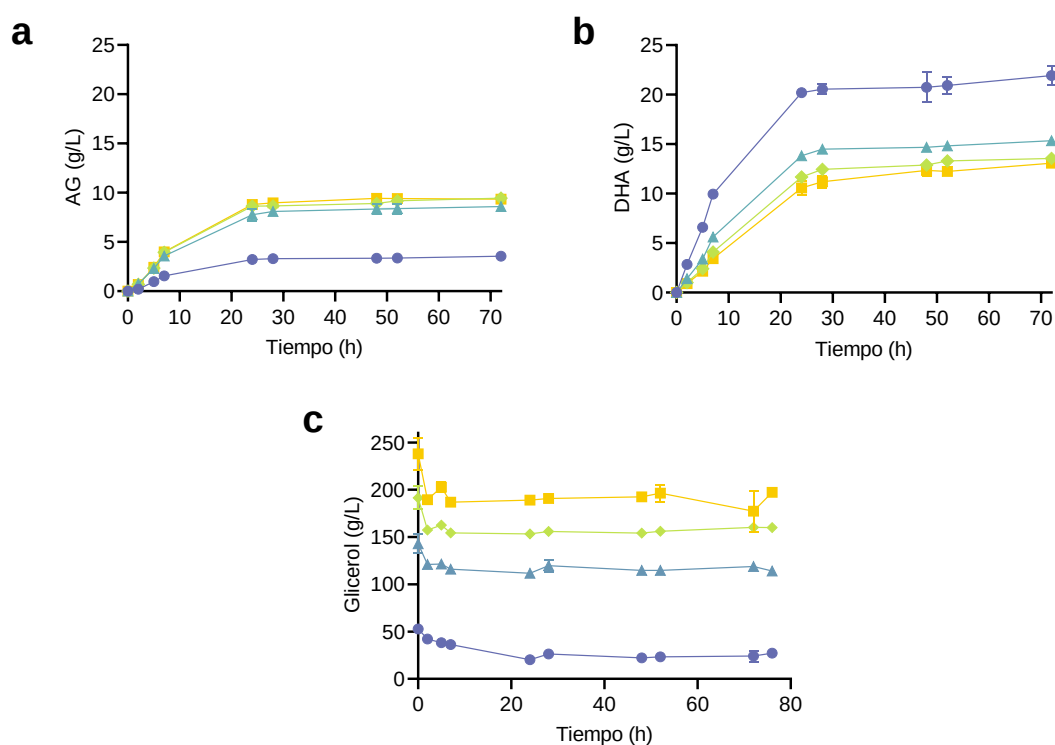


Figura 11. Cinética de producción de AG (a) y DHA (b), y consumo de glicerol (c) por células en reposo libres de Gfr a partir de glicerol puro. Glicerol: 50 g/L (círculo violeta), 150 g/L (triángulo azul), 200 g/L (rombo verde), 250 g/L (cuadrado amarillo).

Los resultados obtenidos muestran que independientemente de la concentración de glicerol, las células en suspensión de Gfr alcanzan la máxima conversión a los productos de interés en las primeras 24 h de reacción. Luego de este tiempo la concentración de DHA y AG se mantiene constante en todos los casos, lo que también ocurre para el caso del sustrato. Se comprobó que, a concentraciones elevadas de glicerol, 200 g/L y 250 g/L, se obtienen las mayores concentraciones de AG ($9,3 \pm 0,1$ g/L y $9,7 \pm 0,1$ g/L, respectivamente).

A su vez, en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente por el grupo, se observa que, a mayor concentración de glicerol inicial, menor es la producción de DHA. Mientras que con 50 g/L de glicerol puro se obtuvieron $21,9 \pm 0,9$ g/L de este compuesto, a 250 g/L de glicerol disminuye la producción de DHA en un 40%, alcanzando un valor de $13,1 \pm 0,5$ g/L en 72 h. Es probable que estos resultados se deban a la inhibición por sustrato sufrida por la enzima mPDHP, fenómeno ampliamente descrito en la literatura²¹⁰. Comparativamente, la enzima mADH, responsable de la conversión de glicerol en gliceraldehído (primer paso hacia la formación de AG), y la enzima mALDH no parecen verse notoriamente afectadas por las concentraciones de glicerol inicial ensayadas. Estos resultados coinciden con los reportados por Habe *et al.*, en los que observan una mayor producción de AG frente a DHA utilizando concentraciones de glicerol de entre 150 y 250 g/L de glicerol, utilizando células en crecimiento de la misma cepa de Gfr utilizada en este estudio²⁶⁹.

Considerando que la producción de AG y DHA fue igual para las concentraciones de glicerol inicial 200 g/L y 250 g/L, se seleccionó la primera para realizar los experimentos siguientes. En estas condiciones, la producción de AG con Gfr fue similar al reporte anterior del grupo utilizando la misma cepa en reposo, pero utilizando un tampón fosfato de potasio como medio de reacción en lugar de agua. Adicionalmente, nuestros resultados superan la producción de AG reportada por De la Morena *et al.* para la producción de AG con células en reposo de *G. oxydans* ATCC 621 a partir de glicerol, donde se obtuvo un aproximado de 0,52 g/L de AG a partir de 30 g/L de sustrato²¹². El reporte antes mencionado es el único trabajo en el cual se reporta la producción de AG por células en reposo de una especie de *Gluconobacter*, aparte del llevado a cabo por nuestro grupo de investigación¹³⁸.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis constituyen el reporte de conversión de glicerol a AG con la concentración más alta alcanzada hasta el momento utilizando células en reposo de esta especie bacteriana utilizando agua como medio de reacción. Sin embargo, en comparación con los 136,5 g/L de AG reportados por Habe *et al.* utilizando células en crecimiento de esta misma cepa, todavía existe espacio para la mejora en la producción de este compuesto²⁶⁹. De todas formas, es importante destacar que los experimentos del trabajo anterior fueron llevados a cabo en un reactor, con agitación y aireación, en comparación con los aquí reportados, que han sido llevados a cabo a escala de matraces sin aireación agregada más que la obtenida por agitación. En este entendido, es posible que las productividades puedan ser mejoradas al llevar a cabo la reacción en un reactor de tanque agitado, o inclusive en reactores de tipo *airlift*, SOS-BR o de columna de burbujas, como los mencionados en la Introducción general de este trabajo. Por otro lado, es relevante mencionar que mientras la producción en crecimiento de AG permite la obtención de altas concentraciones de producto, el mismo se obtiene con baja pureza, contaminado con los componentes del medio de crecimiento y otros metabolitos producidos durante este proceso. Contrariamente, la estrategia aquí desarrollada permite la producción de AG en agua, lo que facilita ampliamente el proceso de purificación del compuesto y reduce los costos asociados a esta tarea.

Tal como se señaló anteriormente, la naturaleza quiral del AG es una de las propiedades más interesantes de este compuesto, dada la importancia de esta característica en la síntesis de moléculas más complejas con

aplicaciones en la industria farmacéutica. En el reporte de Habe *et al.* antes mencionado, la producción de este compuesto por células en crecimiento de la misma cepa bacteriana utilizada en este trabajo presentó un ee hacia el D-AG del 72%²⁶⁹. Sin embargo, dado que las condiciones de producción del compuesto son diferentes, la estructura de la enzima responsable podría verse afectada y se podría ver una diferencia en la enantioselectividad del producto obtenido. Por este motivo, es importante estudiar la composición enantiomérica del AG producido con las células en reposo de Gfr. Para ello, se llevó a cabo un análisis por HPLC utilizando una columna quiral *CHIRALPAK (MA+)*.

Se comenzó utilizando el protocolo de separación recomendado por el fabricante para evaluar la capacidad de este método de separar los enantiómeros D-AG y L-AG, partiendo de una muestra racémica comercial de DL-AG 10 mM. Se ensayaron dos volúmenes distintos de inyección (2 y 10 μ L), para determinar el efecto de la concentración de los compuestos en la separación, y a la vez establecer el volumen a utilizar en los ensayos siguientes. Mientras que al inyectar 10 μ L de la solución DL-AG 10 mM no se logró observar dos picos, al disminuir el volumen inyectado a 2 μ L se pudo observar señales que pueden asociarse a la presencia de los dos enantiómeros (Figura 12).

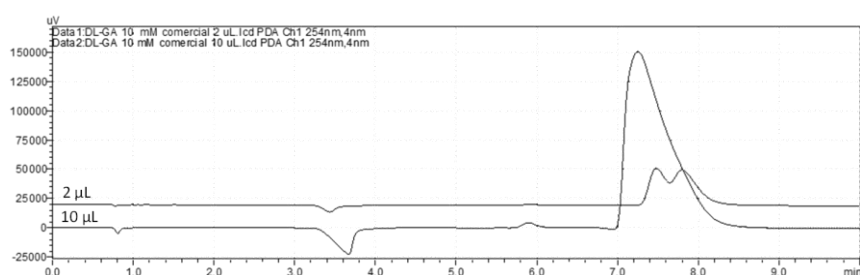


Figura 12. Evaluación de distintos volúmenes de inyección (2 y 10 μ L) para la separación por HPLC de los enantiómeros D-AG y L-AG a partir de una mezcla racémica de DL-AG.

Estos resultados indican que a concentraciones más bajas de DL-AG, la separación es mejor. Sin embargo, cabe destacar que igualmente la resolución entre los dos picos obtenidos fue baja, y los intentos de mejorarla mediante ajustes en la composición de la fase móvil y el flujo de separación no dieron resultados satisfactorios. En el estudio previamente mencionado de Habe *et al.*, se empleó un protocolo basado en el uso de dos columnas en tándem del tipo *CHIRALPAK (MA+)* para la separación de los enantiómeros²⁶⁹. Esta estrategia es comúnmente utilizada para mejorar la resolución quiral, ya que la alta similitud estructural entre los enantiómeros dificulta su separación²⁷¹. Con esta estrategia, los autores lograron separar el D-AG y el L-AG satisfactoriamente. Sin embargo, dado que solo se contaba con una sola columna de este tipo en nuestro laboratorio, se debió continuar los análisis con el mismo protocolo, procurando inyectar volúmenes pequeños que permitiesen una mejor separación.

Con la finalidad de determinar qué señal correspondía a cada uno de los picos obtenidos, se llevó a cabo el análisis de muestras generadas a partir del enriquecimiento de la muestra racémica comercial con soluciones puras de D-

AG y L-AG (Figura 13). De acuerdo con los cromatogramas obtenidos al enriquecer la muestra racémica con las soluciones enantioméricamente puras, la primera señal observada corresponde al L-AG (7,14 min), mientras que la segunda corresponde al D-AG (7,46 min).

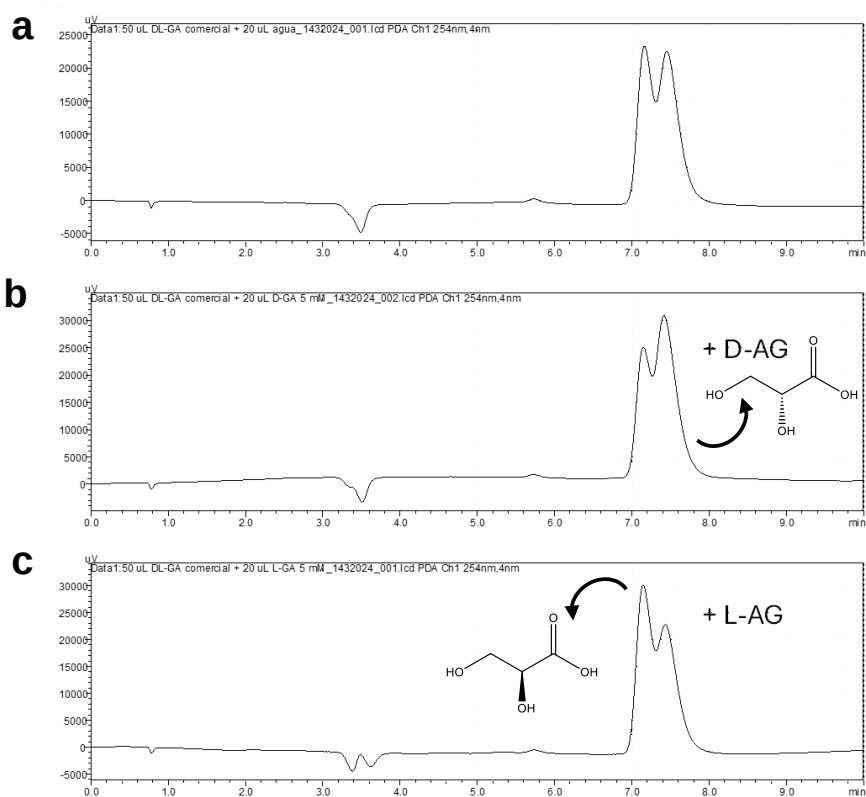


Figura 13. Identificación de la señal de cada enantiómero en una mezcla racémica de DL-AG. a) Mezcla racémica de DL-AG. b) Mezcla racémica de DL-AG + D-AG. c) Mezcla racémica de DL-AG + L-AG. L-AG ($T_{Ret} = 7,14$ min). D-AG ($T_{Ret} = 7,46$ min).

Habiendo identificado las señales de ambos enantiómeros se procedió a construir curvas de calibración para los distintos enantiómeros, tanto a partir de soluciones enantioméricamente puras como de la mezcla racémica comercial. Mientras que la curva de calibración obtenida para las soluciones enantioméricamente puras de L-AG y D-AG fueron iguales a la obtenida para el L-AG en la muestra racémica, la obtenida para el D-AG en la mezcla racémica fue distinta (Figura 14).

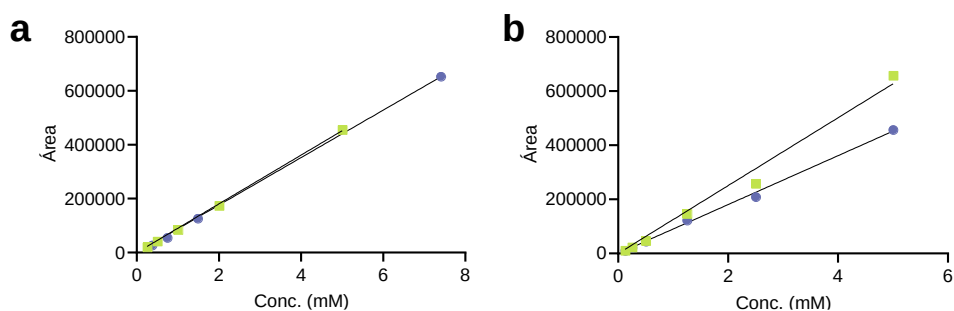


Figura 14. Curvas de calibración obtenidas para D-AG (violeta) ($y = 88064x$, $R^2=0,9997$) y L-AG (verde) ($y = 90393x$, $R^2=0,9996$) en soluciones enantioméricamente puras (a) y en una mezcla racémica (MR) (b). D-AG (MR) ($y = 125383x$, $R^2=0,9917$). L-AG (MR) ($y=90380x$, $R^2 = 0,9986$).

Un análisis del área de los picos de D-AG a distintas concentraciones en la mezcla racémica comercial demostró que al aumentar la concentración de la misma se observa un aumento no esperado en el área del pico generado por efecto de *tailing*. Este efecto es menor al disminuir la concentración de la mezcla racémica (Figura 15).

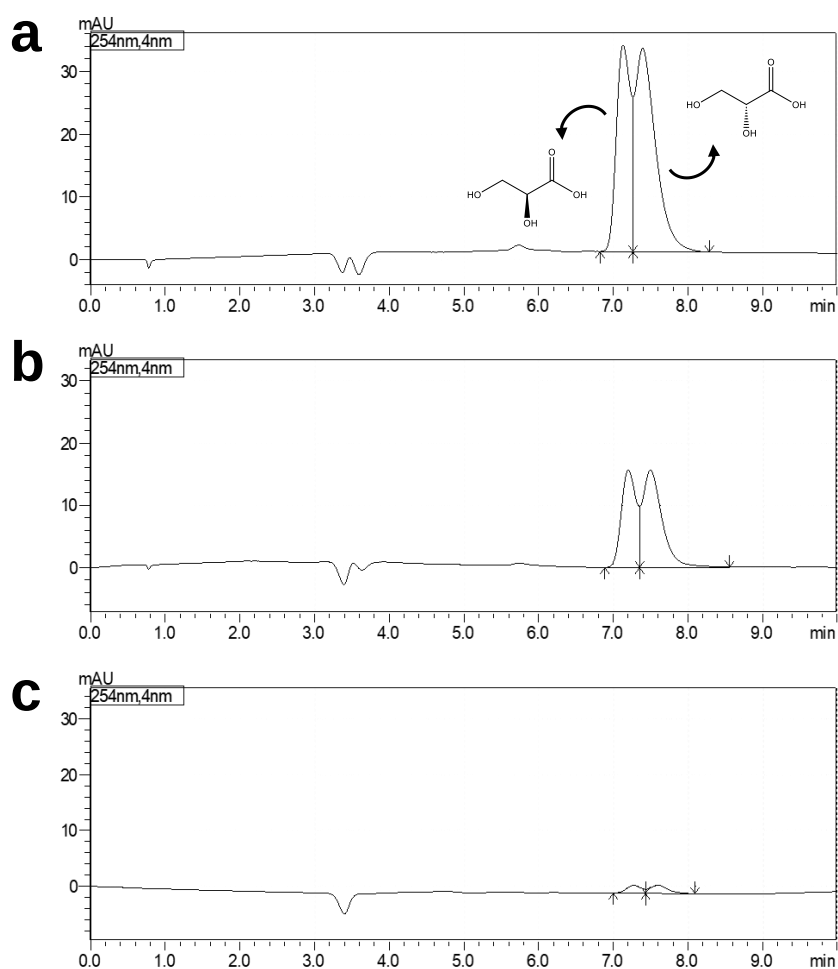


Figura 15. Cromatogramas de la separación de una muestra racémica comercial de DL-AG a distintas concentraciones. a) 5 mM c/u. b) 2,5 mM c/u. c) 0,25 mM c/u. L-AG ($T_{Ret} = 7,14$ min). D-AG ($T_{Ret} = 7,46$ min).

Teniendo en cuenta las curvas de calibración obtenidas para los distintos componentes tanto en su forma enantioméricamente pura y en su mezcla racémica, y el efecto observado para el caso del D-AG, se decidió utilizar las obtenidas a partir de la mezcla racémica determinar la selectividad de las células en reposo de Gfr.

Para ello se llevó a cabo una conversión de 200 g/L de glicerol en las condiciones previamente reportadas y se purificó el AG obtenido por HPLC utilizando una columna de exclusión aniónica. Seguidamente, el AG puro fue analizado utilizando el método de separación quiral (Figura 16).

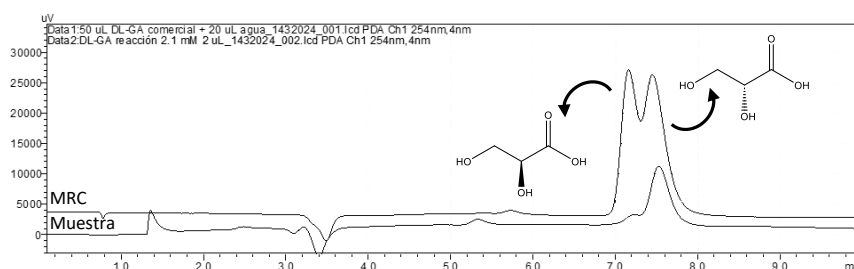


Figura 16. Análisis por HPLC de AG obtenido a partir de la oxidación de glicerol por células en reposo de Gfr (Muestra). Se presenta además como referencia un cromatograma de una mezcla racémica comercial (MRC). L-AG ($T_{Ret} = 7,14$ min). D-AG ($T_{Ret} = 7,46$ min).

Las señales obtenidas en el cromatograma denotan una marcada selectividad de las células en reposo de Gfr hacia la formación de D-AG, aunque se puede constatar la presencia de una menor cantidad de L-AG. A pesar de la baja resolución del método, una estimación del ee obtenido hacia D-AG arrojó un valor de 72,8%, lo que se condice con los datos previamente reportados por Habe *et al.*²⁶⁹. Este resultado demuestra que la selectividad del biocatalizador no se vio modificada por las condiciones de operación, lo que implica robustez.

La alta selectividad hacia la producción de D-GA se encuentra conservada en una variedad de acetobacterias. Por ejemplo, la cepa *Acetobacter tropicalis* NBRC16470 en crecimiento presenta una producción de D-AG con un ee del 99%²⁶⁹. Dentro del género *Gluconobacter*, existen reportes previos de la producción de D-AG por *Gluconobacter sp.* NBRC 3259 en crecimiento, presentando un ee del 77%²⁷². Por su parte, existen reportes de producción de D-AG por *Gluconobacter sp.* CHM43 (anteriormente catalogada como *G. frateurii* CHM43) en crecimiento con un ee de entre el 73 y el 75%¹³⁷. Interesantemente, en ese reporte reciente de Habe *et al.* se generó un mutante de *Gluconobacter sp.* CHM43, denominado TORI4, que presenta KO en los genes correspondientes a las deshidrogenasas de membrana mADH y mPDHP. Se observó que, al contrario de la cepa salvaje, el mutante produce L-AG con un ee de entre 42 y 43%. Los autores hipotetizan que sin los genes correspondientes a las deshidrogenasas mADH y mPDHP, la producción de L-AG puede estar siendo llevada a cabo por la alcohol deshidrogenasa intracelular dependiente de NAD(P) (ADH). Esta hipótesis podría explicar por qué es frecuente obtener una mezcla racémica de DL-AG en la conversión de glicerol por cepas de *Gluconobacter*.

Dada la importancia de obtener compuestos quirales como el D-AG y el L-AG con alta pureza enantiomérica, futuros experimentos podrían enfocarse en la modificación genética de Gfr, dirigiéndose específicamente a la enzima ADH intracelular para aumentar la producción de D-GA. Además, mediante estrategias como la evolución dirigida, se podrían introducir mutaciones en el sitio activo de la enzima mADH para favorecer la obtención de L-AG.

1.4. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en este capítulo demostraron el gran potencial de las cepas Gox y Gfr en reposo para la obtención de compuestos oxidados a partir de glicerol y nuevos derivados. Para el caso de Gox se estudiaron una variedad de potenciales sustratos logrando obtener dos cetonas nuevas, EHA y 3FHA, cuya producción utilizando células en reposo de esta bacteria no había sido reportada hasta el momento. Los productos obtenidos pudieron ser identificados por espectrometría de masas y constituyen compuestos de interés para la síntesis de moléculas aminadas que presenten quiralidad. Considerando la naturaleza quiral de estos sustratos, se estudió la preferencia de la bacteria por los distintos enantiómeros, siendo S-EGE y R-3FGE los que presentaron consumo. Esto demuestra la potencialidad de este microorganismo para llevar a cabo reacciones de desracemización de enantiómeros. Las células en reposo mostraron limitaciones en su capacidad de convertir en su totalidad los nuevos sustratos ensayados que podrían estar relacionadas a efectos de toxicidad o desgaste físico de los catalizadores. Futuros experimentos deberán centrarse en elucidar el porqué de este efecto e intentar remediarlo con estrategias que permitan intensificar los procesos, por ejemplo, mejorando la estabilidad del catalizador a través de su inmovilización.

En cuanto al potencial de la cepa Gfr para producir AG, se logró obtener una de las concentraciones más altas de este compuesto utilizando células en reposo, con la ventaja adicional de que la reacción se llevó a cabo solo en agua. Aunque la producción con células en crecimiento²⁶⁹ de la misma cepa en otros reportes aún sobrepasa la obtenida con células en reposo, esta estrategia catalítica ofrece un medio de reacción más limpio, lo que simplifica el procesamiento posterior y pudiendo así reducir los costos asociados al procesamiento *downstream*.

Del estudio de la composición enantiomérica del AG obtenido se pudo concluir que la selectividad del microorganismo no se ve afectada por las condiciones de operación aquí mencionadas, presentando un ee de D-AG del 72,8%. Este valor es cercano al previamente reportado por Habe *et al.* para AG obtenido por células en crecimiento de la misma cepa²⁶⁹. Los resultados obtenidos en este trabajo nos acercan más hacia el desarrollo de una tecnología limpia de producción económica de AG a partir de glicerol. Dado que las reacciones reportadas durante este capítulo fueron llevadas a cabo en matraces, es posible que los rendimientos productivos puedan ser mejorados aún más escalando la producción a un reactor. La mejora en la aireación que vendría asociada a este escalado permitiría una mejor difusión de oxígeno hacia las células, que potencialmente mejoraría la producción de AG.

CAPÍTULO 2:

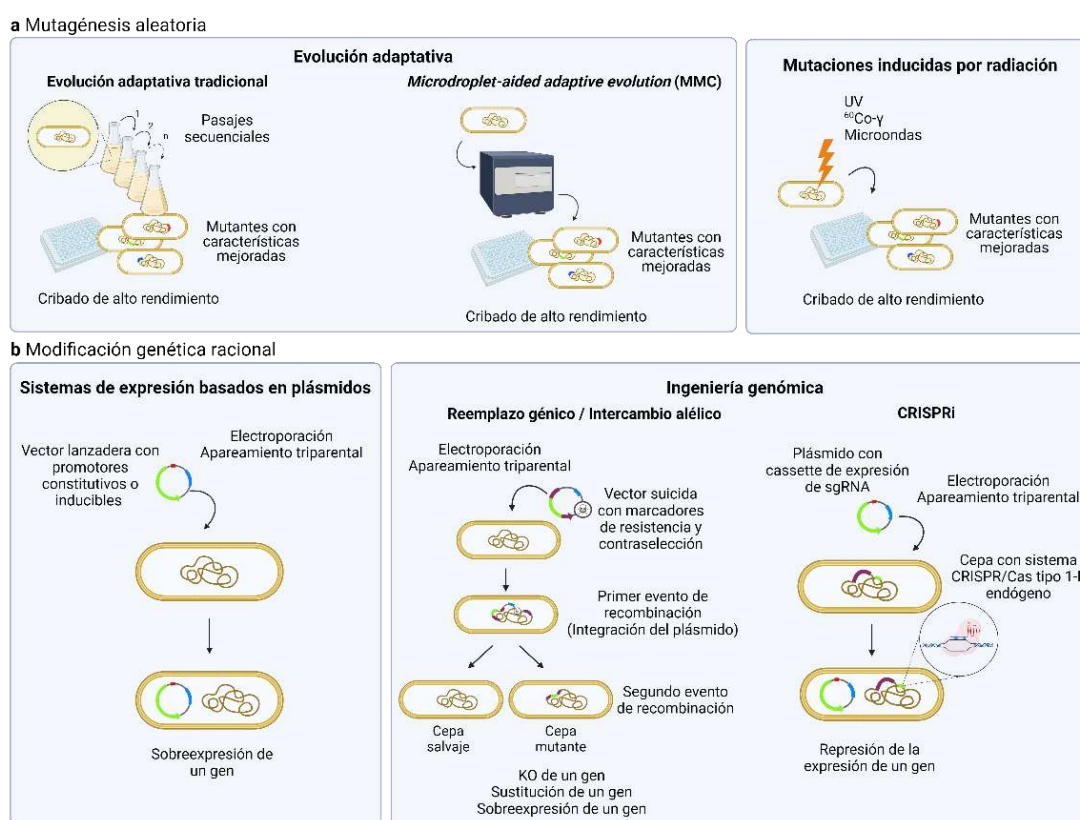
Modificación genética de cepas de *Gluconobacter*

CAPÍTULO 2: Modificación genética de cepas de *Gluconobacter*

2.1. Introducción

Antecedentes de modificación genética en bacterias del género *Gluconobacter*

Las cepas de *Gluconobacter* poseen una serie de cualidades que las convierten en un potencial chasis de interés para aplicaciones de biología sintética. Como ya fue mencionado anteriormente, la capacidad estos microorganismos de oxidar una gran cantidad de carbohidratos, alcoholes y otros compuestos relacionados, es una característica que puede ser aprovechada para producir compuestos de interés a través de ingeniería metabólica²⁷³. Existen distintas estrategias de modificación genética que han sido empleadas de forma exitosa en bacterias del género *Gluconobacter* en los últimos años (Esquema 11).



Esquema 11. Estrategias de modificación de la expresión génica reportadas para su uso en especies de *Gluconobacter*. a) Estrategias de mutagénesis aleatoria que no requieren un conocimiento en profundidad del genoma de la bacteria, las mutaciones se dan al azar. b) Estrategias de modificación genética racional, es necesario conocer el blanco genético a modificar. Permite la generación de mutaciones precisas en el genoma de la bacteria. Adaptado de Ripoll et al.³⁶.

Dada la relevancia industrial de estos microorganismos, existen numerosos ejemplos en los que estas distintas estrategias han sido aplicadas. La finalidad de estas ha sido en su mayoría la mejora de reacciones de biotransformación empleando estos biocatalizadores, siendo la especie *G. oxydans* la más frecuentemente modificada (Tabla 5). Dentro de las estrategias de modificación genética de tipo aleatorio utilizadas en *Gluconobacter*, existen ejemplos de mutación al azar utilizando estrategias de evolución adaptativa o de mutagénesis inducida por radiación (Esquema 11a). Por otro lado, los ejemplos más frecuentes de modificaciones racionales involucran el uso de plásmidos de expresión, o estrategias de modificación genómica permanente, como el intercambio alélico o las tecnologías basadas en CRISPR (Esquema 11b).

Tabla 5. Ejemplos de aplicación de cepas de *Gluconobacter* modificadas genéticamente por distintos métodos para mejorar la obtención de diversos productos a partir de biotransformaciones.

Estrategia de Modificación	Producto objetivo	Cepa de <i>Gluconobacter</i> modificada	Modificación realizada	Efecto en el fenotipo	Ref.
Mutagénesis aleatoria - Evolución adaptativa	Azúcares ácidos (ác. glucónico, ácido xilónico, ácido arabinónico, ácido manónico, ácido galactónico)	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	Sobreexpresión de enzima glucosa deshidrogenasa de membrana (mGluDH)	Mayor producción de azúcares ácidos	123
	L-Sorbosa	<i>G. oxydans</i> WSH-004	Mutaciones relacionadas con la traducción, el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, el metabolismo de carbohidratos y el metabolismo energético	Mayor tolerancia al sorbitol y a la temperatura	246
	A2-KLG	<i>G. oxydans</i> MMC3	Mutaciones aleatorias no determinadas	Mayor tolerancia al sorbitol, mayor crecimiento y mayor producción y tolerancia al A2-KLG	111
Mutagénesis aleatoria - Mutagénesis inducida por radiación	6-NSL	<i>G. oxydans</i> ZJB-605	Mutaciones aleatorias no determinadas	Mayor actividad en la sorbitol deshidrogenasa con aumento en la producción de 6-NSL	94
	6-NSL	<i>G. oxydans</i> ZJB-605	Sobreexpresión de enzima sorbitol deshidrogenasa (mSIDH), sobreexpresión de genes relacionados con el metabolismo del PQQ	Mayor producción de 6-NSL	97
Sistemas de expresión basados en plásmidos	Ácido xilónico	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	Sobreexpresión de mGluDH	Mayor producción de ácido xilónico y mayor tolerancia a inhibidores presentes en el sustrato (rastreo de maíz hidrolizado)	183
	6-NSL	<i>G. oxydans</i> ZJB-605	Sobreexpresión de mSIDH	Mayor producción de 6-NSL	81
	DHA	<i>G. oxydans</i> 621H	Sobreexpresión de mSIDH y el transportador de glicerol GlpFp	Mayor producción de DHA (solo sobreexpresión de mSIDH); mayor crecimiento y mayor tolerancia al glicerol (solo sobreexpresión del transportador)	211
	Levan	<i>G. japonicus</i> LMG 1417	Sobreexpresión de levansucrasa LevS1417	Mayor producción de levan	231
	Ácido xilónico	<i>G. oxydans</i> NL71	Sobreexpresión de tiorredoxina	Mejora en la capacidad oxidativa de la bacteria en presencia de contaminantes presentes en la biomasa lignocelulósica. Aumento de la producción de ácido xilónico	178

Tabla 5. Ejemplos de aplicación de cepas de *Gluconobacter* modificadas genéticamente por distintos métodos para mejorar la obtención de diversos productos a partir de biotransformaciones. **(Continuación)**

Estrategia de Modificación	Producto objetivo	Cepa de <i>Gluconobacter</i> modificada	Modificación realizada	Efecto en el fenotipo	Ref.
Sistemas de expresión basados en plásmidos	L-eritrosa	<i>G. oxydans</i> DSM2003	Sobreexpresión de L-Ribosa isomerasa y mSIDH con ligandos que permiten su colocalización	Aumento en la producción de L-eritrosa por aumento en la proximidad de las enzimas	225
	A2-KLG	<i>G. oxydans</i> WSH-003	Sobreexpresión de L-sorbosa deshidrogenasa y L-sorbose deshidrogenasa de <i>Ketogulonigenium vulgare</i> WSH-001, unidas por un <i>linker</i> y presentando un adaptador SH3, sobreexpresión de la proteína CutA (andamio molecular) de <i>Pyrococcus horikoshii</i> con un ligando SH3, sobreexpresión de genes relacionados al metabolismo del PQQ	Aumento en la producción de A2-KLG por aumento en la proximidad de las enzimas, combinado con un aumento en la biosíntesis de PQQ	77
	3-DHS	<i>G. oxydans</i> NBRC 3244	Sobreexpresión de la DHQasa tipo I AroD de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> con un péptido señal para secreción al periplasma	Aumento en la producción de 3-DHS debido a la exportación de la proteína AroD al periplasma	86
	L-Sorbosa	<i>G. oxydans</i> KCTC 1091	Sobreexpresión de SIDH dependiente de NAD ⁺ de <i>G. oxydans</i> G624, sobreexpresión de <i>LreNox</i> de <i>Lactobacillus reuteri</i>	Aumento en la producción de L-sorbosa por la sobreexpresión de la SIDH dependiente de NAD ⁺ , que es regenerado por <i>LreNox</i>	239
	6-NSL	<i>G. oxydans</i> H-8	Sobreexpresión de hemoglobina Vhb del género <i>Vitreoscilla</i> combinado con la sobreexpresión de mSIDH y genes del metabolismo del PQQ	Aumento en la producción de 6-NSL con aumento en el crecimiento y la expresión de genes relacionados con la cadena respiratoria	79
	5-KF	<i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR	Sobreexpresión de fructosa deshidrogenasa de <i>G. japonicus</i> NBRC 3260	Aumento en la producción de 5-KF por el agregado de la enzima exógena	87
	5-KF	<i>G. oxydans</i> Δ hsdR Δ tolB	Sobreexpresión de la sacarasa SacC de <i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	Mutante con la capacidad de obtener glucosa y fructosa a partir de sacarosa. Por la acción de otra cepa mutante de <i>G. oxydans</i> se obtiene 5-KF a partir de la fructosa obtenida.	89
	A2-KLG	<i>G. oxydans</i> H24	Sobreexpresión de genes asociados a un sistema de percepción de quórum basado en los genes <i>ccdB</i> (<i>E. coli</i>) y <i>LuxI</i> y <i>LuxR</i> (<i>Vibrio fischeri</i>)	Mutante con la capacidad de regular negativamente su propio crecimiento luego de convertir sorbitol en sorbosa, que forma parte de un consorcio con <i>K. vulgare</i> y <i>B. megaterium</i> . La sorbosa es oxidada a A2-KLG por <i>K. vulgare</i> . El A2-KLG no es metabolizado por <i>G. oxydans</i> gracias al sistema de percepción de quorum.	237

Tabla 5. Ejemplos de aplicación de cepas de *Gluconobacter* modificadas genéticamente por distintos métodos para mejorar la obtención de diversos productos a partir de biotransformaciones. **(Continuación)**

Estrategia de Modificación	Producto objetivo	Cepa de <i>Gluconobacter</i> modificada	Modificación realizada	Efecto en el fenotipo	Ref.
Sistemas de expresión basados en plásmidos	AG	<i>Gluconobacter</i> sp. CHM43, <i>Gluconobacter</i> sp. TORI4 (<i>Gluconobacter</i> sp. CHM43 Δ sldBA Δ adhAB)	Sobreexpresión del gen <i>adhABS</i> y las subunidades <i>adhAB</i> de <i>A. tropicalis</i> NBRC 16470	Mutantes con variaciones en el ee de AG	137
	5-KF	<i>G. oxydans</i> IK003.1	Inserción en el genoma de genes <i>fdhSCL</i> de <i>G. japonicus</i> NBRC 3260	Aumento en la producción de 5-KF	25
Ingeniería genómica - Plásmido suicida	5-KF	<i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR	Reemplazo del gen de la enzima mGluDH por el gen <i>fdhSCL</i> de una fructosa deshidrogenasa de <i>G. japonicus</i> NBRC 3260	Mutante con la capacidad de producir 5-KF a partir de sacarosa (esto es posible combinando además la expresión de una levansucrasa de <i>G. japonicus</i> LMG 1417 utilizando un sistema basado en plásmido)	89
	Ácido xilónico	<i>G. oxydans</i> 621H	Deleción de los genes que codifican para la mPDHP	Mutante con una capacidad aumentada de crecimiento en glicerol que permite generar mayor cantidad de biomasa para la obtención de ácido xilónico	274
	L-Sorbosa	<i>G. oxydans</i> WSH-003	Cambio en los promotores de los genes <i>sldBA</i> , <i>pqqABCDE</i> y <i>cyoBACD</i> ; deleción del gen <i>edd</i>	Mutante con mayor producción de L-sorbosa y una capacidad de crecimiento aumentada	243
Ingeniería genómica - Sistemas basados en la tecnología CRISPR-Cas	L-Sorbosa y Ácido glucónico	<i>G. oxydans</i> WSH-003	Represión del gen <i>edd</i>	Mutante con capacidades aumentadas de producción de L-sorbosa y Ácido glucónico (la represión del gen <i>edd</i> fue acompañada de la sobreexpresión del gen <i>gnd</i> con un sistema de expresión basado en un plásmido)	148

Como se mencionó anteriormente, las técnicas de mutagénesis aleatoria son particularmente útiles al trabajar con organismos no modelo como las cepas de *Gluconobacter*, debido a que no es necesario conocer el genoma de la bacteria para utilizarlas. Entre ellas, la evolución adaptativa ha probado ser de utilidad para generar cepas mutantes de *G. oxydans* con buenas producciones de azúcares ácidos, L-Sorbosa y A2-KLG^{111,123,246}. Por otro lado, la mutagénesis inducida por radiación es otra alternativa eficaz para la modificación genética de bacterias del género *Gluconobacter*. A través de la utilización de rayos gamma, UV, o microondas, se ha logrado obtener mutantes de *G. oxydans* con capacidades aumentadas de producción de 6-NSL^{94,97}.

Debido a la importancia industrial de las cepas de *Gluconobacter*, el estudio de su genoma y metabolismo se ha incrementado significativamente en los últimos años, dilucidando nuevas rutas metabólicas y determinando el papel de enzimas clave que constituyen posibles objetivos para fines de ingeniería genética^{106,115,120,171,215,250,254,275,276}. Sin embargo, las herramientas de ingeniería genética para cepas de

Gluconobacter son todavía escasas en comparación con las disponibles para otros organismos, lo que limita su aplicabilidad. De todas formas, existen en la literatura diversos reportes de modificaciones de tipo racional en organismos de este género.

Una técnica frecuente de modificación genética en *Gluconobacter* es la utilización de plásmidos de expresión. En el caso de este género bacteriano, las construcciones basadas en los llamados plásmidos “*shuttle*” o lanzadera (capaces de replicarse también en enterobacterias) típicamente se ensamblan y enriquecen utilizando una cepa de *E. coli* como huésped, y luego se incorporan a una cepa de *Gluconobacter*. En estas bacterias este proceso se lleva a cabo frecuentemente a través de electroporación o conjugación mediante apareamiento triparental^{178,225,231,277}. A través de la incorporación de plásmidos de expresión se han obtenido mutantes de varias especies de *Gluconobacter*, con distintas capacidades de producción de compuestos de interés incorporando genes tanto homólogos como heterólogos. Como ejemplos, estas modificaciones permitieron mejorar la producción de ácido xilónico, 6-NSL, DHA, A2-KLG, 3-DHS, L-sorbosa, L-eritrosa y 5-KF en cepas mutantes de *G. oxydans*^{77,79,81,86,87,89,183,211,225,237,239}. Asimismo, estas técnicas han sido empleadas para generar mutantes de otras cepas de *Gluconobacter* utilizadas con menor frecuencia. Ejemplos de esto son la generación de mutantes de *Gluconobacter* sp. CHM43 capaces de producir AG con estereoselectividades distintas¹³⁷ o una mutante de *G. japonicus* LMG 1417 con una capacidad aumentada de producción de leván²³¹.

Dada la ya mencionada relevancia industrial de las cepas de *Gluconobacter*, es frecuente encontrar un cierto sesgo hacia la generación de mutantes para la obtención de nuevos productos de biotransformación, o para la mejora de los rendimientos de biotransformaciones ya establecidas. Sin embargo, la modificación de estas bacterias para obtener mutantes que expresen proteínas fluorescentes ha sido también foco de una variedad de investigaciones. Los sistemas de expresión basados en plásmidos son los preferidos generalmente para llevar a cabo este tipo de modificaciones, ya que generan altos niveles de fluorescencia debido a las múltiples copias del gen presentes dentro del microorganismo²⁷⁸. La expresión de proteínas fluorescentes en *Gluconobacter* se ha implementado en el pasado para estudiar su morfología⁸³, la localización subcelular de ciertas enzimas a través de la preparación de proteínas fusión^{221,225}, el nivel de expresión génica alcanzado con ciertos promotores^{83,110,279,280} o vectores de expresión novedosos⁸², o la capacidad de represión de un sistema endógeno CRISPR-Cas de tipo I-E¹⁴⁸, entre otras aplicaciones. Sin embargo, la obtención de mutantes que expresen proteínas fluorescentes también resulta atractivo, por ejemplo, para llevar a cabo estudios de imagenología de preparados inmovilizados o biofilms²⁷⁸, facilitando el estudio de la integración de las bacterias a distintos materiales. Asimismo, estos organismos fluorescentes pueden llegar a constituir herramientas importantes en el estudio de la arquitectura de reacciones en cascada con biocatalizadores inmovilizados.

A pesar de la gran cantidad de reportes exitosos de mejora de cepas utilizando plásmidos para la expresión de genes en *Gluconobacter*, al igual que en otros organismos, existen problemáticas asociadas al uso de antibióticos, el número de copias obtenido, y la alta carga metabólica que implica la manutención del plásmido. Debido a esto

y al impacto industrial de las cepas de *Gluconobacter*, se generó la necesidad de desarrollar y adaptar tecnologías eficientes de ingeniería genómica para la ingeniería racional de mutantes libres de plásmidos. La estrategia más relevante para la modificación del genoma de este género bacteriano es el reemplazo de genes, también conocido como intercambio alélico, utilizando vectores suicidas (Esquema 11b).

El reemplazo de genes o intercambio alélico es una técnica bien establecida que se puede utilizar para la eliminación de genes⁹¹ o la generación de mutaciones puntuales²⁴³, así como para la sobreexpresión de ciertos genes mediante la integración de cassettes de expresión completos²⁵, o modificando regiones promotoras²⁴³. Además de un par de brazos homólogos que flanquean la nueva secuencia de ADN que se incorporará al genoma, los vectores suicidas suelen contener un marcador de selección que es generalmente un gen de resistencia a antibióticos, y un gen de contraselección, para ayudar en la selección de los transformantes deseados. Como estos plásmidos no pueden replicarse dentro del huésped, ya que solo pueden replicarse en enterobacterias, después de su introducción a la bacteria desaparecen o se integran en el cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga. Los transformantes que integraron el plásmido después de este primer evento de recombinación se seleccionan mediante su sembrado en placas en presencia del antibiótico seleccionado. Estos transformantes ahora son resistentes a dicho antibiótico, pero presentan susceptibilidad hacia un determinado compuesto, que variará dependiendo del gen de contraselección seleccionado. Después de un segundo evento de recombinación, los transformantes deseados tendrán la nueva secuencia de ADN dentro de su cromosoma bacteriano mientras que el resto del plásmido integrativo se perderá, junto con el gen de contraselección. Al perder el gen de contraselección, los nuevos transformantes serán resistentes al compuesto mencionado anteriormente utilizado para la contraselección. Para diferenciarlos de aquellos en los que no se produjo un segundo evento de recombinación, los transformantes se siembran en placas en presencia del compuesto de contraselección. Posteriormente, los transformantes positivos suelen ser corroborados mediante PCR. El intercambio alélico presenta la ventaja de no dejar marcadores, ya que no queda ningún marcador de selección en el cromosoma bacteriano después del segundo evento de recombinación. En estos últimos años se han utilizado con éxito en cepas de *Gluconobacter* tres sistemas diferentes basados en este principio. Los marcadores de contraselección seleccionados fueron los genes *upp*, *sacB* y *codAB*.

El gen *upp* codifica para una fosforibosil transferasa que convierte el 5-fluorouracilo (5-FU) en 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP). Subsecuentemente, la 5-FUMP es convertida en 5-fluorodesoxiuridina monofosfato que es un inhibidor de la timidilato sintasa. La presencia del inhibidor afecta la reparación y replicación del ADN, por lo que en presencia de 5-FU se genera una presión selectiva negativa sobre el gen *upp*²⁸¹. Para poder ser implementada correctamente, esta técnica requiere que la cepa a ser utilizada haya sido previamente modificada, presentando un KO en su gen *upp* endógeno. Utilizando esta metodología se generaron distintos mutantes de *G. oxydans* IK003.1 para la mejora de la producción de 5-KF²⁵. Alternativamente, los genes *codAB* pueden ser utilizados como marcadores de contraselección. CodA es una citosina deaminasa proveniente de *E. coli* que cataliza la conversión de 5-fluorocitosina (5-FC) en el compuesto tóxico 5-FU que, como se mencionó

anteriormente, es luego metabolizado por el gen *upp* endógeno de la bacteria, afectando la reparación y replicación del ADN. Por su parte, CodB es una citosina permeasa que se ha probado necesaria para el correcto funcionamiento del sistema²⁸². Este sistema es aplicable a la mayoría de las acetobacterias, ya que el gen *upp* ya se encuentra en el cromosoma bacteriano, mientras que los genes *codAB* no, lo que se presenta como una ventaja frente al sistema presentado anteriormente. Esta técnica también fue utilizada con éxito para obtener buenas productividades de 5-KF a partir de la generación de mutantes de *G. oxydans* 621H Δ hsdR⁸⁹. Por último, el gen *sacB* también ha sido utilizado como marcador de contraselección en la modificación genómica de cepas de *Gluconobacter*. El gen *sacB* codifica para una levansucrasa originaria de *Bacillus subtilis*, que al ser expresada en presencia de sacarosa produce la muerte celular²⁴³. Este sistema, al igual que el basado en los genes *codAB*, no requiere de modificaciones previas en la cepa a mutar, lo que lo hace más práctico. Ejemplos de aplicación de esta estrategia permitieron generar un mutante de *G. oxydans* 621H con características mejoradas para la producción de ácido xilónico, así como también un mutante de *G. oxydans* WSH-003 con capacidades de crecimiento y conversión aumentadas para la producción de L-sorbose²⁴³.

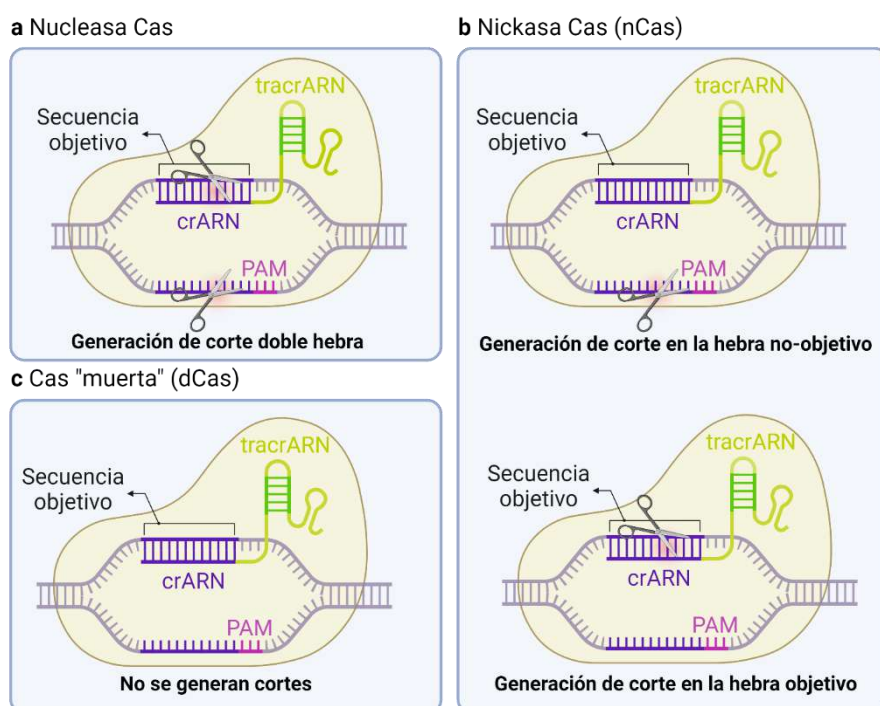
Como se mencionó anteriormente, las técnicas de reemplazo de genes utilizando plásmidos suicidas son las más utilizadas en la literatura para la modificación genómica de cepas de *Gluconobacter*. Sin embargo, su eficiencia de edición sigue siendo algo baja, alcanzando generalmente máximos del 50%. Esto se debe a los dos posibles resultados del segundo evento de recombinación homóloga, en el que se puede obtener el mutante deseado o recuperar el genotipo de tipo salvaje²⁴³. Alternativamente, existen sistemas de edición genómica basados en CRISPR-Cas que hasta el momento no han sido explorados en profundidad en bacterias del género *Gluconobacter*. Estos sistemas serán abordados en profundidad en la siguiente sección.

Tecnologías basadas en CRISPR para la modificación de la expresión génica en procariotas y sus perspectivas de utilización en *Gluconobacter*

En 2005, Mojica *et al.* describieron la función CRISPR en la naturaleza como un tipo de sistema inmunológico adaptativo en procariotas²⁸³. Posteriormente, los premios Nobel Doudna y Charpentier lo plantearon como un potencial sistema a ser explotado con fines de ingeniería genética²⁸⁴. Desde entonces, la tecnología se ha ampliado para utilizarse en una gran variedad de procariotas, arqueas y eucariotas con fines de edición genómica y regulación génica²⁸⁵.

En general, estas tecnologías se basan en la introducción de una nucleasa Cas que puede exhibir actividad catalítica o ser mutada para permanecer inactiva, y un ARN guía (gARN) que se unirá a la nucleasa y la conducirá hacia el sitio objetivo en el genoma del huésped (Esquema 12). El sistema más comúnmente utilizado es CRISPR-Cas9, proveniente originalmente de la bacteria *S. pyogenes*²⁸⁶. En este sistema, Cas9 depende de dos moléculas de ARN: un ARN CRISPR (crARN) que contiene una secuencia de 20 nt que confiere especificidad a Cas9, y un ARN transactivador (tracrARN) que se hibrida parcialmente con el crARN y estabiliza la estructura,

activando Cas9. El crARN y el tracrARN se pueden fusionar, formando un único ARN guía (sgARN). Además, para el posicionamiento correcto del complejo CRISPR-Cas en el ADN objetivo, se debe ubicar un motivo adyacente protoespaciador (conocido como secuencia PAM) cerca de la secuencia de ADN objetivo, que es complementaria al crARN²⁸⁷. Una vez que la nucleasa Cas realiza un corte en el ADN, se pueden introducir modificaciones en el genoma, como inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, mediante distintos mecanismos de reparación. Por otro lado, las nucleasas “muertas” son versiones que han sido mutadas para inactivar su actividad de corte, permitiendo su uso en aplicaciones de regulación génica sin provocar daños en el ADN. Esto las convierte en herramientas versátiles para la modulación de la expresión génica y el estudio de la función de genes específicos sin alterar la secuencia del ADN.

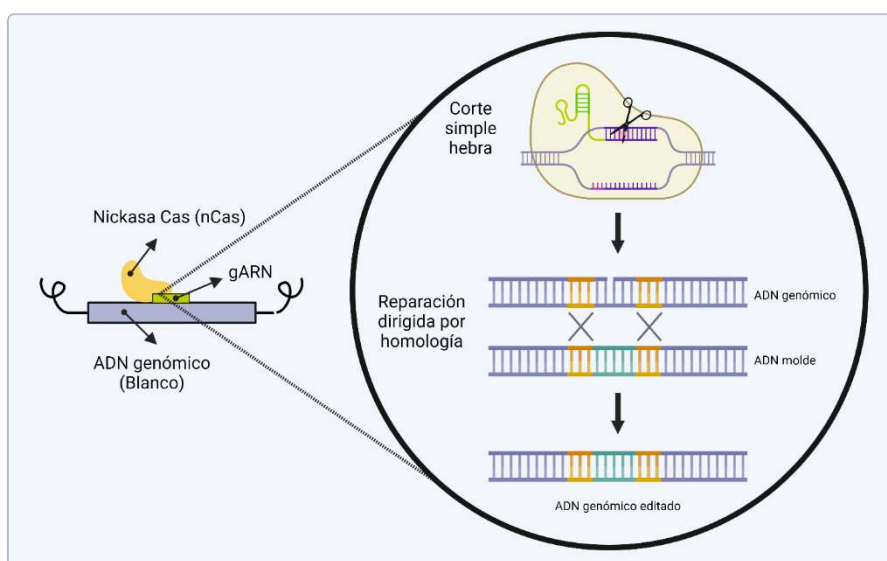


Esquema 12. Variantes de proteínas Cas utilizadas en tecnologías basadas en CRISPR. a) Nucleasas Cas, capaces de generar cortes doble hebra (CDH) en el genoma del huésped. b) Nickasas Cas (nCas), están mutadas y solo pueden generar cortes simple hebra en la secuencia objetivo. c) Proteínas Cas catalíticamente inactivas o “muertas” (dCas), variantes mutantes que no pueden cortar el ADN pero que son útiles para aplicaciones relacionadas con la represión o activación de genes sitio-dirigida. crARN: ARN CRISPR. tracrARN: ARN transactivador. sgARN (ARN de guía simple): crARN + tracrARN. PAM: motivo adyacente protoespaciador. Adaptado de Mulet *et al.*²².

En la última década se han aplicado con éxito diferentes tecnologías basadas en el sistema CRISPR-Cas para modificar bacterias de relevancia industrial. Recientemente, nuestro grupo de investigación llevó a cabo una revisión de la literatura relacionada a esta temática, titulada “*CRISPR Tools in Bacterial Whole-Cell Biocatalysis*”, encontrando una diversidad de ejemplos de aplicación de estas tecnologías para la obtención de más de 80 productos de interés biotecnológico²². En algunos de estos ejemplos se generaron modificaciones permanentes en el genoma utilizando nucleasas Cas y en otros se utilizaron nucleasas “muertas” para generar efectos

reversibles sobre la expresión génica. Sin embargo, hasta el momento existen escasos reportes de la implementación de estas tecnologías en bacterias del género *Gluconobacter*. Dada la importancia industrial de este género de bacterias, resulta de especial interés continuar ampliando las herramientas moleculares disponibles para su modificación, siendo aquellas basadas en CRISPR estrategias prometedoras para optimizar sus capacidades biocatalíticas y desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas.

Entre las técnicas de modificación genómica permanente basada en CRISPR con potencialidad de aplicación en *Gluconobacter* se encuentra la basada en nickasas Cas (Esquema 13). En general, una de las limitaciones de la utilización de nucleasas Cas para la edición del genoma es la toxicidad asociada con la generación de cortes doble hebra (CDH), como es el caso de muchas especies bacterianas de relevancia industrial²⁸⁸. Según la información disponible en el repositorio KEGG *Pathway*, no existen evidencias de que una gran variedad de las bacterias de este género posea completa la vía metabólica RecBCD, necesaria para reparar este tipo de cortes. Alternativamente, la vía de reparación por homología de cortes simple hebra RecFOR se puede encontrar completa en la mayoría de ellas. El desarrollo de nucleasas Cas mutantes con la capacidad de cortar solo una cadena de ADN (nickasas, nCas) ha surgido como una alternativa para aumentar la eficiencia de la mutación en la edición del genoma basada en CRISPR de bacterias que puedan resultar susceptibles a los CDH.

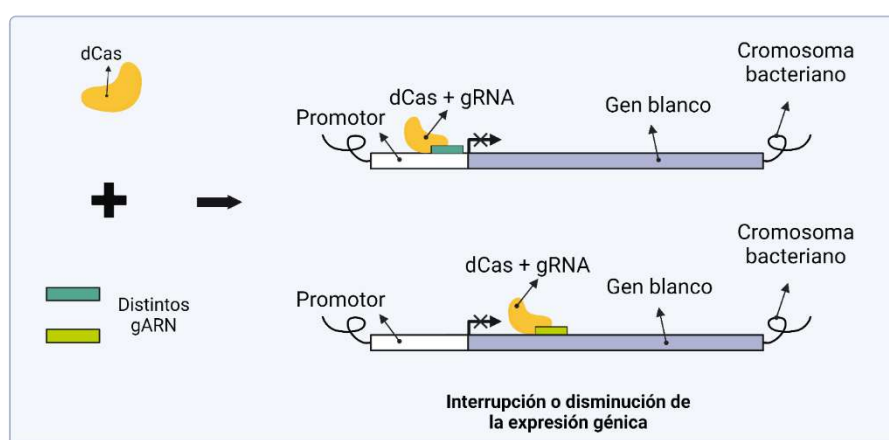


Esquema 13. Modificación genómica mediada por nickasas Cas. El corte de una sola hebra inducido por nCas permite realizar modificaciones genéticas en organismos que cuentan con la vía de reparación por homología adecuada para este tipo de daños. Para obtener la modificación deseada, es necesario proporcionar a la célula una secuencia de ADN con regiones homólogas al genoma, que actuará como molde de reparación. Esta estrategia se presenta como una alternativa en bacterias susceptibles a CDH. gARN: ARN guía. Adaptado de Mulet *et al.*²².

Si la bacteria seleccionada posee la vía de reparación, la versatilidad de esta tecnología es muy alta, permitiendo virtualmente cualquier operación genómica, involucrando tanto inserciones y reemplazos, como también

deleciones. Cabe destacar de todas formas que, aunque promisorio, esta tecnología no se ha probado aún en bacterias del género *Gluconobacter*.

Alternativamente, la tecnología CRISPRi para la modificación reversible de la expresión génica también resulta de especial interés para su implementación en *Gluconobacter* (Esquema 14). En las bacterias, esta técnica se ha convertido en el método preferido para regular la expresión génica de manera secuencia-específica, ya que otras tecnologías como el ARNi no pueden implementarse debido a la ausencia de la maquinaria molecular necesaria. La tecnología CRISPRi implica la utilización de una nucleasa Cas “muerta” o dCas que se acopla con una molécula de gARN que se encarga de guiar el complejo hacia el promotor o secuencia codificante del gen objetivo, lo que resulta en la represión de la expresión del gen. El complejo de ribonucleoproteína actúa estéricamente, inhibiendo la transcripción del gen blanco, ya sea bloqueando el alargamiento o el inicio de la transcripción²⁸⁹.



Esquema 14. Modificación de la expresión génica a partir de CRISPRi utilizando una nucleasa Cas “muerta” (dCas). La formación de complejo dCas-gARN se localiza en el ADN generando la interrupción o la disminución de la expresión de un gen blanco generando un impedimento estérico que dificulta la transcripción. El gARN puede hibridar en el promotor o en la secuencia codificante para el gen. gARN: ARN guía. Adaptado de Mulet *et al.*²².

La regulación de la transcripción mediante CRISPRi surge como una herramienta valiosa en la biocatálisis, ya que puede permitir ajustar rasgos metabólicos o fisiológicos codificados por genes esenciales. A veces, estos genes o vías metabólicas no pueden alterarse mediante métodos tradicionales de supresión de genes, ya que pueden provocar la muerte bacteriana. La represión por CRISPRi puede permitir una expresión basal que no interfiere con los procesos celulares vitales, pero por ejemplo, no genera grandes cantidades de un subproducto indeseado. Además, CRISPRi se puede utilizar como técnica exploratoria previo a realizar un intento de KO. Su simplicidad, en comparación con las técnicas KO, permite evaluar múltiples objetivos génicos y determinar cuál es el más adecuado para lograr la modificación deseada. Además, este enfoque puede ser beneficioso para la represión génica en organismos no modelo genéticamente recalcitrantes cuando el conocimiento de los mecanismos de reparación del ADN que actúan es escaso. CRISPRi también permite la represión simultánea de varios genes mediante la introducción de más de un gARN, esta capacidad de multiplexación puede explotarse en ingeniería

metabólica. Mejorar el flujo metabólico mediante la optimización de la biocatálisis utilizando células completas es una tarea desafiante y que requiere mucho tiempo. De hecho, con frecuencia requiere ajustes simultáneos en los niveles de expresión de múltiples genes. Si bien ciertas vías poseen pasos limitantes de la velocidad identificados, las intrincadas redes metabólicas a menudo exigen un enfoque metódico de prueba y error para ajustar la expresión de múltiples genes con el fin de lograr una biotransformación eficiente. En este sentido, CRISPRi ha surgido para aliviar la carga de trabajo asociada con la ingeniería de vías metabólicas.

Si bien esta herramienta tiene muchas ventajas, es necesario considerar ciertas limitaciones. Primeramente, esta estrategia se limita solamente a la represión de genes, limitando la variedad de modificaciones genéticas a realizar con la misma. A diferencia de las otras estrategias basadas en CRISPR que modifican el genoma, esta técnica requiere de una constante represión lograda por la presencia de plásmidos que codifican para los distintos componentes del sistema. Si bien la capacidad de revertir la represión génica puede ser beneficiosa para ciertos procesos, el mantenimiento de los plásmidos de expresión dentro de la célula no solo representa un alto costo metabólico para la misma, sino que requiere del uso de antibióticos cuyo agregado encarece los procesos productivos. Por otro lado, lograr el nivel óptimo de represión puede requerir una cierta optimización. En los casos en los que se necesita un alto nivel de represión, la técnica de CRISPRi puede no ser lo suficientemente efectiva y requerir alternativamente llevar a cabo un KO. Adicionalmente, una especificidad deficiente del gARN puede provocar efectos no deseados por la hibridación del mismo con regiones del ADN distintas a la secuencia blanco. Aunque este es un problema común para todas las herramientas basadas en CRISPR, en el caso de CRISPRi, medir este efecto puede ser más desafiante. Finalmente, el gran tamaño del complejo dCas-gARN puede provocar la represión de genes aledaños, pudiendo también generar efectos no esperados en el mutante.

Entre los escasos reportes que se encuentran publicados de la aplicación de tecnologías basadas en CRISPR en *Gluconobacter*, se encuentra un reporte de Qin *et al.* en el que se adaptó un sistema endógeno CRISPR/Cas tipo I-E para lograr la represión génica en *G. oxydans* WSH-003¹⁴⁸. Los sistemas CRISPR/Cas de tipo I-E se basan en complejos de múltiples subunidades que se unen al crARN, formando una estructura conocida como “*Cascade*”. Luego, *Cascade* se une al ADN y recluta la nucleasa Cas3, que está a cargo de la degradación del objetivo²⁹⁰. Qin *et al.* identificaron por primera vez este sistema CRISPR/Cas analizando el genoma de *G. oxydans* WSH-003 utilizando *CRISPRCasFinder*¹⁴⁸. Se encontró un sistema típico de tipo I-E, que presenta un grupo de genes cas, que codifican para la nucleasa Cas3 y otras siete proteínas Cas, junto con dos matrices de CRISPR. Por lo general, para desarrollar un sistema CRISPRi basado en un sistema CRISPR/Cas de tipo I-E, es necesario eliminar el gen *cas3* para evitar la actividad de la nucleasa. Curiosamente, los autores encontraron que en *G. oxydans* WSH-003 la nucleasa Cas3 se encontraba inactiva, lo cual fue una ventaja ya que solo se necesitaba la expresión del gARN para implementar el sistema CRISPRi. El sistema CRISPR/Cas se utilizó para reprimir simultáneamente la expresión de las proteínas fluorescentes mCherry, eGFP y CFP de forma exitosa. Asimismo, el sistema pudo ser aplicado para reprimir la expresión de los genes endógenos *gnd* y *edd* en *G. oxydans* WSH-003, que regulan las vías de las pentosas fosfato y Entner-Doudoroff. La represión de *edd* mejoró el crecimiento y la producción de L-

sorbosa, mientras que la represión de *gnd* tuvo efectos negativos. Se construyó una cepa mutante con *edd* reprimido y *gnd* sobreexpresado utilizando un sistema de expresión con plásmido, mejorando la producción de L-sorbosa y ácido glucónico, así como los rendimientos de biomasa. El sistema de CRISPRi reportado por los autores muestra un gran potencial para la represión génica y la ingeniería metabólica.

El otro reporte existente sobre la aplicación de una tecnología basada en CRISPR en *Gluconobacter* es muy reciente (2024) y describe la implementación de un sistema basado en la nucleasa Cas denominada Cpfl. Wang *et al.* lograron llevar a cabo la modificación del genoma de varias cepas de *G. oxydans* a través de la creación de una proteína fusión entre la nucleasa Cas Cpfl y una nucleasa denominada FokI²⁹¹. La necesidad de fusionar Cpfl con FokI radicó en la imposibilidad de la nucleasa Cas de cortar el ADN del huésped, a pesar de poder formar el complejo Cas-gARN y ubicarse correctamente en el blanco genómico esperado. La incorporación de la nucleasa FokI al sistema permitió el corte sitio específico del ADN, pudiendo proceder luego con la reparación por homología del CDH. Interesantemente, en el caso de las cepas *G. oxydans* CGMCC 1.0110, ATCC 9937, 621H, WSH-003, y WSH-004, la generación de CDH no resultó tóxica para las bacterias, a pesar de posiblemente no contar con el sistema de reparación RecBCD completo. Mediante la aplicación del sistema desarrollado, los investigadores lograron efectuar ediciones genéticas simples y dobles, constituyendo el primer informe de la implementación de un sistema basado en CRISPR-Cas para la modificación genómica en *Gluconobacter*. Los autores subrayan que, tras 15 años de investigación en este ámbito y los intentos infructuosos de implementar sistemas de edición basados en CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, CRISPR/Cas12f, CRISPR/Cas12i y CRISPR/Cas12k en *G. oxydans*, este avance representó un hito significativo en la ingeniería genómica de este género bacteriano.

En este capítulo de la Tesis se buscará generar una serie de mutantes de *Gluconobacter* con aplicaciones distintas, empleando técnicas variadas de modificación genética de microorganismos. En primer lugar, se tendrá como objetivo la obtención de mutantes de las cepas en estudio Gfr y Gox con la capacidad de expresar una proteína fluorescente. La finalidad de la obtención de estos mutantes es su utilización en el posterior estudio de preparados inmovilizados. Para ello se llevará a cabo el diseño de un sistema de expresión basado en plásmidos. Adicionalmente, en base a los resultados obtenidos en el Capítulo 1 de este trabajo, se buscará generar un mutante de Gfr que no sea capaz de producir DHA a partir de glicerol, para obtener únicamente AG a partir de este compuesto. Para ello se implementarán herramientas basadas en CRISPR, utilizando una nickasa para la modificación genética permanente de la bacteria generando un KO en el gen *sldBA*.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cepas bacterianas

La cepa *E. coli* DH5α fue obtenida de *New England BioLabs* (Massachusetts, EE. UU.). Las cepas de *Gluconobacter* utilizadas fueron mencionadas anteriormente en la sección “1.2.1. Cepas bacterianas”. Para el caso de *E. coli* DH5α y sus mutantes, las mismas fueron mantenidas en placas de medio LB-agar (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7,5) a 30 °C, con el agregado de antibióticos en caso de que fuera necesario. En tales casos, las condiciones se detallan más adelante. Las cepas de *Gluconobacter* fueron mantenidas en placas de medio de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) a 30 °C, con el agregado de antibióticos para el caso de los mutantes. Las concentraciones de antibiótico para cada caso se detallan más adelante.

2.2.2. Reactivos generales

La glucosa, K₂HPO₄, etanol absoluto y NaCl y glicerol fueron de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). La peptona y el acetato de sodio trihidrato fue de *PanReac AppliChem* (Barcelona, España). El extracto de levadura, la triptona y agar fueron de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). El MgSO₄·7H₂O fue de J.T. Baker (Pensilvania, EE. UU.). El HEPES-Na y el KH₂PO₄ fueron de *Macron Chemicals* (Pensilvania, EE. UU.). La agarosa fue de *Bioron* (Römerberg, Alemania).

2.2.3. Reactivos de biología molecular

La enzima T4 ligasa y las enzimas de restricción Sall, Bsal, BamHI, Ascl, EcoRI, SbfI, EcoRV, NdeI, NotI, SpeI, HindIII y sus correspondientes tampones de reacción fueron de *ThermoScientific* (Massachusetts, EE. UU.). El marcador de peso molecular fue *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331*, los dNTPs y el MgCl₂ fueron también del mismo fabricante. La enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* y su correspondiente tampón de reacción fue de *New England BioLabs* (Massachusetts, EE. UU.). La enzima fosfatasa alcalina fue de *Invitrogen* (Massachusetts, EE. UU.). La enzima Taq polimerasa y su correspondiente tampón de reacción fue de *Applied Biological Materials* (British Columbia, Canadá). El colorante de ADN *GoodView* fue de *SBS Genetech* (Pekín, China). La utilización de todos los reactivos mencionados en esta sección se llevó a cabo siempre de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Los antibióticos kanamicina, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y estreptomycin fueron de Sigma-Aldrich (Misuri, EE. UU.).

2.2.4. Plásmidos

Los plásmidos pSEVA231-CRISPR, pMYMH464, y pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 fueron obtenidos del repositorio *Addgene* (<https://www.Addgene.org/>). Los plásmidos pTWIST-CRISPR y pTWIST-CRISPRi fueron sintetizados por *Twist Bioscience* (California, EE. UU.). La secuencia del plásmido pMJ825 se obtuvo de la página web del repositorio *Addgene*.

2.2.5. Estudio de susceptibilidad a antibióticos de Gfr

En una placa de 24 pocillos se suplementó 1,3 mL de medio de crecimiento con glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) con distintas concentraciones (10 – 200 µg/L) de una variedad de antibióticos (kanamicina, estreptomicina, cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina). Cada pocillo fue inoculado con 100 µL de un precultivo de Gfr con una DO_{600 nm} de 1. La placa fue incubada con agitación a 30 °C, realizando lecturas periódicas en un lector de placas *Tecan Infinite m200 Pro* (Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de 600 nm durante 50 h.

2.2.6. Preparación de mutantes fluorescentes de Gox y Gfr

El diseño del plásmido pmCherry fue llevado a cabo utilizando el programa *SnapGene* de *GSL Biotech* (California, EE. UU.). Las minipreparaciones de ADN plasmídico (miniprep) fueron llevadas a cabo con el kit *ZR Plasmid Miniprep Classic* de *Zymo Research* (California, EE. UU.). Las reacciones de purificación de ADN obtenido a partir de la escisión de bandas de geles se llevaron a cabo con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* de *Promega* (Wisconsin, EE. UU.).

2.2.6.1. Construcción de plásmido pmCherry

La construcción del plásmido pmCherry se llevó a cabo a partir de los plásmidos pSEVA231-CRISPR y pMYMH464. Los mismos fueron digeridos con las enzimas EcoRI y BamHI. Los fragmentos de ADN necesarios para obtener la construcción deseada se obtuvieron a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes con estos fragmentos fueron escindidas del gel y posteriormente purificadas. A continuación, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos purificados del plásmido pSEVA231-CRISPR y el pMYMH464. La construcción pmCherry fue verificada por un ensayo de restricción utilizando la enzima NotI.

2.2.6.2. Transformación de Gox y Gfr competentes con el plásmido pmCherry

Se llevó a cabo la electroporación de bacterias electrocompetentes de Gox y Gfr utilizando el protocolo descrito más adelante en la sección “2.2.10.2. Transformación de Gox y Gfr electrocompetentes”. Las transformantes fueron plaqueadas en placas de medio de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L,

MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) suplementado con kanamicina 50 µg/mL e incubadas a 30 °C por 24-48 h. Los mutantes obtenidos fueron denominados Gox-mCherry y Gfr-mCherry.

2.2.7. Microscopía de Epifluorescencia

Las bacterias mutantes Gox-mCherry y Gfr-mCherry fueron fijadas utilizando el fijador *Fluoroshield* de *Sigma-Aldrich* (Misuri, EE. UU.). Las imágenes de las bacterias fluorescentes fueron llevadas a cabo utilizando un Microscopio de Epifluorescencia *Olympus IX81* de *Olympus* (Tokio, Japón), con un objetivo de 60x. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa *ImageJ* (V 1.53e) de los Institutos Nacionales de la Salud (Maryland, EE. UU.)

2.2.8. Modificación genética de Gfr por CRISPR

Los diseños de los plásmidos, las reacciones de purificación de ADN y las miniprep fueron llevadas a cabo de la misma forma que se detalló en la sección anterior “2.2.6. Preparación de mutantes fluorescentes de Gox y Gfr”. La extracción de ADN genómico de Gfr se llevó a cabo utilizando el kit *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit* de *Zymo Research* (California, EE. UU.). Los cebadores para las reacciones de PCR fueron diseñados utilizando el programa *Primer3Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y evaluados con la herramienta *OligoAnalyzer Tool* de *IDT* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Los cebadores fueron sintetizados por la empresa *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando un termociclador *SimplyAmp Thermal Cycler* de *Applied Biosystems* de *Thermo Fisher Scientific* (Massachusetts, EE. UU.). Las condiciones utilizadas para las distintas reacciones de PCR se detallan más adelante. Las reacciones de purificación de ADN obtenido a partir de reacciones de PCR o a partir de la escisión de bandas de geles se llevaron a cabo con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* de *Promega* (Wisconsin, EE. UU.).

2.2.8.1. Construcción de plásmido pCRISPR-BsaI

La construcción del plásmido pCRISPR-BsaI se llevó a cabo a partir de los plásmidos pSEVA231-CRISPR y pTWIST-CRISPR. Los mismos fueron digeridos con las enzimas Sall y Ascl. Los fragmentos de ADN necesarios para obtener la construcción deseada se obtuvieron a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes con estos fragmentos fueron escindidas del gel y posteriormente purificadas. A continuación, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos purificados del plásmido pSEVA231-CRISPR y el pTWIST-CRISPR. La construcción pCRISPR-BsaI fue verificada por un ensayo de restricción utilizando la enzima EcoRI.

2.2.8.2. Generación y clonado de guía en plásmido pCRISPR-BsaI para obtener el plásmido pCRISPR-guía

El diseño de la guía se llevó a cabo utilizando la herramienta en línea *CRISPR Design Tool* de *Synthego* (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool>). El protocolo para la generación de los oligos, su *annealing* y posterior clonado en el plásmido pCRISPR-BsaI fue tomado de los recursos informáticos del Laboratorio del Dr. Feng Zhang, disponibles en la web del repositorio *Addgene*²⁹². Los oligos fueron sintetizados por la compañía *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur). La enzima de restricción utilizada fue BsaI. El plásmido obtenido como producto final fue denominado pCRISPR-guía y su identidad fue verificada por secuenciación como se detalla más adelante en la sección “2.2.11. Secuenciación de plásmidos”.

2.2.8.3. Construcción de plásmido pMYMH464-BH5-BH3

La construcción del plásmido pMYMH464-BH5-BH3 se llevó a cabo a partir del plásmido pMYMH464 y dos fragmentos de ADN conteniendo los brazos de homología al cromosoma bacteriano de *Gfr*, obtenidos por PCR. Los fragmentos Brazo de homología 5' (BH5) y Brazo de homología 3' (BH3) fueron obtenidos con los cebadores y el ciclado detallados en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Componentes y protocolo de reacción de PCR para la amplificación de la secuencia BH5.

Cebadores			
Nombre	Secuencia	Descripción	
5_ARM_FWD	5' AGGGCCCTGCAGGATTCTGACGCGTTCCATGCT 3'	Cebador sentido para PCR de brazo de homología 5' (FWD) con sitio de corte SbfI	
5_ARM_PROM_REV	5' GTAGTACCTGCAGGGCTAGCACAATACCTAGGACTGAGCTA GCGGTCAAGGCTGTTGCGAGAAGATGAG 3'	Cebador antisentido para PCR de brazo de homología 5' + Promotor J23104 (REV) con sitio de corte SbfI	
Mezcla reactiva			
Componente		Mezcla X1 reacción (μL)	
H ₂ O		15,5	
Taq ABM (5 U/μl)		1	
Taq tampón (10X)		2,5	
Mg (25 mM)		2,5	
dNTPs (2,5 μM c/u)		0,5	
Cebador 5_ARN_FWD (10 μM)		1	
Cebador 5_ARM_PROM_REV (10 μM)		1	
ADN molde (125,1 ng/μl)		1	
Total		25	
Ciclado			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Cantidad de ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización Annealing Extensión	95	30	35
	55 o 58	30	
	72	90	
Extensión final	72	600	1

Tabla 7. Componentes y protocolo de reacción de PCR para la amplificación de la secuencia BH3.

Cebadores			
Nombre	Secuencia	Descripción	
3_Arm_FWD	5' CGTCTACTAGTCCGGTCTCATCTTCTCGC AA 3'	Cebador sentido para PCR de brazo de homología 3' (FWD) con sitio de corte SpeI	
3_Arm_REV	5' GAGCCGCGGCCGCGACCCACTTCTCTTC ACCCG 3'	Cebador antisentido para PCR de brazo de homología 3' con sitio de corte NotI	
Mezcla reactiva			
Componente		Mezcla X1 reacción (μL)	
H ₂ O		15,5	
Taq ABM (5 U/μL)		1	
Taq Tampón (10X)		2,5	
Mg (25 mM)		2,5	
dNTPs (2,5 μM c/u)		0,5	
Cebador 3_Arm_FWD (10 μM)		1	
Cebador 3_Arm_REV (10 μM)		1	
ADN molde (125,1 ng/μL)		1	
Total		25	
Ciclado			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Cantidad de ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización Annealing Extensión	95	30	35
	55 o 58	30	
	72	90	
Extensión final	72	600	1

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, para purificar estos productos se llevó a cabo la precipitación de los mismos agregando 0,1 volúmenes de NaOAc 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de EtOH absoluto. La mezcla se incubó por 16 h a -20 °C. Luego se centrifugó por 20 min a 14000 rpm y 4 °C, descartando el sobrenadante. A continuación, se agregaron 500 μL de EtOH 70% y sin resuspender se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm, nuevamente descartando el sobrenadante. El pellet obtenido se secó en termobloque a 60 °C y a continuación se agregaron 40 μL de agua libre de ADNasa.

Para el clonado de la secuencia BH5 en el plásmido pMYMH464 se llevó a cabo la digestión del plásmido y del fragmento BH5 previamente purificado con la enzima SbfI. La digestión del plásmido pMYMH464 se llevó a cabo en presencia de fosfatasa alcalina. Los resultados de la misma fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto de digestión del fragmento BH5 y el fragmento de interés del plásmido pMYMH464 (obtenido a partir de escisión del gel de agarosa) fueron purificados y posteriormente se llevó a cabo la ligación del fragmento del plásmido pMYMH464 y el fragmento BH5. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α con el producto de ligación y los controles realizados (mezcla reactiva sin T4 ligasa y mezcla reactiva sin inserto) siguiendo el protocolo descrito en la sección “2.2.10.1. Transformación de *E. coli* electrocompetentes”. Las colonias obtenidas en la placa correspondiente a la ligación fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la presencia del

fragmento BH5 utilizando las mismas condiciones de reacción detalladas en la Tabla 7, exceptuando que en vez del agregado de ADN molde se agregó una pequeña cantidad de la colonia a analizar tomada con un ansa estéril, y el tiempo de la desnaturalización inicial subió a 240 s. Se llevó a cabo una miniprep de las colonias que resultaron positivas y se verificó la identidad del producto obtenido por un ensayo de restricción con las enzimas EcoRV y NdeI, visualizando los resultados en gel de agarosa al 1%. El plásmido obtenido se denominó pMYMH464-BH5.

Para el clonado de la secuencia BH3 en el plásmido pMYMH464-BH5 se siguió un protocolo similar al anteriormente mencionado para el clonado del fragmento BH3. Se llevó a cabo la digestión del plásmido pMYMH464-BH5 y el fragmento BH3 obtenido por PCR, con las enzimas NotI y SpeI. Los resultados de la digestión del plásmido fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto de digestión del fragmento BH3 y el fragmento de interés del plásmido pMYMH464-BH5 (obtenido a partir de escisión del gel de agarosa) fueron purificados y se llevó a cabo una ligación con ambos fragmentos previamente digeridos y purificados. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α con el producto de ligación y los controles realizados (mezcla reactiva sin T4 ligasa y mezcla reactiva sin inserto) siguiendo el protocolo descrito en la sección “2.2.10.1. Transformación de *E. coli* electrocompetentes”. Las colonias obtenidas en la placa correspondiente a la ligación fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la presencia del fragmento BH3 utilizando las mismas condiciones de reacción detalladas en la Tabla 7, exceptuando que en vez del agregado de ADN molde se agregó una pequeña cantidad de la colonia a analizar tomada con un ansa estéril, y el tiempo de la desnaturalización inicial subió a 240 s. Se llevó a cabo una miniprep de las colonias que resultaron positivas y se verificó la identidad del producto obtenido por un ensayo de restricción con las enzimas HindIII y NdeI, visualizando los resultados en gel de agarosa al 1%. El plásmido obtenido se denominó pMYMH464-BH5-BH3.

2.2.8.4. Evaluación de fluorescencia de GFP en *E. coli* DH5α conteniendo pMYMH464-BH5-BH3

Se prepararon precultivos de 3 mL de *E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 en medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) suplementado con 25 µg/mL de cloranfenicol. Como control, se prepararon precultivos de *E. coli* DH5α sin el plásmido, en 3 mL de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) sin antibiótico. Los precultivos se incubaron a 37 °C y 230 rpm por 16 h. En una placa de 96 pocillos se colocaron por duplicado muestras de 200 µL de los precultivos de las bacterias *E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 y de las bacterias control *E. coli* DH5α sin plásmido. Se colocaron además muestras de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) para utilizar como blanco. Utilizando un lector de placas *CLARIOstar Plus* de *BMG LABTECH* (Ortenberg, Alemania) se llevaron a cabo medidas de fluorescencia y de DO_{600 nm}. Las medidas de fluorescencia se obtuvieron estableciendo una longitud de onda de excitación a 480-8 nm y una longitud de onda de emisión de 535-15 nm. La ganancia se estableció en 500. Las medidas de DO_{600 nm} se utilizaron para normalizar los valores obtenidos de las medidas de fluorescencia.

2.2.8.5. Construcción de plásmido pTEMPLATE

Se clonó el gen de la enzima β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina, al plásmido pMYMH464-BH5-BH3. Para ello se diseñó una PCR para obtener el fragmento de ADN conteniendo el cassette de expresión de la enzima, presente en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. El fragmento de interés fue obtenido con los cebadores y el ciclado detallados en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes y protocolo de reacción de PCR para la amplificación del cassette de expresión de la β -lactamasa a partir del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0.

Cebadores			
Nombre	Secuencia	Descripción	
AMP_FWD	5' TGAGGCGGCCGCAGACGTCAGGTGGCA CTTT 3'	Cebador sentido para PCR de gen de la enzima β -lactamasa con sitio de corte NotI	
AMP_REV	5' TGAGGCGGCCGCCTTTTCTACGGGGTCT GACG 3'	Cebador antisentido para PCR de gen de la enzima β -lactamasa con sitio de corte NotI	

Mezcla reactiva	
Componente	Mezcla X1 reacción (μL)
Agua	33,8
Phusion HF Tampón (5x)	10
Taq Phusion (2000 U/mL)	0,2
Cebador AMP_FWD (10 mM)	2
Cebador AMP_REV (10 mM)	2
dNTPs (2,5 μM c/u)	1
ADN molde	1
Total	40

Ciclado			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Cantidad de ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	8	30
Annealing	62	15	
Extensión	72	30	
Extensión final	72	600	1

El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1%. Se llevó a cabo la digestión del plásmido pMYMH464-BH5-BH3 y el fragmento conteniendo el cassette de expresión de la enzima β -lactamasa obtenido por PCR con la enzima NotI. Los resultados de la digestión del plásmido fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto de digestión del fragmento conteniendo el cassette de expresión de la β -lactamasa y el fragmento de interés del plásmido pMYMH464-BH5-BH3 (obtenido a partir de escisión del gel de agarosa) fueron purificados y posteriormente se llevó a cabo una ligación con ambos fragmentos. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α con el producto de ligación y los controles realizados (mezcla reactiva sin T4 ligasa y mezcla reactiva sin inserto) siguiendo el protocolo descrito en la sección “2.2.10.1 Transformación de *E. coli* electrocompetentes”. A partir de las colonias crecidas en la placa de bacterias transformadas con el producto de la ligación se realizó una miniprep y la identidad del producto obtenido se verificó por un ensayo de restricción

utilizando la enzima NotI, visualizando los resultados en gel de agarosa al 1%. El plásmido obtenido se denominó pTEMPLATE.

2.2.8.6. Transformación de Gfr competentes con los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE

Se llevó a cabo la electroporación de bacterias electrocompetentes de Gfr utilizando el protocolo descrito más adelante en la sección “2.2.10.2. Transformación de Gox y Gfr electrocompetentes”. Las transformantes fueron plaqueadas en placas de medio de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) suplementado con kanamicina 50 µg/mL o ampicilina 100 µg/mL e incubadas a 30 °C por 24-48 h.

2.2.9. **Preparación de bacterias electrocompetentes**

2.2.9.1. Preparación de *E. coli* electrocompetentes

Se prepararon precultivos de *E. coli* DH5α en 5 mL de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) e incubaron a 37 °C y 230 rpm por 16 h. Se inocularon 250 mL de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) con 12,5 mL de precultivo y se incubó el matraz a 37°C y 230 rpm hasta alcanzar un valor de DO_{600 nm} de 0,5. El cultivo fue enfriado en baño de hielo por 15 min. Posteriormente, el cultivo fue transferido a tubos de centrifuga de 50 mL y centrifugado a 1000 g y 4°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. Cada pellet fue lavado con 50 mL de glicerol 10% frío, posteriormente centrifugando a 1000 g y 4°C por 15 min. Se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron lavados nuevamente con 25 mL de glicerol 10% frío, posteriormente centrifugando a 1000 g y 4 °C por 20 min. Se descartó el sobrenadante. Se juntaron los pellets en un solo tubo y se realizó un lavado más con 5 mL de glicerol 10% frío. Las células fueron centrifugadas a 1000 g y 4 °C por 20 min. Se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 1 mL de glicerol 10% y se generaron alícuotas de 40 µL de la suspensión bacteriana en tubos de 1,5 mL. Las alícuotas fueron congeladas colocando los tubos en un baño de EtOH absoluto a -80 °C. Las alícuotas con las bacterias electrocompetentes fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. Todo el protocolo mencionado fue llevado a cabo en condiciones asépticas.

2.2.9.2. Preparación de Gox y Gfr electrocompetentes

Se prepararon cultivos de 5 mL de Gox o Gfr en medio de glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 16 h. Se diluyeron los cultivos al décimo (Gfr) o al quinto (Gox) en un volumen final de 25 mL de medio de glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y se colocaron en matraces de 250 mL. Los cultivos se incubaron hasta alcanzar un valor de DO_{600 nm} de entre 0,5 y 0,8. Los cultivos fueron enfriados en baño de hielo por 15 min. Posteriormente, fueron transferidos a tubos de centrifuga de 50 mL y centrifugados a 2700 g y 4 °C por 10

minutos. Se descartó el sobrenadante. Cada pellet fue lavado con 10 mL de tampón HEPES 1 mM, pH 7,0, posteriormente centrifugando a 1000 g y 4 °C por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron lavados nuevamente con 10 mL de tampón HEPES 1 mM, pH 7,0, posteriormente centrifugando a 2700 g y 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron lavados con 5 mL de glicerol 10% frío, posteriormente centrifugando a 2700 g y 4 °C por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Finalmente, los pellets se resuspendieron en 0,5 mL de glicerol 10% frío y se generaron alícuotas de 65 µL de la suspensión bacteriana en tubos de 1,5 mL. Las alícuotas fueron congeladas colocando los tubos en un baño de EtOH absoluto a -80°C. Las alícuotas con las bacterias electrocompetentes fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. Todo el protocolo mencionado fue llevado a cabo en condiciones asépticas.

2.2.10. Transformación de bacterias electrocompetentes

2.2.10.1. Transformación de *E. coli* electrocompetentes

Se mezcló un volumen correspondiente a una cantidad de ADN cercana a 1 ng con un pellet de células competentes de *E. coli* DH5α. La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0,1 cm de *Bio-Rad* (California, EE. UU.), utilizando un electroporador *MicroPulser* de *Bio-Rad* (California, EE. UU.) empleando el programa “Ec1”. Las bacterias fueron recuperadas agregando 1 mL de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) e incubadas durante 1 h a 37 °C y 230 rpm. Posteriormente, cada tubo fue centrifugado a 13000 rpm durante 15 s y se descartó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en el medio remanente y se plaqueó en una placa de LB-agar (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7,5) suplementado con kanamicina 50 µg/mL, cloranfenicol 25 µg/mL o ampicilina 100 µg/mL y se incubó a 37 °C por 24 h.

2.2.10.2. Transformación de Gox y Gfr electrocompetentes

Se mezcló un volumen correspondiente a una cantidad de ADN cercana a los 600 ng con un pellet de células competentes de Gox o Gfr. La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0,1 cm de *Bio-Rad* (California, EE. UU.), utilizando un electroporador *MicroPulser* de *Bio-Rad* (California, EE. UU.) empleando un pulso de 2,0 kV. Las bacterias fueron recuperadas agregando 1 mL de medio de glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) e incubadas a 30 °C y 200 rpm por 4 h. Posteriormente, cada tubo fue centrifugado a 13000 rpm durante 15 s y se descartó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en el medio remanente y se plaqueó en una placa de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) suplementado con kanamicina 50 µg/mL o ampicilina 100 µg/mL y se incubó a 30 °C por 24-48 h.

2.2.11. Secuenciación de plásmidos

La secuenciación del plásmido pCRISPR-guía fue llevada a cabo por la empresa *Genewiz* (Nueva Jersey, EE. UU.). El cebador utilizado para llevar a cabo las reacciones de secuenciación se observa en la Tabla 9.

Tabla 9. Cebador para secuenciación de plásmido pCRISPR-guía.

Cebador		
Nombre	Secuencia	Descripción
CRNA_Seq	5' ACTGGGTGGAGATTGACGAG 3'	Cebador sentido para secuenciación de la guía clonada en el plásmido pCRISPR-guía

2.3. Resultados y discusión

La modificación genética de las bacterias para conferirles capacidades como la fluorescencia resulta en mutantes con aplicaciones fundamentales para el estudio de estrategias biocatalíticas, como la inmovilización. La generación de dichos mutantes facilita la obtención de imágenes que permiten estudiar los intrincados sistemas y diversas arquitecturas que pueden derivar de la aplicación de este tipo de estrategias. Particularmente, el desarrollo de mutantes fluorescentes de Gox y Gfr a través de la preparación de un plásmido de expresión para una proteína fluorescente constituye un recurso de alta importancia para nuestro grupo de investigación. Este recurso permitiría profundizar más en la estructura de los preparados inmovilizados generados, facilitando la obtención de imágenes de los mismos.

Modificar la expresión génica en Gfr para reducir o eliminar por completo la producción de DHA durante la síntesis de AG daría lugar a un mutante de gran importancia industrial. Este mutante no solo presentaría potencialmente la alta capacidad de producción de AG de la cepa salvaje, sino que otorgaría sobrenadantes de reacción libres o bajos en DHA. Esto, como se mencionó anteriormente, tiene la potencialidad de facilitar el procesamiento *downstream* durante el proceso productivo del AG. Llevar a cabo esta modificación con una tecnología basada en CRISPR-Cas no solamente sería novedoso, sino que añadiría una herramienta clave para la modificación de esta y potencialmente otras cepas de *Gluconobacter*.

A continuación se presentarán los resultados obtenidos de la modificación genética de las cepas Gox y Gfr de acuerdo a los abordajes mencionados en los párrafos anteriores.

Preparación de mutantes fluorescentes de Gox y Gfr

La generación de bacterias que expresan proteínas fluorescentes tiene, como se mencionó en la introducción de este capítulo, una variedad de aplicaciones. En el caso particular de las bacterias del género *Gluconobacter*, la obtención de este tipo de mutantes posibilita la toma de imágenes que permiten estudiar su inmovilización, o incluso su interacción con otras proteínas en sistemas más complejos de cascadas biocatalíticas. Asimismo, en oportunidades la capacidad de expresar una proteína fluorescente en este género bacteriano permite su utilización como gen reportero, lo que resulta útil en ensayos de expresión de proteínas. Dado que el foco principal de esta Tesis es estudiar nuevas técnicas de inmovilización para generar biocatalizadores basados en *Gluconobacter*, el estudio de la integración de las bacterias a los distintos materiales es la principal motivación detrás de la preparación de estas mutantes.

Generalmente, la técnica preferida para la introducción de genes que codifican para proteínas fluorescentes en bacterias es a través de plásmidos. La utilización de plásmidos en estos casos resulta una técnica sencilla y que posibilita la obtención de altas cantidades de proteína fluorescente debido a que los plásmidos se presentan en

múltiples copias²⁷⁸. Es por esta razón que se seleccionó esta técnica para la generación de los mutantes fluorescentes de Gox y Gfr.

La modificación genética de organismos no modelo como las bacterias del género *Gluconobacter* es por lo general desafiante, ya que *a priori* no se cuenta con reportes de aplicación de la amplia variedad de herramientas previamente descritas para otros organismos. Inclusive, este género bacteriano ha sido en oportunidades catalogado como genéticamente recalcitrante^{148,243}, lo que implica que presenta una cierta resistencia a ser modificado genéticamente. Por estas razones, antes de comenzar con el diseño de construcciones genéticas para este tipo de bacterias, es imperativo llevar a cabo un estudio de la bibliografía disponible para una correcta selección de los recursos a utilizar.

Un análisis exhaustivo de la bibliografía relacionada con la modificación genética de bacterias del género *Gluconobacter* fue publicado por nuestro grupo de investigación en el marco de un artículo de revisión titulado “*New perspectives into Gluconobacter-catalysed biotransformations*”³⁶. Esta revisión permitió determinar los recursos genéticos más ampliamente utilizados para estas bacterias.

La selección del plásmido *backbone* se llevó a cabo considerando no solamente el origen de replicación a utilizar, sino también el gen a ser empleado como marcador de selección. Con respecto al origen de replicación, el más utilizado en *Gluconobacter* es denominado pBBR1 OriV. Este origen de replicación es originario del plásmido pBBR1 de la bacteria *Bordetella bronchiseptica*²⁹³ y requiere además de la expresión de la proteína de replicación pBBR1 Rep. Existen en la literatura diversos ejemplos de utilización de plásmidos con este origen de replicación en bacterias de la especie *G. oxydans*^{84,98,183}, a la que la cepa Gox pertenece. Para el caso de bacterias de la especie *G. frateurii*, según nuestro mejor conocimiento, no existe una gran variedad de reportes de modificación genética utilizando plásmidos con este origen de replicación para expresión de proteínas. En el año 2008, Soemphol *et al.* reportaron el uso de un plásmido con el origen de replicación pBBR1 OriV en *G. frateurii* THD32²⁹⁴. Sin embargo, existen reportes más recientes en los que se utiliza un plásmido con este origen de replicación en *Gluconobacter* sp. CHM43, una cepa que hasta poco era catalogada como *G. frateurii*^{137,236,295}. En base a estos datos se buscó trabajar con un plásmido *backbone* que contenga este origen de replicación.

Por otro lado, la elección del marcador de selección requirió encontrar un gen que confiera resistencia frente a un antibiótico al que ambas cepas salvajes, Gox y Gfr, fueran susceptibles. En el caso particular de las cepas del género *Gluconobacter*, existe una gran variabilidad en la resistencia natural que poseen frente a algunos antibióticos. Por ejemplo, Liu *et al.* estudiaron la susceptibilidad de 5 cepas distintas de *G. oxydans* a los antibióticos gentamicina, ampicilina, estreptomycin, cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina, obteniendo resultados variados entre las cepas⁸². El antibiótico kanamicina, fue en todos los casos efectivo, lo que concuerda con otros reportes de su utilización como marcador de selección con diversas especies de *G. oxydans*^{93,110,296}. Por su parte, existen reportes de la utilización de kanamicina como agente de selección en la obtención de mutantes

de *G. frateurii* THD32, utilizando sistemas de plásmidos suicidas^{294,297}. Nuevamente, también existe un reporte de la cepa *Gluconobacter* sp. CHM43 (anteriormente *G. frateurii*) en la cual se generaron mutantes a través de transformación con plásmido, utilizando como agente de selección la kanamicina¹³⁷. Tomando en cuenta estos datos se decidió seleccionar el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en el plásmido a construir.

Entre los plásmidos disponibles en el repositorio *Addgene* se encuentra el plásmido pSEVA231-CRISPR (Figura 17a), un plásmido derivado del pSEVA231, originario del repositorio SEVA (*Standard European Vector Architecture*). El origen de replicación de este plásmido es pBBR1 OriV, y adicionalmente cuenta con un cassette de expresión para el gen que codifica para la enzima aminoglicósido fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Asimismo, posee la secuencia del terminador t0 del fago lambda (BBa_K4818021), un terminador conocido y validado en bacterias²⁹⁸ que dada su ubicación en el plásmido podría aprovecharse para el cassette de expresión de la proteína fluorescente. Las características antes mencionadas hacen de este plásmido un buen candidato para ser el *backbone* de la construcción a obtener.

Por otro lado, fue necesario seleccionar una proteína fluorescente con buenas propiedades para imagenología, teniendo en cuenta el fin de la construcción a realizar. La proteína fluorescente mCherry es una de las más utilizadas en imagenología *in vivo* e *in vitro*²⁹⁹, con amplia aplicabilidad en bacterias. Esta es una proteína de 28 kDa, monomérica, fotoestable, que presenta longitudes de onda de excitación y emisión a 587 y 610 nm, respectivamente^{300,301}. Esta proteína posee además la ventaja añadida de que su coloración es visible al ojo humano, lo que facilita la detección de las transformantes que la producen. Adicionalmente, existen reportes anteriores de su expresión heteróloga en bacterias del género *Gluconobacter*^{82,110}. Debido a esto, se seleccionó esta proteína fluorescente para llevar a cabo el diseño de la construcción.

Para la generación del cassette de expresión para la proteína mCherry en *Gluconobacter* se debe llevar a cabo una cuidadosa selección tanto del promotor, como del sitio de unión al ribosoma (RBS) y el terminador a utilizar. La correcta selección de estos elementos reguladores es necesaria para que la expresión proteica sea exitosa. Dado que las bacterias de este género bacteriano no son consideradas organismos modelo, fue necesario identificar aquellos elementos de uso más frecuente, con los que se obtuvieran buenos resultados. En un trabajo de Teh *et al.*, los autores estudiaron una gran variedad de elementos reguladores para generar una “caja de herramientas” para la modificación genética de acetobacterias³⁰². Entre las construcciones genéticas descritas en este reporte se encuentra el plásmido pMYMH464 (Figura 17b), utilizado por los autores para probar la eficiencia de distintos terminadores en las acetobacterias *Gluconacetobacter xylinus* 700178, *Gluconacetobacter hansenii* 53582, y *Komagataeibacter rhaeticus* iGEM. El mismo contiene un cassette de expresión para la proteína mCherry bajo el promotor J23104, con el RBS “AAAGAGGAGAAA” (BBa_B0034), y el terminador ECK120033736, seguido de un cassette de expresión para GFP sin promotor. Según reportan los autores, todos los elementos reguladores pertenecientes al cassette de expresión de mCherry resultaron tener efectos positivos fuertes en el contexto de la

expresión proteica. Dado que el plásmido pMYMH464 se encontraba disponible en el repositorio *Addgene*, se decidió adquirirlo y construir el plásmido objetivo de este trabajo, combinando el cassette de expresión para mCherry disponible en pMYMH464 con el plásmido *backbone* pSEVA231-CRISPR. El nuevo plásmido, en adelante pmCherry, se generó a partir de la digestión de los plásmidos parentales con las enzimas EcoRI y BamHI, y la posterior ligación de las regiones de interés de cada uno (Figura 17c). Cabe destacar que debido a los sitios de restricción disponibles en ambos plásmidos, el corte con BamHI no permite escindir el cassette de expresión de mCherry completo, ya que deja por fuera su terminador. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, el terminador t0 del fago lambda disponible en el *backbone* pSEVA231-CRISPR queda ubicado correctamente para dar fin a la transcripción.

Los productos resultantes de las reacciones de digestión de los plásmidos pSEVA231-CRISPR y pMYMH464 fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (Figura 17d). El plásmido pMYMH464 tiene un peso molecular de 4601 pb. De la digestión del mismo con las enzimas EcoRI y BamHI se esperaba obtener dos bandas, una correspondiente al fragmento del cassette de expresión de mCherry con un peso de 783 pb, y otra correspondiente al resto del plásmido con un peso correspondiente de 3818 pb. Por otro lado, el plásmido pSEVA231-CRISPR tiene un peso molecular de 3368 pb. La digestión con las enzimas seleccionadas resultaría en dos bandas. Una primera banda debería presentar un peso de 3102 pb, ya que contiene el origen de replicación OriV junto a la proteína pBBR1 Rep, y un cassette de expresión para la proteína aminoglicósido fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Por otro lado, se esperaría una banda más pequeña de 266 pb, que contendría el resto del plásmido.

Los resultados obtenidos en el gel de agarosa para la digestión del plásmido pMYMH464 fueron los esperados, pudiendo observarse las bandas descritas en el párrafo anterior (Figura 17d, carril 1). Con respecto a los resultados obtenidos de la digestión del plásmido pSEVA231-CRISPR, se observa una banda que puede corresponderse con la anteriormente mencionada banda de 3102 pb, mientras que la banda de 266 pb de bases no se logra visualizar (Figura 17d, carril 2). Es posible que esta última banda no sea visible dado su tamaño más pequeño, que se corresponde además con una concentración de ADN menor. Esta baja concentración de ADN podría ser insuficiente para su correcta visualización.

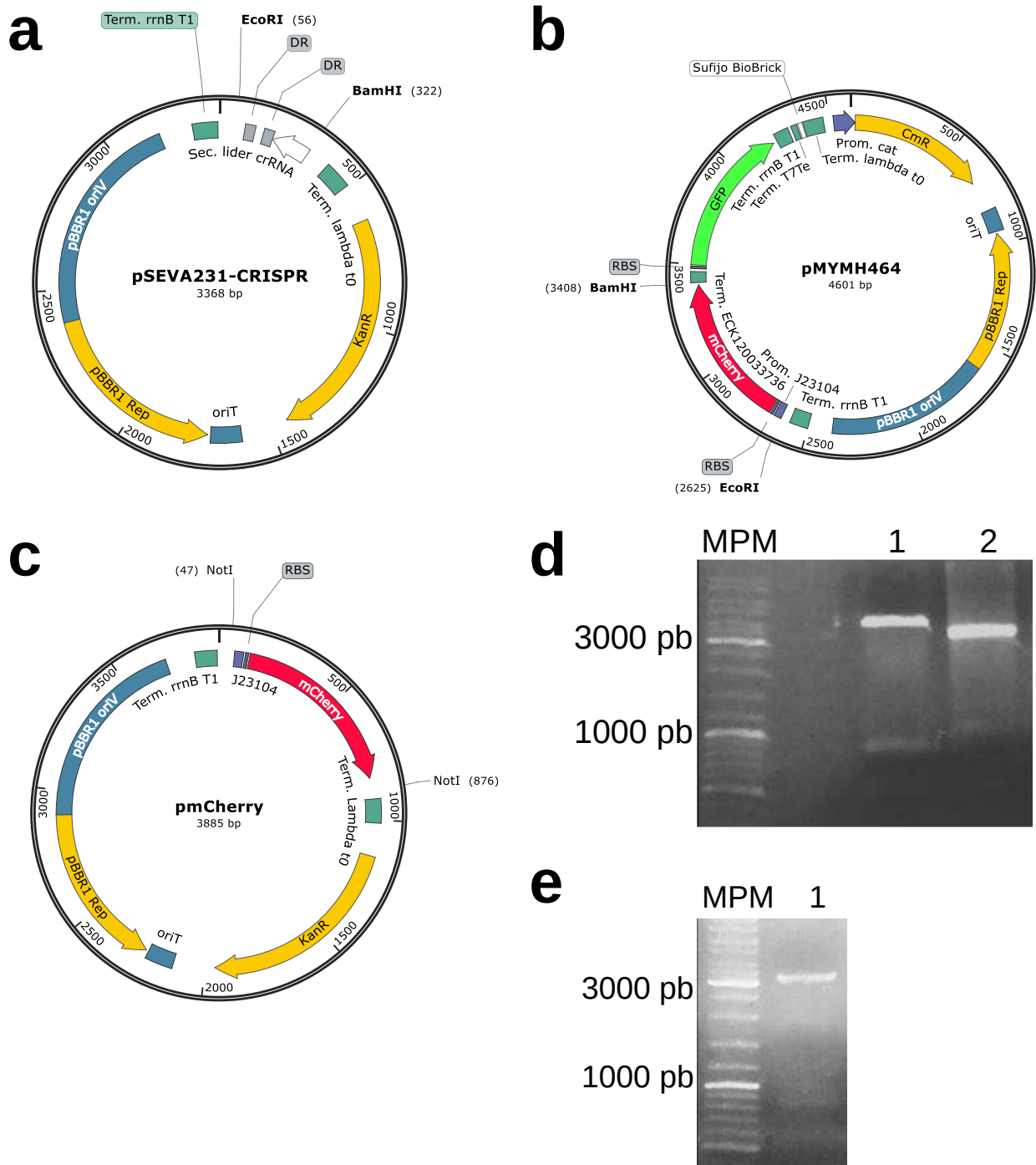


Figura 17. Construcción y verificación del plásmido pmCherry. a) Mapa del plásmido parental pSEVA231-CRISPR mostrando los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y BamHI. b) Mapa del plásmido parental pMYMH464 mostrando los sitios de restricción EcoRI y BamHI. c) Mapa del plásmido objetivo pmCherry mostrando los sitios de restricción para la enzima NotI. d) Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión de los plásmidos pMYMH464 y pSEVA231-CRISPR con las enzimas EcoRI y BamHI. MPM: Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: pMYMH464 digerido. Carril 2: pSEVA231-CRISPR digerido. e) Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión del plásmido pmCherry con la enzima NotI. MPM: Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: Plásmido pmCherry digerido.

La banda de 783 pb del carril 1 y la banda de 3102 pb del carril 2 fueron escindidas del gel, purificadas y ligadas para construir el plásmido denominado pmCherry. El producto de la ligación fue introducido mediante electroporación en bacterias *E. coli DH5α*. Se obtuvo una colonia transformante que se propagó y a partir de esto se logró obtener un plásmido mediante la realización de una miniprep. Para confirmar la identidad del plásmido obtenido se llevó a cabo un ensayo de restricción con la enzima NotI. Cabe destacar que las bacterias portadoras del plásmido obtenido presentaron una coloración rojiza, característica de la expresión de mCherry.

Se realizó una simulación *in silico* de una digestión del plásmido pmCherry con NotI. La misma indicó que una digestión en estas condiciones generaría dos bandas, ya que el plásmido diseñado posee dos sitios de corte para esta enzima que flanquean la secuencia del cassette de expresión de la proteína mCherry. Las bandas a obtener en ese caso deberían tener un peso de 871 pb, para la que contiene el cassette de expresión de mCherry, y otra de 3056 pb, que se correspondería con el resto del plásmido.

La digestión del presunto plásmido mCherry resultó en dos bandas. Una de ellas presentó mayor intensidad y un tamaño mayor a 3000 pb, pudiendo corresponderse con la banda esperada de 3056 pb (Figura 17e, carril 1). La otra banda observada fue más tenue y presentó un peso cercano a 900 pb, pudiendo corresponderse con la banda esperada de 871 pb (Figura 17e, carril 1). Nuevamente, la dificultad para visualizar la banda más pequeña puede estar asociada a su tamaño con respecto a la otra banda obtenida. El patrón de bandas observado, que se condice con el esperado para una digestión del plásmido pmCherry, junto con la obtención de bacterias *E. coli* de color rosa con resistencia a kanamicina, confirman la correcta preparación del plásmido pmCherry.

Una vez obtenido el plásmido pmCherry se procedió a llevar a cabo la transformación de bacterias electrocompetentes de Gox y Gfr. En ambos casos se logró obtener transformantes que expresaron a simple vista la proteína mCherry, con una coloración rosa fuerte que se diferencia claramente de la coloración de las cepas salvajes (Figura 18a y 18b), denominadas Gox-mCherry (Figura 18c) y Gfr-mCherry (Figura 18d). Para el caso de Gox, la cepa salvaje presenta originalmente una coloración amarillenta, mientras que para el caso de Gfr, la cepa salvaje presenta un leve tono rosa-anaranjado. Ambas cepas mutantes presentaron un crecimiento en placa semejante al de las cepas salvajes. La adquisición de la tonalidad rosa fuerte en Gfr comenzó a los 2 días de crecimiento, mientras que para Gox en placa no se observó una coloración notoria en ese tiempo. En cultivo líquido las mutantes de Gox crecieron de la misma forma que la cepa salvaje y a las 24 h de crecimiento ya presentaron el color rosa.

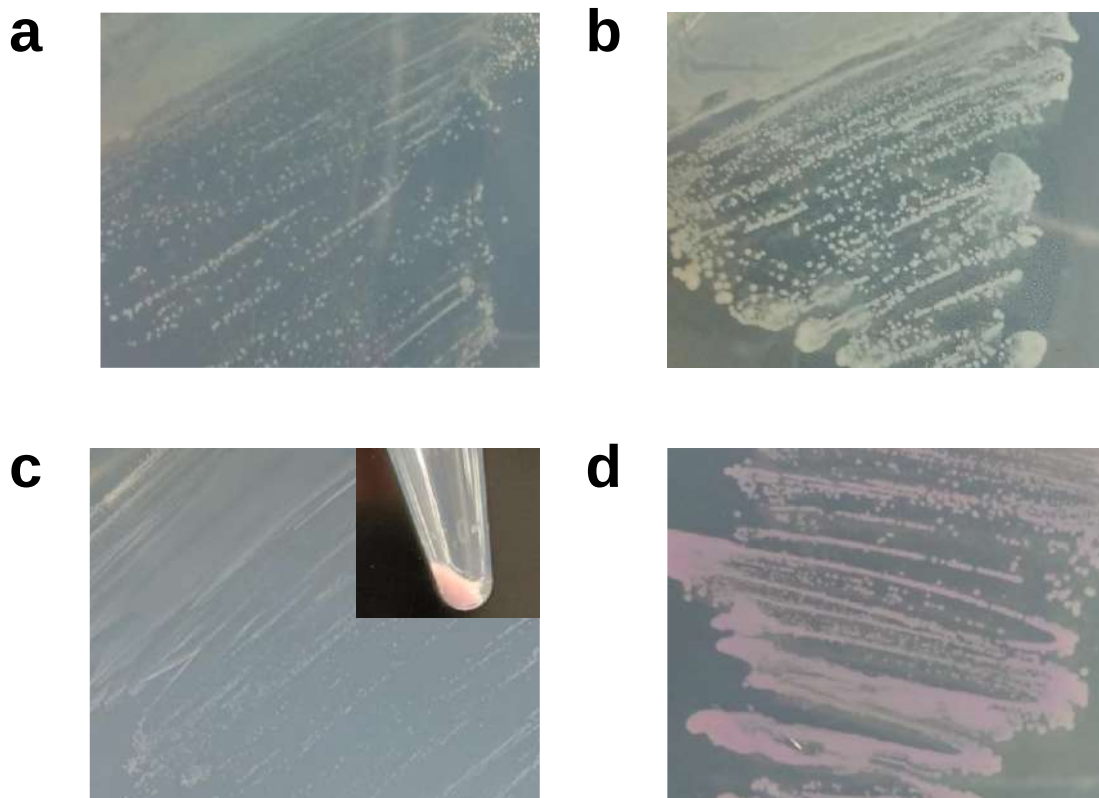


Figura 18. Imágenes macroscópicas de las cepas mutantes Gox-mCherry y Gfr-mCherry y sus pares salvajes. a) Gox salvaje. b) Gfr salvaje. c) Gox-mCherry. Recuadro: Imagen de un pellet de Gox-mCherry obtenido a partir de un cultivo líquido. d) Gfr-mCherry.

Para evaluar la potencialidad de las nuevas cepas mutantes en imagenología, se procedió a analizarlas por microscopía de epifluorescencia. Como controles, también se analizaron las cepas salvajes. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 19.

Las imágenes de campo claro revelan, en todos los casos, la morfología característica de las bacterias del género *Gluconobacter*, que se presentan como bacilos de aproximadamente 1 a 2 μm de longitud. En las imágenes obtenidas con el filtro para mCherry, se observan únicamente las bacterias productoras de la proteína mCherry, es decir, *Gox-mCherry* y *Gfr-mCherry*. Todas las imágenes, incluidas las de las cepas silvestres, fueron procesadas de manera uniforme utilizando el programa *ImageJ*. La aparición de fluorescencia solamente en las imágenes de las mutantes confirma nuevamente que la modificación genética fue exitosa y que la proteína se expresó correctamente.

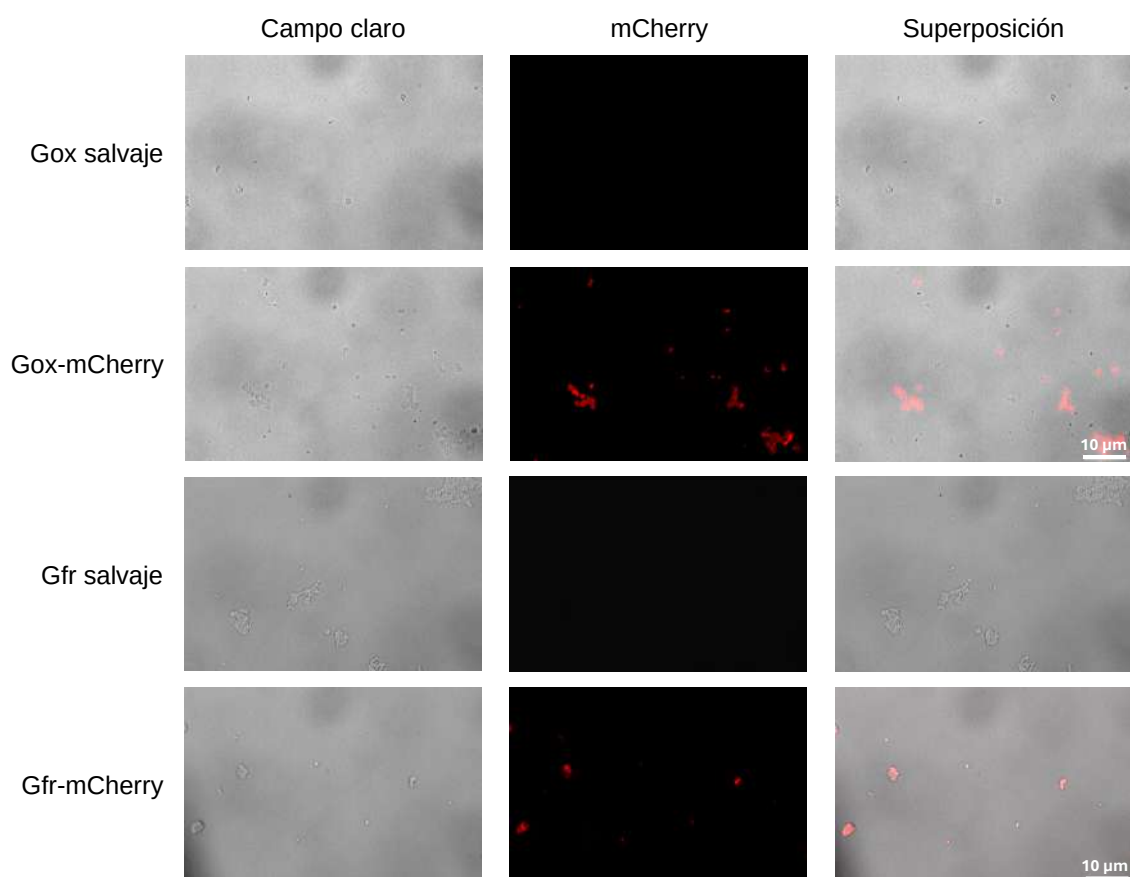


Figura 19. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia de las cepas mutantes Gox-mCherry y Gfr-mCherry y sus pares salvajes. En todos los casos la amplificación fue de 60x.

Las mutantes Gox-mCherry y Gfr-mCherry obtenidas resultaron fundamentales para el estudio de algunos de los preparados inmovilizados descritos en el siguiente capítulo de esta Tesis. Asimismo, constituyen una herramienta de alto valor para futuros estudios de inmovilización del Grupo de Tecnología de Proteínas.

Modificación genómica de Gfr utilizando una tecnología basada en CRISPR-Cas

El alto potencial de aplicación del AG y sus derivados ha sido resumido por Sato en un trabajo de revisión relativamente reciente²⁶⁸. Entre estas potenciales aplicaciones se destacan, por ejemplo, su uso como suplemento para tratar los efectos del alcohol en el organismo, o su uso como componente de productos dermatológicos o cosméticos, debido a su efecto protector sobre una línea de fibroblastos humanos. Adicionalmente, su quiralidad lo hace un compuesto relevante para aplicaciones en química fina. Sin embargo, el valor de mercado de este compuesto es aún muy elevado, por lo que la investigación sobre sus potenciales aplicaciones sigue siendo limitada. En este entendido, obtener una metodología económica y sencilla para la producción de este compuesto a escala de laboratorio resulta valioso para facilitar su investigación. Asimismo,

que el proceso pueda ser escalado a nivel industrial resultaría crucial para reducir los costos de producción, lo que aumentaría la disponibilidad del compuesto y facilitaría su utilización en diversas aplicaciones sintéticas.

En el capítulo anterior se describió un proceso de producción de este compuesto en agua, utilizando células en reposo de Gfr. Si bien en este proceso aún hay espacio de mejora, ya que los rendimientos de conversión de sustrato podrían ser incrementados, la obtención de AG en un medio limpio facilita el procesamiento *downstream* del compuesto, lo que permite disminuir los costos productivos. Sin embargo, entre las problemáticas que presenta la cepa Gfr para la obtención de AG puro, se encuentra el hecho de que la cepa también oxida el glicerol al producto alternativo DHA. Este compuesto, en el marco de una producción industrial de AG, resultaría un contaminante a retirar del medio de reacción una vez finalizado el proceso, lo que encarece los costos de purificación.

En un trabajo publicado en 2010, Habe *et al.* hacen mención de un intento de KO de la enzima mPDHP en la cepa Gfr, sin éxito³⁰³. La finalidad de este estudio era generar una cepa mutante que produzca únicamente AG a partir de glicerol, a través del silenciamiento del gen *sldBA* que codifica para mPDHP, responsable de la producción de DHA. La obtención de este mutante no solo podría mejorar las productividades de AG, ya que la totalidad del glicerol podría ser convertido a este compuesto, sino que también permitiría una producción más limpia, y por tanto económica, del mismo. Ante la imposibilidad de conseguir el mutante antes mencionado, los autores utilizaron como recurso un mutante de otra cepa de *G. frateurii*, *G. frateurii* THD32, obtenido por la tecnología de intercambio alélico utilizando un plásmido suicida. Este mutante presenta una disrupción en el gen *sldA* causada por la introducción de un gen de resistencia a kanamicina. Con este mutante, los autores reportaron una producción de AG de 89,1 g/L a lo largo de 4 días de crecimiento, sin acumulación de DHA.

En base a este reporte anterior, y considerando que la cepa Gfr es una de las mejores productoras de AG, resulta interesante llevar a cabo el KO del gen *sldBA* para generar una mutante que produzca AG como único producto desde glicerol. De esta forma se podría potencialmente superar las productividades descrita por Habe *et al.* en el reporte antes mencionado. Asimismo, se planteó utilizar la tecnología CRISPR-Cas, ya que hasta el momento existen escasos reportes de aplicación de la misma en cepas de *Gluconobacter*, y generalmente presenta una alta eficiencia de modificación genética en bacterias.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, solo existe un reporte muy reciente de modificación genómica de *Gluconobacter* utilizando una tecnología basada en CRISPR, en *G. oxydans*²⁹¹. En dicho reporte se utilizó una quimera de la nucleasa Cpf1 y la proteína nucleasa FokI debido a que sin este último dominio, la Cpf1 era incapaz de cortar el ADN del huésped. La búsqueda de alternativas más sencillas de implementación de tecnologías basadas en CRISPR en *Gluconobacter* no solo resulta pertinente, sino que es necesaria para avanzar en el desarrollo de estos importantes catalizadores de célula entera. El diseño de las estrategias de modificación a mencionar a continuación se llevó a cabo con la colaboración del grupo de investigación del Dr. Leonardo Ríos-

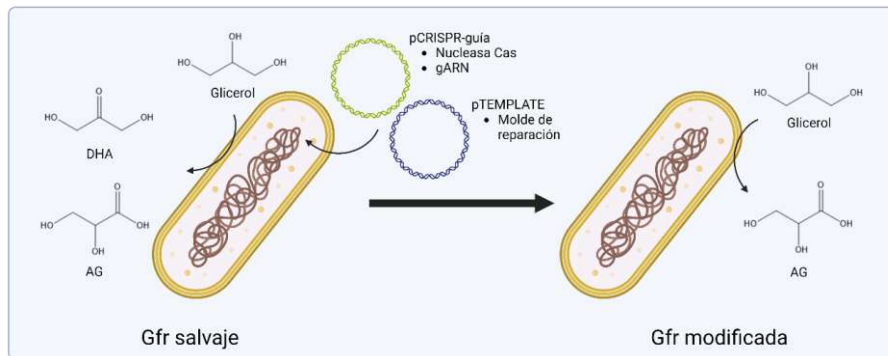
Solís, que se encontraba establecido dentro del Instituto de Bioingeniería de la Universidad de Edimburgo (Edimburgo, Escocia), lugar dónde se realizó una pasantía de investigación en el marco de esta Tesis.

Para llevar a cabo el diseño de la estrategia de KO de mPDHP, fue fundamental contar con el genoma completo de Gfr, disponible en el repositorio *Ensembl Bacteria* bajo el número de acceso GCA_000509445. En este repositorio se puede acceder a las secuencias de distintos genes, junto con su contexto genómico. Para el caso de mPDHP, tal como se mencionó anteriormente, el gen que la codifica se denomina *sldBA* y su secuencia está disponible bajo el número de acceso GAD10350. Este policistrón codifica para ambas subunidades de la enzima, la subunidad mayor en el gen *sldA* y la menor en el gen *sldB*. En el estudio anteriormente mencionado de KO a mPDHP se tuvo como blanco la secuencia del gen que codifica para la subunidad A de esta enzima³⁰³. Esta subunidad se corresponde con el dominio deshidrogenasa, sin el cual la misma pierde su actividad. En consecuencia, se seleccionó la secuencia codificante de esta subunidad como blanco para la modificación genética deseada.

El KO de un gen utilizando una tecnología basada en reparación por homología puede proceder por las tres formas mencionadas en la Introducción general de esta Tesis: a través de la delección, inserción o reemplazo de una secuencia perteneciente al gen blanco. La interrupción de la secuencia codificante del mismo con un cassette de expresión para una proteína reportera es una estrategia interesante, ya que no solo permite generar el KO del gen, sino que también puede potencialmente añadir a las bacterias una característica nueva. En el caso de Gfr, la introducción de un cassette de expresión para una proteína fluorescente en su genoma permitiría obtener otro mutante fluorescente de manipulación más sencilla, ya que no requeriría la presión selectiva de antibióticos para la expresión de la proteína.

La proteína fluorescente GFP es otra proteína reportera muy frecuentemente utilizada en bacterias, que cuenta además con antecedentes de expresión heteróloga en *Gluconobacter*^{123,279}. Esta proteína monomérica presenta un peso de 26,9 kDa y es generalmente más brillante que mCherry^{304,305}. Bajo la acción de un promotor fuerte, un cassette de expresión para esta proteína podría potencialmente generar un mutante fluorescente de Gfr con la capacidad de producir solo AG a partir de glicerol, y además presentar aplicaciones en imagenología.

Una vez seleccionada la estrategia para llevar a cabo el KO del gen *sldA*, fue necesario diseñar el protocolo para implementar el sistema de edición basado en CRISPR-Cas. En bacterias, es frecuente que la introducción de las nucleasas Cas, sus gARN asociados y los moldes de reparación sea a través de plásmidos²². Para el caso de las nucleasas Cas y los gARN se introducen cassettes de expresión, mientras que el molde de reparación se introduce como una secuencia flanqueada por brazos que presentan homología con secuencias cercanas al sitio de corte de la nucleasa. Para evitar generar construcciones muy grandes que dificulten el proceso de transformación, una opción viable es introducir los elementos anteriormente mencionados en dos plásmidos distintos. Por ejemplo, generar un primer plásmido que contenga los cassettes de expresión de la nucleasa Cas y el gARN, y un segundo plásmido que contenga el molde de reparación (Esquema 15).



Esquema 15. Estrategia de KO del gen *sldBA* en Gfr mediante la tecnología CRISPR-Cas. La introducción de los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE permite la expresión de la nucleasa Cas, que genera un corte en el ADN de la bacteria. Este corte sería reparado utilizando el molde de reparación presente en la secuencia del plásmido pTEMPLATE. Como resultado, se obtendría un mutante capaz de producir únicamente AG a partir de glicerol.

El protocolo seleccionado requirió del diseño de estos dos plásmidos, denominados pCRISPR-guía y pTEMPLATE. El plásmido pCRISPR-guía debía contener la secuencia codificante para la nucleasa Cas y el gARN. Por otro lado, el plásmido pTEMPLATE debía contener un molde de reparación para ser utilizado luego del corte de la nucleasa, que permita la interrupción del gen *sldBA*. En este caso este molde de reparación contendría brazos que presenten homología con el cromosoma bacteriano de Gfr flanqueando un cassette de expresión para GFP.

De esta forma, transformando Gfr con ambos plásmidos se podría lograr el KO de la enzima mPDHP a través de un corte en la secuencia del gen *sldBA* generado por la nucleasa Cas, guiado por el gARN diseñado para hibridar con el comienzo de la secuencia del gen. Una vez generado el corte en el ADN, se llevaría a cabo una reparación por homología utilizando como molde las secuencias homólogas presentes en el plásmido pTEMPLATE, que flanquean el cassette de expresión para la proteína GFP. Luego de la reparación, la secuencia del gen *sldBA* se vería interrumpida por el cassette de expresión de GFP, silenciando la expresión de la enzima mPDHP y permitiendo la expresión de la proteína fluorescente. Una vez determinada esta estrategia general para la modificación genética de Gfr utilizando un sistema basado en CRISPR-Cas, se debió llevar a cabo el diseño *in silico* de los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE.

Diseño *in silico* y construcción del plásmido pCRISPR-guía

Para el caso del plásmido pCRISPR-guía, se decidió obtener de forma sintética una secuencia que incluyera tanto el cassette de expresión de la nucleasa como el cassette que codifica para el gARN incluyendo sitios BsaI para el clonado de la guía. Esta secuencia fue diseñada para posteriormente ser clonada en un plásmido *backbone*, para obtener una construcción intermedia denominada pCRISPR-BsaI. Esta construcción luego se utilizó para clonar la guía y finalmente obtener el plásmido pCRISPR-guía. A continuación se presentarán las distintas etapas que se llevaron a cabo para obtener estas construcciones.

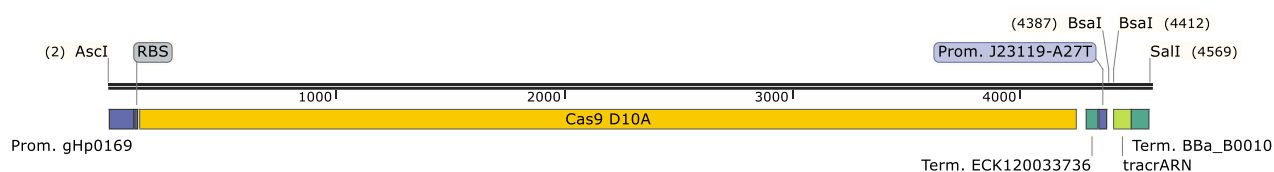
Se comenzó seleccionando la nucleasa Cas que llevaría a cabo el corte en el ADN del huésped. Dado que no existen antecedentes en la bibliografía de expresión activa de nucleasas Cas en cepas de *G. frateurii*, inicialmente se decidió seleccionar la más utilizada para modificación genómica de bacterias, Cas9²⁸⁸. Como se mencionó anteriormente en la introducción de este capítulo, es frecuente que las bacterias presenten la incapacidad de reparar CDH debido a que no presentan las vías metabólicas necesarias de forma completa, o la expresión de genes clave de estas vías es muy baja. Para determinar si Gfr presenta la capacidad de reparar este tipo de cortes, se llevó a cabo un estudio de los genes involucrados en los mecanismos de reparación de CDH en esta bacteria, utilizando la base de datos *KEGG Pathway* con el código de acceso “gfa”. En base al estudio de la bacteria modelo *E. coli*, se sabe que la vía RecBCD es esencial para la reparación de este tipo de cortes³⁰⁶. Según la información disponible en *KEGG Pathway*, la especie Gfr parece carecer de las proteínas RecB, RecC y RecD, involucradas en el comienzo de esta vía metabólica. No obstante, vale mencionar que esta especie presenta la vía metabólica RecFOR completa, que se encarga principalmente de la reparación por homología de cortes simple hebra y en ocasiones puede participar de la reparación por homología de CDH^{307,308}, pero con una muy baja eficiencia³⁰⁶.

Frente a estos hallazgos se planteó utilizar una variante de la nucleasa Cas9 con actividad nickasa, es decir, con la capacidad de cortar solo una hebra del ADN. El laboratorio de las Prof. Doudna y Charpentier ha desarrollado en el pasado mutantes de Cas9 con esta capacidad, denominadas Cas9 D10A y Cas9 H840A²⁸⁴. La mutante D10A presenta una mutación en el dominio RuvC de la Cas9, por lo que solamente genera cortes en la hebra complementaria a la guía²⁸⁴. Por otro lado, la mutante H840A presenta una mutación en el dominio HNH de Cas9, cortando solamente la hebra no complementaria a la guía²⁸⁴. La implementación de estrategias de modificación genómica empleando nickasas ha sido utilizada anteriormente con éxito en bacterias, por ejemplo en los géneros *Escherichia*³⁰⁹, *Bacillus*³¹⁰, *Clostridium*^{311,312} y *Lactobacillus*³¹³. En la mayoría de los ejemplos mencionados, la modificación se llevó a cabo empleando la nickasa Cas9 D10A. Por este motivo se seleccionó la misma para el presente trabajo.

Para el diseño del cassette de expresión de esta nickasa se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior y la revisión bibliográfica realizada por el grupo de investigación. Si bien el promotor J23104 presentó buenos resultados en Gfr, se debió seleccionar otro promotor debido a que fue no fue posible obtener por síntesis química una secuencia sintética que lo contenga. Por esa razón se seleccionó el promotor gHp0169, descrito como un promotor fuerte en cepas de *G. oxydans*^{81,98}. La secuencia de la nucleasa Cas9 D10A fue tomada del plásmido pMJ825 depositado en *Addgene* por el laboratorio de la Prof. Doudna y posteriormente optimizada para una mejor lectura de codones por la empresa *Twist Bioscience*. Debido a su probada funcionalidad en Gfr, el RBS “AAAGAGGAGAAA” utilizado en el plásmido pmCherry también fue utilizado para esta construcción. Finalmente, se seleccionó el terminador ECK120033736 para completar el cassette de expresión de la nickasa, ya que como se mencionó anteriormente, Teh *et al.* comprobaron su eficacia en acetobacterias³⁰².

El diseño del gARN a utilizar se llevó a cabo teniendo en cuenta un diseño de guía única (sgARN). Esto implica que la secuencia guía (crARN) y el ARN transactivador (tracrARN) forman parte de una misma molécula, por lo que tienen un promotor y un terminador común. Como se mencionó con anterioridad, antes de obtener el plásmido pCRISPR-guía, se buscó generar un plásmido intermedio (pCRISPR-Bsal). Esto se llevó a cabo para que el sistema diseñado pueda utilizarse en el futuro para el clonado de una variedad de guías para otras aplicaciones. En consecuencia, el diseño del cassette codificante para la guía fue diseñado con dos sitios de corte para la enzima Bsal *upstream* de una secuencia de tracrARN tomada del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2, disponible en *Addgene*. El promotor J23119-A27T y el terminador BBa_B0010 fueron seleccionados ya que presentan buen desempeño en acetobacterias, según Teh *et al.*³⁰².

Una vez diseñados los cassettes de expresión de la nickasa y la guía, los mismos fueron combinados en una misma secuencia (Esquema 16). Esta secuencia debió además ser flanqueada por sitios de restricción, para poder luego ser clonada en un vector *backbone*. Debido a los buenos resultados obtenidos en la sección anterior, el plásmido backbone seleccionado para contener la secuencia sintética con los cassettes de expresión antes mencionados fue pSEVA231-CRISPR. El plásmido otorgará a la construcción el origen de replicación pBBR1 OriV, a la vez que incorporará el gen que otorga resistencia a kanamicina.



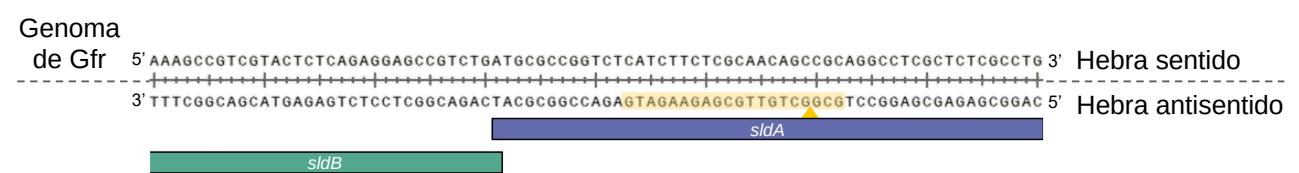
Esquema 16. Secuencia sintética diseñada conteniendo el cassette de expresión de la nickasa Cas9 D10A y un cassette de expresión para sgARN. El cassette de expresión para la nickasa Cas9 D10A posee el promotor gHp0169, el sitio de unión al ribosoma (RBS) “AAAGAGGAGAAA” y el terminador ECK120033736. El cassette de expresión para el sgARN contiene el promotor J23119-A27T y el terminador BBa_B0010 flanqueando la secuencia codificante para el sgARN. Esta secuencia contiene dos sitios de corte para la enzima Bsal que permiten el clonado de distintas guías (crARN), seguido de la secuencia que codifica para el tracrARN. La secuencia sintética presenta en su extremos 5’ y 3’ sitios de corte para las enzimas AscI y SalI, respectivamente, para su posterior clonado en el plásmido pSEVA231-CRISPR para generar el plásmido pCRISPR-Bsal. tracrARN: ARN transactivador.

Los sitios de restricción añadidos en los flancos de la secuencia fueron para las enzimas AscI y SalI, debido a que permiten su incorporación al plásmido pSEVA231-CRISPR para generar el plásmido pCRISPR-Bsal.

Seguidamente se debió diseñar la guía o crARN, que hibrida con el ADN del huésped para que la nickasa pueda realizar el corte. El diseño de la misma se debe llevar a cabo considerando la hebra a ser cortada para obtener una reparación por homología más eficiente. Por ejemplo, en un reporte de Song *et al.* los autores mencionan que la reparación por recombinación homóloga a partir de un corte simple hebra ocurre 8 veces más eficientemente si se lleva a cabo en la hebra que se transcribe (hebra antisentido) que si ocurre en la que no se transcribe (hebra

sentido)³¹³. En base a esto, considerando que la nickasa Cas9 D10A genera cortes en la hebra complementaria a la guía, la misma debió diseñarse complementaria a la hebra que se transcribe.

Para llevar a cabo el diseño de la guía se utilizó la herramienta en línea *CRISPR Design Tool* de *Synthego*. En la misma se seleccionó el genoma de la bacteria Gfr y el código del gen *sldBA* (GAD10350), y entre las opciones sugeridas por el programa se seleccionó una que hibridara con la hebra que se transcribe, y que su posición fuera cercana al comienzo de la secuencia codificante *sldA* (Esquema 17).



Esquema 17. Corte esperado para la nickasa Cas9 D10A en el genoma de Gfr. *sldB*: fragmento de gen que codifica para la subunidad II de mPDHP. *sldA*: fragmento de gen que codifica para la subunidad I de mPDHP. En amarillo se resalta la hebra de ADN con la que hibrida la guía. El corte esperado en la hebra blanco se indica con un triángulo amarillo.

Una vez seleccionada la secuencia guía se llevó a cabo el diseño de dos oligos a los que se añadieron además secuencias complementarias a los extremos cohesivos generados en la digestión del plásmido pCRISPR-BsaI por la enzima BsaI, para su posterior clonado en el plásmido (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencias de los oligos que constituyen la guía para generar el corte en el gen *sldBA* utilizando la nucleasa Cas9 D10A.

Nombre	Secuencia ^a
Oligo 1	5' AGTGCATCTTCTCGCAACAGCCGC 3'
Oligo 2	5' AAACGCGGCTGTTGCGAGAAGATG 3'

^aLas secuencias subrayadas indican las secuencias complementarias a los extremos cohesivos generados en la digestión del plásmido pCRISPR-BsaI por la enzima BsaI.

Mediante un protocolo de *annealing* y posterior clonado de los oligos en el plásmido pCRISPR-BsaI se logra obtener el plásmido pCRISPR-guía.

La construcción del plásmido intermedio pCRISPR-BsaI requirió de la digestión del plásmido pSEVA231-CRISPR (Figura 20a) y el plásmido pTWIST-CRISPR (Figura 20b) por las enzimas *AscI* y *Sall*. Este último plásmido contiene la secuencia sintética diseñada de acuerdo a lo descrito anteriormente (Esquema 16). La digestión con este par de enzimas de restricción del plásmido pSEVA231-CRISPR resultaría en dos bandas, una de 2916 pb y una segunda de 452 pb. Por otro lado, la digestión del plásmido pTWIST-CRISPR deberían liberar la secuencia diseñada que se presentaría como una banda de 4567 pb y luego una segunda banda de 2168 pb.

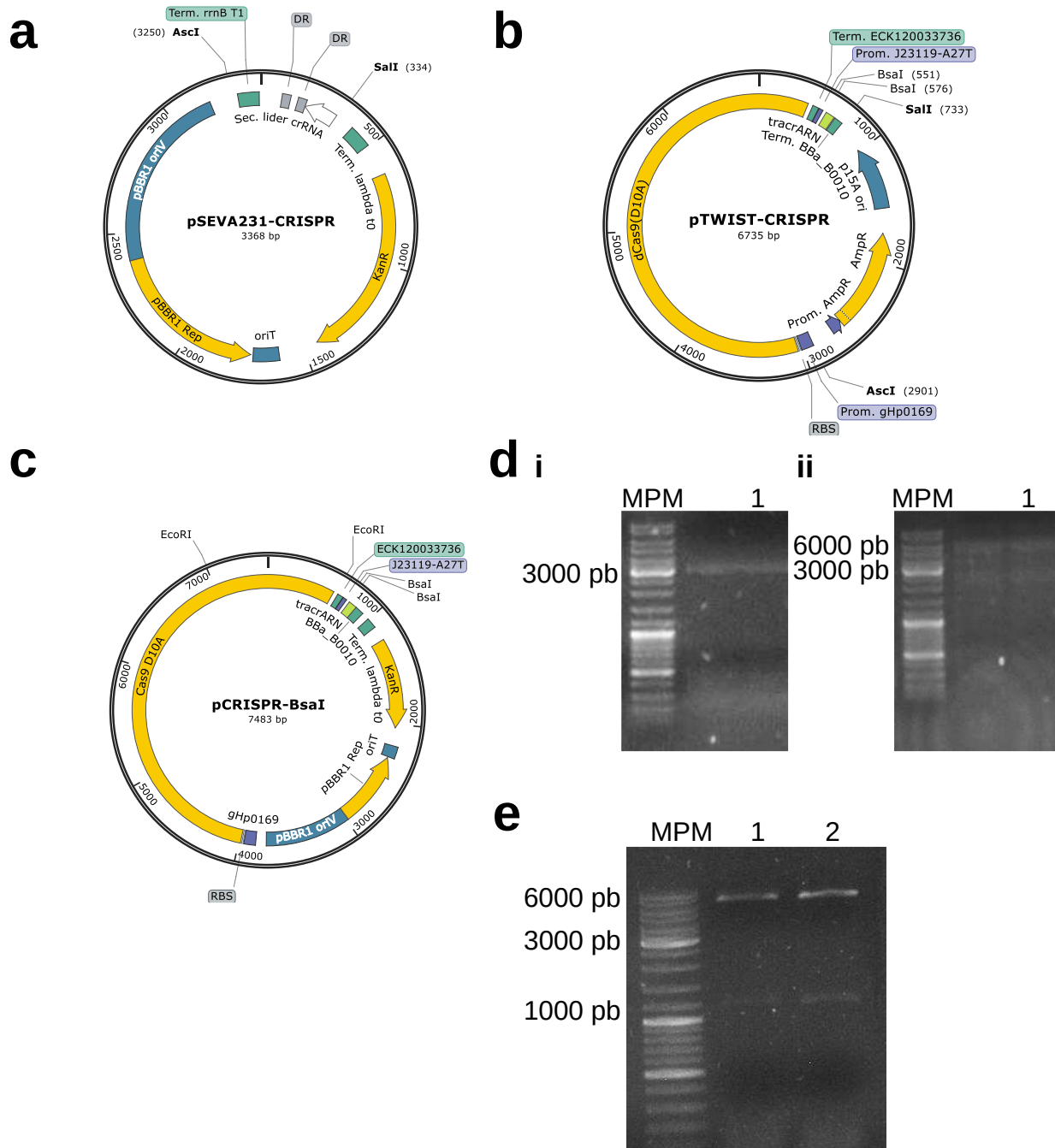


Figura 20. Construcción y verificación del plásmido pCRISPR-BsaI. a) Mapa del plásmido parental pSEVA231-CRISPR mostrando los sitios de restricción para las enzimas AscI y SalI. b) Mapa del plásmido parental pTWIST-CRISPR mostrando los sitios de restricción para las enzimas AscI y SalI. c) Mapa del plásmido objetivo pCRISPR-BsaI mostrando los sitios de restricción para EcoRI. d) Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión de los plásmidos pSEVA231-CRISPR (i) y pTWIST-CRISPR (ii) con las enzimas AscI y SalI. MPM: Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331* (*ThermoScientific*). i) Carril 1: pSEVA231-CRISPR digerido. Carril 2: pTWIST-CRISPR digerido. e) Electroforesis en gel de agarosa 1% del ensayo de restricción para identificación de construcción pCRISPR-BsaI utilizando la enzima EcoRI. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331* (*ThermoScientific*). Carril 1: Clon 2. Carril 2: Clon 1.

Los resultados obtenidos para la digestión de ambos plásmidos coincidieron con los esperados. Para el caso del pSEVA231-CRISPR (Figura 20d, i), se logró observar una banda de 2916 pb. Esta banda corresponde a la sección del plásmido que contiene el origen de replicación junto a los cassettes de expresión para la proteína de replicación y la que confiere resistencia a kanamicina. Por otro lado, la banda correspondiente a 452 pb no se logró visualizar, probablemente por su pequeño tamaño que implica una concentración más baja de ADN. La digestión del plásmido pTWIST-CRISPR presentó dos bandas (Figura 20d, ii). Una de ellas, de 4567 pb corresponde a la secuencia diseñada anteriormente, incluyendo los cassettes de expresión para la nickasa Cas9 D10A y la guía, conteniendo los sitios de restricción para BsaI. La otra banda, de 2168 pb corresponde con el resto del plásmido.

Tanto la banda de 2196 pb del plásmido *backbone* pSEVA231-CRISPR y la banda correspondiente al inserto de 4567 pb del plásmido pTWIST-CRISPR fueron escindidas del gel, purificadas y ligadas para obtener el plásmido pCRISPR-BsaI. Se transformaron bacterias DH5α con el producto de la ligación y se obtuvieron dos clones que potencialmente contenían el plásmido. Se realizaron minipreps de cultivos de esos clones y se llevó a cabo un ensayo de restricción para verificar la identidad del plásmido obtenido.

Una simulación *in silico* de la digestión de pCRISPR-BsaI con EcoRI resultó en dos bandas, una de 6370 pb y otra de 1113 pb. Los resultados obtenidos para la digestión de los plásmidos tomados de los dos clones presentaron un patrón de bandas que es consistente con el obtenido en la simulación *in silico* (Figura 20e), pudiendo concluir que se logró obtener con éxito la construcción pCRISPR-BsaI.

Luego de confirmar la identidad del plásmido pCRISPR-BsaI, se procedió a clonar en este plásmido la guía para obtener el plásmido pCRISPR-guía. Para ello se digirió el plásmido con la enzima BsaI y se llevó a cabo una ligación con los oligos previamente hibridados (Figura 21). La digestión del plásmido se llevó a cabo en presencia de una enzima fosfatasa para desfosforilar los extremos generados y así disminuir la posibilidad de religación. Por su parte, al realizar la hibridación de la guía, se añadió una kinasa con la finalidad de fosforilar el ADN doble hebra generado y permitir la ligación del mismo con el resto del plásmido.

La reacción de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5α. Se obtuvieron 13 clones, de los cuales 3 fueron seleccionados para analizar por secuenciación. En dos de los clones se observó la guía correcta (Figura A5), mientras que en uno de ellos se observó una mutación probablemente causada durante la síntesis de los oligos que la componen. El plásmido obtenido de la secuencia correspondiente al clon 3 se denominó pCRISPR-guía.

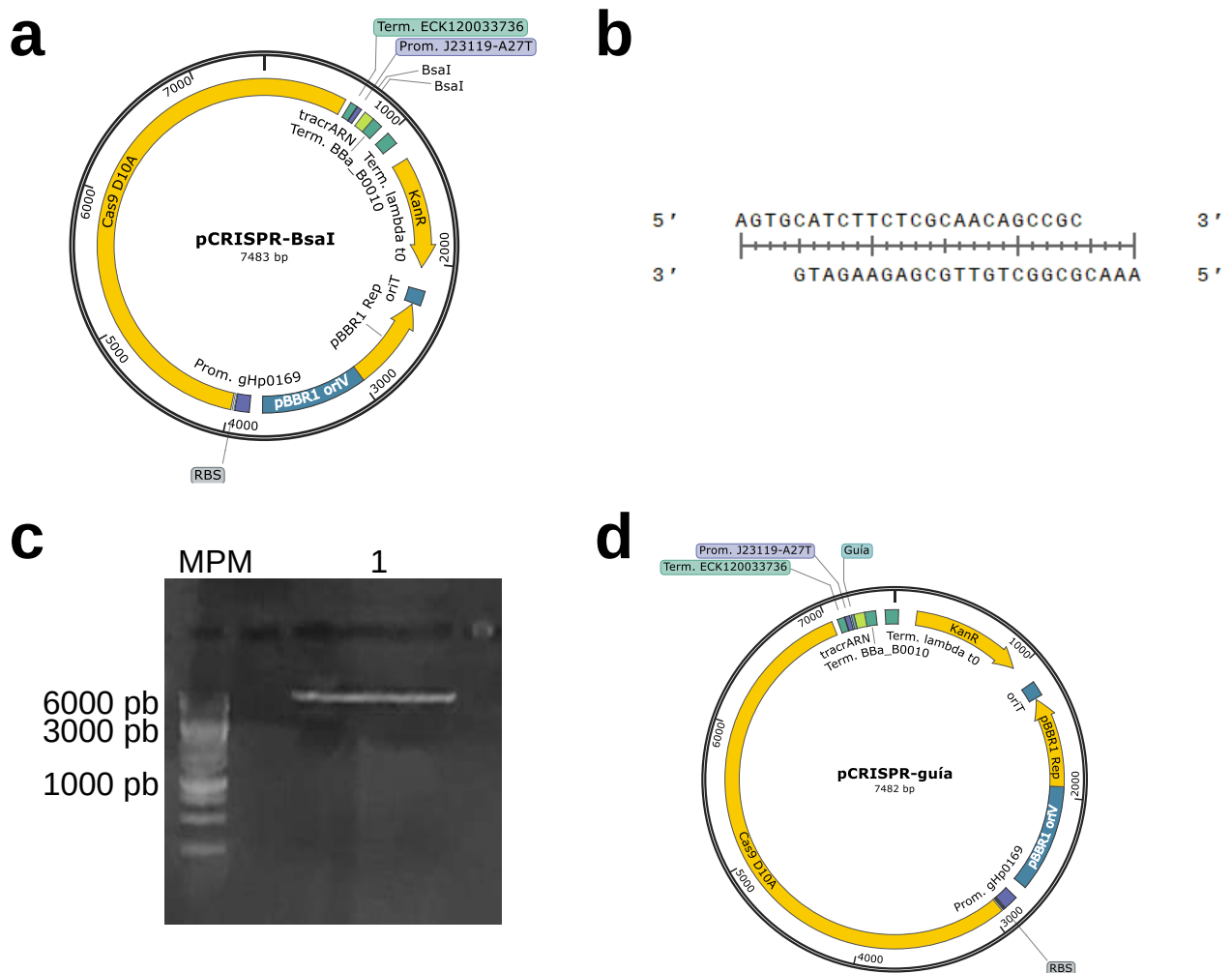


Figura 21. Construcción del plásmido pCRISPRi-guía. a) Mapa del plásmido parental pCRISPR-BsaI mostrando los sitios de restricción para la enzima BsaI. b) Oligos hibridados que componen la guía. c) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pCRISPR-BsaI digerido con la enzima BsaI. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: pCRISPR-BsaI digerido. d) Mapa del plásmido objetivo pCRISPR-guía.

Diseño *in silico* y construcción del plásmido pTEMPLATE

El diseño del plásmido pTEMPLATE requirió del desarrollo de un molde de reparación para ser utilizado por Gfr una vez se haya realizado el corte simple hebra por la nickasa Cas9 D10A. Este molde de reparación debía contener los brazos de homología a través de los cuales se llevaría a cabo la reparación homóloga, y un cassette de expresión para la proteína fluorescente GFP. Considerando que ya se contaba con el plásmido pMYMH464, que contenía un cassette de expresión para esta proteína sin promotor y con el terminador *rrnB* T1, ampliamente utilizado en bacterias, se decidió utilizarlo como plásmido *backbone* para generar el pTEMPLATE. El mismo cuenta con el origen de replicación pBBR1 OriV que permite su replicación en *Gluconobacter*, y un cassette de resistencia a cloranfenicol, que potencialmente podía ser útil para una selección de dobles transformantes de Gfr.

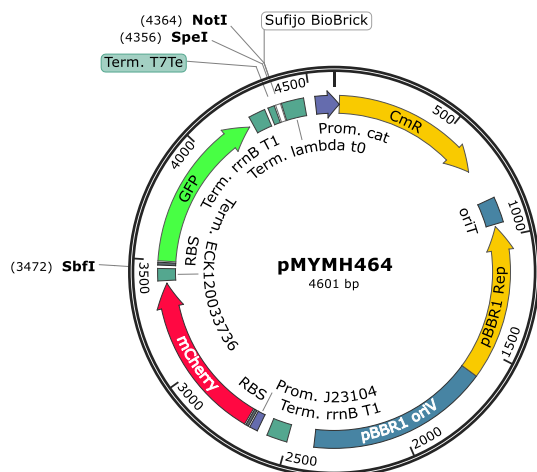
Un estudio de los sitios de restricción disponibles en el plásmido pMYMH464 demostró que era posible generar una construcción que presente el cassette de la proteína GFP flanqueado por brazos homólogos al genoma de Gfr, utilizando las enzimas de restricción SbfI, SpeI y NotI (Figura 22a). De esta forma, se pueden obtener las secuencias de los brazos homólogos a partir de reacciones de PCR utilizando como molde el genoma de Gfr (Figura 22b). Cabe mencionar que para que el cassette de la proteína GFP quede completo, se debió considerar el agregado de un promotor en el diseño de los brazos homólogos a obtener, así como también sitios de restricción para el clonado secuencial posterior de los brazos homólogos en el plásmido *backbone*.

Los brazos homólogos se diseñaron en base al contexto genómico del corte simple hebra a realizar. Para ello se recurrió nuevamente al repositorio *Ensembl Bacteria*, que facilita la búsqueda de la secuencia de un gen junto con su contexto genómico. Con respecto al tamaño de los brazos de homología a diseñar, se ha observado que brazos homólogos de un tamaño de 1 kb presentan un buen rendimiento de recombinación al utilizar nickasas para cortar el ADN del huésped^{310,312}. En ese entendido, se tomó en cuenta ese tamaño para llevar a cabo el diseño de los mismos.

Se generaron pares de cebadores para obtener dos fragmentos a partir del genoma de Gfr que se denominaron brazo de homología 5' (BH5) y brazo de homología 3' (BH3) (Figura 22b). Para el caso del fragmento BH5, a clonar *upstream* de la secuencia codificante de la proteína GFP presente en el plásmido pMYMH464, se agregaron sitios de corte para la enzima de restricción SbfI. A su vez, para el caso del cebador antisentido se agregó la secuencia del promotor J23104 ya que como se mencionó anteriormente, en el plásmido *backbone* la secuencia de la proteína GFP carece de este elemento regulador (Figura 22b, i). Para el caso del fragmento BH3, se agregaron a los cebadores diseñados para su obtención sitios de restricción para las enzimas SpeI (cebador sentido) y NotI (cebador antisentido), para su clonado en el plásmido pMYMH464 (Figura 22b, ii).

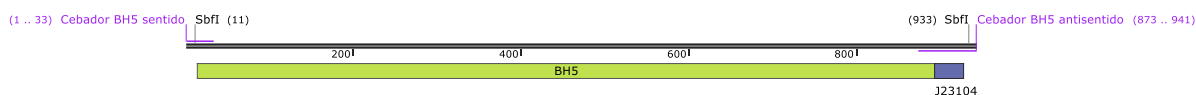
A modo de poner a punto las reacciones de PCR para obtener los brazos de homología a partir del ADN genómico de Gfr purificado, se ensayaron dos temperaturas de *annealing* distintas: 55 °C y 58 °C (Figura 22d). En ambos casos se logró obtener por PCR los fragmentos BH5 y BH3, para posteriormente ser clonados en el plásmido pMYMH464 (Figura 22a) y generar el plásmido intermedio pMYMH464-BH5-BH3 (Figura 22c).

a



b

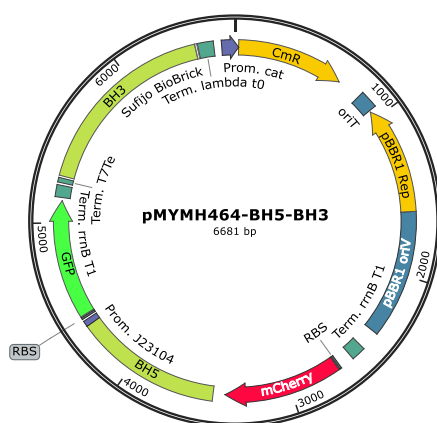
i



ii



c



d

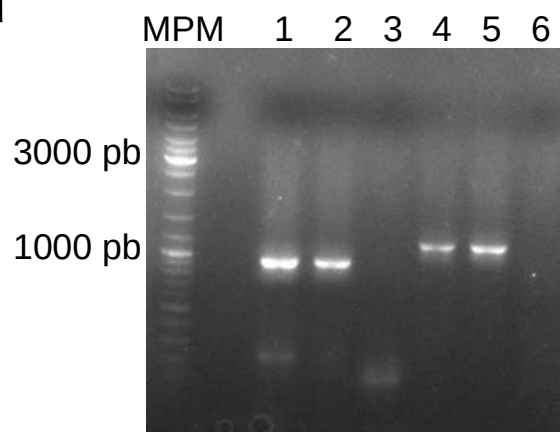
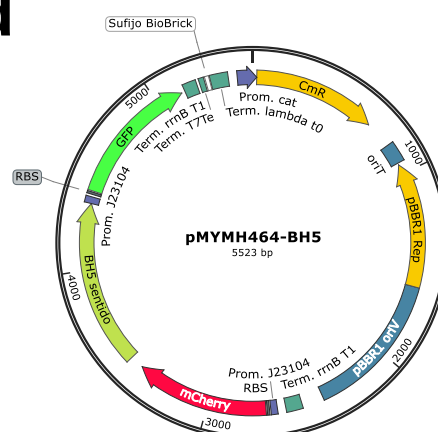
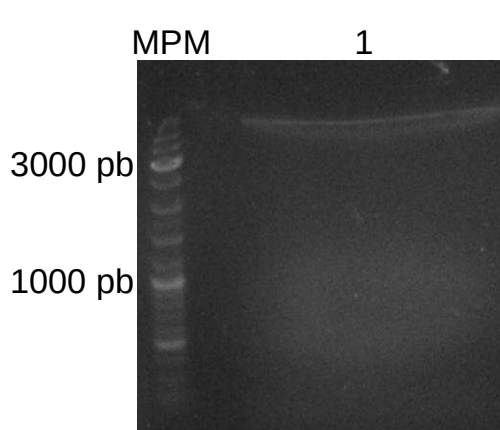
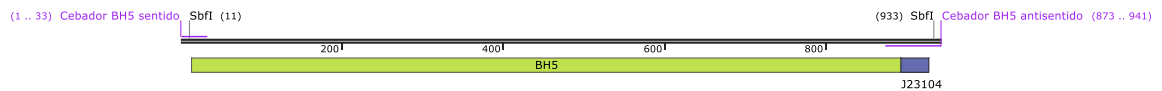
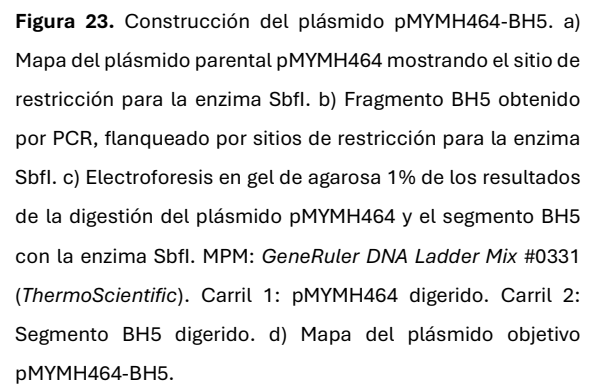


Figura 22. Diseño del plásmido pMYMH464-BH5-BH3. a) Mapa del plásmido parental pMYMH464 mostrando los sitios de restricción para las enzimas SbfI, NotI y SpeI. b) Productos de PCR a obtener, conteniendo los brazos de homología al genoma que flanquearán el cassette de expresión de la proteína GFP. i) BH5: brazo de homología 5' al cassette de GFP, incluye en su extremo 3' el promotor J23104. ii) BH3: Brazo de homología 3' al cassette de GFP. Los sitios que hibridan con los cebadores utilizados para las reacciones de PCR se muestran en violeta. c) Mapa del plásmido objetivo pMYMH464-BH5-BH3. c) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de reacción de PCR para la obtención de los brazos homólogos BH5 (flanqueado por sitios de restricción SbfI) y BH3 (flanqueado por sitios de restricción NotI y SpeI). MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331* (ThermoScientific). Carril 1: BH5, temperatura de *annealing* 55 °C. Carril 2: BH5, temperatura de *annealing* 58 °C. Carril 3: C- BH5 (sin ADN molde), temperatura de *annealing* 55 °C. Carril 4: BH3, temperatura de *annealing* 55 °C. Carril 5: BH3, temperatura de *annealing* 58 °C. Carril 6: C- BH3 (sin ADN molde), temperatura de *annealing* 55 °C.

En los carriles 1 y 2 se observa la reacción de PCR de amplificación del fragmento BH5. *In silico* se determinó que este producto de PCR tendría un peso molecular de 941 pb, lo que se corresponde con el resultado obtenido. Por

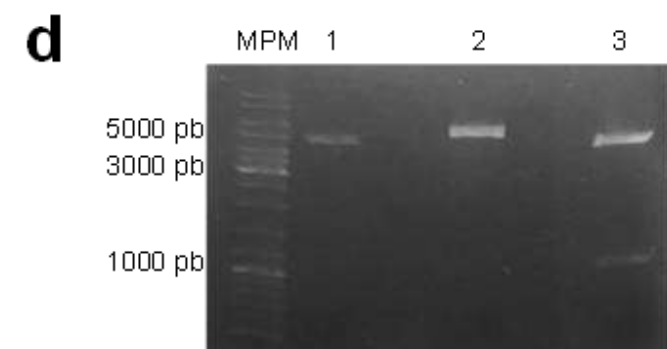
a



Se realizó una digestión *in silico* del plásmido que resultó en una sola banda de 4601 pb, mientras que la del fragmento BH5 resultó en una banda de 922 pb. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos de la digestión del plásmido y el fragmento (Figura 23c).

Se escindió la banda del plásmido pMYMH464 linealizado del gel y se purificó. La digestión del producto de PCR correspondiente al segmento BH5 también se purificó y se procedió a llevar a cabo una ligación con ambos productos. El producto obtenido de la ligación fue utilizado para transformar *E. coli* DH5α. Se obtuvieron 29 clones que potencialmente podían contener el plásmido pMYMH464-BH5 (Figura 23d). Los mismos fueron estriados en placa y crecieron exitosamente, con excepción de los clones 2 y 28.

Para detectar la presencia del inserto en el plásmido se llevó a cabo una PCR de colonia utilizando los mismos cebadores que se emplearon para obtener el inserto a partir del genoma de Gfr (Figura 24a y Figura A6). De todas las transformantes obtenidas, solo los clones 4 y 11 presentaron el fragmento B5. Cabe destacar que, dado que se utilizó una enzima sola para cortar el plásmido y el inserto, existía la posibilidad de que el inserto se hubiese ligado de la forma deseada (Figura 24b) o al revés (Figura 24c). Es de destacar que solo el inserto ligado en la dirección correcta permitiría que la construcción diseñada pudiese ser utilizada como molde de reparación luego del corte con la nickasa, por lo que era relevante determinar la dirección del inserto en los plásmidos que contenían los clones de interés. Por esta razón se llevó a cabo un ensayo de restricción de los plásmidos obtenidos a partir de los clones 4 y 11, utilizando las enzimas de restricción EcoRV y NdeI (Figura 24d). El corte con estas enzimas produce patrones diferentes para las distintas posibilidades de ensamblaje del plásmido. Para el caso de un ensamblaje correcto, se esperaba obtener dos bandas, una de 4417 pb, y otra de 1106 pb. Por el contrario, para el caso de un ensamblaje incorrecto, la digestión del plásmido daría lugar a una banda de 5139 pb y otra de 330 pb.



a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos obtenidos a partir de reacciones de PCR a partir de colonia de las potenciales transformantes del plásmido pMYMH464-B5. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix* #0331 (*ThermoScientific*). Carril 1: C+ fragmento BH5 (obtenido por PCR). Carril 2: C- (sin ADN molde). Carril 3: Clon 1. Carril 4: Clon 3. Carril 5: Clon 4. Carril 6: Clon 5. Carril 7: Clon 6. Carril 8: Clon 7. Carril 9: Clon 8. Carril 10: Clon 9. Carril 11: Clon 10. Carril 12: Clon 11. Carril 13: Clon 12. Las electroforesis correspondientes al resto de los clones analizados pueden observarse en la Figura A6.

DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific). Carril 1: Control negativo, plásmido pMYMH464. Carril 2: Clon 4. Carril 3: Clon 11.

Los resultados obtenidos constataron que el plásmido recuperado a partir del clon 11 presentaba el plásmido pMYMH464-B5 correctamente, ya que se pudo observar el patrón de bandas esperado. Este patrón incluye las bandas de 4417 pb y 1106 pb anteriormente mencionadas. Por otro lado, el clon 4 presentó el fragmento B5 integrado al revés, comprobado por la presencia de una banda de 5139 pb. Se esperaba además una banda de 330 pb que no es visible, probablemente por su pequeño tamaño y baja concentración.

Una vez obtenido el plásmido pMYMH464-BH5 (Figura 25a), se procedió a integrar el fragmento BH3 (Figura 25b) en su secuencia, para generar el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 (Figura 25c). Para ello se procedió a llevar a cabo la digestión del plásmido y del fragmento BH3 obtenido por PCR con las enzimas de restricción NotI y SpeI. Para el caso del plásmido, el mismo fue sometido a electroforesis en gel de agarosa luego de la digestión (Figura 25d), mientras que el fragmento fue purificado directamente.

La digestión *in silico* del plásmido pMYMH464-BH5 presentó dos bandas, una correspondiente a 5515 pb y una más pequeña de 8 pb. Los resultados obtenidos en el gel concuerdan con esta predicción ya que se puede observar la banda de 5515 pb, mientras que la de 8 pb es muy pequeña como para ser visualizada por esta metodología.

Se escindió la banda de 5515 pb del gel y se purificó para llevar a cabo una ligación con el fragmento BH3, también digerido y purificado. El producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5α. Se obtuvieron 40 clones que potencialmente podrían contener el plásmido pMYMH464-BH5-BH3. En este caso, dado que se usaron dos enzimas de restricción distintas, el clonado fue direccional, por lo que el inserto solo debería haberse clonado en una dirección.

a

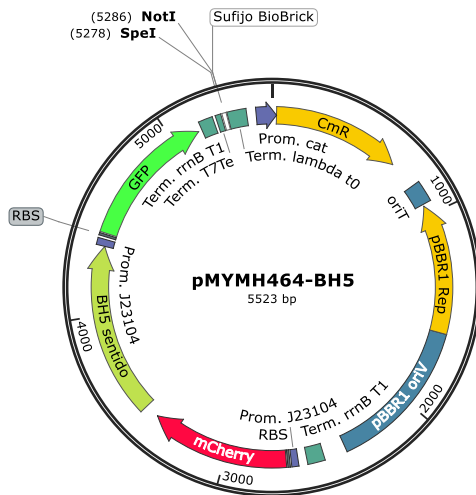
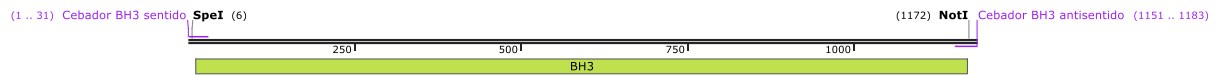
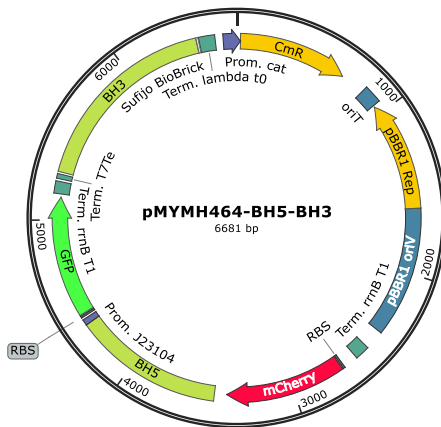


Figura 25. Construcción del plásmido pMYMH464-BH5-BH3. a) Mapa del plásmido parental pMYMH464-BH5 mostrando los sitios de restricción para las enzimas SpeI y NotI. b) Fragmento BH3 obtenido por PCR, flanqueado por sitios de restricción para las enzimas SpeI y NotI. c) Mapa del plásmido objetivo pMYMH464-BH5-BH3. d) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la digestión de pMYMH464-BH5 con las enzimas de restricción NotI y SpeI. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: pMYMH464-BH digerido.

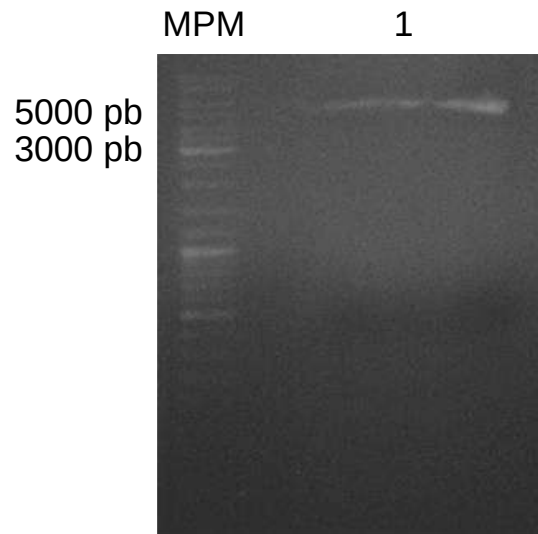
b



c



d



Debido a que se obtuvo una gran cantidad de colonias, se decidió inicialmente seleccionar 8 para evaluar la presencia del fragmento BH3 por PCR de colonia (Figura 26a). Para esto se utilizaron nuevamente los cebadores diseñados para obtener el fragmento BH3 del genoma de Gfr.

Para confirmar que el plásmido presente en los clones 1 a 3 era efectivamente pMYMH464-BH5-BH3 (Figura 26b) se llevó a cabo un ensayo de restricción con las enzimas NdeI y HindIII (Figura 26c). Se analizó también el clon 4 para evaluar si se trataba de un falso negativo. La digestión *in silico* del plásmido pMYMH464 presentó dos bandas, una de 5532 pb y otra de 1149 pb. El ensayo de restricción confirmó que los clones 1, 2 y 3 presentan el plásmido pMYMH464-BH5-BH3. Por su parte, el clon 4 se descartó como falso negativo ya que presentó un patrón de bandas distinto. El patrón obtenido para este clon se condice con el esperado para el plásmido pMYMH464-BH5, lo que puede significar que hubo una digestión parcial del mismo y la reacción de ligación estaba contaminada con plásmido cerrado o cortado con una sola enzima. Se continuó trabajando con el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 proveniente del clon 1.

Para comprobar que el cassette de expresión de GFP quedó completo y funcional al agregar el promotor J23104 a la construcción, se llevó a cabo una medida de fluorescencia de un cultivo líquido de *E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 (Figura 27). Como control también se realizaron medidas de un cultivo de *E. coli* DH5α sin el plásmido.

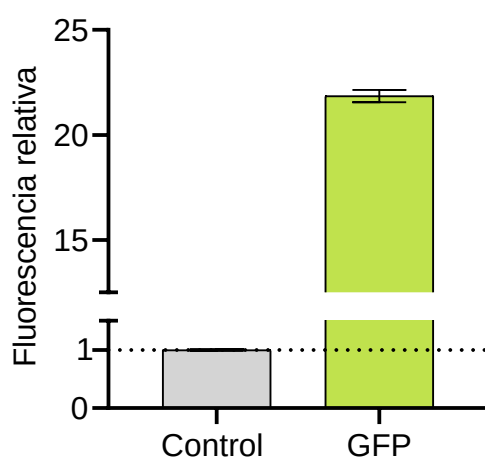


Figura 27. Medida de fluorescencia relativa de un cultivo líquido de *E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 (GFP). Control: cultivo líquido de *E. coli* DH5α sin plásmido. Datos normalizados por densidad óptica.

El cultivo líquido de *E. coli* DH5α transformado con el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 presentó una fluorescencia relativa $21,9 \pm 0,3$ veces mayor que el cultivo control, lo que indica que el cassette de GFP se encuentra funcional en la construcción.

De acuerdo con la estrategia general planteada al comienzo de esta sección, el éxito de la edición genómica de Gfr con el sistema planteado depende, entre otras cosas, de la capacidad de transformar la bacteria con los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE simultáneamente. Para facilitar la identificación de dobles transformantes, una opción frecuentemente utilizada es usar plásmidos que otorguen resistencia a diferentes antibióticos. Dado

que el plásmido pCRISPR-guía otorga resistencia a kanamicina, es necesario contar con otro marcador de selección diferente en el pTEMPLATE. El marcador de selección presente en el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 es un cassette que otorga resistencia al antibiótico cloranfenicol. Este antibiótico fue usado exitosamente por Teh *et al.* como agente de selección en otras acetobacterias a concentraciones de entre 140 y 245 µg/mL³⁰². Sin embargo, como se señaló anteriormente, las cepas de *Gluconobacter* suelen presentar resistencia a una gran variedad de antibióticos, entre ellos el cloranfenicol. De hecho, todas las cepas de Gox ensayadas por Liu *et al.* en un reporte citado anteriormente fueron resistentes a este antibiótico, con la mayoría resistiendo concentraciones de hasta 200 µg/mL⁸².

Dado que no existe información en la literatura sobre la resistencia a antibióticos de la cepa Gfr, se decidió llevar a cabo un análisis de crecimiento de la misma en distintas concentraciones de una variedad de antibióticos (Tabla 11). Los experimentos fueron realizados realizando cultivos líquidos en placa de 24 pocillos.

Tabla 11. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos para Gfr.

		Concentración (µg/mL)					
		10	25	50	100	200	245
Antibiótico	Kanamicina	-	-	-	ND	ND	ND
	Estreptomicina	-	ND	-	-	-	ND
	Ampicilina	+	ND	+	-	-	ND
	Cloranfenicol	+	ND	+	+	+	+
	Tetraciclina	+	ND	-	-	-	ND

ND: No determinado.

+: Se observa crecimiento luego de 50 h de cultivo líquido.

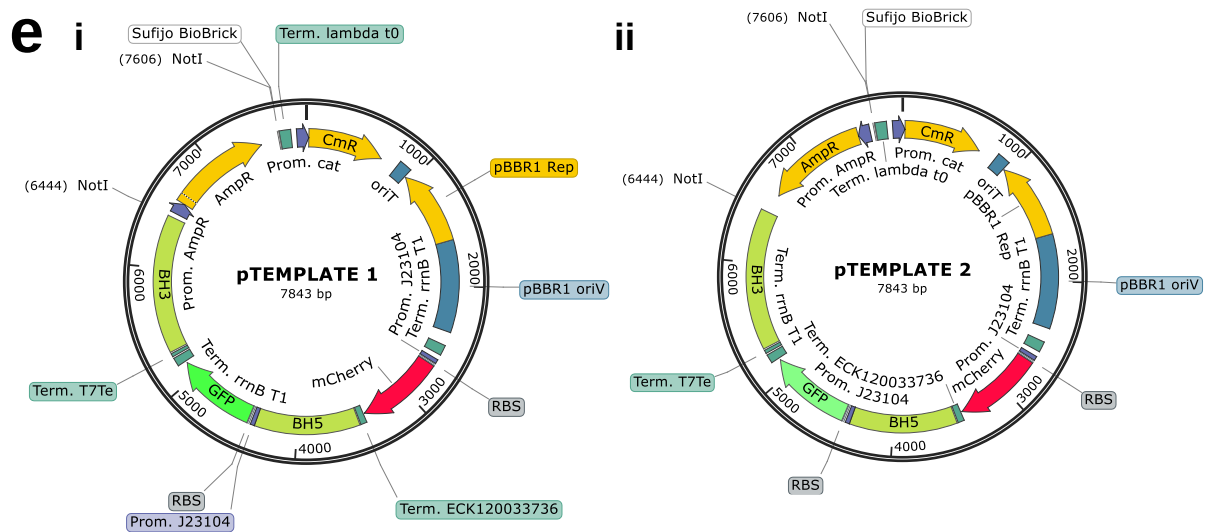
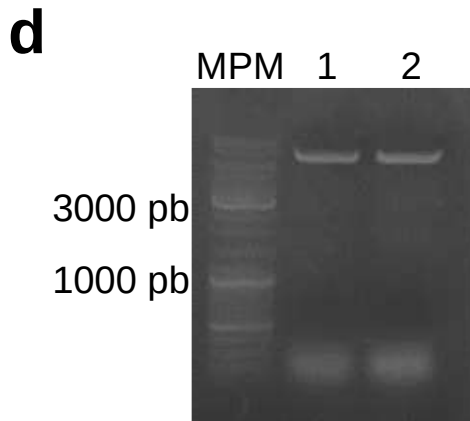
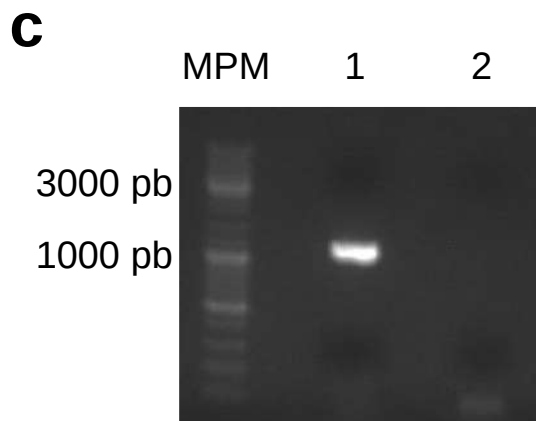
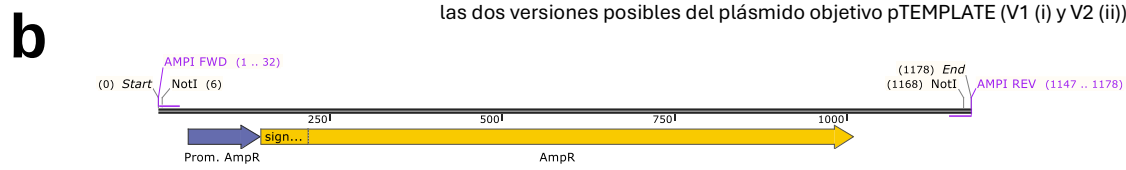
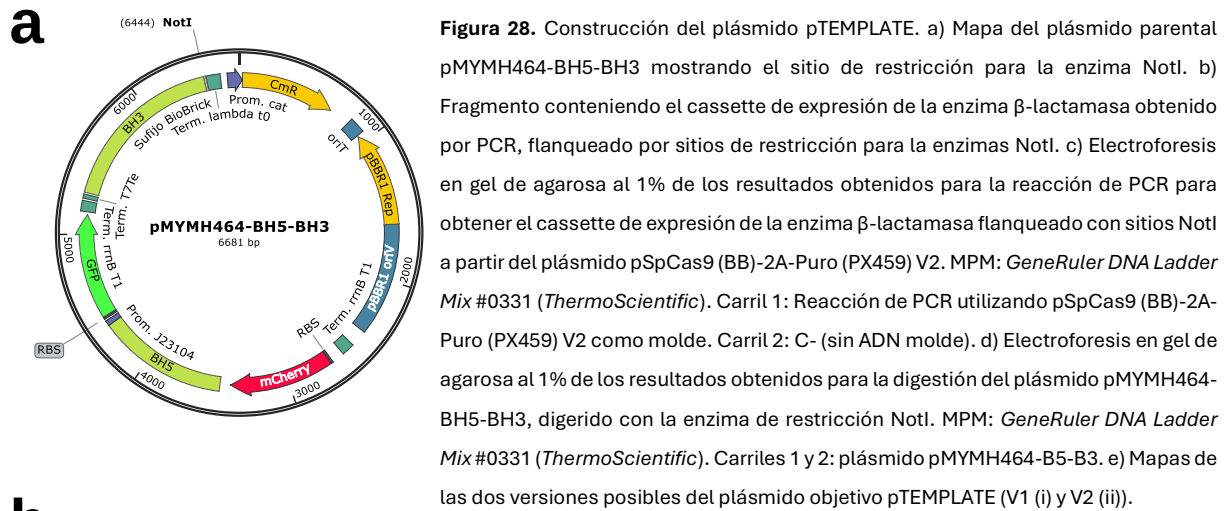
-: No se observa crecimiento luego de 50 h de cultivo líquido.

Se comprobó que Gfr no es susceptible al cloranfenicol en un rango de entre 100 y 245 µg/mL, por lo que no resulta ser la mejor opción como agente de selección. Para el caso del resto de los antibióticos ensayados se encontró al menos una concentración que impide el crecimiento de la bacteria. En el caso de la ampicilina, una concentración de 100 µg/mL no permite su proliferación. En el caso de la kanamicina y la estreptomicina, la mínima concentración inhibitoria del crecimiento encontrada fue 10 µg/mL. Finalmente, para la tetraciclina la mínima concentración inhibitoria del crecimiento fue 50 µg/mL.

En base a los resultados antes presentados y considerando que la ampicilina es un antibiótico de uso frecuente que además cuenta con antecedentes de utilización en *Gluconobacter*^{82,314} se decidió utilizarlo como agente de selección para las transformantes que presenten el plásmido pTEMPLATE.

Habiendo obtenido previamente el plásmido pMYMH464-BH5-BH3 (Figura 28a), se procedió a diseñar una PCR para obtener un fragmento de ADN conteniendo un cassette de expresión para la enzima β -lactamasa (Figura 28b). Esta enzima es la responsable de generar resistencia a ampicilina en las bacterias. En el laboratorio se contaba con el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2, que presenta un cassette de expresión para esta enzima, por lo que se seleccionó como ADN molde para obtener el fragmento deseado. En base a los sitios de restricción disponibles en el plásmido pMYMH464-BH5-BH3, se decidió que los cebadores a diseñar contuvieran sitios NotI para el posterior clonado del fragmento de ADN en el plásmido pMYMH464-BH5-BH3. Cabe destacar que al utilizar una sola enzima de restricción para el corte del plásmido, la posterior ligación del cassette de expresión para la β -lactamasa podía proceder en ambas direcciones (Figura 28e, i e ii). Sin embargo, en este caso particular, la orientación del cassette de expresión no será relevante para su función, ya que la enzima se expresará en cualquiera de las dos direcciones. Por lo tanto, ambos productos resultantes se consideran como pTEMPLATE.

Partiendo de una miniprep de pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2, se llevó a cabo una PCR con los cebadores previamente diseñados (Figura 28c). El producto de PCR esperado según una simulación *in silico* de la PCR debía presentar un tamaño de 1178 pb. El resultado observado en el gel concuerda con lo esperado ya que se logra visualizar una banda por encima de los 1000 pb. El producto de PCR fue purificado, digerido con NotI y purificado nuevamente para ser utilizado como inserto en la reacción de ligación para obtener el plásmido pTEMPLATE. El plásmido pMYMH464-BH5-BH3 fue digerido con NotI para poder llevar a cabo el clonado del cassette de expresión de la enzima β -lactamasa. De esta digestión se esperaba un producto lineal de 6681 pb. El resultado obtenido de la digestión del plásmido presentó una banda cercana a los 6000 pb que coincide con lo esperado. La banda fue escindida del gel y purificada para posteriormente llevar a cabo una ligación con el fragmento correspondiente al cassette de expresión de la β -lactamasa. El resultado de la ligación fue utilizado para transformar *E. coli* DH5 α y se obtuvieron 4 colonias en medio LB suplementado con ampicilina. A partir de las mismas se generaron estrías, de las cuales solo 2 crecieron.



Para confirmar que los clones obtenidos contenían el plásmido pTEMPLATE de acuerdo a lo esperado, se realizó un ensayo de restricción sobre los plásmidos extraídos a partir de miniprep (Figura 29). Este ensayo se llevó a cabo con la enzima de restricción NotI, ya que con la misma se podría liberar el inserto y obtener un patrón de bandas compuesto por dos bandas. Una banda debería presentar un tamaño de 1178 pb, correspondiéndose con el tamaño del inserto, y una segunda banda debería presentar un tamaño de 6681 pb, correspondiéndose con el resto del plásmido.

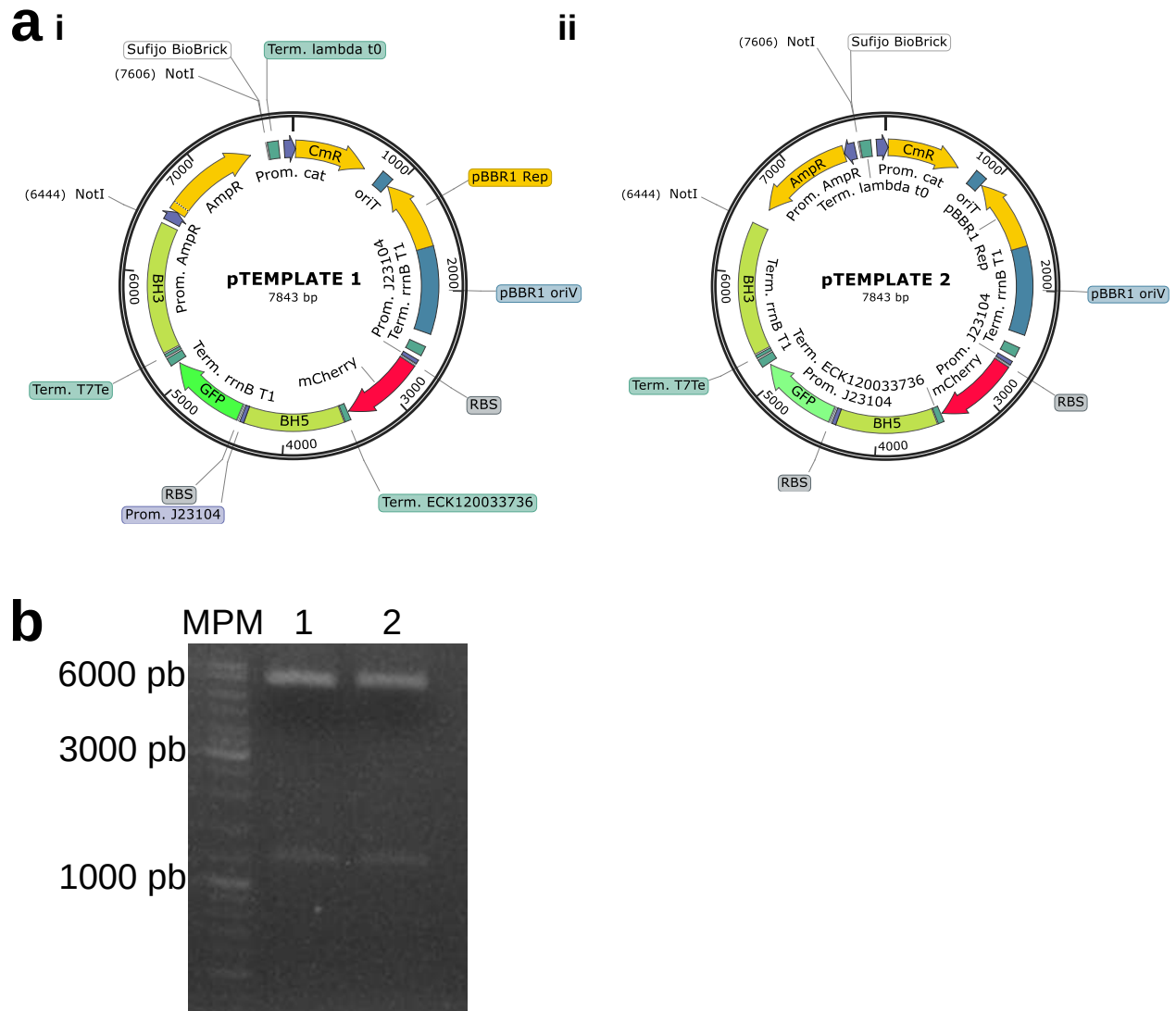


Figura 29. Verificación de la construcción del plásmido pTEMPLATE. a) Mapas de las dos versiones posibles del plásmido objetivo pTEMPLATE (V1 y V2) mostrando los sitios de restricción para la enzima NotI. b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los resultados obtenidos para el ensayo de restricción de los plásmidos obtenidos a partir de los clones 1 y 2, digeridos con la enzima de restricción NotI. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: Clon 1. Carril 2: Clon 2.

Los resultados del ensayo de restricción de los plásmidos obtenidos a partir de los clones 1 y 2 presentaron el patrón de bandas esperado. Esto, sumado a la capacidad de crecer en presencia de ampicilina de las transformantes permitió confirmar la correcta construcción del plásmido pTEMPLATE.

Transformación de Gfr con los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE

Una vez obtenidos los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE, como punto de partida se decidió llevar a cabo la transformación de Gfr electrocompetentes con los plásmidos por separado. Esto se llevó a cabo para determinar si era posible obtener transformantes de Gfr con al menos uno de los plásmidos, antes de intentar una doble transformación.

Para el caso del plásmido pCRISPR-guía, se decidió además llevar a cabo controles, electroporando Gfr con el plásmido *backbone* original (pSEVA231-CRISPR) y el plásmido intermedio pCRISPR-BsaI. Estos controles se llevaron a cabo para detectar, en caso de que no existieran transformantes que incluyan el plásmido pCRISPR-guía, si la expresión de la nickasa dCas9 D10A pudiese ser tóxica en Gfr, sola o en presencia de la guía. Luego de la transformación se logró obtener transformantes a partir de todos los plásmidos, lo que implica que es posible transformar Gfr con el plásmido pCRISPR-guía.

Para el caso del plásmido pTEMPLATE, se llevó a cabo la transformación de Gfr con el mismo, y el producto se plaqueó en placas de LB-ampicilina (100 µg/mL) de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de susceptibilidad a antibióticos. Sin embargo, tras varios intentos de transformación, no se logró obtener colonias transformantes luego de 48 horas de crecimiento. El tamaño de los plásmidos suele ser una limitante a la hora de la transformación de bacterias, generalmente presentando una eficiencia de transformación que es inversamente proporcional al tamaño del plásmido³¹⁵. El plásmido pTEMPLATE presenta una diferencia de tamaño de 361 pb con respecto al plásmido pCRISPR-guía, lo que lo hace ligeramente más grande. La eficiencia de transformación del plásmido pCRISPR-guía fue baja (~ 80 UFC/µg de plásmido), por lo que es esperable que para un plásmido más grande sea aún más baja, disminuyendo la probabilidad de obtención de transformantes. Otra posible explicación a la falta de transformantes puede estar relacionada con una expresión nula o subóptima del gen de resistencia en los transformantes generados. El nivel de resistencia que confiere un plásmido puede variar por muchos factores, como su número de copia o la fuerza del promotor del gen de resistencia. En este entendido, resulta plausible que el promotor que presenta el gen que confiere resistencia a ampicilina no sea lo suficientemente fuerte en Gfr, a diferencia de lo observado para las *E. coli* DH5α utilizadas para construir el plásmido pTEMPLATE.

Dada la imposibilidad de seleccionar transformantes de Gfr que contengan el plásmido pTEMPLATE, no fue posible llevar a cabo una doble transformación con los plásmidos del sistema CRISPR planteado. Sin embargo, existen alternativas a ser exploradas en el futuro para llevar a cabo la transformación de Gfr con las secuencias codificantes para todos los componentes del sistema. En primer lugar, teniendo en cuenta la posibilidad de que la

expresión de la β -lactamasa haya sido subóptima, se podría sustituir el promotor del cassette de expresión del gen de resistencia a ampicilina por uno con mayor fuerza en Gfr.

Por otro lado, suponiendo que la problemática está asociada al tamaño del plásmido, se podría disminuir el tamaño de pTEMPLATE a través de la eliminación de fragmentos de ADN presentes en el plásmido parental que no necesariamente presentan utilidad en la estrategia diseñada. Estos fragmentos comprenden el cassette de expresión que confiere resistencia a cloranfenicol y el cassette de expresión para la proteína mCherry. La remoción de estas secuencias del plásmido permitiría reducir su tamaño en un ~20%, lo que potencialmente podría mejorar su eficiencia de transformación.

Finalmente, se podría modificar la estrategia generando un plásmido único que incluya los cassettes de expresión de la nickasa Cas9 D10A, la guía y el molde de reparación. Adicionalmente, este diseño sólo requeriría de un marcador de selección, que de acuerdo con los resultados obtenidos podría ser kanamicina. Existen antecedentes de este tipo de diseño llevado a cabo para la modificación genética de bacterias de los géneros como *Lactobacillus* y *Clostridium*^{312,313}. Cabe destacar que, si la problemática está asociada al tamaño del plásmido, esta última opción no sería la más adecuada ya que resultaría en un plásmido de alrededor de 10 kb. Sin embargo, se podría considerar optimizar las condiciones de la electroporación o inclusive diseñar un sistema que pueda ser introducido por apareamiento triparental.

Asimismo, la exploración de otras estrategias basadas en CRISPR para el silenciamiento de *sldBA*, como CRISPRi, podrían ser implementadas para la obtención de un mutante de Gfr que produzca AG con mínima o nula acumulación de DHA. Algunos experimentos realizados con esta aproximación se presentan en la sección “Perspectivas futuras” de esta Tesis.

2.4. Conclusiones parciales

Durante este capítulo de la tesis se buscó generar mutantes de dos especies de *Gluconobacter* para distintos fines. En primer lugar, se logró exitosamente generar mutantes fluorescentes de Gfr y Gox que expresan la proteína mCherry. La obtención de estos mutantes resulta fundamental para el estudio de preparaciones inmovilizadas de los mismos. Si bien existen antecedentes en la literatura de obtención de mutantes fluorescentes de la especie *G. oxydans*, puntualmente, para la cepa Gox este constituye el primer reporte. Para el caso de Gfr, en lo mejor de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de un mutante fluorescente de esta especie bacteriana, y por ende también de la cepa Gfr. Ambos mutantes mostraron un fenotipo distinguible a simple vista de la cepa salvaje, presentando una coloración rosa fuerte característica de la proteína mCherry. Adicionalmente, se logró visualizar la fluorescencia emitida por la proteína a través de microscopía de epifluorescencia, confirmando el potencial de los mutantes obtenidos para imagenología.

Dado que el conocimiento sobre la modificación genética de especies del género *Gluconobacter* es aún limitado, los aprendizajes obtenidos sobre los distintos elementos reguladores utilizados con éxito para la expresión de la proteína mCherry son fundamentales para avanzar en la investigación sobre la modificación genética de este género bacteriano.

El intento de modificación genómica de Gfr utilizando un sistema basado en una nickasa Cas no fue fructífero. Si bien se logró construir los plásmidos pCRISPR-guía y pTEMPLATE exitosamente, no se pudo probar el funcionamiento de la estrategia diseñada por problemas de selección de transformantes asociados al plásmido pTEMPLATE. Sin embargo, se identificaron algunas falencias en el diseño de la estrategia, las cuales serán abordadas en futuros experimentos.

La aplicación de técnicas de edición genómica basadas en CRISPR para bacterias del género *Gluconobacter* es un área que se encuentra actualmente en desarrollo, presentando tan solo una publicación muy reciente como antecedente. Los resultados obtenidos durante este capítulo resultan fundamentales para continuar acercándonos hacia la obtención de una tecnología de modificación de *Gluconobacter* basada en la nickasa Cas9 D10A.

CAPÍTULO 3:

Inmovilización de cepas de *Gluconobacter* en matrices no tradicionales

CAPÍTULO 3: Inmovilización de cepas de *Gluconobacter* en matrices no tradicionales

3.1. Introducción

Antecedentes en la inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter*

La inmovilización de biocatalizadores, junto con sus ventajas y desafíos fue extensivamente discutida en la Introducción general de esta tesis. En este capítulo se buscará profundizar sobre las técnicas de inmovilización de células enteras, con especial énfasis en aquellas utilizadas para la inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter*. En el caso particular de este género bacteriano se encuentran en la literatura numerosos ejemplos de inmovilización^{96,210,316–319}, principalmente de cepas de la especie *G. oxydans* utilizadas en biotransformaciones^{140,320–322} (Tabla 12). Las estrategias y matrices de inmovilización utilizadas son diversas y serán discutidas a lo largo de esta sección, junto con las ventajas añadidas que presentan para las reacciones catalizadas por los preparados inmovilizados obtenidos.

Tabla 12. Estrategias y matrices de inmovilización utilizadas en la preparación de inmovilizados de *Gluconobacter*.

Estrategia de inmovilización	Matriz de inmovilización	Tipo de matriz	Cepa de <i>Gluconobacter</i> inmovilizada	Producto obtenido	Ref.
Adsorción	Cerámica porosa	Origen inorgánico	<i>G. oxydans</i> ZJB09113	DHA	33
	Partículas de rastrojo de maíz	Origen orgánico	<i>G. oxydans</i> ZJB16009	6-NSL	42
	RTV2	Polímero sintético	<i>G. oxydans</i> ZJB16009	6-NSL	96
Adsorción + unión covalente	Espuma de poliuretano	Polímero sintético	<i>G. oxydans</i> MTCC 904	DHA	205
					210
					323
Atrapamiento	Agar	Polímero natural	<i>G. oxydans</i> NBRC14819	DHA	324
	Agarosa	Polímero natural	<i>G. oxydans</i> NBRC14819	DHA	78
	Alginato	Polímero natural	<i>G. oxydans</i> ATCC 621	DHA	217, 206

Tabla 12. Estrategias y matrices de inmovilización utilizadas en la preparación de inmovilizados de *Gluconobacter*. (Continuación)

Estrategia de inmovilización	Matriz de inmovilización	Tipo de matriz	Cepa de <i>Gluconobacter</i> inmovilizada	Producto obtenido	Ref.
Atrapamiento	Alginato	Polímero natural	<i>G. oxydans</i> NL71	Ácido xilónico	62
	Alginato	Polímero natural	<i>G. oxydans</i> NBRC14819	DHA	58
	PVA	Polímero sintético	<i>G. oxydans</i> NCIMB 8035	Ácido fenilacético	32
	PVA + alginato	Polímero sintético + polímero natural	<i>G. oxydans</i> NL71	Ácido glicólico	140
	PVA + alginato	Polímero sintético + polímero natural	<i>G. oxydans</i> NL71	Ácido xilónico	63

Como se mencionó anteriormente, una cuidadosa selección de la estrategia y la matriz de inmovilización es esencial para el desarrollo de un biocatalizador eficiente. Con respecto a las estrategias de inmovilización para células enteras, se destaca el atrapamiento como la técnica más utilizada⁴⁷. La adsorción, encapsulación, y la unión covalente también son empleadas, aunque no tan frecuentemente⁴⁷. Por su parte, la selección de la matriz de inmovilización es sumamente importante a la hora de inmovilizar células microbianas, ya que las mismas pueden ver afectado su metabolismo. Un ejemplo pertinente es el caso de células de *G. oxydans subesp. industrius* VKM B-1280, las que se ha observado modificar su comportamiento tras la inmovilización en una matriz de poli(alcohol vinílico) reticulado con N-vinilo, autoorganizándose en grupos a través de la secreción de un material polimérico extracelular⁴⁹.

Los protocolos de inmovilización de células por atrapamiento generalmente se valen de la utilización de polímeros de origen natural como el agar, el alginato, o la agarosa; o de origen sintético como la poliacrilamida, el PVA o el poliuretano^{47,50}. La inmovilización por atrapamiento en hidrogeles naturales como agar, agarosa, y alginato es un enfoque utilizado con frecuencia para la preparación de biocatalizadores heterogéneos de *Gluconobacter*, siendo el alginato el más utilizado para este propósito (Tabla 12). Estas matrices de inmovilización son asequibles, biocompatibles, químicamente inertes y fáciles de operar, principalmente en condiciones suaves^{206,325}. Por lo general, el formato elegido para la inmovilización bacteriana en estos hidrogeles son las esferas, ya que su preparación es sencilla, escalable y rentable^{58,62}. La preparación de estos inmovilizados consiste en la mezcla de la biomasa con una solución acuosa de agar, agarosa o alginato y la posterior adición gota a gota de la mezcla resultante en una solución de CaCl₂ (para el alginato) o aceite de girasol frío (para el agar y la agarosa). Luego, las esferas resultantes se pueden separar fácilmente del líquido con un colador. Mediante estas tecnologías de inmovilización, se ha logrado obtener recientemente productos como DHA^{58,78,206,217} y el ácido xilónico⁶² con preparaciones inmovilizadas de *Gluconobacter*.

Como ejemplo de la preparación de catalizadores heterogéneos basados en *Gluconobacter* con esta tecnología, Stasiak-Róžańska *et al.* utilizaron alginato al 4% para inmovilizar no solo células enteras, sino también un extracto bacteriano preparado por disrupción por ultrasonido de *G. oxydans* ATCC 621^{206,217}. Las preparaciones inmovilizadas resultantes se emplearon con éxito para biotransformar glicerol crudo en DHA a escala de matraces. El extracto de células bacterianas inmovilizadas se utilizó durante dos ciclos de producción, obteniéndose una producción máxima de DHA de $8,9 \pm 0,03$ g/L y de $8,7 \pm 0,06$ g/L a partir de 30 g/L de glicerol crudo durante el primer y segundo ciclo de utilización, respectivamente. En un trabajo posterior, los autores compararon las capacidades de producción de DHA de células enteras y extractos bacterianos en forma libre e inmovilizada utilizando alginato al 4% como matriz ²⁰⁶. Dentro de los biocatalizadores inmovilizados, se demostró la superioridad de las células enteras inmovilizadas, ya que se obtuvo un máximo de $15,6 \pm 0,7$ g/L de DHA a partir de 50 g/L de glicerol crudo en comparación con los $5,0 \pm 0,57$ g/L obtenidos con el extracto bacteriano inmovilizado después de 96 h y $20,7 \pm 1,4$ g/L de DHA con células libres después de 96 h. Los autores discuten que la inmovilización puede dificultar el intercambio de gases entre el medio de reacción y los biocatalizadores inmovilizados, así como afectar la transferencia de masa de sustratos y productos hacia y desde el interior de las preparaciones inmovilizadas.

Recientemente nuestro grupo de investigación observó el mismo efecto después de la inmovilización de Gox en esferas de agar y agarosa, otros dos hidrogeles naturales⁷⁸. La conversión de glicerol crudo a escala de matraces disminuyó significativamente después de la inmovilización. Mientras que las células libres en reposo produjeron $36,1 \pm 0,2$ g/L de DHA, las preparaciones inmovilizadas en agar y agarosa produjeron $9,0 \pm 2,3$ g/L y $8,5 \pm 1,1$ g/L de DHA, respectivamente, en el mismo período de 20 horas. Sin embargo, se pudieron lograr conversiones cuantitativas de 50 g/L de glicerol crudo con ambas preparaciones inmovilizadas después de aproximadamente 150 h. Además, a diferencia de las células de reposo libres que no pudieron ser reutilizadas, las preparaciones inmovilizadas pudieron reutilizarse hasta 5 veces, conservando actividades residuales de alrededor del 60%, lo que demuestra la estabilización operativa proporcionada por la inmovilización.

Los preparados inmovilizados obtenidos a partir de polímeros naturales presentan frecuentemente este tipo de limitaciones en la transferencia de masa y gases. Sin embargo, este problema puede ser resuelto mediante una cuidadosa selección del reactor en el que se implementa la reacción. Por ejemplo, Hua *et al.*⁶² lograron aumentar la presión parcial de oxígeno en la bioconversión de xilosa en ácido xilónico, mejorando la disponibilidad de oxígeno, sustratos y fuentes de nitrógeno en *G. oxydans* NL71 inmovilizado en alginato al 3%. La utilización de un reactor de tipo SOS-BR, en el que se generan altas presiones de oxígeno, mejoró los rendimientos de 190,6 g/L a 292,1 g/L de ácido xilónico.

Otra aplicación interesante de las matrices de inmovilización basadas en alginato es la preparación de catalizadores heterogéneos híbridos para la implementación de cascadas catalíticas. El alginato, debido a su versatilidad, facilita la creación de este tipo de catalizadores a través de su combinación con otros materiales. Las cascadas catalíticas inmovilizadas, aunque desafiantes en su diseño ya que la tecnología tiene que contemplar

los requisitos de cada biocatalizador, tienen la ventaja de la disposición espacial proximal de los biocatalizadores que puede mejorar la tasa catalítica general. Además, como se mencionó en la Introducción general de este trabajo, estas estrategias pueden simplificar el proceso, permitiendo que la reacción se lleve a cabo en un solo recipiente, lo que elimina la necesidad de aislar y purificar los productos intermedios. Con el fin de aprovechar estas ventajas, nuestro grupo reportó la co-inmovilización de Gox y PfATA, una transaminasa de *P. fluorescens*, para la biosíntesis en un solo recipiente de serinol a partir de glicerol puro y crudo⁵⁸. PfATA se inmovilizó primero por quelación en microesferas de agarosa-IDA-Co²⁺ y el producto resultante se mezcló con un pellet bacteriano de *G. oxydans*. La mezcla resultante se incorporó a una solución de alginato al 3% y se formaron esferas. Dentro de las preparaciones híbridas, el glicerol fue oxidado a DHA por *G. oxydans* y posteriormente sometido a una aminación reductiva por PfATA en la presencia de L-alanina, para producir serinol y piruvato como subproducto. Con esta tecnología se produjeron 36 mM de serinol a partir de glicerol puro después de 44 h.

Aunque los polímeros naturales son el material más estudiado para la inmovilización bacteriana, existen una variedad de polímeros sintéticos que también pueden ser utilizados con este fin. Por ejemplo, la espuma de poliuretano es una nueva matriz de inmovilización sintética que ha sido estudiada por Dikshit *et al.* para inmovilizar *G. oxydans* MTCC 904 con el fin de obtener DHA^{204,205,210}. Esta matriz de inmovilización tiene una alta porosidad y una gran superficie que le permite obtener una alta densidad celular en un volumen relativamente pequeño. Además de tratarse de una matriz de bajo costo, el protocolo de inmovilización resulta bastante sencillo, combinando una primera etapa de adsorción de las células al material, con la posterior formación de uniones covalentes a través del entrecruzamiento con glutaraldehído³²⁴. Implementando esta tecnología Dikshit *et al.* informaron de una mejora en la producción de DHA tras combinar la inmovilización de *G. oxydans* en espuma de poliuretano con la sonicación de los medios de fermentación²⁰⁵. En el trabajo mencionado, los preparados inmovilizados fueron sonicados junto con el medio de fermentación durante la biotransformación. Se observó un aumento en el consumo de glicerol de entre 61,06 y 71,70% a diferentes concentraciones iniciales de glicerol crudo (20 – 50 g/L). Utilizando esta estrategia de inmovilización, Dikshit *et al.* también llevaron a cabo la biotransformación de glicerol crudo en DHA en modalidad *fed-batch*. En el trabajo, se probaron varias estrategias de alimentación por pulsos a escala de matraces²¹⁰. En comparación con las células en reposo y en crecimiento libres, las células inmovilizadas en espuma de poliuretano mostraron un mejor rendimiento de DHA, logrando una conversión de glicerol del 87,52% equivalente a 65,64 g/L de glicerol después de 4 pulsos de alimentación con glicerol (15 g/L).

El PVA es otro polímero sintético interesante que se puede utilizar para la inmovilización bacteriana, ya que es un hidrogel barato, no tóxico y duradero^{326,327}. Constituye una alternativa a polímeros naturales como la carragenina, el pectato y el alginato que generalmente presentan poca estabilidad mecánica, ya que es escasamente biodegradable y capaz de resistir temperaturas de hasta 55 °C y valores de pH entre 3,1 y 8,5³²⁸. Esta matriz se ha utilizado recientemente para biotransformaciones con una variedad de microorganismos, sola o combinada con otros materiales como alginato y polietilenglicol^{329–331}. Como ejemplo de aplicación en cepas de *Gluconobacter*,

Mihal' *et al.* informaron de la inmovilización de *G. oxydans* NCIMB 8035 para la producción de ácido fenilacético a partir de 2-feniletanol³². En la investigación se utilizó la tecnología *Lentikats*, que implicó la formación de hidrogeles de forma lenticular que presentan menores problemas de difusión y permiten una fácil separación de los medios de reacción debido a su diámetro³²⁸. La biotransformación se llevó a cabo en condiciones de no crecimiento, en un biorreactor de tipo *airlift*. La inmovilización en PVA demostró ser beneficiosa para las células, ya que las protegió de la muerte inducida por altas concentraciones de feniletanol. Sin embargo, se observó una disminución esperada en la tasa de transferencia de oxígeno, así como en la tasa de intercambio del sustrato y el producto hacia y desde el biocatalizador. Utilizando el biocatalizador inmovilizado se obtuvieron 7,17 g/L de ácido fenilacético, lo que representa un rendimiento del 89,8%. Los preparados inmovilizados también pudieron reutilizarse hasta tres veces manteniendo un 44% de actividad residual. Además, se demostró que los *Lentikats* pudieron ser almacenados a 6 °C en una solución tampón fosfato 1 M durante 28 días, con efectos menores en su actividad.

Al inmovilizar en PVA, es frecuente experimentar una aglomeración de las esferas obtenidas. Para evitar este fenómeno, el PVA es frecuentemente mezclado con alginato, lo que mejora sus propiedades^{38,331,332}. Hua *et al.* utilizaron recientemente esta estrategia para inmovilizar *G. oxydans* NL71 con el fin de producir ácido glicólico a partir de etilenglicol¹⁴⁰. En el trabajo, la inmovilización se llevó a cabo preparando una solución acuosa de PVA al 9% con alginato al 1-2% y mezclándola con la biomasa seca. A continuación, la mezcla se bombeó a una solución que contenía un 5% de ácido bórico y un 1% de CaCl₂, obteniendo esferas de 2-3 mm de diámetro. Después de la inmovilización, se observó una disminución en la transferencia de masa, al igual que con los hidrogeles naturales mencionados anteriormente. Una vez más, este problema se logró sortear aumentando la suplementación de oxígeno mediante la utilización de tipo SOS-BR.

Con el mismo enfoque, Zhou *et al.* prepararon esferas de PVA-alginato para inmovilizar *G. oxydans* NL71 para la producción de ácido xilónico a partir de xilosa⁶³. Nuevamente, las limitaciones de transferencia de gas y masa fueron disminuidas a partir de la utilización de un reactor de tipo SOS-BR. Se ensayó el uso repetido de este preparado inmovilizado en ciclos de 28 horas iniciados con 200 g/L de xilosa, obteniéndose aproximadamente 1,6 kg de ácido xilónico después de ocho ciclos. Además, las esferas pudieron ser utilizadas en un sistema continuo que incorporó electrodiálisis de membrana bipolar para la obtención de ácido xilónico en lugar de su sal de sodio. Con este enfoque, se acumularon 329,2 ± 7,2 g/L de ácido xilónico después de 48 h.

Como último ejemplo de la utilización de un polímero sintético para la inmovilización de *cepas de Gluconobacter*, se ha utilizado recientemente un tipo de material de silicona de dos componentes llamado RTV2, para inmovilizar *G. oxydans* ZJB16009 para la producción de 6-NSL⁹⁶. El proceso de inmovilización requirió de la preparación de cubos de RTV2 mediante un proceso de varios pasos que comenzó con la mezcla del material con NaCl y carbón activado. A continuación, la mezcla se pasó por un tamiz de malla 80 y, después de una agitación de 10 minutos, se dejó reposar para permitir la solidificación. Posteriormente, se cortaron partículas cúbicas de 2 mm de lado y

se lavaron en un baño de agua a presión a 121 °C. A continuación, los cubos se incubaron en H₂SO₄ 1 mM durante una hora, y posteriormente se lavaron con agua. Después de empacar un biorreactor de columna de burbujas con las partículas resultantes, el biorreactor se esterilizó y se llenó con medio de crecimiento estéril. La inmovilización bacteriana se llevó a cabo inoculando el medio y cultivando el sistema durante 24 h a 30 °C. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los cubos con agua estéril. Utilizando este protocolo, se estima que se cargaron 4,0 g/L de peso seco de células en el biorreactor. Las células bacterianas pudieron reutilizarse hasta nueve veces en ciclos de 36 horas de producción de 6-NSL, con un ciclo de regeneración *in situ* de 12 horas cada 3 ciclos de producción. Se logró obtener un promedio de 42,6 g/L de 6-NSL (83,1% de tasa de conversión) en cada ciclo.

Existen además otras alternativas de matrices orgánicas para la inmovilización bacteriana, como puede ser la utilización de residuos agrícolas como el rastrojo de maíz. Hu *et al.* inmovilizaron células de *G. oxydans* ZJB16009 en partículas de este residuo para la producción de 6-NSL⁴². La estrategia de inmovilización consistió en la adsorción celular al material lignocelulósico, con un protocolo similar al comentado anteriormente para la inmovilización por RTV2. Como el bagazo de rastrojo de maíz es un residuo de la producción de maíz, es una materia prima barata para utilizar como matriz de inmovilización, lo que permite contribuir a la obtención de procesos industriales más verdes y económicos⁴¹. En estas condiciones, los preparados inmovilizados pudieron ser reutilizados hasta 4 veces, manteniendo una actividad residual por encima del 70%. Después de 4 ciclos, se logró una producción promedio de $44,2 \pm 1,5$ g/L de 6-NSL por ciclo, lo que corresponde a una tasa de conversión de $88,4 \pm 2,0\%$.

Varias matrices inorgánicas también han demostrado ser adecuadas para la inmovilización de *Gluconobacter*. A modo de ejemplo, Hu *et al.* utilizaron cerámica porosa para inmovilizar *G. oxydans* ZJB09113 con la finalidad de obtener DHA a partir de glicerol en un reactor de columna de burbujas³³. Se ensayaron tres cerámicas porosas diferentes, con tamaños de poro de 30, 40 y 50 µm, logrando una producción máxima de DHA utilizando cerámicas con poros de 40 µm. Con esta estrategia se inmovilizaron aproximadamente 4,8 g/L de células. Se probaron varias tasas de aireación, observando que a 1,2 vvm se obtuvieron las mayores conversiones. Los autores discuten que la tasa de aireación óptima para las células libres en reposo fue mayor que la obtenida para las células inmovilizadas. Esta es una ventaja de la inmovilización bacteriana en cerámicas porosas, ya que la dispersión de gases se ve beneficiada, extendiendo así el tiempo de residencia del aire en el biorreactor de columna de burbujas. La producción de DHA se estudió en condiciones optimizadas con diferentes estrategias de alimentación con glicerol y urea. La alimentación continua de una solución de glicerol y urea logró la mayor concentración de DHA ($177,2 \pm 6,8$ g/L). En estas condiciones, las células inmovilizadas pudieron reutilizarse hasta 12 veces, con una producción media de $96,4 \pm 4,1$ g/L por ciclo, lo que se traduce en una tasa de conversión del $94,8 \pm 2,2\%$.

Un análisis en profundidad de la literatura sobre la inmovilización de *cepas de Gluconobacter* demuestra claramente las notables ventajas de esta tecnología para las reacciones catalizadas por estas bacterias. La mejora

de la estabilidad operativa y la facilitación del procesamiento posterior a través de una separación más fácil de los medios de reacción del biocatalizador son las ventajas más comunes, aunque se han descrito mejoras distintivas para reacciones específicas. Si bien la naturaleza de la matriz de inmovilización no parece desempeñar un papel importante en los beneficios proporcionados por la heterogeneización de estas bacterias hasta ahora, los soportes naturales obtenidos a partir de residuos industriales pueden resultar ventajosos en el futuro, cuando se realicen análisis más exhaustivos de la sostenibilidad de los procesos. Por otro lado, dado que la mayoría de los reportes utilizan como matrices de inmovilización hidrogeles de origen natural como el alginato, existen limitantes en la reusabilidad de los preparados obtenidos asociadas a la baja resistencia mecánica del material. El desarrollo de matrices más resistentes que soporten una reutilización sostenida es necesario para facilitar la implementación de procesos industriales con células inmovilizadas de este género bacteriano.

Otro desafío común que aún no ha sido completamente resuelto en la inmovilización de cepas de *Gluconobacter* está asociado a la naturaleza aeróbica estricta inherente de estas bacterias. Este reto hace avanzar la investigación en el campo hacia soluciones tecnológicas que mejoren las limitaciones de la transferencia de oxígeno. En ese entendido, la aplicación de preparaciones inmovilizadas que retengan con éxito las bacterias a través de interacciones entre la membrana externa y una matriz inerte altamente porosa pueden ser ideales para un suministro óptimo de oxígeno a las bacterias durante la catálisis. El desarrollo de soportes obtenidos por impresión 3D es por ejemplo una alternativa interesante para la obtención de este tipo de preparados inmovilizados. Asimismo, el desarrollo de preparaciones inmovilizadas del tipo “célula única” que constituyan la encapsulación de estas bacterias puede ayudar a disminuir significativamente las restricciones difusionales experimentadas por el oxígeno en las matrices de inmovilización tradicionales.

En la siguiente sección de esta introducción se buscará profundizar en algunas de estas estrategias de inmovilización emergentes, sus ventajas asociadas, y su posibilidad de implementación en bacterias del género *Gluconobacter*.

Nuevas estrategias de inmovilización y su potencialidad de aplicación en biotransformaciones catalizadas por *Gluconobacter*

Como se logró evidenciar en la sección anterior, la mayoría de los reportes actuales de inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter* recurren a estrategias de inmovilización tradicionales, la mayoría de ellos a hidrogeles naturales. Este tipo de matrices, aunque ventajosas desde el punto de vista económico y práctico, presentan limitaciones asociadas a su baja estabilidad mecánica y a dificultades en la transferencia de oxígeno que limitan su implementación en procesos industriales.

En los últimos años han surgido alternativas novedosas para la inmovilización de microorganismos que presentan un gran potencial para la inmovilización de *Gluconobacter*, pero que aún no han sido exploradas en profundidad. Estas nuevas estrategias poseen características que podrían mejorar la estabilidad de los preparados, disminuir

los problemas asociados a restricciones difusionales e incluso conferir a los microorganismos nuevas cualidades, mejorando su potencial como biocatalizadores. En particular, en este trabajo de Tesis se hará énfasis en tres tecnologías innovadoras: la utilización de materiales híbridos como soportes de inmovilización, la preparación de soportes de inmovilización a través de impresión 3D, y la inmovilización de célula única a través de la incorporación de materiales a la superficie microbiana.

Inmovilización en soportes obtenidos a partir de materiales híbridos

Recientemente, el uso de materiales híbridos combinados para distintos fines ha abierto un sinfín de posibilidades, en las que cada uno de los materiales añade ventajas al material final³³³⁻³³⁶. Estos materiales mejorados pueden tener aplicaciones diversas, entre ellas funcionar como matrices de inmovilización de biocatalizadores. En particular, el alginato es la matriz más utilizada para la inmovilización de *Gluconobacter*, otorgando preparados activos, de fácil obtención, pero que presentan limitantes desde el punto de vista de su estabilidad operacional. En este entendido, la mejora de las propiedades físicas del alginato mediante la preparación de materiales híbridos más estables y altamente reutilizables resulta de interés para la obtención de inmovilizados basados en *Gluconobacter*.

Entre las distintas estrategias para mejorar las propiedades de los geles de alginato se destaca la incorporación de materiales nanoestructurados como la arcilla montmorillonita (MT) o las nanopartículas de sílica biomimética (SiNPs). Por ejemplo, Etcheverry *et al.* reportaron la preparación de esferas de alginato-MT para la adsorción del pesticida Paraquat³³⁷. En el trabajo destacan una mejoría en la estabilidad térmica y la capacidad de adsorción de las esferas obtenidas con el agregado de la arcilla, constituyendo un material interesante para el tratamiento de aguas contaminadas. Asimismo, Sezen *et al.* describieron la preparación de esferas de alginato-MT para una aplicación similar, la adsorción del colorante azul de metileno, reportando también un aumento en la resistencia mecánica de los preparados³³⁸. Existe además un reporte reciente de Xu *et al.* de la generación de preparaciones de alginato reforzadas con MT, presentando una mejoría en sus propiedades mecánicas, elásticas y su estabilidad térmica³³⁹. El material mejorado presenta potenciales aplicaciones para aislamiento térmico y como retardante de llama. El agregado de MT a preparaciones basadas en alginato también ha permitido recientemente la preparación de esferas utilizadas para el *delivery* de fármacos, como lo evidencia el reporte de Bera *et al.*³⁴⁰. Las propiedades mejoradas del material resultan promisorias para generar tratamientos para el cáncer de mama que involucren la liberación controlada de fármacos.

La incorporación de bacterias en preparaciones de este estilo también ha sido reportada con éxito, por ejemplo en el trabajo de Meftah Kadmiri *et al.*, donde se llevó a cabo la preparación de esferas bioinoculantes basadas en *Azospirillum brasilense* DSM 1690 y *Pseudomonas fluorescens* Ms-01³⁴¹. Las mismas fueron preparadas combinando alginato con las arcillas MT o halloysita, presentando entre otras ventajas una mayor estabilidad celular, evidenciada por una mayor supervivencia de las bacterias luego del proceso de inmovilización. Un efecto

similar sobre la supervivencia de bacterias encapsuladas fue reportado recientemente por Sun *et al.*³⁹. En el trabajo, los autores añadieron MT para mejorar las propiedades de un hidrogel de pectina y alginato, con la finalidad de mejorar la estabilidad de bacterias probióticas. A pesar de las promisorias características reportadas para los materiales híbridos alginato-MT, y su exitosa aplicación en diversas áreas de la ciencia, su implementación como matriz para la obtención de biocatalizadores inmovilizados aún no ha sido explorada.

En la misma línea y como se mencionó anteriormente, existen numerosos reportes recientes de la mejora de las propiedades del alginato a través del agregado de SiNPs, con diversos fines. Por ejemplo, Marangoni Júnior *et al.* describieron la mejora en la estabilidad térmica de films de alginato con el agregado de bajas concentraciones de SiNPs para una potencial aplicación en la industria alimenticia³⁴². Con el mismo fin, Hou *et al.* reportaron la preparación de films de una combinación de agar y alginato con SiNPs³⁴³. Los autores observaron mejoras en las propiedades mecánicas del hidrogel a través del agregado del material nanoparticulado. El agregado de SiNPs o hidroxiapatita a una formulación de alginato para el tratamiento de heridas también presentó mejoras en material obtenido según un reporte de Zhang *et al.*³⁴⁴. Según los autores, el material resultante presentó una mayor resistencia mecánica y menor degradabilidad. Adicionalmente, también existen reportes de la utilización de matrices híbridas de alginato y SiNPs para el *delivery* de fármacos. Un ejemplo de esto fue reportado por Mishra *et al.*, en un trabajo en el cual se obtuvieron preparaciones híbridas conteniendo el fármaco anticáncer Doxorrubicina³⁴⁵. La incorporación de las nanopartículas en este caso permitió una liberación lenta y sostenida del fármaco, lo que resulta interesante de cara a una aplicación médica.

Nuevamente, la cantidad de reportes en los cuales se incorporan bacterias a materiales híbridos de alginato y SiNPs es limitada, y mayoritariamente aplicada a áreas ajenas a la biocatálisis. Un ejemplo reciente fue reportado por Feng y Qian, en el que se incorporaron esporas de *Lysinibacillus sphaericus* LMG 22,257 a una mezcla de alginato y nanosílica³⁴⁶. La mezcla resultante luego se incorporó a una mezcla de concreto para generar “bioconcreto” o “concreto autorreparable”. Por otro lado, mezclas de alginato y sílica también han sido utilizadas para el atrapamiento de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* GG. Haffner *et al.* han reportado la preparación de microcápsulas de este material híbrido conteniendo la bacteria probiótica^{347,348}, demostrando que el agregado de sílica colabora en la estabilidad de las bacterias protegiéndolas, a la vez que disminuye su liberación al medio. Adicionalmente, existen una serie de reportes del grupo de investigación del Dr. Rodríguez-Nogales que abordan la inmovilización de la bacteria *Oenococcus oeni* en cápsulas de alginato y sílica para realizar la fermentación maloláctica en vinos^{349–354}. La incorporación de alginato en las cápsulas mejoró significativamente la capacidad de consumo de ácido L-málico por parte de las bacterias, a la vez que les confirió mayor resistencia mecánica y estabilidad. Finalmente, entre los escasos reportes de la utilización de combinaciones de alginato y SiNPs para inmovilización de microorganismos con fines biocatalíticos se encuentra el reporte de Wang *et al.* para la producción de 1-feniletanol³⁵⁵. En el reporte los autores describen la inmovilización de *Rhodotorula glutinis* en cápsulas de alginato, recubiertas con polidopamina y SiNPs, resultando en una matriz de inmovilización superior al alginato. En particular, la adición de la sílica no solamente mejoró la estabilidad química y mecánica de los

preparados, evidenciada por una alta reusabilidad, sino que permitió llevar control la porosidad de los preparados obtenidos.

Los ejemplos mencionados previamente destacan la capacidad de mejorar las propiedades de los materiales al combinar alginato con componentes nanoestructurados. Estas mejoras permiten aplicaciones diversas, incluyendo la generación de preparados microbianos inmovilizados para distintos fines. No obstante, aunque esta área es de gran relevancia en la investigación de materiales, es importante señalar que el uso de estas matrices para la inmovilización con fines biocatalíticos sigue siendo un campo con un gran potencial por explorar.

Inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D

Otra alternativa novedosa para la inmovilización de biocatalizadores es el empleo de soportes obtenidos por impresión 3D. Esta tecnología, también conocida como manufacturación aditiva, ha surgido en los últimos años y ha despertado un gran interés por su amplio potencial de aplicación en diversas áreas como la industria alimenticia y la medicina³⁵⁶. La impresión 3D permite producir de forma eficiente una variedad de estructuras complejas, con medidas precisas y utilizando diversos materiales³⁵⁷. Estas características hacen de esta una tecnología particularmente interesante para la preparación de soportes de inmovilización para microorganismos. La posibilidad de obtener estructuras con geometrías específicas y alta porosidad permite aumentar el área efectiva de inmovilización y con ello la carga celular³⁵⁸. Inclusive, algunos materiales permiten controlar la porosidad obtenida, facilitando la difusión de gases y masa desde y hacia los microorganismos inmovilizados^{359,360}. Por otro lado, la variedad de materiales que pueden ser utilizados permite obtener preparaciones específicas para cada microorganismo, favoreciendo su integración al material y disminuyendo la pérdida de células al medio^{34,358}. Adicionalmente, las piezas son generalmente obtenidas de forma sencilla, escalable y económica³⁶¹.

La inmovilización en estructuras obtenidas por impresión 3D puede proceder en dos modalidades, denominadas atrapamiento y post-impresión³⁵⁷. La diferencia entre estas modalidades radica en el momento en el que el microorganismo es puesto en contacto con el material. La inmovilización por atrapamiento es también denominada *3D-bioprinting* y está basada en la preparación de “biotintas” en las que el microorganismo se incorpora previo a la impresión de la pieza 3D. Por otro lado, la inmovilización post-impresión se da una vez obtenida la pieza que actuará como soporte de inmovilización. A través de estas modalidades se han obtenido preparaciones inmovilizadas de microorganismos con diversos fines. Como ejemplos se encuentra el tratamiento de efluentes³⁶²⁻³⁶⁵, la preparación de cultivos *starter* para la industria alimenticia³⁶⁶, la obtención de preparaciones con aplicaciones biomédicas³⁶⁴, la elaboración de biosensores^{367,368} y celdas de combustible microbianas³⁶⁹, e incluso la preparación de biocatalizadores inmovilizados (Tabla 13).

Tabla 13. Ejemplos de biotransformaciones catalizadas por microorganismos inmovilizados en soportes obtenidos por impresión 3D.

Producto obtenido	Microorganismo inmovilizado	Material de inmovilización	Tecnología de impresión	Modalidad de inmovilización	Ref.
Ácido propiónico	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> C.I.P 53.164	Poliamida 2200 (Nylon 12)	Fusión en Lecho de Polvo: Sinterizado Selectivo por Láser (SLS)	Post-impresión	370
Compuestos fenólicos	<i>Rhodococcus opacus</i> IEGM 248	Monómeros bifuncionales cargados positivamente e hidrofílicos que exhiben grupos amina cuaternaria (MAETAC) y grupos hidroxilo (HEMA)	Fotopolimerización en Cubeta: Procesamiento de Luz Digital (DLP)	Post-impresión	34
Butanol	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> DSM 14923	Nylon (PA 2200)	Fotopolimerización en Cubeta: Procesamiento de Luz Digital (DLP)	Post-impresión	371
Acetato	<i>E. coli</i> MG1655	23 % en peso <i>Pluronic F-127</i> hidrogel + cultivo bacteriano (10:1)	Extrusión: Escritura Directa de Tinta (DIW)	Atrapamiento	358
Etanol	<i>S. cerevisiae</i> salvaje	<i>F127-BUM</i> hidrogel + levadura	Extrusión: Escritura Directa de Tinta	Atrapamiento	372
Ácido hialurónico	<i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Gelatina y gelatina metacrilóil + bacteria	Extrusión	Atrapamiento	373
2,3-butanodiol	<i>S. cerevisiae</i> mutante	<i>F127-BUM</i> hidrogel + levadura	Extrusión	Atrapamiento	372
3,4-dihidroxi-L-fenilalanina	<i>E. coli</i> mutante	<i>F127-BUM</i> hidrogel + bacteria	Extrusión	Atrapamiento	372
Colicin B	<i>E. coli</i> mutante	<i>F127-BUM</i> hidrogel + bacteria	Extrusión	Atrapamiento	372
Betaxantinas	<i>S. cerevisiae</i> mutante y <i>E. coli</i> mutante	<i>F127-BUM</i> hidrogel + bacteria + levadura	Extrusión	Atrapamiento	372

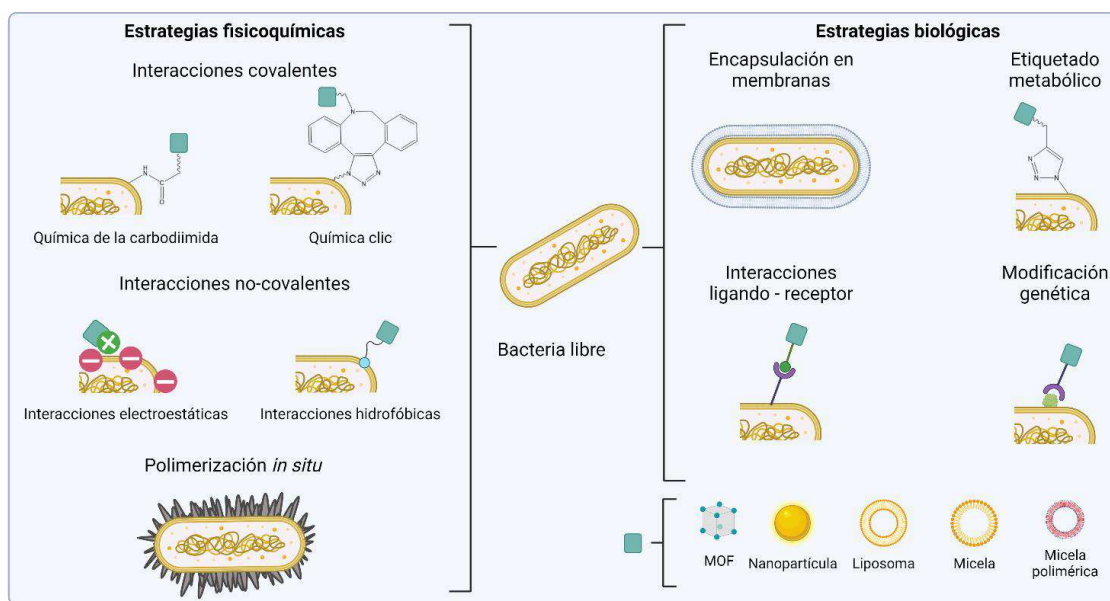
La utilización de este tipo de soportes de inmovilización en reacciones biocatalizadas por microorganismos es muy reciente, por lo que los ejemplos encontrados en la literatura son limitados. Sin embargo, un análisis de la bibliografía disponible da cuenta del alto potencial que presenta esta tecnología (Tabla 13), ya habiendo sido aplicada en microorganismos de relevancia industrial como *E. coli* o *S. cerevisiae*, entre otros, para la preparación de una variedad de compuestos de interés. Hasta el momento, la mayoría de los ejemplos recabados utilizan el atrapamiento como modalidad de inmovilización, a través de la preparación de biotintas. Sin embargo, existen también algunos ejemplos de microorganismos inmovilizados post-impresión, en los que se apela a la formación de biofilms en la superficie del material.

En el caso de *Gluconobacter*, si bien existen antecedentes del uso de la impresión 3D para la preparación de biosensores a partir de una biotinta de *G. oxydans*³⁷⁴, la implementación de esta tecnología para la obtención de preparados inmovilizados con fines productivos aún no presenta reportes en la literatura. Dada su naturaleza aerobia estricta y las dificultades en la difusión de sustratos y productos que se presentan en consecuencia al

inmovilizar por atrapamiento en soportes tradicionales, la inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D resulta una alternativa atractiva a estudiar.

Inmovilización de célula única: incorporación de materiales a la superficie celular

El recubrimiento o la modificación de la superficie de los microorganismos por incorporación de materiales es un tipo de inmovilización que les confiere propiedades únicas, nuevas funciones, y diversas ventajas que potencian su aplicación en áreas como la biomedicina³⁷⁵, la bioremediación³⁷⁶, y la biocatálisis^{375,377}. Ejemplos del impacto positivo de estas técnicas son la reducción de las restricciones difusionales frecuentemente asociadas a la inmovilización, la permeabilidad selectiva, la posibilidad de funcionalización, y el aumento en la estabilidad a través de una mayor tolerancia a condiciones ambientales, entre otras capacidades³⁷⁶⁻³⁷⁸. Estas modificaciones de la superficie celular pueden proceder mediante una variedad de técnicas fisicoquímicas y biológicas (Esquema 18)³⁷⁵. En particular, en este trabajo de Tesis se hará énfasis en dos aproximaciones, el decorado de la superficie microbiana con nanopartículas y la encapsulación celular para la obtención de esporas artificiales a partir de polimerización *in situ*.



Esquema 18. Ejemplos de técnicas de modificación de la superficie bacteriana a través de la incorporación de materiales. MOF: *Metal Organic Framework*. Adaptado de Wu et al.³⁷⁵.

Si bien estas dos aproximaciones presentan ventajas en común, se diferencian en algunos aspectos. Mientras que en el caso del recubrimiento con nanopartículas las mismas se asocian a la superficie del microorganismo una vez sintetizadas, la generación de esporas artificiales requiere de una síntesis *de novo* de la estructura. Esto muchas veces resulta en que la decoración del microorganismo con nanopartículas resulte una aproximación más sencilla y directa, pudiendo implementarse simplemente a partir de una incubación de las células con el

nanomaterial^{379,380}. Por el contrario, la generación de las esporas artificiales puede proceder de forma más compleja, pudiendo incluso requerir una modificación de la membrana del microorganismo que permita la formación de la estructura³⁸¹.

La decoración de la superficie de los microorganismos con nanopartículas es frecuentemente utilizada en biomedicina para imagenología³⁸² y delivery de fármacos³⁸³ o en biorremediación, para la degradación de contaminantes³⁷⁶. Esta aproximación requiere de una meticulosa selección de las nanopartículas a utilizar, considerando la naturaleza de las mismas, el tipo de interacción que se buscará establecer con el microorganismo, y la aplicación que tendrá el producto resultante. Las nanopartículas tienen naturalezas diversas, pudiendo encontrarlas de origen orgánico, inorgánico o basadas únicamente en carbono³⁸⁴. Las nanopartículas de origen orgánico están compuestas por proteínas, carbohidratos, lípidos, polímeros, o cualquier otro tipo de molécula orgánica. Las inorgánicas por su parte están compuestas por materiales como la cerámica, los metales y los materiales semiconductores. Aquellas que son basadas solamente en carbono solo se componen de átomos de este elemento, como por ejemplo los fullerenos, las nanopartículas de carbono negro y los *quantum dots* de carbono. Cada tipo de nanopartícula puede además estar funcionalizada con distintas moléculas, añadiéndole más complejidad a su superficie. Es por esta razón que las nanopartículas poseen propiedades únicas que pueden ser incorporadas a los microorganismos a través de su integración a la superficie, lo que hace de esta una estrategia muy versátil.

La incorporación de nanopartículas magnéticas a la superficie de distintos microorganismos es un claro ejemplo de este tipo de aplicaciones, siendo generalmente implementada para mejorar la separación y reutilización de los microorganismos decorados luego de su utilización. De esta forma, levaduras de las especies *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*, o la bacteria *Pseudomonas sp.* W1, han sido eficientemente separadas de su medio de reacción luego de ser empleadas en la producción de etanol³⁸⁵ y seroalbúmina humana³⁸⁶, o para la degradación del contaminante Di-n-butyl ftalato³⁸⁷, respectivamente. Por otro lado, las propiedades ópticas de nanopartículas de materiales fotoelectrónicos como el oro pueden ayudar a incrementar las actividades metabólicas de ciertos microorganismos. La decoración de la bacteria reductora de metales *Shewanella algae* con este tipo de nanopartículas permitió mejorar la producción *in situ* del fármaco antineoplásico Terodotoxina en modelos animales, al ser sometida a un láser³⁸⁸.

Por otro lado, la formación de esporas artificiales o nanoencapsulación es otra estrategia novedosa para mejorar la estabilidad y el desempeño de los microorganismos^{381,389}. Esta aproximación surge a partir de la búsqueda de imitar el proceso natural de esporulación que ocurre en una variedad de microorganismos, resultando en la formación de estructuras protectoras³⁹⁰. Este tipo de estructuras artificiales pueden ser generadas a partir de materiales como la sílica, los fosfatos de calcio, diversos polímeros, o compuestos de coordinación por metales³⁹¹.

Youn *et al.* describieron dos generaciones de esporas artificiales, la primera corresponde a las esporas pasivas o “*passive shells*” y la segunda a esporas activas o “*active shells*”³⁹². Las esporas de la primera generación son aquellas cuyas principales propiedades son la durabilidad y la permselectividad, ya sean de naturaleza estática o degradable, están enfocadas principalmente en la citoprotección. Ejemplos de este tipo de esporas encuentran aplicación en la industria alimenticia, en el recubrimiento de probióticos para mejorar su *delivery*, protegiéndolos de las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal^{393,394}. Por otro lado, la segunda generación de esporas se denomina activa debido a que incorpora propiedades que van más allá de la citoprotección, con la capacidad añadida de poder llevar a cabo reacciones químicas que no son endógenas a las células que contienen. Algunas de estas esporas han sido eficientemente utilizadas para la inmovilización de enzimas en su superficie, posibilitando la ocurrencia de reacciones que pueden desde reconfigurar la conectividad metabólica y alterar positivamente los entornos celulares, hasta permitir la obtención de compuestos de valor agregado^{392,395}. Esta última aplicación biocatalítica es particularmente interesante, pudiendo combinar reacciones catalizadas por el microorganismo encapsulado, con las catalizadas por la o las enzimas ancladas en la superficie.

La decoración de microorganismos con nanopartículas junto con la nanoencapsulación son estrategias altamente interesantes para su implementación en biocatálisis. Las mismas no solamente pueden dar lugar a catalizadores más resistentes y con menos restricciones difusionales, sino que los materiales que se incorporan a la superficie microbiana añaden características nuevas que pueden dar lugar a la obtención de productos de valor agregado. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas en biocatálisis aún no ha sido explotada completamente, lo que hace de este un nicho de investigación altamente relevante. En la Tabla 14 se puede observar un compendio de algunos de los ejemplos disponibles sobre la temática.

Tabla 14. Ejemplos de aplicación de técnicas de modificación de la superficie de microorganismos con fines biocatalíticos.

Producto	Biocatalizador/es inmovilizado/s	Técnica de inmovilización	Material incorporado a la superficie	Ref.
L-fenilacetilcarbinol	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	Decorado con nanopartículas	Nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	380
Tetrodotoxina	<i>Shewanella algae</i> K3259	Decorado con nanopartículas	Nanopartículas de oro	388
ABTS oxidado	<i>S. cerevisiae</i> + β-gal + Glucosa oxidasa + HRP	Nanoencapsulación/Preparación de esporas artificiales	Fe ³⁺ y ácido benzeno-1,3,5-tricarboxílico (BTC)	395
Etanol	<i>S. cerevisiae</i>	Decorado con nanopartículas	Nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ recubiertas con L-lisina	385
Maltosa	<i>E. coli</i> + α-amilasa-PEG ₄ -colesterol	Nanoencapsulación/Preparación de esporas artificiales	Pluronic L-121	396
(R)-benzoína	<i>E. coli</i> SG13009 que expresa una benzaldehído liasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar I	Nanoencapsulación/Preparación de esporas artificiales	Silicona hidrofóbica o hidrofílica	397
	<i>E. coli</i> que expresa una benzaldehído liasa	Nanoencapsulación /Preparación de esporas artificiales	Dopamina y N-oleoil dopamina	398

Tabla 14. Ejemplos de aplicación de técnicas de modificación de la superficie de microorganismos con fines biocatalíticos. **(Continuación)**

Producto	Biocatalizador/es inmovilizado/s	Técnica de inmovilización	Material incorporado a la superficie	Ref.
n-Octil caprilato	<i>E. coli</i> que expresa una alcohol deshidrogenasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> + <i>E. coli</i> que expresa CalB	Nanoencapsulación /Preparación de esporas artificiales	Dopamina y N-oleoil dopamina	398
1-feniletanol	<i>E. coli</i> que expresa una alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>	Nanoencapsulación /Preparación de esporas artificiales	Dopamina y N-oleoil dopamina	398
(R)-2-Hidroxi-1-fenil-propanona	<i>E. coli</i> que expresa una alcohol deshidrogenasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> + <i>E. coli</i> que expresa una benzaldehído liasa	Nanoencapsulación /Preparación de esporas artificiales	Dopamina y N-oleoil dopamina	398

En el caso de las bacterias del género *Gluconobacter*, no se han encontrado ejemplos en los que se utilicen el decorado de la superficie con nanopartículas o la formación de esporas artificiales con fines biocatalíticos. Por esta razón, y dadas las ventajas asociadas a la implementación de estas técnicas, resulta de especial interés evaluar la aplicabilidad de estas tecnologías en este género bacteriano.

En este capítulo se evaluarán una variedad de técnicas no tradicionales de inmovilización en bacterias del género *Gluconobacter*. Las técnicas estudiadas abarcarán la inmovilización en sílica biomimética, la integración a materiales híbridos basados en alginato y nanomateriales, la inmovilización post-impresión en estructuras generadas por impresión 3D, y la generación de esporas artificiales a partir de polimerización *in situ*. Dado que cada técnica a aplicar resulta una novedad para este género bacteriano, el objetivo es contribuir al conocimiento en la inmovilización de estos microorganismos, con especial énfasis en una potencial aplicación industrial de los preparados obtenidos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Gluconobacter* utilizadas fueron Gox, Gfr, y Gox-mCherry. Las mismas fueron mantenidas en placas de medio de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) a 30 °C, con el agregado de kanamicina 50 µg/mL para el caso del mutante Gox-mCherry.

3.2.2. Reactivos generales

La glucosa, el glicerol, el K₂HPO₄, el HCl, el CaCl₂·2H₂O y el NaH₂PO₄ fueron de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). El extracto de levadura y la triptona fueron de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). La peptona fue de *PanReac AppliChem* (Barcelona, España). El MgSO₄·7H₂O fue de *J.T. Baker* (Pensilvania, EE. UU.). El KH₂PO₄ y el FeCl₃ fue de *Macron Chemicals* (Pensilvania, EE. UU.). El tetrametil ortosilicato (TMOS) fue de *Merck* (Darmstadt, Alemania). El ácido tánico (TA) y el alginato fueron de *Sigma* (Illinois, EE. UU.). La MT fue de *Aldrich* (Vermont, EE. UU.) La kanamicina y la polietilenimina (PEI) 1300 MW fueron de *Sigma-Aldrich* (Misuri, EE. UU.).

3.2.3. Inmovilización bacteriana en sílica biomimética

Se mezclaron pellets de Gfr (20 mg de peso seco de células) con distintos volúmenes de PEI 1300 MW 10%, pH 8,0, tampón fosfato de sodio 5 mM, pH 8,0 y TMOS hidrolizado (0,9 M) de acuerdo a la Tabla 15.

Tabla 15. Composición de las mezclas de síntesis de inmovilización en sílica biomimética de Gfr.

Volumen final de reacción (mL)	PEI 10%, pH 8,0 (mL)	Tampón fosfato de sodio 5 mM, pH 8,0 (mL)	TMOS hidrolizado (mL)
0,59	0,05	0,44	0,1
14,75	1,25	11	2,5
29,50	2,5	22	5

El TMOS hidrolizado se obtuvo en todos los casos a partir de la mezcla de 6 mL de HCl 1 mM y 942 µL de TMOS que fue mezclada con un vórtex antes de su utilización. El proceso de inmovilización se comenzó poniendo en contacto el pellet bacteriano con la PEI 10% y el tampón fosfato de sodio 5 mM por 15 minutos en un agitador de rodillos a 21°C. Pasado ese tiempo se agregó el TMOS hidrolizado y se volvió a poner la mezcla en un agitador de rodillos a 21°C por 45 minutos. Al finalizar la síntesis se llevó a cabo una centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se llevaron a cabo dos lavados con agua destilada con un 15% del volumen de síntesis, en todos los casos descartando el sobrenadante.

3.2.4. Análisis por SEM de inmovilizados en sílica biomimética y células libres

Las muestras de Gfr libre e inmovilizado en sílica biomimética se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de emisión de campo de alta resolución con un microscopio *Quanta FEG 250* de *Thermo Fisher Scientific* (Massachusetts, EE. UU.) en condiciones de bajo vacío con un voltaje de haz de 20 kV y un aumento de entre 10000x y 40000x.

3.2.5. Síntesis de SiNPs para la obtención de preparados híbridos

La síntesis de las SiNPs se llevó a cabo según lo descrito por Jackson *et al.*³¹. Se preparó una mezcla de 20 mL de tampón de fosfato de sodio 100 mM pH 8,0, 5 mL de PEI MW 1300 5% y 5 mL de TMOS previamente hidrolizado, en un tubo de 50 mL. La hidrólisis del TMOS se realizó agregando 942 μ L de TMOS a 6 mL de HCl 1 mM y luego mezclando la solución resultante usando un vórtex. Tras la adición de TMOS hidrolizado, se formaron inmediatamente SiNPs. Para eliminar cualquier reactivo restante presente en el sobrenadante de la reacción de síntesis, la suspensión de SiNPs se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y se lavó tres veces con 30 mL de agua destilada.

3.2.6. Inmovilización bacteriana en alginato y preparados híbridos de alginato y nanomateriales

Para la preparación de esferas de alginato, se mezclaron 20 mg de peso seco de células (de Gfr o Gox) con 2 mL de alginato al 6% y 1 mL de agua (para el caso de la preparación A4), o 1 mL de MT (30 o 120 mg/mL) (para el caso de las preparaciones A4M1 y A4M4), o SiNPs (30 o 120 mg/mL) (para el caso de las preparaciones A4S1 y A4S4), obteniendo una concentración final de alginato del 4%. Las mezclas conteniendo las células se añadieron gota a gota utilizando una bomba de jeringa (20 μ L/s) a 30 mL de CaCl₂ 50 mM. Las esferas resultantes se incubaron durante 1 hora a 4 °C, se separaron con un colador y se lavaron con agua destilada. Las dimensiones de todas las preparaciones inmovilizadas se midieron utilizando el programa *ImageJ* (V 1.53e) de los Institutos Nacionales de la Salud (Maryland, EE. UU.).

3.2.7. Análisis por SEM de preparados de alginato y preparados híbridos de alginato y nanomateriales

Las esferas se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se fracturaron. Se eliminó el hielo de la muestra fracturada mediante sublimación al vacío (secado por congelación) utilizando un liofilizador *LyoQuest* de *Telstar* (Barcelona, España). A continuación, las muestras se visualizaron mediante SEM ambiental de emisión de campo de alta resolución con un microscopio *Quanta FEG 250* de *Thermo Fisher Scientific* (Massachusetts, EE. UU.) en condiciones de bajo vacío con un voltaje de haz de 10 kV y un aumento de 100x o 1600x.

3.2.8. Análisis de textura de preparados de alginato y preparados híbridos de alginato y nanomateriales

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un analizador de textura *TA.XT.Plus* de *Stable Micro Systems* (Surrey, Reino Unido). Se evaluaron 10 esferas para cada condición (A4, A4M1, A4M4, A4S1 o A4S4). La sonda utilizada fue una P2 cilíndrica y la carga de la celda fue de 5 kg. El modo de prueba fue compresión, la velocidad previa a la prueba fue de 5 mm/s, la velocidad de prueba fue de 1 mm/s y la velocidad posterior a la prueba fue de 5 mm/s. El modo objetivo se estableció en Tensión (100 %). El tipo de disparo se configuró como Automático (Fuerza) y la fuerza de disparo fue de 1 N. El modo de interrupción se configuró en Nivel y la sensibilidad de interrupción fue de 10 g. Los análisis estadísticos de varianza (ANOVA) se realizaron utilizando el programa *Prism* (V 8.0.1) de *GraphPad Software* (California, EE. UU.).

3.2.9. Análisis por microscopía confocal de fluorescencia de preparados de alginato y preparados híbridos A4S4

Los preparados inmovilizados de alginato, y de matrices híbridas de alginato y nanomateriales, se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio *Zeiss LSM 800* de *Zeiss* (Oberkochen, Alemania). Las matrices híbridas y de alginato que contenían la cepa fluorescente Gox-mCherry se montaron enteras en agua destilada. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite x63 (apertura numérica de 1,3) para adquirir pilas Z, y se crearon proyecciones de intensidad máxima de las secciones ópticas con el programa *ImageJ* (V 1.53e) de los Institutos Nacionales de la Salud (Maryland, EE. UU.).

3.2.10. Inmovilización bacteriana en cubos obtenidos por impresión 3D

Los cubos fueron impresos en el Laboratorio del Dr. Simone Dimartino en la Universidad de Edimburgo. La composición del material utilizado para su obtención, denominado material A, se puede observar en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición del material A, utilizado para la impresión de soportes de inmovilización.

Material A		
	Componente	% (v/v)
Monómero 1	Cloruro de 2-metacrilato de 2-etilhexiltrimetilamonio	12
Monómero 2	Hidroxietil metacrilato	12
Entrecruzante	Etilenglicol dimetacrilato	16
Porógeno	Ciclohexanol y dodecanol	60

Se tomaron 6 cubos y se lavaron con 25 mL agua mQ estéril, repitiendo el procedimiento 3 veces. Paralelamente se prepararon precultivos de Gfr realizados en 3 mL en medio de glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,5) a 30 °C y 180 rpm durante 16 h. Se inoculó un cultivo de 250 mL con 6 mL de precultivo de Gfr y se incubó a 30 °C y 200 rpm en matraz de 1 L conteniendo medio de cultivo con

glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0). Cuando el cultivo alcanzó un valor de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,6 se agregaron los 6 cubos al matraz en condiciones asépticas. Se incubó el cultivo con los cubos a 30 °C y 200 rpm hasta obtener un valor de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 1. Posteriormente, los cubos se volvieron a lavar con 25 mL agua estéril, repitiendo el procedimiento 3 veces.

3.2.11. Inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D utilizando un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

Las estructuras impresas para su utilización en el reactor de lecho rotatorio *SpinChem* de 200 mL fueron preparadas en el mismo material que los cubos previamente utilizados (sección “3.2.10. Inmovilización bacteriana en cubos obtenidos por impresión 3D”, Tabla 16). Nuevamente, esta tarea fue llevada a cabo por el grupo de investigación del Dr. Simone Dimartino en la Universidad de Edimburgo. Para la inmovilización de Gfr se llevaron a cabo precultivos de 3 mL en medio de glucosa (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, D-glucosa 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,5), que fueron incubados a 30 °C y 200 rpm durante 24 horas. La inmovilización de las bacterias se llevó a cabo inoculando 300 mL de medio de glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0) con 3 mL de precultivo con un valor de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 3. El crecimiento de Gfr se llevó a cabo dentro del reactor a 30 °C, 120 rpm, 8 L/min de aireación, durante 72 horas, en presencia de las piezas obtenidas por impresión 3D. Al finalizar el crecimiento, se determinó la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ alcanzada. Luego, las piezas y el reactor se lavaron dos veces con 300 mL de agua estéril durante 10 minutos, a 30 °C y 120 rpm, sin aireación, midiendo la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ resultante del agua de lavado. A continuación, se añadieron nuevamente 300 mL del medio de glicerol antes mencionado y se incubaron las piezas con Gfr inmovilizado en medio fresco durante 24 horas. Nuevamente, luego del crecimiento se determinó la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ alcanzada. Las piezas y el reactor fueron luego lavadas dos veces con 300 mL de agua estéril durante 10 minutos, a 30 °C y 120 rpm, sin aireación, midiendo la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ resultante del agua de lavado.

3.2.12. Evaluación indirecta de la inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D para su utilización en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

El protocolo a detallar a continuación se elaboró a partir del reportado por Dikshit *et al.*³²⁴. Se llevó a cabo la inmovilización de Gfr en 4 piezas obtenidas por impresión 3D en el reactor de lecho rotatorio tal como se describió en la sección “3.2.11. Inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D utilizando un reactor de lecho rotatorio”. A modo de control se incubó una de las piezas previamente autoclavada en 75 mL de medio de cultivo de glicerol (glicerol 100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0) estéril. Se incubó la pieza a 30°C y 80 rpm por 24 horas. Se tomó una pieza con Gfr inmovilizado y la pieza control, y se lavaron 2 veces con 2 mL de agua destilada estéril. Luego de los lavados se colocó cada pieza en un tubo de 50 mL con 10 mL de agua mQ estéril y se procedió a sonicar durante 5 minutos (amplitud 30%, 5 s on, 2 s off) utilizando un sonicador *Vibra-cell VCX 130* de *Sonics* (Connecticut, EE. UU.). Luego de transcurrido ese

tiempo se tomaron muestras de 1 mL de los sobrenadantes obtenidos y se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min. Se cuantificó la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit de *Millipore* (Massachusetts, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.2.13. Análisis por SEM de soportes obtenidos por impresión 3D para su utilización en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

En primer lugar, las piezas se fijaron utilizando glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato (pH 7,2) durante un tiempo adecuado para asegurar la fijación de las bacterias. Posteriormente, se realizaron lavados con tampón fosfato para eliminar el exceso de glutaraldehído. A continuación, se deshidrataron las muestras mediante un tratamiento en etanol con concentraciones crecientes de 50%, 70%, 90% y 100%, repitiendo la deshidratación en 100% dos veces. Este procedimiento fue seguido por un secado de punto crítico utilizando un equipo *Denton Vacuum* de *Denton* (Nueva Jersey, EE. UU.), que consistió en cinco recambios de 20 minutos, luego 10 minutos y, finalmente, 5 minutos, para evitar la formación de meniscos que podrían dañar la morfología de las bacterias inmovilizadas. Finalmente, las piezas se montaron sobre tacos metálicos y se metalizaron con oro puro durante 120 segundos a 30 mA mediante un sistema de *sputtering Denton Vacuum Desk II* de *Denton* (Nueva Jersey, EE. UU.). Las muestras fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido *Jeol JSM 5900 LV* de *Jeol* (Tokio, Japón). La preparación de muestras y la adquisición de imágenes fue llevada a cabo por la Unidad de Microscopia Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias (UdelaR, Montevideo, Uruguay).

3.2.14. Inmovilización bacteriana a partir de la formación de esporas artificiales

Se preparó una suspensión de 20 mg de peso seco de células de Gox en 4,90 mL de agua destilada. A la suspensión se le agregaron 500 µL de TA 40 mg/mL y se mezcló utilizando un vórtex durante 10 s. A la suspensión resultante se le añadieron 500 µL de FeCl₃ 10 mg/mL y nuevamente se mezcló usando un vórtex por 10 segundos. La suspensión celular resultante fue centrifugada por 5 min a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet fue nuevamente resuspendido en 4,9 mL de agua y se repitió la adición de TA y FeCl₃ como se describió anteriormente. Luego la suspensión celular fue nuevamente centrifugada por 5 min a 5000 rpm. Se realizó un lavado con 4,9 mL de agua destilada. El pellet resultante de GoxTAFE se mantuvo en hielo hasta su uso.

3.2.15. Análisis por TEM de bacterias libres y esporas artificiales de Gox

Se llevaron a cabo análisis por microscopía electrónica de transferencia (TEM) de las bacterias libres y cubiertas con el polímero TAFE. La fijación física de muestras se realizó con un sistema de congelación de alta presión *Leica HPM100* de *Leica Microsystems* (Wetzlar, Alemania) utilizando 20% de seroalbúmina bovina (BSA) en el medio de cultivo como crioprotector. El embebido a baja temperatura se llevó a cabo con un sistema automático de sustitución de congelación *Leica EM AFS2* de *Leica Microsystems* (Wetzlar, Alemania) en una solución de 2% de acetato de uranilo/acetona de *Electron Microscopy Systems* (Pensilvania, EE. UU.) y un kit de baja viscosidad *Spurr*

de *Sigma-Aldrich* (Massachusetts, EE. UU.). Las resinas se curaron a 60°C en un horno de vacío *Bioblock Scientific 45001* de *ThermoFisher* (Massachusetts, EE. UU.) durante 48 horas. El corte ultrafino de los bloques de resina se realizó con un ultramicrotomo *Leica EM UC7* de *Leica Microsystems* (Wetzlar, Alemania) utilizando un cuchillo de diamante *Diatome Ultra 35°* de *Diatome* (Nidau, Suiza) a un grosor de 100 nm y se colocaron sobre rejillas de cobre de 75 aberturas de *Ted Pell* (California, EE. UU.) post-teñidas con una solución de citrato de plomo (Pensilvania, EE. UU.) durante 30 segundos. Las imágenes se adquirieron con un microscopio *Jeol JEM 1400PLUS* de *Jeol* (Tokio, Japón) operado a un voltaje de aceleración de 80 kV equipado con una fuente LaB6. Las imágenes fueron tomadas por el grupo de investigación del Dr. Fernando López-Gallego (CICBiomaGUNE, San Sebastián, España).

3.2.16. Análisis por microscopía confocal de esporas artificiales de Gox con GFP-His inmovilizada en su superficie

Este análisis fue llevado a cabo por el grupo de investigación del Dr. Fernando López-Gallego del CIC BiomaGUNE. Se descongelaron y resuspendieron pellets congelados de *E. coli* que expresa His-GFP en Tampón C (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,0). La suspensión celular se sonicó a 4°C durante 20 minutos (amplitud 30%, 5 s on, 5 s off) utilizando un sonicador *Sonopuls HD 4100* de *Bandelin* (Berlín, Alemania). Los restos celulares se descartaron mediante centrifugación a 14,000 g durante 30 minutos a 4°C y se conservó el extracto crudo soluble. El sobrenadante se cargó en una resina de agarosa activada con cobalto (IDA-Co²⁺). Antes de la purificación, la columna se equilibró y se lavó con el Tampón C, luego la resina se incubó con el extracto crudo en *batch* durante 1 hora a 4°C (1:10 resina/proteína). A continuación, la resina con la proteína unida se lavó con el Tampón C, y la enzima se eluyó finalmente con el Tampón D (Tampón C + 500 mM imidazol). Las proteínas se filtraron en gel utilizando columnas PD-10 de *GE Healthcare* (Illinois, EE. UU.) para eliminar el imidazol y cambiar la proteína al Tampón E (Tampón C sin imidazol). Se añadieron 500 µL de la solución de proteína pura a 1 mg/mL a un pellet de 0,4 mg de peso seco de GoxTAFE. La suspensión se incubó durante 1 hora a 4 °C en un agitador rotatorio. Después de la incubación, se realizaron tres lavados con 1 mL de Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. En cada lavado, la suspensión se centrifugó a 4800 g durante 2 minutos y el sobrenadante se descartó. La funcionalización previa del portaobjetos *µ-Slide 8 Well Glass Bottom* de *Ibidi* (Gräfelfing, Alemania) se realizó con polilisina 0,01%, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con agua mQ y se colocaron las muestras directamente encima. La fluorescencia de las proteínas GFP-His y mCherry se siguió utilizando microscopía confocal de barrido láser con un microscopio *ZEISS LSM 880* de *Zeiss* (Oberkochen, Alemania) y un objetivo de inmersión de 63x (*Plan-Apochromat*, 0,8) usando aceite, empleando óptica adaptativa de reflexión (detector GaAsP) y un detector de transmisión láser de 633 nm. La excitación de los láseres fue de λ_{exc} = 488 nm para GFP y λ_{exc} = 561 nm para mCherry. El procesamiento de imágenes confocales se realizó utilizando el paquete FIJI para el programa *ImageJ* de los Institutos Nacionales de Salud (Maryland, EE. UU.). Las imágenes fueron tomadas por el grupo de investigación del Dr. Fernando López-Gallego (CICBiomaGUNE, San Sebastián, España).

3.2.17. Biotransformaciones de glicerol a AG y DHA por preparados inmovilizados en matraces

Las biotransformaciones de glicerol con las distintas preparaciones inmovilizadas se llevaron a cabo en matraces de 250 mL que contenían 30 mL de 50 g/L de glicerol en agua (para reacciones con Gox inmovilizado) o 200 g/L de glicerol en agua (para reacciones con Gfr inmovilizado). Para el caso de las reacciones llevadas a cabo con los cubos obtenidos por impresión 3D, el volumen de reacción fue de 15 mL. El inóculo de cada reacción fue 20 mg de peso seco de células inmovilizados en los distintos soportes, exceptuando el caso de los cubos obtenidos por impresión 3D, en los que se estimó un inóculo de 1,76 mg de peso seco de células. En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras de las reacciones periódicamente y se analizaron por HPLC de acuerdo a los protocolos detallados en las secciones “1.2.9. Preparación general de muestras para análisis por HPLC” y “1.2.10. Análisis por HPLC convencional”. En los casos que se determinó la turbidez del medio de reacción, se llevó a cabo un análisis por espectrofotometría a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1800* de *Shimadzu* (Kioto, Japón).

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo al menos por duplicado.

3.2.18. Estudios de reutilización de células libres y preparados inmovilizados en matraces

Las células libres e inmovilizadas se reutilizaron hasta 8 veces en reacciones de 24 h. Al finalizar cada ciclo productivo se tomaron muestras para su análisis por HPLC de acuerdo a lo especificado en las secciones “1.2.9. Preparación general de muestras para análisis por HPLC” y “1.2.10. Análisis por HPLC convencional”. Para las células libres, las inmovilizadas en sílica biomimética y las esporas artificiales de TAFE, luego de cada uso fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue descartado. Se realizó un lavado resuspendiendo el pellet en 5 mL de agua destilada, seguido de una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue colocado en un matraz de 250 mL que contenía 30 mL de 50 g/L de glicerol en agua (para reacciones con Gox) o 200 g/L de glicerol en agua (para reacciones con Gfr). Para las células inmovilizadas en alginato o en el soporte híbrido A4S4, las esferas se recogieron del matraz de reacción utilizando un colador y se lavaron una vez con 10 mL de agua destilada. Después del lavado, las esferas se colocaron en un matraz de 250 mL que contenía 30 mL de 50 g/L de glicerol en agua (para reacciones con Gox inmovilizado) o 200 g/L de glicerol puro en agua (para reacciones con Gfr inmovilizado). La actividad residual se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Actividad\ residual\ (\%) = \frac{Producto\ obtenido\ en\ uso\ x\ (g/L)}{Producto\ obtenido\ en\ uso\ 1\ (g/L)} \times 100$$

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo al menos por duplicado.

3.2.19. Biotransformación de glicerol a AG y DHA por preparados inmovilizados utilizando soportes obtenidos por impresión 3D en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

Las reacciones de biotransformación se llevaron a cabo con 300 mL de medio de reacción (glicerol 200 g/L en agua), sin esterilidad. Las condiciones de operación fueron 30 °C, 200 rpm y aireación 8 L/min. Se tomaron muestras periódicamente que fueron analizadas por HPLC de acuerdo con lo especificado en las secciones “1.2.9. Preparación general de muestras para análisis por HPLC” y 1.2.10. “Análisis por HPLC convencional”.

Las reacciones fueron llevadas a cabo por duplicado de forma asincrónica.

3.3. Resultados y discusión

La inmovilización de bacterias para biotransformaciones es un área de interés por la gran variedad de ventajas operacionales que otorga a los procesos productivos. Esto, sumado a la necesidad de alcanzar productividades de relevancia industrial, lleva al constante desarrollo de matrices y estrategias de inmovilización que permitan generar biocatalizadores robustos y altamente activos.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la inmovilización de bacterias del género *Gluconobacter* no es una excepción, ya que se pueden encontrar sendos ejemplos de publicaciones que abordan la implementación de este recurso para la producción de una variedad de compuestos de relevancia. Sin embargo, cabe volver a destacar que frecuentemente, las matrices de inmovilización utilizadas para la inmovilización de *Gluconobacter* constituyen polímeros naturales como el alginato que presentan una serie de desventajas a la hora de la preparación de biocatalizadores. Los problemas difusionales encontrados por sustratos y productos, y la baja estabilidad operacional de los mismos limita la aplicabilidad de los preparados obtenidos.

Por esta razón, el desarrollo de nuevas matrices y estrategias de inmovilización para *Gluconobacter* con propiedades mejoradas resulta de especial interés. A continuación se detallan los esfuerzos realizados para inmovilizar las cepas Gfr y Gox en una variedad de matrices de inmovilización novedosas, que podrían resultar en preparados inmovilizados con perspectiva de uso industrial para una variedad de biotransformaciones.

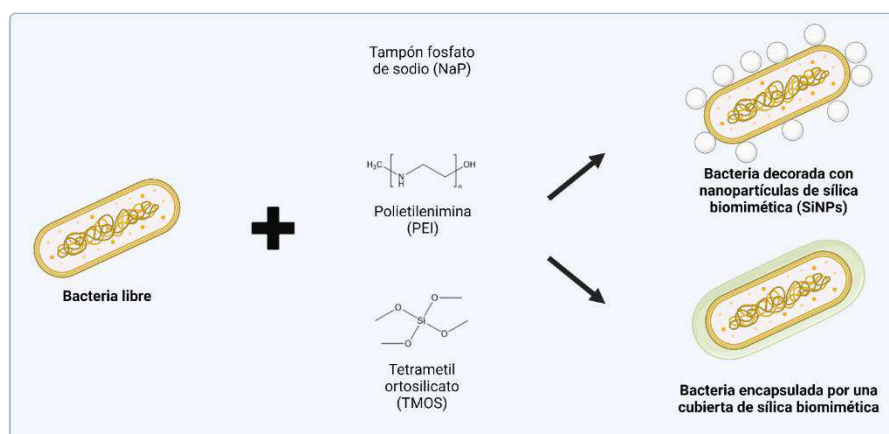
Inmovilización en sílica biomimética

La inmovilización de biocatalizadores, especialmente enzimas, en soportes de sílica es una práctica común para aumentar la estabilidad y reusabilidad de las preparaciones. Usualmente, este tipo de inmovilización procede en condiciones suaves, otorgando estructuras biocompatibles con altas estabilidades térmicas, mecánicas y operacionales³⁹⁹. Al igual que a las enzimas, la integración de microorganismos a estructuras basadas en sílica puede otorgarles una serie de ventajas operacionales que resulten beneficiosas para su uso en biocatálisis. La incorporación de materiales silíceos a la superficie de los microorganismos puede potencialmente proceder a través de dos formas. La primera de ellas consiste en la formación previa de estructuras, como por ejemplo nanopartículas, que posteriormente se depositan en la superficie bacteriana a través de interacciones de distintas naturalezas. La segunda involucra formación de estructuras de tipo cápsula, que se generan *de novo* sobre el microorganismo.

La mayoría de la literatura que asocia SiNPs con microorganismos tiende a estar relacionada a su aplicación como agentes antimicrobianos^{400,401}. Sin embargo, esto no se debe principalmente a las características de la sílica como tal, sino a la fácil preparación de derivados basados en sílica que incorporan otros agentes antimicrobianos, como fármacos o metales. De hecho, hasta el momento no se ha explorado la posibilidad de decorar microorganismos

con este tipo de nanopartículas con fines biocatalíticos. Sin embargo, existen antecedentes de preparación de cápsulas citocompatibles basadas en sílica para el recubrimiento de microorganismos como algas unicelulares del género *Chlorella*⁴⁰² o bacterias como *Zymomonas mobilis*⁴⁰³, siendo este último un ejemplo de aplicación en biocatálisis para la obtención de etanol. Estos recubrimientos aportaron protección frente a la temperatura, mientras que en el caso de *Z. mobilis* también fueron estabilizantes frente a pH, y permitieron un uso sostenido a lo largo de 10 ciclos catalíticos, manteniendo los rendimientos por encima del 90%.

Nuestro grupo de investigación posee un amplio *expertise* en la síntesis de distintos tipos de nanopartículas de sílica biomimética, especialmente para la preparación de derivados enzimáticos para su uso en biocatálisis^{31,334,404-407}. Sin embargo, hasta el momento los protocolos de inmovilización desarrollados no han sido aplicados a bacterias. En ese entendido, considerando la potencialidad de los recubrimientos basados en sílica para mejorar las propiedades de los biocatalizadores de célula entera, se buscó evaluar la posibilidad de incorporar estructuras de sílica a *Gluconobacter*. En base a lo discutido anteriormente, los protocolos a aplicar podrían resultar en la decoración de la superficie de las bacterias con nanopartículas de sílica, o en la generación de cápsulas que formen una malla alrededor de la superficie bacteriana (Esquema 19).



Esquema 19. Posibles productos de la inmovilización bacteriana en sílica biomimética.

Para estos experimentos se utilizó la cepa Gfr y la reacción de oxidación de glicerol hacia AG y DHA como modelos de aplicación de esta técnica. Dentro de los distintos protocolos disponibles para la preparación de SiNPs, la combinación del polímero aminado PEI con el precursor TMOS, en presencia de iones fosfato, es uno de los más sencillos y efectivos. Las condiciones suaves de reacción (temperatura ambiente y tampón fosfato de sodio a pH 8,0) hacen de estos protocolos una opción ideal para la inmovilización de biocatalizadores. Tomando como inspiración las silafinas utilizadas por las diatomeas en la naturaleza para precipitar la sílica, el agregado de una molécula aminada como la PEI induce el proceso de biomineralización a partir de un precursor silíceo, en este caso el TMOS hidrolizado³¹. Considerando que a pH 8,0 los grupos aminos del polímero PEI están cargados positivamente, y considerando que los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa de bacterias

Gram-negativas como Gfr poseen carga negativa^{31,414}, es probable que el polímero recubra las bacterias mediante interacciones electrostáticas. Una vez establecidas estas interacciones, el agregado del precursor silíceo podría conducir a la formación de estructuras que recubran las células. Esta hipótesis sirvió como base para desarrollar el protocolo de inmovilización que se describirá a continuación.

En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación, Torres-Herrero *et al.* observaron que variaciones en los tiempos de incubación y la concentración de fosfato en el tampón utilizado para la reacción de síntesis tienen un efecto sobre la velocidad de formación y la estructura final de las SiNPs⁴⁰⁷. Mientras que la síntesis de nanopartículas a altas concentraciones de fosfato (100 mM) procede de manera instantánea, a concentraciones más bajas (5 mM) se entelatece. En base a esto y con la finalidad de asegurar la integración de la sílica a las bacterias, se optó por llevar a cabo una incubación inicial de 15 minutos de las mismas con la mezcla de tampón fosfato de sodio 5 mM, pH 8,0 y PEI 5%, seguido de una incubación de 45 minutos luego de la adición del TMOS hidrolizado (0,9 M). Como una primera aproximación, se decidió evaluar la inmovilización de 20 mg de Gfr en un volumen de mezcla de reacción de 0,59 mL, en base a los volúmenes utilizados en el trabajo mencionado anteriormente⁴⁰⁷. En paralelo, se llevó a cabo un control de síntesis sin el agregado de Gfr. Al finalizar los tiempos de incubación estipulados, se observó que en el control no había una formación evidente de SiNPs (Figura A7). A nivel macroscópico tampoco fue evidente un cambio en el pellet obtenido luego de la reacción de síntesis con bacterias en comparación con un pellet de bacterias libres (Figura 30, paneles a1 y b1). Una observación al microscopio de las bacterias libres y las bacterias sometidas al proceso de inmovilización empleando una tinción de Gram no mostró diferencias notables entre los preparados (Figura 30, paneles a2 y b2).

Dado que el control sin bacterias no mostró la formación de estructuras a simple vista, es posible que en estas condiciones las mismas no se hayan formado. Adicionalmente, los resultados similares observados en la tinción de Gram para las bacterias potencialmente inmovilizadas y las bacterias libres podrían respaldar esta posibilidad. Con la finalidad de evaluar si un aumento en el volumen de reacción manteniendo la misma cantidad de bacterias daba lugar a resultados distintos, se decidió escalar la reacción 25 y 50 veces, lo que se correspondió con volúmenes de reacción de 14,75 y 29,50 mL.

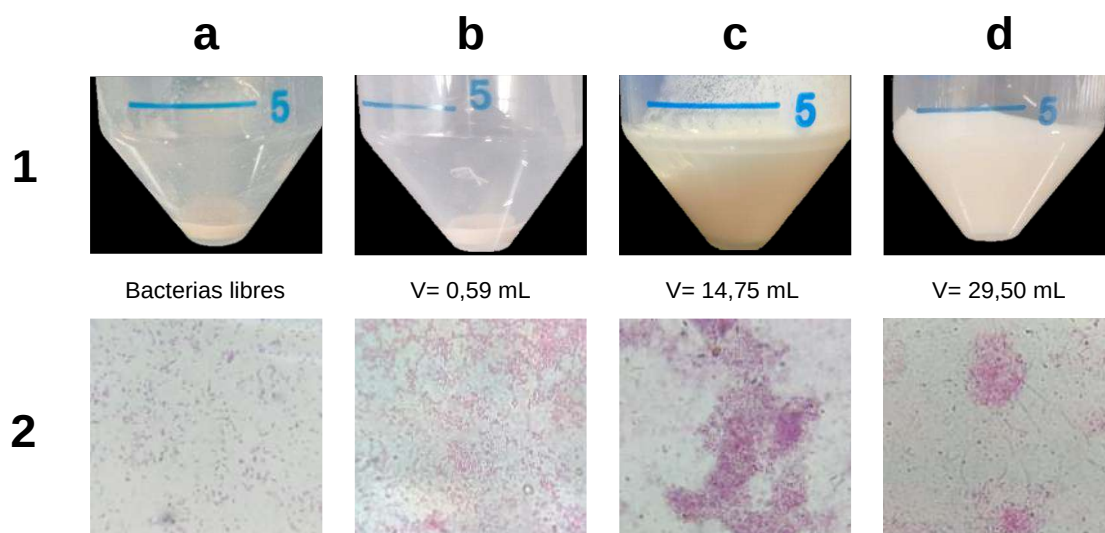


Figura 30. Puesta a punto de inmovilización de Gfr en sílica biomimética variando los volúmenes de síntesis. a) Visualización macroscópica de los pellets obtenidos luego de la inmovilización. b) Visualización por microscopía óptica de los pellets obtenidos luego de la inmovilización empleando una tinción de Gram (100x).

Al aumentar el volumen de síntesis se hizo evidente la formación de estructuras de sílica, tanto a simple vista como a nivel microscópico. En ambos casos, el pellet obtenido luego de la inmovilización fue más voluminoso que el de las células libres, aumentando su tamaño junto con el aumento del volumen de reacción (Figura 30, paneles c1 y d1). El pellet correspondiente al mayor volumen de síntesis (29,50 mL) presentó además una coloración más blanquecina, indicando posiblemente una mayor cantidad de estructuras de sílica formadas. Estos resultados son esperados debido a una mayor cantidad de precursor de sílica en el volumen total, junto con un aumento proporcional del catalizador de la síntesis (PEI). La falta de generación de material silíceo en volúmenes más pequeños puede haber sido determinado por una agitación diferencial con respecto a mayores volúmenes o a tiempos de incubación insuficientes tal y como se ha demostrado previamente⁴⁰⁷, atribuyéndose estos parámetros a puntos críticos de la síntesis.

Tras la tinción de Gram, a nivel microscópico se observaron diferencias con respecto a lo observado para las bacterias libres (Figura 30, paneles a2, c2 y d2). En base a un análisis de todo el campo visual de los preparados obtenidos, los pellets correspondientes con las diferentes síntesis de estructuras de sílica presentaron agregados que se visualizan como cúmulos de células con formas irregulares. La aparición de estos cúmulos, junto con el aumento de tamaño en los pellets, indican que se dio la formación de las estructuras de sílica, y que estas potencialmente afectaron la organización de las células de Gfr.

La principal diferencia entre los cúmulos observados para las reacciones de síntesis llevadas a cabo en 14,75 mL y 25,90 mL es la densidad aparente de células observadas en cada caso. Los cúmulos observados para la reacción de síntesis en 14,75 mL parecen presentar una densidad de células mayor que aquellos observados para la reacción de síntesis de 25,90 mL. Esto podría explicarse por una mayor cantidad de estructuras de sílica obtenidas

en el último caso, que estaría de alguna forma diluyendo la cantidad de células visible en los cúmulos. En base a esto, considerando que la síntesis llevada a cabo en un volumen de 14,75 mL presentó evidencia suficiente de haber generado un cambio en las células, se seleccionó para continuar con el estudio de esta estrategia.

Para poder determinar qué tipo de estructuras se formaron a partir de la síntesis, se llevó a cabo un análisis por SEM del pellet obtenido en las condiciones seleccionadas, observando además bacterias libres como control (Figura 31). Las imágenes obtenidas mostraron una clara diferencia entre las células libres y las inmovilizadas. Para el caso de estas últimas se logró visualizar una estructura de tipo red, en la que se observan SiNPs que se encuentran organizadas sobre la superficie de las bacterias.

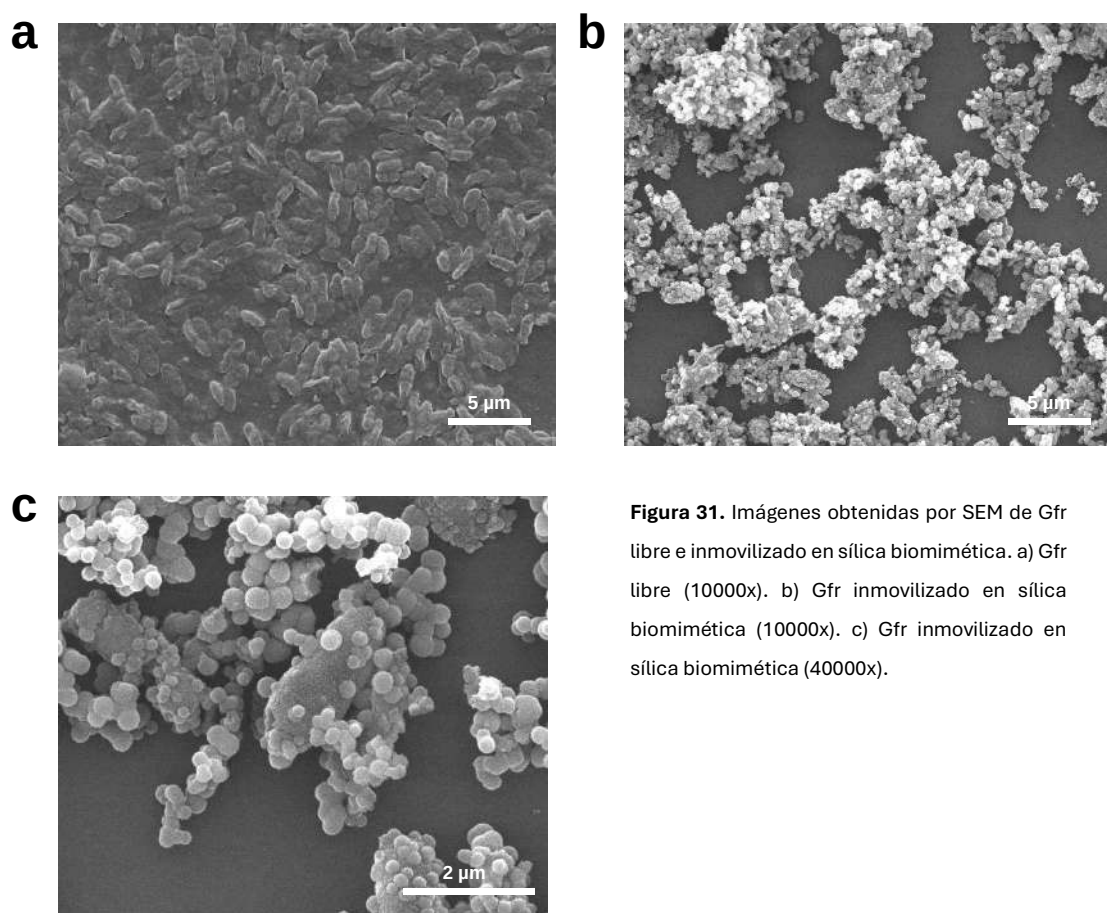


Figura 31. Imágenes obtenidas por SEM de Gfr libre e inmovilizado en sílica biomimética. a) Gfr libre (10000x). b) Gfr inmovilizado en sílica biomimética (10000x). c) Gfr inmovilizado en sílica biomimética (40000x).

Para evaluar si este recubrimiento de SiNPs aporta ventajas a las células, se estudió la cinética de conversión de 200 g/L de glicerol con la preparación inmovilizada. Esta concentración de sustrato fue la que otorgó mejores resultados en el Capítulo 1 de esta tesis, en lo que respecta a la producción de AG. Como se mencionó con anterioridad, este compuesto aún no se obtiene a granel a nivel industrial y tiene un muy alto valor en el mercado comparado con la DHA. Por este motivo se decidió utilizar estas condiciones de conversión.

Luego de 148 h, la producción de AG fue de $6,6 \pm 0,4$ g/L (Figura 32a), lo que se corresponde a un 29% menos de la actividad presentada por las células en reposo en las mismas condiciones, según lo observado en el primer capítulo de esta Tesis. Por su parte, la producción de DHA disminuyó de manera más significativa tras la inmovilización, ya que al final de la reacción se obtuvieron $2,5 \pm 0,1$ g/L (Figura 32b), lo que corresponde a una disminución del 82% de la capacidad de producción del compuesto por las células. Con respecto a la cinética observada, los resultados demuestran que la producción de ambos compuestos alcanza el valor máximo antes de las 21 horas de reacción y luego se detiene, manteniéndose en adelante una concentración constante. Este comportamiento fue comparable al observado para las células libres en experimentos anteriores.

En cuanto al consumo del sustrato, se observó una disminución pronunciada en su concentración durante las primeras horas de la reacción (Figura 32c), sin una formación equivalente de producto. Este fenómeno se refleja claramente en los balances de masas realizados en las distintas muestras tomadas a lo largo de la reacción (Figura 32d). Dicho comportamiento podría deberse a una adsorción inicial del sustrato por los preparados inmovilizados, que luego es transformado en producto o liberado al medio de reacción. El balance de masas final mostró porcentajes de moles totales en el sobrenadante cercanos al 100%, lo que sugiere que, al concluir las reacciones, no quedaría retenida una cantidad considerable de sustrato o productos en la matriz.

La capacidad diferencial de producción de los compuestos AG y DHA con respecto a las células libres puede potencialmente verse relacionado a una variedad de factores. Por ejemplo, tanto la matriz formada como los reactivos presentes en la síntesis pueden haber tenido un efecto negativo sobre las enzimas responsables de la síntesis de los compuestos, con un efecto más marcado sobre la mPDHP. Considerando las velocidades iniciales de formación de producto, el recubrimiento con SiNPs no parece haber generado restricciones difusionales significativas para la producción de AG. La formación de este compuesto en las primeras horas de la reacción presentó una velocidad de $0,92 \pm 0,01$ g/L.h, que fue incluso mayor a la observada por las células en reposo libres en las mismas condiciones ($0,47 \pm 0,02$ g/L.h), según los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta Tesis. Por su parte, la velocidad inicial de formación de DHA por las células recubiertas fue más baja que la observada para las células en reposo libres, presentando valores de $0,29 \pm 0,03$ g/L.h y $0,48 \pm 0,02$ g/L, respectivamente. En este caso, la disminución en la velocidad de formación de producto podría estar asociada a un peor desempeño de la enzima mPDHP producto de la inmovilización, que alternativamente favorece la producción del compuesto de oxidación alternativo AG.

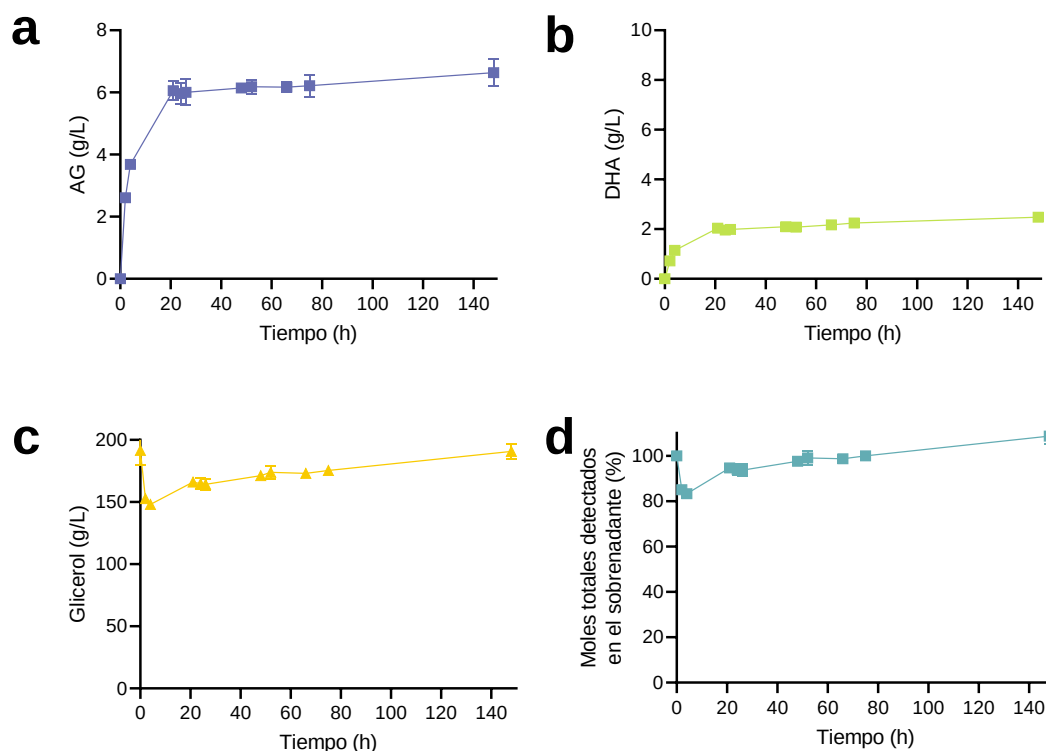


Figura 32. Biotransformación de glicerol por células de Gfr inmovilizadas en sílica biomimética. a) Cinética de producción de AG. b) Cinética de producción de DHA. c) Cinética de consumo de glicerol. d) Porcentaje de moles totales de sustrato y productos detectados en el sobrenadante.

Cabe destacar que las preparaciones inmovilizadas desarrollaron una coloración amarillenta que fue detectada en la toma de muestra correspondiente a las 21 horas de reacción (Figura 33). Esta coloración posiblemente esté relacionada con la oxidación de los grupos amino de la PEI utilizada para la inmovilización. Este cambio de coloración también fue observado y estudiado más en profundidad en la siguiente sección de este capítulo, en el que se desarrollaron una variedad de matrices híbridas de alginato y nanomateriales.

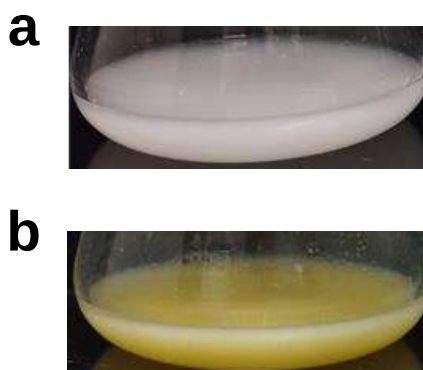


Figura 33. Coloración de las preparaciones inmovilizadas al inicio (a) y al final (b) de la reacción.

Con la finalidad de determinar si el recubrimiento con las SiNPs permite una mejora en la estabilidad operacional de las bacterias, se llevaron a cabo dos reacciones consecutivas de conversión de 200 g/L de glicerol, utilizando como control bacterias libres (Figura 34).

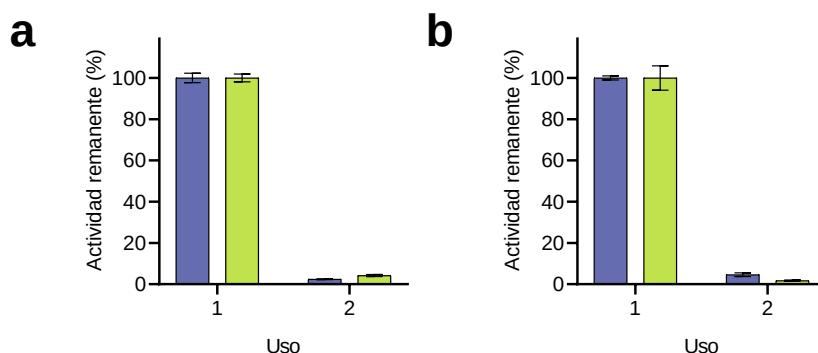


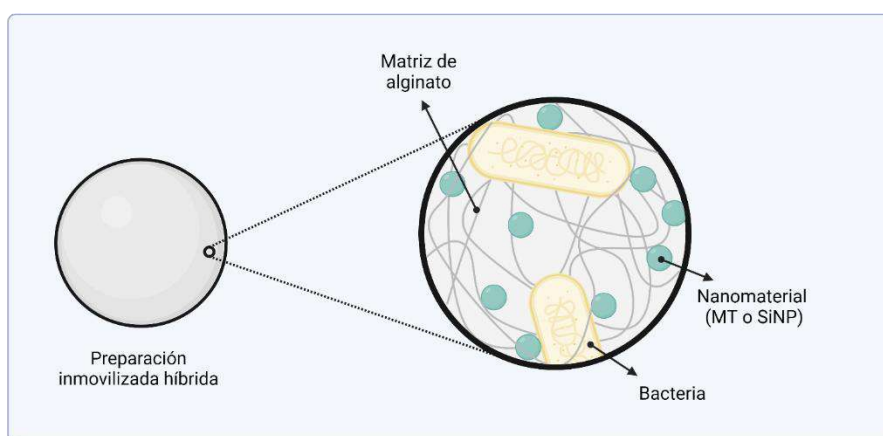
Figura 34. Ensayos de reutilización de células de Gfr en reposo (a) e inmovilizadas en sílica biomimética (b). Cada uso fue de 24 h. Actividad remanente de producción de AG (violeta). Actividad remanente de producción de DHA (Verde).

La reusabilidad de las células inmovilizadas de Gfr, tal como la de las células en reposo libres, decayó sensiblemente luego del primer uso. La producción de ambos compuestos disminuyó al menos un 95% en todos los casos, demostrando que el recubrimiento de SiNPs no ejerció en este caso un efecto protector sobre las células.

Los resultados obtenidos en esta sección constituyen el primer reporte de inmovilización en sílica biomimética para Gfr, no habiendo tampoco en la literatura otro ejemplo de inmovilización en una matriz de este tipo para otras cepas de *Gluconobacter*. Este reporte constituye una primera aproximación, por lo que aún puede verse beneficiado de una optimización del protocolo de inmovilización que mejore el desempeño de las preparaciones obtenidas. En las condiciones ensayadas se logró obtener bacterias recubiertas por nanopartículas, con una capacidad diferencial de producción de AG y DHA, en comparación con lo observado para las células libres en reposo. La inmovilización en esta matriz benefició la producción del primer compuesto frente a la del segundo. Dada la relevancia y el alto valor comercial del AG, esta estrategia podría ser implementada para disminuir la producción de DHA por parte de las bacterias, facilitando la purificación del mismo. Asimismo, considerando el gran potencial de las SiNPs para atrapar en su interior o inmovilizar enzimas en su superficie, la implementación de esta estrategia de inmovilización podría dar lugar a la preparación de cascadas inmovilizadas para la combinación de Gfr con la acción de distintas enzimas. Resultaría interesante además estudiar la aplicabilidad de esta técnica de inmovilización bacteriana a otras bacterias del género *Gluconobacter*.

Inmovilización en soportes híbridos de alginato y nanomateriales

Como quedó evidenciado en la introducción de este capítulo, el alginato es una matriz ampliamente utilizada para la inmovilización de *Gluconobacter* debido a su bajo costo, fácil uso y buen desempeño en bioconversiones, entre otras ventajas. Sin embargo, muchas veces esta matriz es lábil, lo que dificulta su reutilización sostenida y provoca pérdida de bacterias de la matriz al medio. De hecho, en un trabajo reciente del grupo de investigación observamos que las preparaciones de alginato de Gox perdían su integridad estructural completa después de cuatro usos repetidos⁵⁸. Una alternativa interesante para mejorar las propiedades estructurales de los hidrogeles es agregar materiales nanoestructurados a la matriz, como la ya mencionada arcilla MT y las SiNPs. Mediante su adición a la matriz de alginato es posible mejorar la resistencia mecánica evitando la rotura su rotura. Además, la incorporación de estos nanomateriales silíceos podría contribuir a una disminución de pérdida de bacterias al medio a través de la formación de interacciones electrostáticas. Se ha demostrado que las bacterias se adhieren a la superficie de la MT⁴¹⁰⁻⁴¹², mientras que las propiedades de la sílica biomimética, como la carga superficial, pueden contribuir a la adhesión bacteriana³¹. Es importante destacar que ambos materiales son sostenibles: la MT es una arcilla natural y las SiNPs biomiméticas se sintetizan sin solventes orgánicos ni requerimientos de alta temperatura, además de ser "inteligentes" por su capacidad de desintegrarse tras su uso⁴¹³. Por estas razones, se propuso combinar alginato y estos dos nanomateriales para generar nuevas matrices de inmovilización, con el objetivo de mejorar las propiedades del biocatalizador obtenido (Esquema 20).



Esquema 20. Representación esquemática de preparaciones híbridas que combinan alginato y nanomateriales para la inmovilización de bacterias. MT: montmorillonita. SiNP: nanopartícula de sílica.

Para el desarrollo de esta estrategia de inmovilización, nuevamente se decidió trabajar con la cepa Gfr, utilizando la conversión de glicerol a AG y DHA como modelo. Se evaluó la adición de SiNPs y MT en dos concentraciones diferentes (1 % y 4 % p/v), utilizando esferas de alginato (A4) sin adición de materiales como control. El protocolo de inmovilización fue el mismo que el utilizado para las preparaciones inmovilizadas A4, pero con un paso inicial en el que se mezclaron los pellets bacterianos con suspensiones acuosas conteniendo los nanomateriales. Las

preparaciones resultantes se denominaron de la siguiente manera: 4% alginato + 1% MT (A4M1), 4% alginato + 4% MT (A4M4), 4% alginato + 1% SiNPs (A4S1) y 4% alginato + 4% SiNPs (A4S4). Todas las preparaciones híbridas obtenidas presentaron tamaños similares ($3,6 \pm 0,4$ mm de diámetro en promedio) y formas esféricas, con ligeras diferencias de color asociadas a la adición de los nanomateriales (Figura 35, paneles a1 – e1).

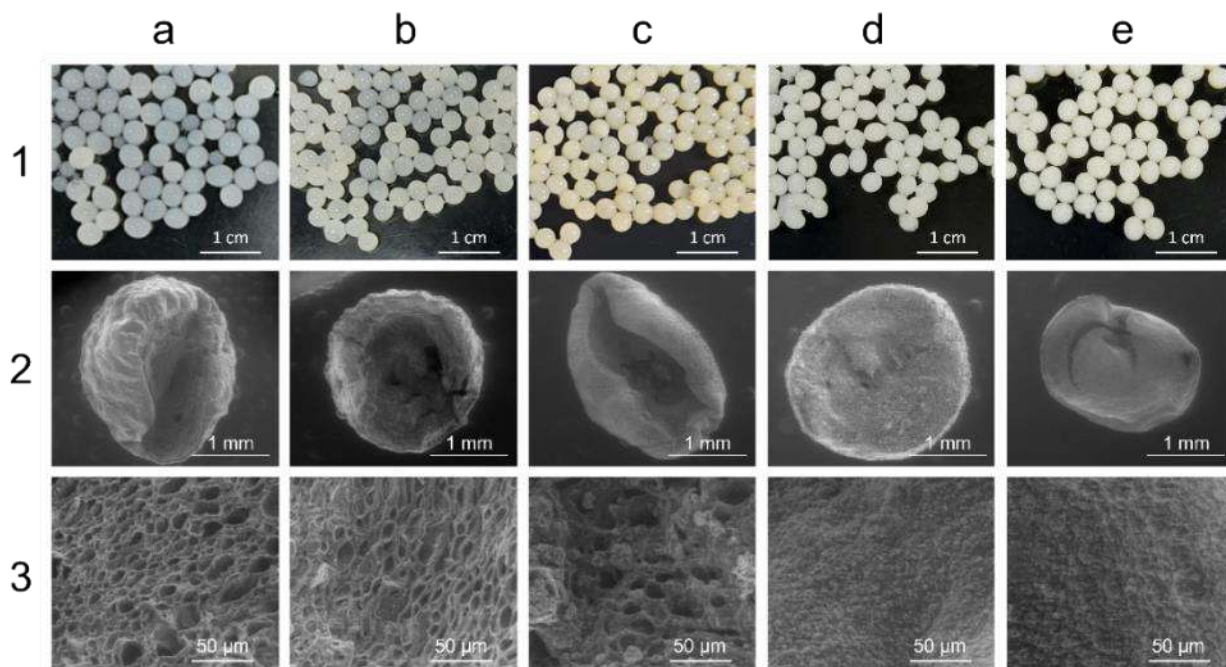


Figura 35. Inmovilización de Gfr en materiales híbridos. 1) Aspecto macroscópico de a) A4, b) A4M1, c) A4M4, d) A4S1, y e) A4S4. 2) Imágenes obtenidas por SEM (100x) de a) A4, b) A4M1, c) A4M4, d) A4S1, y e) A4S4. 3) Imágenes obtenidas por SEM (1600x) de a) A4, b) A4M1, c) A4M4, d) A4S1 y e) A4S4.

La caracterización adicional de las preparaciones híbridas se llevó a cabo mediante SEM. Para evitar un colapso estructural significativo, cada esfera fue inicialmente congelada con nitrógeno líquido y fracturada, para posteriormente ser secada por liofilización. Las micrografías mostraron que las preparaciones A4S1 y A4S4 fueron las que colapsaron menos (Figura 35, paneles d1 y e1, respectivamente), mientras que las otras preparaciones mostraron signos claros de colapso estructural (Figura 35, paneles a1, b1 y c1). Esto indicaría que las matrices que contienen SiNPs son más rígidas y pueden ser más resistentes, lo que sería beneficioso para su utilización como matrices de inmovilización en reacciones de conversión. La observación de las secciones transversales de las esferas resultantes reveló diferencias en la porosidad de las matrices. Se pueden observar poros más grandes en la esfera control (A4) (Figura 35, panel a2), mientras que la incorporación de MT resultó en una menor porosidad. Esta disminución de la porosidad parece depender de la concentración, como lo demuestran las diferencias observadas en las micrografías (Figura 35, paneles b2 y c2). Además, las preparaciones inmovilizadas que contenían SiNPs (A4S1 y A4S4) presentaron una morfología distintiva ya que no se observaron poros evidentes en ninguna de las micrografías (Figura 35, paneles d2 y e2). Una matriz compuesta por una malla más estrecha podría

correlacionarse con una mayor resistencia mecánica y podría permitir una disminución de la pérdida de bacterias al medio, un problema común relacionado con las matrices de alginato⁵⁸.

Para estudiar la resistencia mecánica de las preparaciones, se realizó un análisis mediante texturometría. Con esta técnica se logró determinar la fuerza necesaria para generar una ruptura en los distintos tipos de esferas. En todos los casos, la adición de materiales nanoestructurados resultó en preparaciones híbridas significativamente más resistentes en comparación con el control (A4). A mayor porcentaje de MT y SiNPs, mayor resistencia a la ruptura, siendo A4S4 la preparación inmovilizada que presentó mejores resultados (Figura 36).

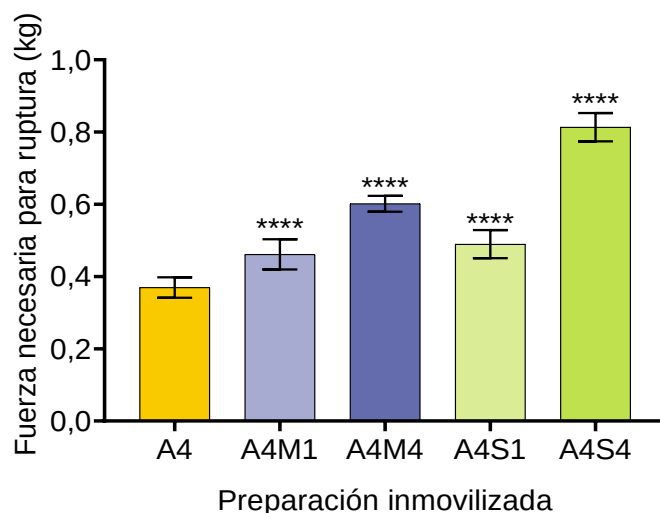


Figura 36. Análisis de resistencia mecánica de preparaciones inmovilizadas realizado mediante texturometría. El análisis estadístico fue llevado a cabo con respecto a las muestras control (A4). **** = p-valor < 0,0001.

Para evaluar la capacidad de las preparaciones híbridas para sintetizar AG y DHA, se llevaron a cabo reacciones de conversión de glicerol puro a una concentración inicial de sustrato de 200 g/L. (Figura 37). Estas condiciones fueron análogas a las utilizadas en la sección anterior, para evaluar la capacidad de conversión de glicerol de los preparados inmovilizados de Gfr, recubiertos con SiNPs.

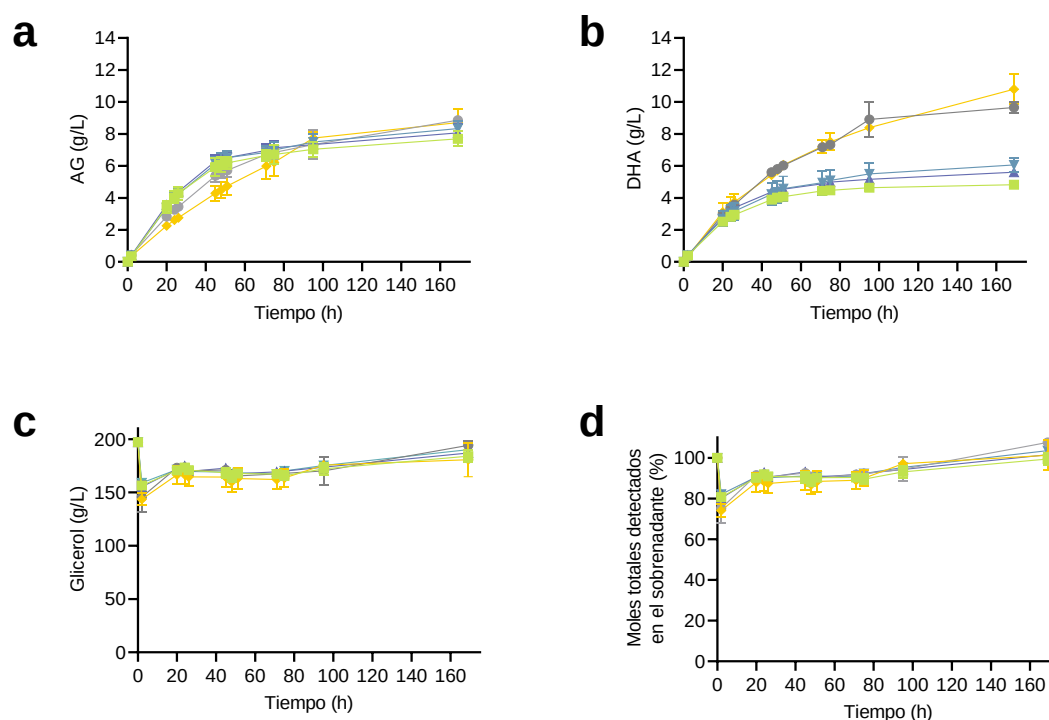


Figura 37. Biotransformación de glicerol utilizando preparaciones inmovilizadas de Gfr a partir de distintas matrices. a) Cinética de la producción AG con A4 (cuadrado verde), A4M1 (triángulo invertido azul), A4M4 (triángulo violeta), A4S1 (círculo gris) y A4S4 (rombo amarillo). b) Cinética de producción de DHA con A4 (cuadrado verde), A4M1 (triángulo invertido azul), A4M4 (triángulo violeta), A4S1 (círculo gris) y A4S4 (rombo amarillo). c) Cinética de consumo de glicerol con A4 (cuadrado verde), A4M1 (triángulo invertido azul), A4M4 (triángulo violeta), A4S1 (círculo gris) y A4S4 (rombo amarillo). d) Porcentaje de moles totales detectados en el sobrenadante con A4 (cuadrado verde), A4M1 (triángulo invertido azul), A4M4 (triángulo violeta), A4S1 (círculo gris) y A4S4 (rombo amarillo).

Las velocidades iniciales de formación del producto difirieron entre las preparaciones inmovilizadas, especialmente en la producción de AG con A4S1 y A4S4 (Tabla 17). Sin embargo, después de 170 h, la producción de AG fue similar para todas las preparaciones inmovilizadas, incluido el control (A4), alcanzando concentraciones de alrededor de 8 g/L. Sin embargo, la producción de DHA fue mejor con las preparaciones híbridas que incluían SiNPs, ya que se obtuvieron $9,7 \pm 0,3$ g/L y $10,8 \pm 0,9$ g/L con las preparaciones A4S1 y A4S4, respectivamente.

El consumo de glicerol fue similar en todas las preparaciones, a pesar de ligeras variaciones en las concentraciones finales de los compuestos obtenidos. De manera análoga a lo observado en la sección anterior para los preparados inmovilizados en sílica biomimética, durante las primeras horas de la reacción se evidenció una disminución pronunciada en la concentración del sustrato (Figura 37c) sin una formación equivalente de producto. Este comportamiento se refleja claramente en los balances de masas obtenidos a lo largo de las reacciones (Figura 37d), lo que sugiere una posible retención inicial de glicerol por los materiales utilizados. No obstante, los balances de masas al final de las reacciones mostraron porcentajes de moles totales en el

sobrenadante cercanos al 100%, lo que indica que no estaría quedando retenida una cantidad notable de sustrato o productos en ninguna de las matrices.

Tabla 17. Producción de AG y DHA a partir de glicerol con varias preparaciones inmovilizadas de Gfr a base de alginato.

Preparación inmovilizada	Diámetro inicial (mm)	Diámetro final (mm) ^a	V _{inicial} de formación de AG (g/L.h) ^b	V _{inicial} de formación de DHA (g/L.h) ^b	Máxima conc. de AG (g/L) ^a	Máxima conc. de DHA (g/L) ^a	DO _{600 nm} final ^a
A4	3,7 ± 0,5	3,5 ± 0,5	0,172 ± 0,1	0,126 ± 0,004	7,7 ± 0,5	4,8 ± 0,2	0,368 ± 0,042
A4M1	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,3	0,169 ± 0,1	0,135 ± 0,023	8,3 ± 0,5	6,1 ± 0,5	0,095 ± 0,021
A4M4	3,5 ± 0,4	3,1 ± 0,4	0,178 ± 0,1	0,139 ± 0,002	8,1 ± 0,6	5,6 ± 0,1	0,106 ± 0,031
A4S1	3,5 ± 0,3	2,8 ± 0,3	0,141 ± 0,1	0,149 ± 0,002	8,9 ± 0,2	9,7 ± 0,3	0,137 ± 0,154
A4S4	3,9 ± 0,4	2,7 ± 0,3	0,11 ± 0,01	0,155 ± 0,029	8,7 ± 0,8	10,8 ± 0,9	0,039 ± 0,007

^aLuego de 170 h.

^bCálculo basado en el dato de concentración obtenido a las 20 h de reacción.

Es de destacar que después de 24 h de reacción, las preparaciones A4S1 y A4S4 comenzaron a presentar un tono amarillo, que se intensificó aún más a lo largo del experimento y parece depender de la concentración de SiNPs, análogo a lo detallado en la sección anterior. Para conocer más sobre este fenómeno, se llevaron a cabo dos experimentos control con esferas compuestas por la matriz A4S4 simulando las condiciones de reacción, pero con algunas modificaciones. El primer experimento control se llevó a cabo con esferas que contenían Gfr, pero el medio de reacción utilizado fue simplemente agua. El segundo control fue llevado a cabo con esferas preparadas a partir de la matriz A4S4 sin el agregado de bacterias. En este caso el medio de reacción fue 200 g/L de glicerol en agua. Luego de 24 h, ambos controles se mostraron sin cambio de color (Figura A8). Esto indica que la oxidación del glicerol por Gfr está causando el cambio de coloración, probablemente al promover la oxidación de los grupos amino de la PEI remanentes luego de la síntesis de SiNPs.

Una evaluación por espectrofotometría UV-VIS de los sobrenadantes de la reacción después de 170 h de producción (Tabla 17, Figura A9) mostró que los correspondientes a las preparaciones A4 mostraron una mayor turbidez, probablemente debido al daño de la matriz y la pérdida de células al medio. Por otra parte, aquellos sobrenadantes provenientes de las preparaciones híbridas resultaron ser los más limpios. Estos resultados resultan alentadores, ya que un sobrenadante de reacción más limpio requiere menos procesamiento posterior e implicaría, si la turbidez es debida a la rotura de las esferas, una mayor resistencia física y capacidad de reutilización. Considerando el mejor desempeño mostrado por las preparaciones A4S4, se seleccionaron para los experimentos subsiguientes.

Como se mencionó anteriormente, una problemática común asociada al atrapamiento de bacterias en hidrogeles es la pérdida de células al medio de reacción. En consecuencia, se realizó un experimento para determinar si la adición de SiNPs a la matriz de alginato contribuye a la disminución de este fenómeno. Para este experimento, se simuló una reacción de conversión de glicerol, pero el medio de reacción se reemplazó con agua estéril. A diferencia de los experimentos anteriores, Gfr se inmovilizó en condiciones asépticas en las matrices A4 y A4S4. Todos los reactivos y materiales fueron esterilizados antes de su uso.

A las 24 h se tomaron muestras de los sobrenadantes de reacción, se sembraron en placas y se contaron las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) obtenidas en cada caso. La incorporación de SiNPs a las preparaciones de A4S4 contribuyó a disminuir la pérdida de células al medio, ya que las UFC/mL detectadas en el sobrenadante correspondiente al material híbrido (A4S4) fue apenas un 10% del total de UFC/mL detectado en el sobrenadante control (A4), siendo 150 ± 71 UFC/mL y 1310 ± 297 UFC/mL respectivamente. La pérdida de bacterias al medio para ambas preparaciones fue baja, considerando que los 20 mg de peso seco de células inmovilizadas corresponden aproximadamente a 5×10^{10} UFC. La cantidad de UFC/mL detectada en los sobrenadantes de reacción constituye un $8,9 \times 10^{-6}\%$ para el caso de las preparaciones A4S4, frente a un $78,4 \times 10^{-6}\%$ detectada en los sobrenadantes de reacción de las preparaciones A4. Una explicación plausible para este fenómeno puede estar relacionada con el establecimiento de interacciones iónicas entre Gfr y la matriz. Las SiNPs están cargadas positivamente debido a la PEI, mientras que los LPS presentes en la membrana externa de Gfr tienen carga negativa. Además, la mejor resistencia física de este material puede estar relacionada con la malla de matriz más estrecha con tamaños de poros reducidos que disminuyen la pérdida de células al medio.

Para visualizar las bacterias en el interior de los preparados, esferas preparadas a partir de las matrices A4 y A4S4 se analizaron mediante microscopía confocal. Las bacterias inmovilizadas en esta caso fueron Gox-mCherry. Ambos catalizadores mostraron una integración bacteriana homogénea similar en el material (Figura 38). Sin embargo, las imágenes presentaron ligeras diferencias que parecen estar relacionadas con la dureza de los catalizadores, ya que se logró un corte más limpio en las preparaciones A4 en comparación con el obtenido en las preparaciones A4S4. Esta distribución bacteriana similar es coherente con los resultados de conversión de DHA y AG comparables que se demostraron anteriormente.

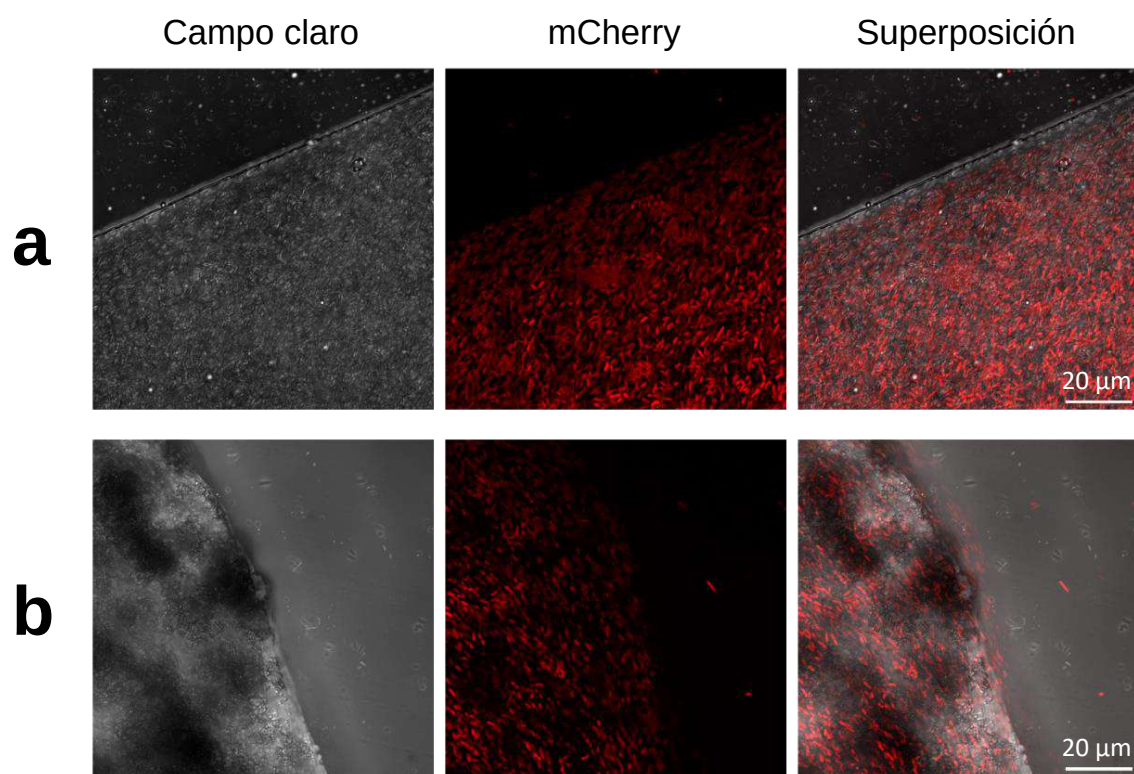


Figura 38. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de preparaciones inmovilizadas de Gox-mCherry fluorescente en las matrices A4 (a) y A4S4 (b).

Continuando con la caracterización de los inmovilizados, se estudió la capacidad de reutilización de los preparados A4S4 en comparación con la capacidad de reutilización de los preparados control (A4), y de las células libres en 8 reacciones sucesivas de conversión de glicerol (Figura 39). Cada reacción tuvo una duración de 24 h.

La capacidad de reutilización de los preparados inmovilizados híbridos fue ampliamente superior a la de los preparados de alginato y las células libres. Las células libres disminuyeron su capacidad de producción de AG y DHA a menos del 10% a partir del segundo uso. Los preparados híbridos mantuvieron su actividad remanente de producción de AG por encima del 15% a lo largo de todo el ensayo, mientras que los preparados de alginato presentaron valores inferiores al 15% desde el uso 4. Considerando la producción de DHA, los preparados híbridos presentaron un mejor desempeño, nuevamente manteniendo una actividad remanente por encima del 15% durante todo el ensayo, mientras que los preparados de alginato dejaron de producir este compuesto a partir del uso 6.

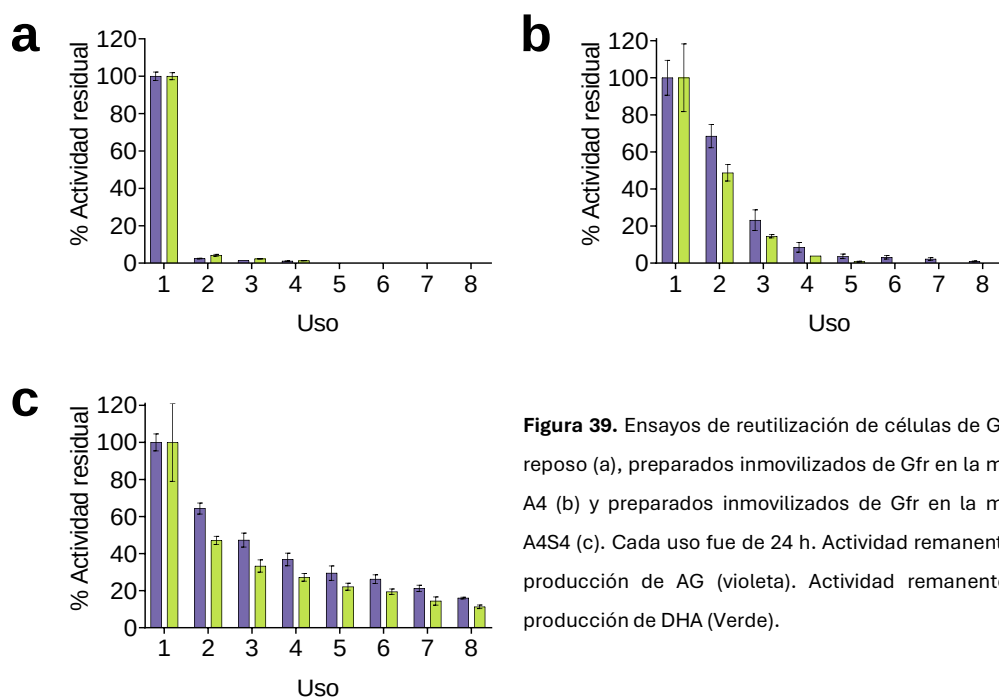


Figura 39. Ensayos de reutilización de células de Gfr en reposo (a), preparados inmovilizados de Gfr en la matriz A4 (b) y preparados inmovilizados de Gfr en la matriz A4S4 (c). Cada uso fue de 24 h. Actividad remanente de producción de AG (violeta). Actividad remanente de producción de DHA (Verde).

Con respecto a la integridad física de los preparados luego de los sucesivos usos, se logró demostrar que el agregado de SiNPs mejora su resistencia. Luego de 5 usos consecutivos, los preparados de alginato comenzaron a presentar rupturas, perdiendo sensiblemente su estructura esférica luego de 8 usos (Figura 40a y b). En contraste, los preparados de A4SA mantuvieron su integridad física a lo largo de todos los usos, modificando solamente su coloración (Figura 40c y d). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos previamente, observados en la Tabla 17.

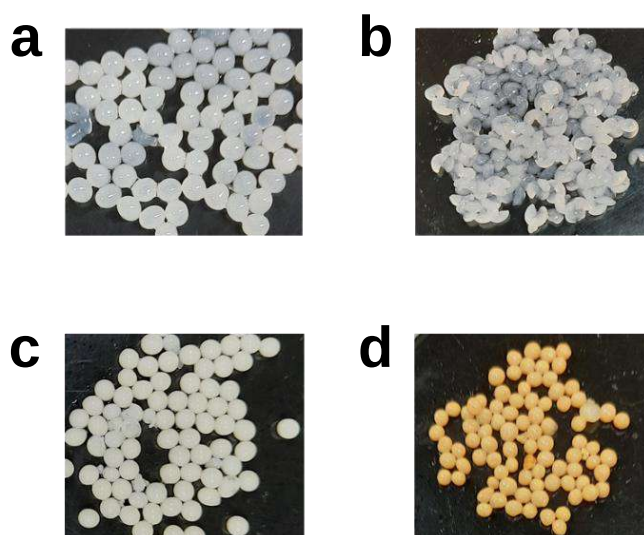


Figura 40. Preparaciones inmovilizadas basadas en Gfr. a) Preparaciones A4 al comienzo del uso 1. b) Preparaciones A4 al final del uso 8. c) Preparaciones A4S4 al comienzo del uso 1. d) Preparaciones A4S4 al finalizar el uso 8.

Para determinar si la matriz de inmovilización A4S4 puede ser aplicada para generar inmovilizados activos de otra cepa de *Gluconobacter*, se procedió a obtener preparaciones inmovilizadas de Gox. Las mismas fueron utilizadas para producir DHA a partir de glicerol. La conversión se llevó a cabo utilizando 50 g/L de glicerol como sustrato y como control, se llevó a cabo la misma reacción de conversión⁷⁸ empleando células en reposo. Esta concentración de sustrato fue anteriormente utilizada por nuestro grupo de investigación, utilizando Gox inmovilizado en alginato⁵⁸, agar, y agarosa, logrando obtener en todos los casos conversiones cuantitativas a DHA en estas condiciones. En esta ocasión, los preparados inmovilizados de Gox utilizando la matriz A4S4 permitieron una conversión cuantitativa de glicerol a DHA, demostrando que la matriz desarrollada pudo ser extendida exitosamente a otra bacteria del género *Gluconobacter* (Figura 41). Utilizando estos preparados inmovilizados se logró obtener $50,4 \pm 3,4$ g/L de DHA en 169 h, mientras que en el mismo tiempo las células en reposo permitieron la obtención de $55,4 \pm 4,8$ g/L del producto. Sin embargo, cabe destacar que las células en reposo alcanzaron una meseta en la formación de producto, concordante con el consumo total de sustrato, a las 24 horas de reacción. Por su parte, los preparados inmovilizados alcanzaron la meseta más tarde, en un punto que podría definirse entre las 100 y las 140 h. Una velocidad de conversión similar a la observada para los inmovilizados estudiados en este trabajo fue reportada previamente por nuestro grupo de investigación, utilizando alginato como matriz de inmovilización de Gox bajo las mismas condiciones experimentales⁵⁸.

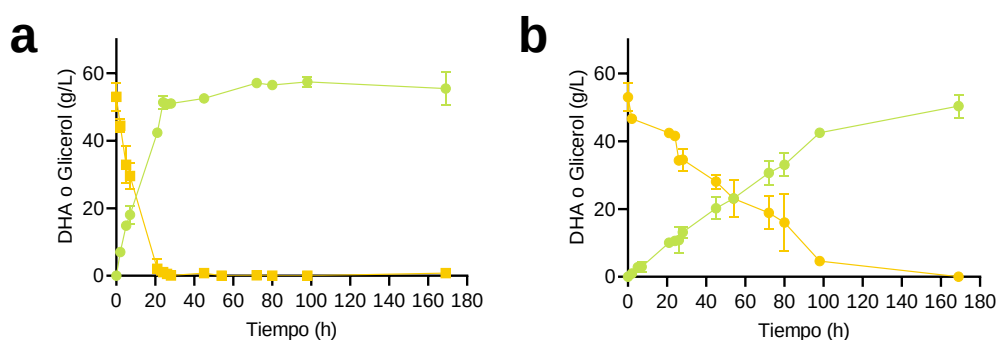


Figura 41. Biotransformaciones de glicerol a DHA por células en reposo (a) y preparaciones inmovilizadas de Gox (b). Glicerol (amarillo). DHA (verde).

Nuevamente, se observó una disminución de la velocidad de formación de producto luego de la inmovilización, análoga a la observada en el caso de Gfr. Como se mencionó anteriormente, este fenómeno puede ser atribuible a las restricciones difusionales que experimentan sustratos y productos, desde y hacia el medio de reacción.

De forma similar a lo observado con Gfr, los preparados inmovilizados de Gox también presentaron una coloración amarilla que fue incrementando a lo largo del ensayo, ya observándose amarillas a las 24 h (Figura A10).

Se realizó también un ensayo de reutilización de los preparados inmovilizados en los que se constató nuevamente el efecto protector de la matriz sobre la actividad de las bacterias, tal como se observó para Gfr. En el caso de Gox, mientras las células en reposo pierden la mitad de su actividad remanente luego de 3 usos (Figura 42a), los

preparados inmovilizados de Gox se mantienen por encima de este valor al menos por 7 usos consecutivos (Figura 42b).

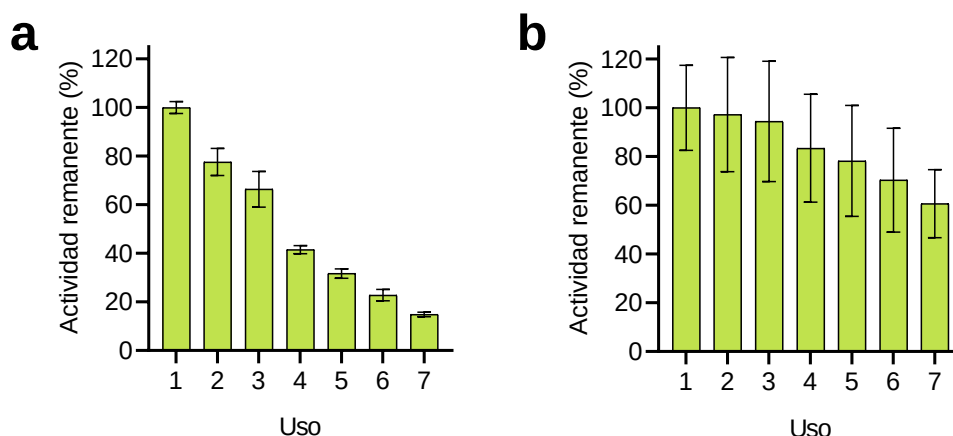


Figura 42. Ensayos de reutilización de células en reposo (a) y preparados inmovilizados A4S4 (b). Cada uso fue de 24 h. Actividad remanente de producción de DHA (Verde).

Las esferas del material A4S4 mostraron nuevamente una alta estabilidad mecánica, manteniendo su integridad estructural luego de 7 ciclos productivos (Figura A11).

La matriz de inmovilización A4S4 demostró tener propiedades mejoradas con respecto a la matriz alginato, de uso tradicional para la inmovilización de cepas de *Gluconobacter*. Las productividades comparables, junto con una mayor estabilidad mecánica comprobada, y una disminución de la pérdida de células al medio durante las reacciones de conversión, hacen de la matriz A4S4 una alternativa interesante al alginato. La misma se logró utilizar exitosamente para la inmovilización de dos cepas distintas de *Gluconobacter*, para la obtención de dos productos distintos a partir de glicerol. Estos experimentos abren la puerta a la posibilidad de inmovilizar otras cepas de *Gluconobacter*, con la potencialidad de generar la gran variedad de productos de biotransformación por los que este género bacteriano se caracteriza.

Dentro de las limitaciones encontradas con esta matriz, se encuentra la aparición de restricciones difusionales luego de la inmovilización que impactan negativamente en la velocidad de formación de producto, comparables a las experimentadas luego de la inmovilización en alginato. Sin embargo, existen estrategias que podrían evaluarse para intentar disminuir este efecto y en consecuencia, mejorar las productividades obtenidas con los preparados inmovilizados. Por ejemplo, la implementación de la reacción en un reactor en vez de en matraces podría mejorar la agitación y con eso mejorar no solamente la aireación sino también la transferencia de masa. En un trabajo publicado por Hua *et al.* mencionado en la introducción de este capítulo, se describe el uso de un reactor de tipo SOS-BR para la conversión de xilosa en ácido xilónico por *G. oxydans* NL71 inmovilizado en alginato⁶². Con esta tecnología, los autores reportan una producción de 292,1 g/L de ácido xilónico, frente a una producción de 190,6 g/L del compuesto utilizando un reactor de tanque agitado convencional, con aireación. Los autores plantean que

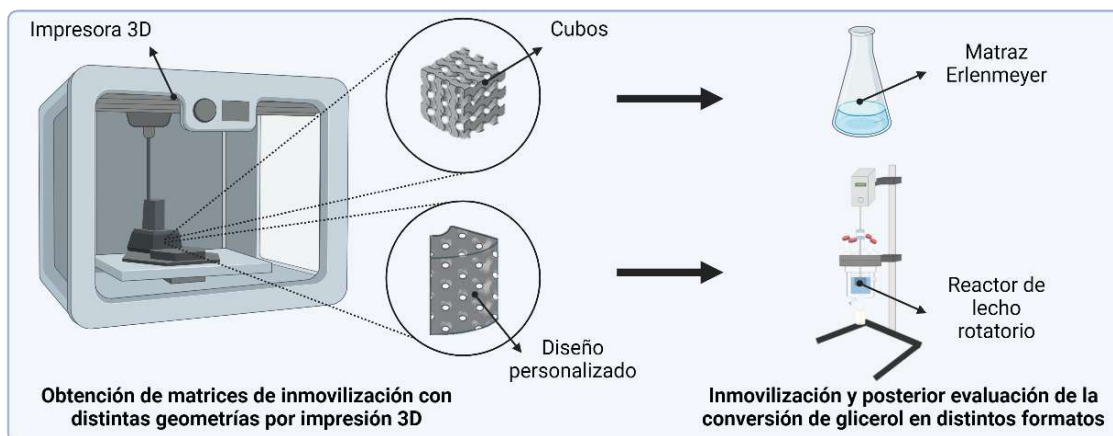
el aumento en la presión parcial de oxígeno en el reactor de oxígeno comprimido facilita el acceso de sustratos y oxígeno hacia el preparado inmovilizado, promoviendo la catálisis. En este entendido, esta estrategia podría ser beneficiosa para mejorar la productividad de las conversiones con preparados inmovilizados utilizando la matriz A4S4.

Otra alternativa poco estudiada es la reportada por Jung Kim *et al.*, en la que se llevó a cabo la inmovilización de *G. suboxydans* KCCM21182 en alginato para producción de L-sorbosa, añadiendo a los preparados distintos transportadores de oxígeno⁴¹⁵. De entre todos los compuestos ensayados, el n-dodecano presentó los mejores resultados. Utilizando este transportador de oxígeno, los autores reportaron una mejora en consumo de oxígeno acompañada de un aumento en la producción de L-sorbosa de hasta un 48%. Esta técnica también podría ser fácilmente implementada para mejorar la performance de los preparados inmovilizados obtenidos a partir de la matriz A4S4.

Inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D

En los últimos años, los avances tecnológicos en el área de la manufacturación aditiva han permitido diversificar su aplicación a una variedad de campos, entre ellos la biocatálisis. La posibilidad de obtener estructuras complejas en una gran diversidad de materiales a partir de impresión 3D, permite el desarrollo de matrices de inmovilización con propiedades mejoradas, facilitando la obtención de compuestos de relevancia industrial. Los beneficios que puede otorgar esta tecnología van desde la obtención de preparados más resistentes, con mayor capacidad de reutilización, hasta la obtención de estructuras que benefician la transferencia de masa entre el catalizador y el medio de reacción.

Como se desprende de la revisión bibliográfica presentada en la introducción de este capítulo, esta moderna aproximación a la obtención de preparados inmovilizados aún no ha sido aplicada a bacterias del género *Gluconobacter*. La utilización de estructuras con geometrías que permitan mejorar el intercambio de masas y gasas, en especial de oxígeno, constituye un recurso clave para la mejora de procesos biocatalizados por estos microorganismos. Asimismo, la obtención de materiales duraderos y altamente reutilizables es necesaria para asegurar una buena productividad, lo que hace que la investigación sobre este tipo de matrices sea altamente relevante. En consecuencia, en el marco de una colaboración con el Dr. Simone Dimartino del Instituto de Bioingeniería de la Universidad de Edimburgo, se buscó estudiar soportes de inmovilización para *Gluconobacter* obtenidos por impresión 3D, que reúnan estas características (Esquema 21). Todas las estructuras reportadas a continuación, fueron impresas por el grupo de investigación del Dr. Dimartino utilizando una tecnología fotopolimerización en cubeta. Posteriormente, las mismas fueron enviadas al Laboratorio de biotecnología de la Universidad ORT Uruguay para su implementación.



Esquema 21. Representación esquemática de la obtención de preparados inmovilizados utilizando matrices de inmovilización obtenidas por impresión 3D.

Nuevamente, para la puesta a punto de esta estrategia de inmovilización se utilizó Gfr y la conversión de glicerol a AG y DHA como modelo. La misma fue abordada con un enfoque de inmovilización post-impresión, en el cual se buscó en primera instancia obtener las estructuras impresas y seguidamente llevar a cabo la inmovilización.

En una primera aproximación, se llevó a cabo la preparación de cubos 0,8 cm de lado, con giroides como estructura interna (Figura 43a y b). Las estructuras giroidales son un tipo de superficie mínima triplemente periódica (TPMS, por sus siglas en inglés), que se caracteriza por presentar una geometría única y compleja⁴¹⁶. Entre sus propiedades más destacables se encuentra poseer un área superficial maximizada para mejorar la transferencia de masa, y poseer una elevada rigidez estructural³⁴, lo que las hace estructuras ideales para la preparación de matrices de inmovilización de microorganismos.

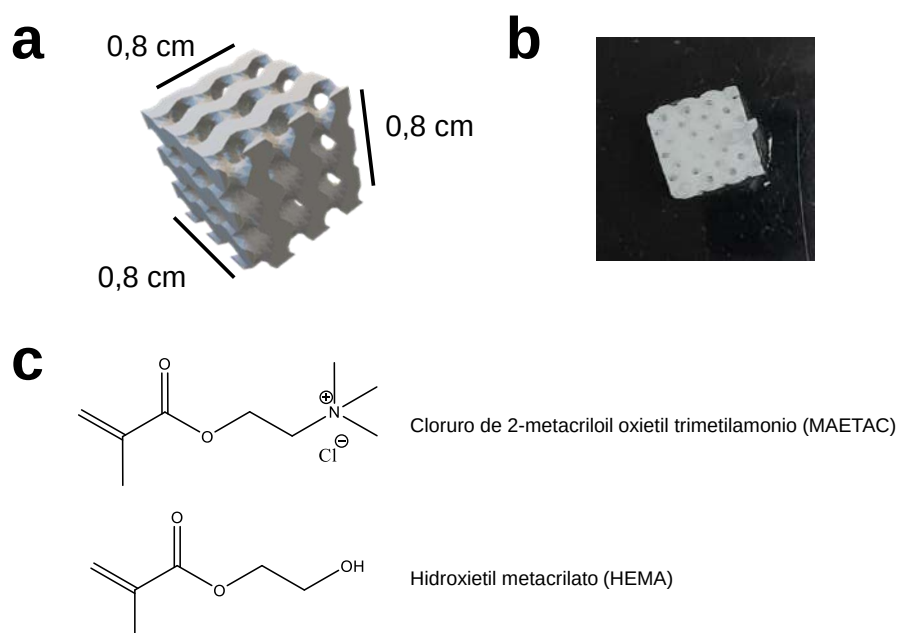
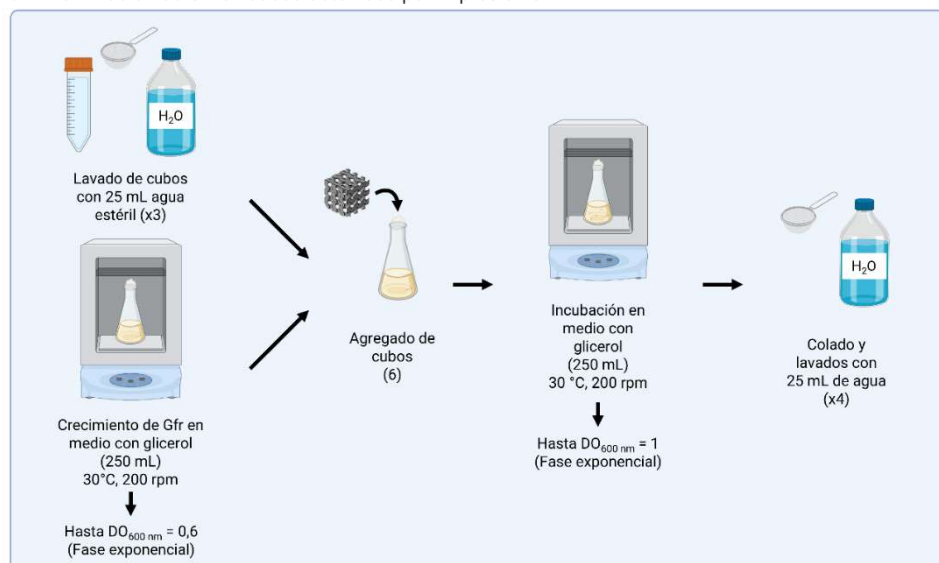


Figura 43. Cubos obtenidos por impresión 3D en el material A, conteniendo motivos giroidales como estructura interna. a) Esquema representativo con dimensiones. b) Imagen de la estructura impresa. c) Monómeros bifuncionales que componen el material A.

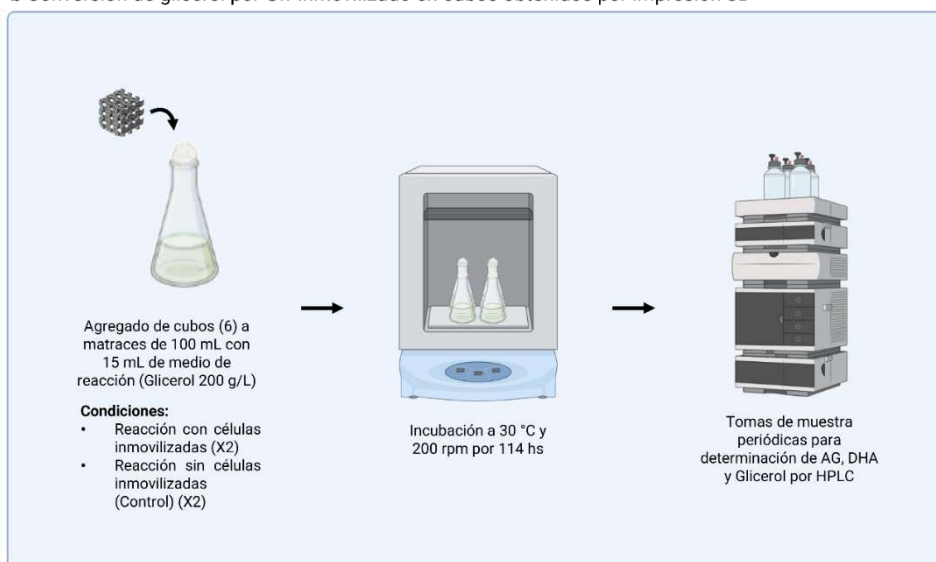
La elección del material para la impresión de las estructuras fue basada en un reporte previo de Dimartino *et al.*, en el que se llevó a cabo la inmovilización de *Rhodococcus opacus* IEGM 248 para llevar a cabo la desulfurización de benzotiofeno³⁴. Dada la carga superficial negativa de *Gluconobacter* dada por la presencia de los LPS que componen su membrana externa, la utilización de un material cargado positivamente permitiría la formación de interacciones electrostáticas que favorecerían la formación de un biofilm. Por esta razón, el material seleccionado presenta monómeros bifuncionales cargados positivamente e hidrofílicos, que presentan aminas cuaternarias (MAETAC), y grupos hidroxilos (HEMA), fomentando la inmovilización celular (Figura 43c). Adicionalmente, el material se compuso de etilenglicol metacrilato como agente entrecruzante, con ciclohexanol y dodecanol como porógenos. La funcionalidad metacrilato fue seleccionada para proporcionar al material la capacidad de ser autoclavado. Este material fue denominado material A y en adelante será referido como tal.

Una vez obtenidos los soportes, fue necesario diseñar una estrategia para la inmovilización de Gfr en los mismos (Esquema 22a), seguido del diseño de una estrategia para llevar a cabo la conversión de glicerol a partir su utilización (Esquema 22b). Cabe destacar que en el transporte desde la Universidad de Edimburgo se notó un cierto daño estructural, evidenciado por el desprendimiento de pequeñas partículas del soporte (Figura A12).

a Inmovilización de Gfr en cubos obtenidos por impresión 3D



b Conversión de glicerol por Gfr inmovilizado en cubos obtenidos por impresión 3D



Esquema 22. Protocolos de inmovilización de Gfr (a) y conversión de glicerol (b) utilizando como matriz de inmovilización cubos obtenidos por impresión 3D.

La inmovilización se llevó a cabo poniendo en contacto 6 cubos de material A, lavados previamente con agua destilada (Figura 44a), con un cultivo de Gfr en el comienzo de la fase exponencial de crecimiento con un valor de $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6. Los cubos fueron incubados utilizando una agitación orbital de 200 rpm a 30 °C hasta que el cultivo alcanzó un valor de $DO_{600\text{ nm}}$ de 1, proceso que tomó 3,5 h. Cabe destacar que durante el procedimiento de inmovilización se observaron partículas macroscópicas que fueron apareciendo producto de la rotura de los cubos (Figura 44b). En consecuencia, luego de la inmovilización se observó una sensible pérdida de integridad del material (Figura 44c), lo que indica que la resistencia mecánica del mismo y su geometría no serían adecuadas para su utilización empleando este protocolo. Al finalizar la etapa de inmovilización, los cubos presentaron una

disminución de tamaño causada por la deformación del material, que resultó en la obtención de estructuras más esféricas. Esta deformación posiblemente haya estado asociada a la agitación orbital utilizada. Asimismo, se observó un cambio de coloración significativo luego del proceso de inmovilización, ya que los cubos que inicialmente eran blancos tomaron una coloración amarillenta que pudo haberse debido a la adsorción de las células, junto con componentes del medio de cultivo.

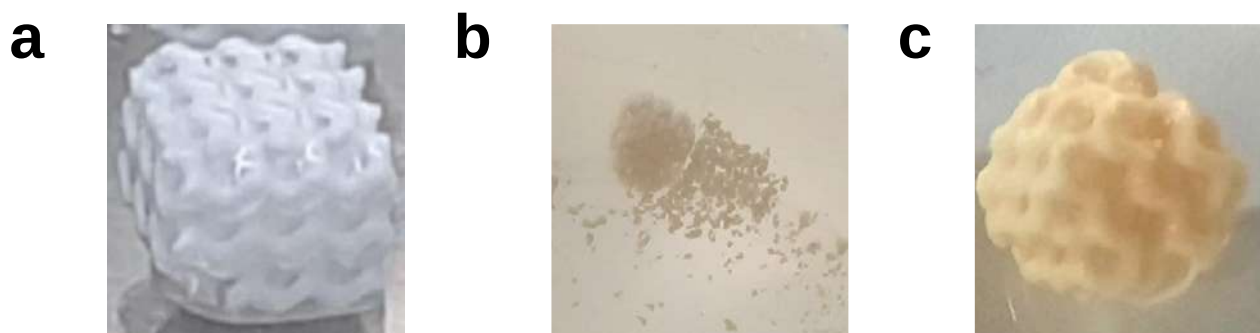


Figura 44. Inmovilización de Gfr en cubos preparados a partir del material A. a) Estructura de un cubo previo al protocolo de inmovilización. b) Estructura de un cubo durante el protocolo de inmovilización dentro del matraz, rodeado del debris generado. c) Estructura de un cubo luego del protocolo de inmovilización.

Los cubos conteniendo Gfr inmovilizado fueron luego lavados con agua destilada y utilizados para la conversión de 200 g/L de glicerol en agua, poniéndolos en contacto con 15 mL del medio de reacción en un matraz de 100 mL (Figura 45a, i). Adicionalmente, se llevó a cabo un control utilizando cubos libres de Gfr para evaluar el desempeño del material en las condiciones del experimento (Figura 45a, ii). Luego de 114 h se obtuvieron $2,9 \pm 0,3$ g/L de DHA y $0,4 \pm 0,1$ g/L de AG (Figura 45b). Si bien este resultado indica una inmovilización exitosa y activa de Gfr en el material, los rendimientos obtenidos fueron más bajos que los presentados por los preparados inmovilizados de alginato y nanomateriales reportados en la sección anterior, especialmente para el caso del AG. Cabe destacar además, que a diferencia de lo observado para los preparados híbridos antes mencionados, el producto mayoritario obtenido de la oxidación del glicerol por Gfr inmovilizado en los cubos impresos fue la DHA. Un análisis de la cinética de producción de ambos compuestos demostró además que mientras que la producción de DHA se mantuvo durante al menos 45 horas, la producción de AG se detuvo en las primeras 15 horas de reacción.

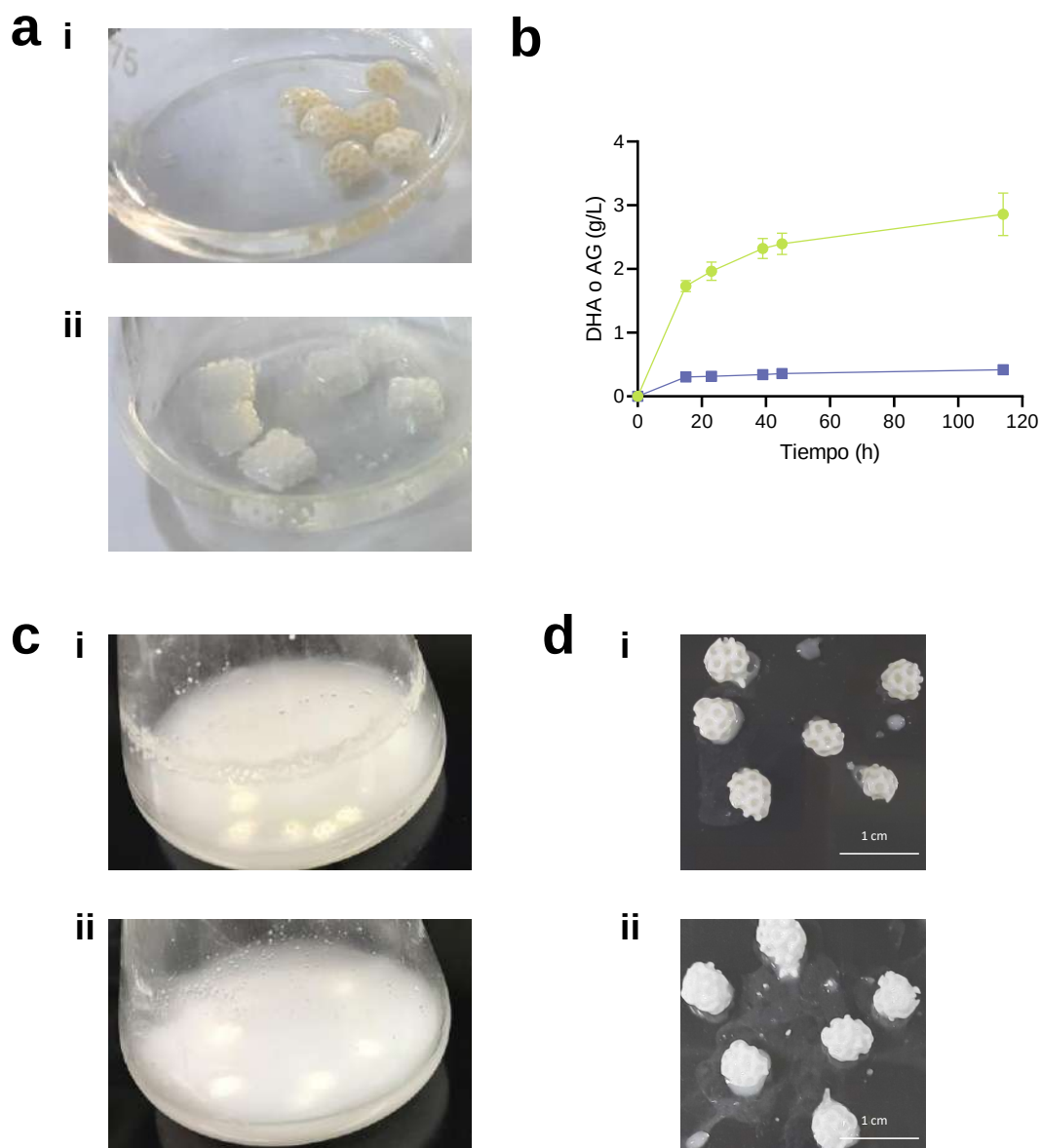


Figura 45. Biotransformación de glicerol por Gfr inmovilizado en cubos obtenidos por impresión 3D utilizando el material A. a) Comienzo de la reacción (i) y la reacción control sin células (ii). b) Cinética de producción de AG (cuadrados violetas) y DHA (círculos verdes) a partir de glicerol por Gfr inmovilizado en cubos obtenidos por impresión 3D. c) Fin de la reacción (i) y la reacción control sin células (ii) (114 h). d) Estructura de los cubos obtenidos por impresión 3D luego de 114 h de reacción (i) y de reacción control (ii).

La baja conversión hacia los productos de interés pudo deberse a distintos factores, como por ejemplo a la cantidad de bacterias presentes en la reacción. En tal caso, se podría aumentar la cantidad de cubos por reacción, lo que resultaría en un aumento en la cantidad de biocatalizador. Asimismo, se podría modificar el protocolo de inmovilización aumentando la cantidad de tiempo en el que los cubos están en contacto con el cultivo, o incluso añadiendo etapas a la inmovilización en las que se sustituya el medio de cultivo existente por medio fresco, para favorecer el crecimiento de las células en la superficie de los soportes. Por ejemplo, Belgrano *et al.* reportaron un protocolo basado en varias etapas de crecimiento para la inmovilización de *Propionibacterium acidipropionici*

C.I.P 53.164, en estructuras obtenidas por impresión 3D semejantes a las utilizadas en este trabajo³⁷⁰. En dicho reporte, los autores llevaron a cabo entre 3 y 5 ciclos de crecimiento del biocatalizador con agregados de medio fresco antes de utilizar las preparaciones inmovilizadas resultantes para la producción de ácido propiónico.

Otra posibilidad que puede afectar la conversión puede estar relacionada a cambios metabólicos en las células al crecer en adherencia como biofilms. La formación de biofilms bacterianos viene acompañada de la secreción de sustancias poliméricas extracelulares que les confieren funciones como la adherencia a superficies y promueven la formación de *clusters*⁴¹⁷. De hecho, la formación de *clusters* de bacterias embebidos en polímeros extracelulares ha sido anteriormente descrito por Truong *et al.* para *G. oxydans subesp. industrius* B-1280 inmovilizado en una matriz de PVA entrecruzada con N-vinil pirrolidona⁴⁹. Este cambio organizacional y metabólico de las bacterias puede afectar la oxidación de glicerol de distintas formas. Por ejemplo, la actividad de las enzimas deshidrogenasas puede verse disminuida por cambios en la expresión génica producto de la modificación del metabolismo. Asimismo, la formación de la matriz de polímeros extracelulares puede generar restricciones difusionales que dificulten la difusión de los sustratos y productos desde y hasta las células. Este efecto podría ser una de las causales de la producción diferencial de AG y DHA, que difiere con lo observado en las secciones anteriores de esta Tesis, en experimentos con Gfr libres e inmovilizadas partiendo de una concentración de glicerol de 200 g/L.

Al finalizar la reacción de conversión, la integridad estructural de los cubos fue afectada de forma comparable a lo observado luego del proceso de inmovilización. Eso también pudo haber afectado la conversión de glicerol, ya que las células inmovilizadas pueden haberse visto dañadas. El medio de reacción que inicialmente se presentaba traslúcido se volvió turbio y blanquecino producto del desgaste de la matriz (Figura 45c, i). Este cambio de coloración fue inicialmente detectado a las 15 horas de reacción, aunque su aparición puede haber ocurrido con anterioridad. El tamaño de los cubos disminuyó considerablemente, nuevamente tendiendo hacia una forma más esférica (Figura 45d, i). El daño estructural y el cambio en la coloración del medio de reacción también fue observado en las reacciones control llevadas a cabo en ausencia de la bacteria, observando nuevamente una reducción en el tamaño de los cubos, acompañada de la aparición del tono blanquecino en el medio de reacción (Figura 45c, ii y 45d, ii). Estos resultados indican que el material A no presenta la resistencia mecánica suficiente para poder llevar a cabo las reacciones de conversión en las condiciones ensayadas, contaminando el medio de reacción con fragmentos de la estructura. Dada la limitada estabilidad operacional presentada por estas estructuras frente a las condiciones utilizadas para la biotransformación, se decidió modificar tanto la geometría de las matrices de inmovilización, como las condiciones de operación.

De los resultados obtenidos en esta primera aproximación, se desprende que la vigorosa agitación orbital utilizada fue la principal causal de rotura de las matrices con forma de cubo, tanto en las etapas de inmovilización como de conversión. Sin embargo, una buena aireación es clave para llevar a cabo reacciones de oxidación con *Gluconobacter* como la aquí estudiada. En consecuencia, es de vital importancia encontrar condiciones de

implementación para las matrices de inmovilización en las que se protejan las estructuras, pudiendo asegurar además una buena aireación que permita la oxidación del glicerol por Gfr. Aprovechando la gran versatilidad que otorga la impresión 3D para la generación de estructuras con formas complejas, se decidió preparar piezas compuestas por el material A que pudiesen ser utilizadas en un reactor de lecho rotatorio de tipo *SpinChem* (Figura 46). Tal como se señaló en la Introducción general de esta Tesis, este tipo de reactores está diseñado específicamente para evitar la desintegración de las matrices de inmovilización, manteniéndolas retenidas dentro del cilindro rotatorio. Esto permite incrementar las velocidades de agitación sin comprometer la integridad estructural de las matrices, favoreciendo además una mejor transferencia de masa.

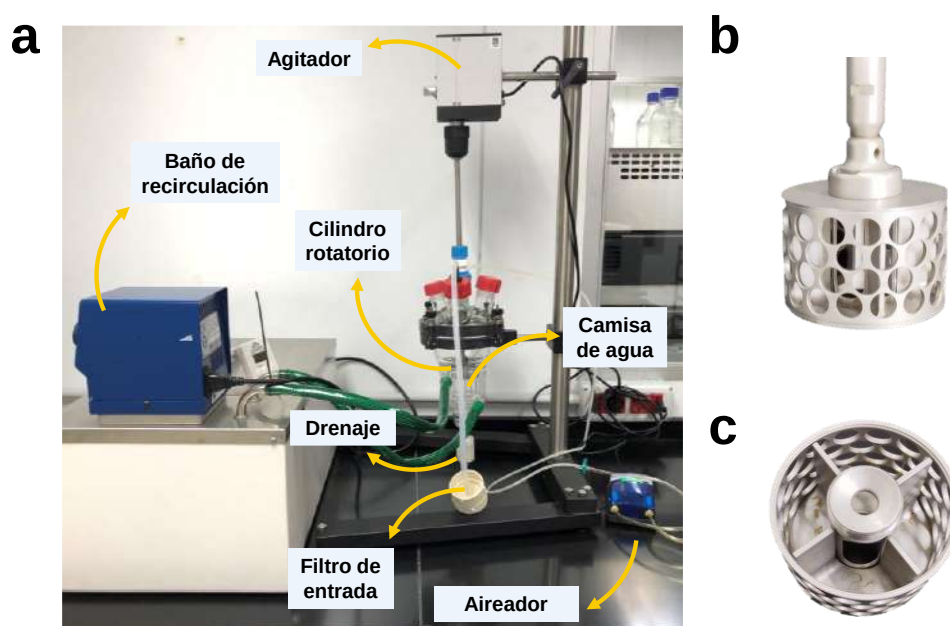


Figura 46. Reactor de lecho rotatorio *SpinChem* RBR S2 equipado con un recipiente *SpinChem* Vessel V2 (300 mL). a) Configuración del reactor de lecho rotatorio. Agitador: controla la velocidad de giro del cilindro rotatorio. Cilindro rotatorio: compartimento que contiene las preparaciones inmovilizadas. Camisa de agua: camisa que permite mantener la temperatura del reactor. Baño de recirculación: baño de agua termostatzado que alimenta la camisa de agua. Aireador: bomba que permite la aireación dentro del reactor. Filtro de entrada: Filtro de entrada al reactor (0,22 μm) que permite el agregado de medio de cultivo y agua estériles. Drenaje: Permite el recambio de medio de cultivo y agua. b) Vista externa del cilindro rotatorio. c) Vista interna del cilindro rotatorio, con sus 4 secciones.

A partir de las medidas internas del cilindro rotatorio, que se encuentra dividido en 4 secciones, se llevó a cabo el diseño de piezas que cubrieran toda el área interna del mismo. Estas piezas presentaron una estructura semejante a un cuarto de cilindro hueco, con una estructura interna compuesta por motivos giroidales (Figura 47a). Cabe destacar que en el traslado desde la Universidad de Edimburgo se pudo observar algunos daños estructurales en las piezas (Figura 47b). De todas formas, las mismas pudieron ser colocadas correctamente dentro del cilindro rotatorio, indicando que el diseño de las estructuras fue correcto (Figura 47c).

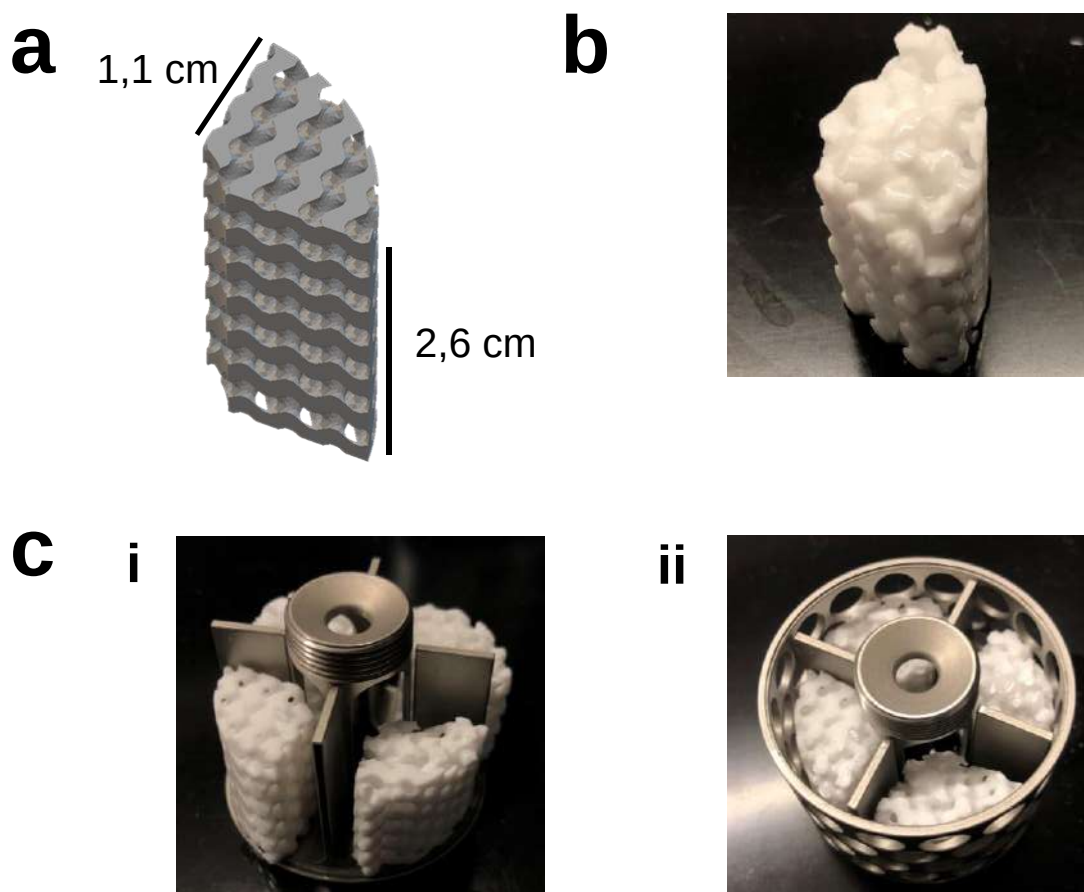
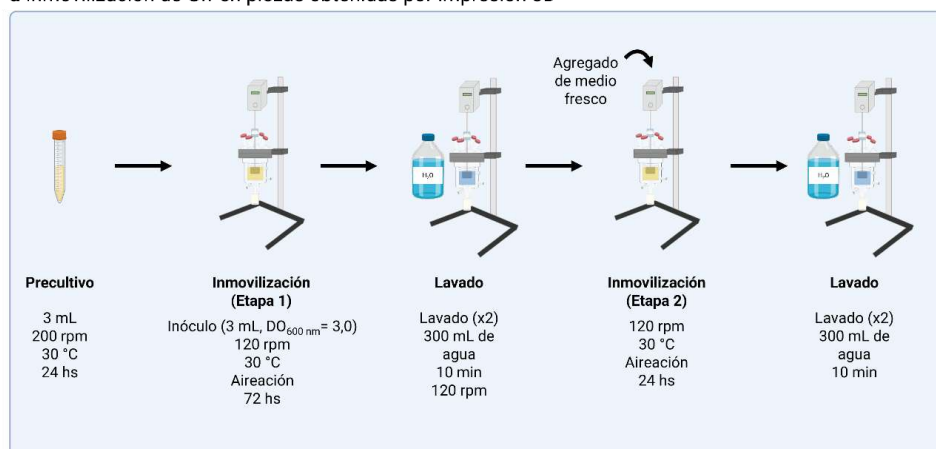


Figura 47. Piezas obtenidas por impresión 3D en material A, conteniendo motivos giroidales como estructura interna, para su uso en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio. a) Esquema representativo con dimensiones. b) Imagen de la estructura impresa, mostrando una superficie irregular producto del daño. c) Piezas colocadas dentro del cilindro rotatorio, sin la cubierta externa (i) y con la cubierta externa (ii).

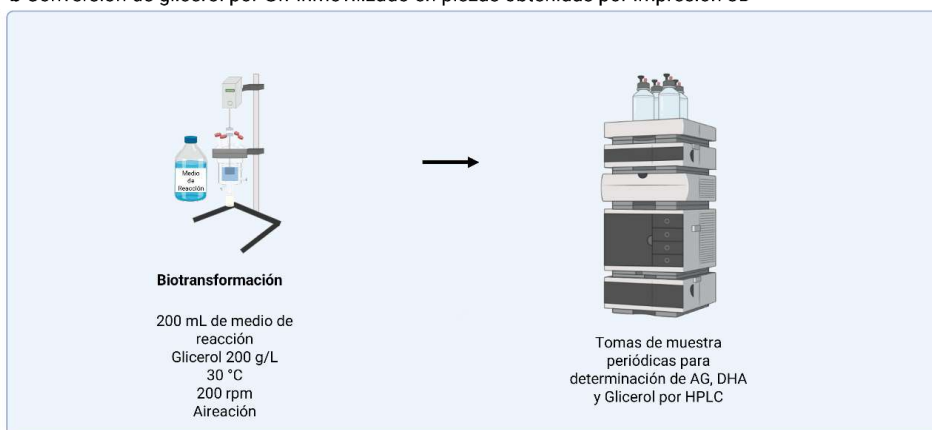
Una vez obtenido el material impreso, se procedió a diseñar un protocolo para llevar a cabo la inmovilización de las bacterias (Esquema 23a), seguido de un protocolo de conversión (Esquema 23b). Para la inmovilización en el reactor de lecho rotatorio, se decidió llevar a cabo un protocolo de dos etapas, en base al trabajo antes mencionado de Belgrano *et al.*³⁷⁰. En una primera etapa, se comenzó por llevar a cabo la esterilización del reactor junto con las piezas de material A ubicadas dentro del cilindro rotatorio, utilizando un autoclave. Posteriormente, se conectó el reactor con el módulo agitador, una bomba aireadora y un baño de recirculación para mantener la temperatura utilizando una camisa de agua, y seguidamente se llenó de medio fresco estéril. El medio fue luego inoculado con un precultivo de Gfr e incubado durante 72 h. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de crecimiento junto con las bacterias de vida libre y se realizaron lavados *in situ* del reactor y las piezas impresas con agua estéril. Este procedimiento se llevó a cabo con la finalidad de retirar las bacterias que se encontraban creciendo en suspensión, manteniendo a aquellas que estaban creciendo en adherencia sobre el soporte. Posteriormente, en una segunda etapa, se agregó medio fresco estéril para fomentar el crecimiento de estas últimas sobre la superficie de las piezas. Luego del agregado del nuevo medio de cultivo, las bacterias fueron incubadas nuevamente durante 24 h. Al finalizar esta segunda etapa del crecimiento, nuevamente el reactor y las piezas con

las bacterias inmovilizadas fueron lavadas para eliminar las bacterias de vida libre, manteniendo solamente aquellas que se encontraban creciendo en adherencia en la superficie del soporte.

a Inmovilización de Gfr en piezas obtenidas por impresión 3D



b Conversión de glicerol por Gfr inmovilizado en piezas obtenidas por impresión 3D



Esquema 23. Protocolos de inmovilización de Gfr (a) y conversión de glicerol (b) utilizando como matriz de inmovilización piezas obtenidas por impresión 3D para su utilización en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio.

Luego del proceso de inmovilización, el daño a la matriz se redujo sensiblemente en comparación con lo observado para los cubos utilizados en matraz Erlenmeyer. Si bien se pudo observar una pequeña cantidad de debris en el sobrenadante de la inmovilización, la estructura de las piezas se mantuvo prácticamente igual a la observada inicialmente (Figura 48a y b). El principal cambio observado tuvo que ver con el cambio de color de las piezas, que al igual que los cubos anteriormente ensayados cambiaron su coloración a un tono amarillento. Este cambio de color estuvo probablemente asociado a la presencia de las células y componentes del medio de cultivo en su superficie.

Para corroborar la inmovilización de Gfr en la superficie de las piezas, se llevaron a cabo dos técnicas complementarias. La primera constó en colocar una pieza con Gfr inmovilizado en un baño de agua y someterla a ultrasonido, para posteriormente medir la concentración de proteína resultante en la suspensión generada por el

método del BCA. La presencia de bacterias adheridas al soporte se puede correlacionar con la aparición de proteínas en la suspensión, producto de la lisis celular causada por acción del ultrasonido. Como control se incubó una pieza esterilizada en medio de cultivo libre de bacterias, para descartar el aporte posible de componentes proteicos del medio en la medida a realizar. Este protocolo fue adaptado del reportado por Dikshit *et al.*, en el que los autores utilizan un tratamiento con ultrasonido para verificar la inmovilización de *G. oxydans* MTCC 904 en espuma de poliuretano⁴¹⁸. La medida de la suspensión resultante del tratamiento con ultrasonido de la pieza con bacterias inmovilizadas presentó una concentración proteica de $1,7 \pm 0,2$ g/L. Por su parte, el sobrenadante control presentó cantidades no cuantificables de proteína ($< 0,2$ g/L), ya que los valores medidos no entraron dentro del rango de detección de la técnica. Las diferencias de concentración proteica obtenidas en los sobrenadantes pueden atribuirse a la presencia de bacterias en las piezas utilizadas para la inmovilización.

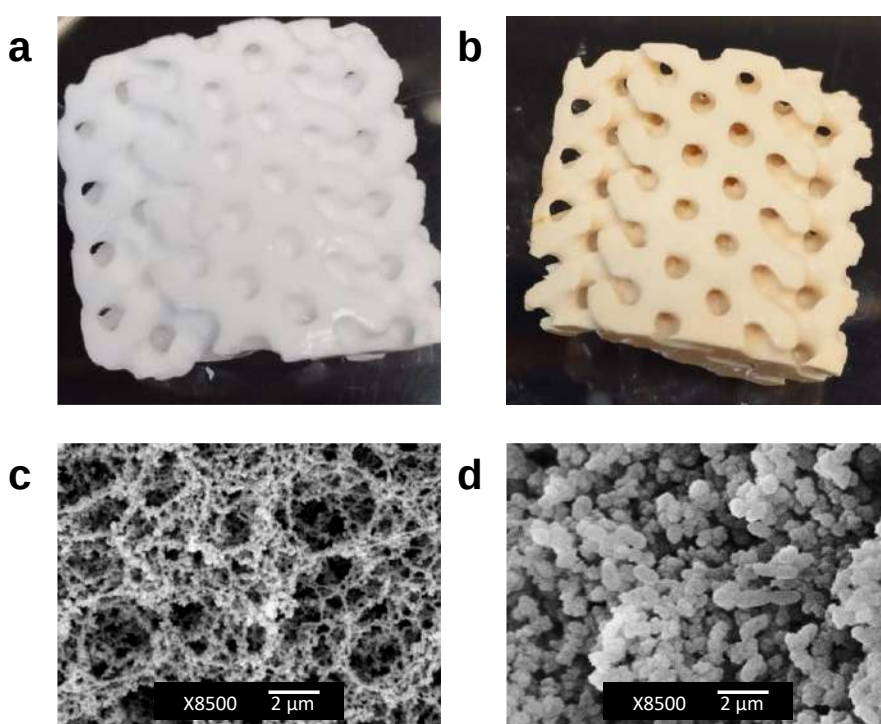


Figura 48. Inmovilización de Gfr en piezas impresas en material A para su utilización en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio. a) Vista macroscópica de pieza obtenida por impresión 3D antes de la inmovilización. b) Vista macroscópica de pieza obtenida por impresión 3D luego de la inmovilización. c) Imagen obtenida por SEM de pieza obtenida por impresión 3D antes de la inmovilización (x8500). d) Imagen obtenida SEM de pieza obtenida por impresión 3D luego de la inmovilización (x8500).

La segunda técnica utilizada para verificar la inmovilización de Gfr fue SEM. Se tomaron imágenes de las piezas impresas antes y después del proceso de inmovilización, para detectar la presencia de las bacterias en la superficie de las mismas (Figura 48). Las imágenes obtenidas antes de la inmovilización demuestran la alta porosidad presentada por el material, que se observa como una intrincada red formada a partir de los monómeros MAETAC y HEMA (Figura 48c). Por el contrario, en las imágenes obtenidas luego de la inmovilización, los poros dejan de ser visibles a causa de la proliferación de las bacterias Gfr en la superficie del material (Figura 48d). Las

mismas se presentan con la clásica morfología esperada para esta cepa, con forma de bacilos con un largo aproximado de 1 μm . Los resultados obtenidos a partir de ambas técnicas permitieron confirmar la exitosa inmovilización de Gfr en las piezas a través del protocolo de inmovilización desarrollado.

Luego de la inmovilización se diseñó un protocolo de conversión de glicerol, en el que se añadieron 300 mL de medio de reacción sin esterilizar (glicerol 200 g/L en agua) en el reactor de lecho rotatorio, y se llevó a cabo la reacción en condiciones similares a la inmovilización. La aireación de la bomba y la temperatura de operación del reactor se mantuvieron iguales, mientras que la velocidad de rotación del cilindro que contenía las piezas se aumentó a 200 rpm con el objetivo de mejorar la transferencia de oxígeno hacia las bacterias inmovilizadas. Para estudiar la reproducibilidad de la reacción, tanto el procedimiento de inmovilización como el de conversión se llevaron a cabo por duplicado, pero de forma asincrónica. En las condiciones estudiadas, se logró obtener tanto DHA como AG a partir de glicerol con las bacterias inmovilizadas (Figura 49).

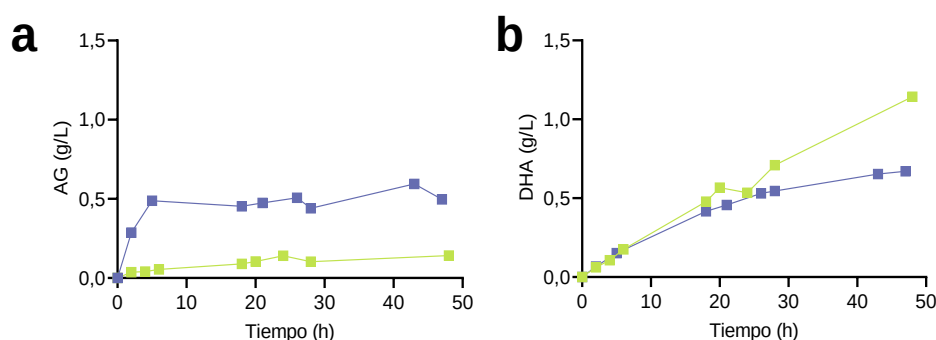


Figura 49. Biotransformación de glicerol por Gfr inmovilizado en piezas de material A empleando un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio. a) Cinética de producción de AG por Gfr inmovilizado en las piezas impresas en material A. Se muestran los resultados obtenidos de dos réplicas experimentales llevadas a cabo de forma asincrónica. Primer experimento (verde). Segundo experimento (violeta). b) Cinética de producción de DHA por Gfr inmovilizado en las piezas impresas en material A. Se muestran los resultados obtenidos de dos réplicas experimentales llevadas a cabo de forma asincrónica. Primer experimento (verde). Segundo experimento (violeta).

A pesar de haber llevado a cabo el proceso de inmovilización y conversión en las mismas condiciones, la producción final de AG y DHA fue ligeramente distinta en ambas réplicas experimentales. Mientras en el primer experimento se logró obtener 1,14 g/L de DHA y 0,14 g/L de AG luego de 48 h, al final del segundo experimento se obtuvo una concentración de 0,67 g/L y 0,49 g/L en el mismo lapso, respectivamente. Este efecto no fue observado para el caso de los cubos, obteniendo resultados más reproducibles entre los duplicados. Las bajas concentraciones registradas para cada compuesto probablemente causaron la mayor variabilidad en los resultados, ya que la medición de concentraciones tan reducidas suele estar asociada a un margen de error elevado. El análisis de la cinética de producción de ambos compuestos en el reactor de lecho rotatorio indica que la producción de GA se detuvo dentro de las primeras 6 horas de reacción para ambos experimentos. Contrariamente, la producción de DHA se sostuvo por al menos 28 h en ambos ensayos, aunque se observó una

desaceleración algo más pronunciada en la producción del compuesto a partir de este punto en el segundo experimento.

En base a las imágenes obtenidas por SEM de las bacterias inmovilizadas y las áreas superficiales de los distintos soportes, se puede hacer una estimación de la cantidad de bacterias que se pueden inmovilizar en cada uno según su área superficial. Según datos obtenidos por el grupo de investigación del Dr. Dimartino, el material A presenta poros de un tamaño promedio de 80,4 nm. La medida aproximada de las células de Gfr es de $1,27 \pm 0,13 \mu\text{m}$ de largo, por $0,61 \pm 0,06 \mu\text{m}$ de ancho (Figura A13, Tabla A1). Esto implica que las bacterias no pueden ingresar a los poros del material, por lo que solo el área externa de las distintas piezas está disponible para la adhesión bacteriana. Tomando como modelo el área de una elipse para representar el área que ocuparía una bacteria, se llevó a cabo una estimación de la cantidad de bacterias que pudieron haber sido inmovilizadas en las distintas aproximaciones. Considerando el área de una bacteria como $0,62 \mu\text{m}^2$ y el área superficial de las distintas piezas obtenidas por impresión 3D, sin contar los poros, se obtuvieron estimados de la cantidad de bacterias estimadas por pieza, por reacción y por gramo de sustrato en las distintas reacciones (Tabla 18). Para realizar estas estimaciones se asumió además una capa única de células.

Tabla 18. Estimación de bacterias inmovilizadas en las superficies de las distintas piezas obtenidas por impresión 3D.

Tipo de soporte	Área pieza (cm ²)	Cantidad de bacterias por pieza	Cantidad de piezas por reacción	Cantidad de bacterias por reacción	Cantidad de bacterias por g de sustrato
Cubo	4,5	$7,3 \times 10^8$	6	$4,4 \times 10^9$	$14,6 \times 10^8$
Pieza <i>SpinChem</i>	47,0	$7,6 \times 10^9$	4	$3,1 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^8$

Cabe destacar que, aunque todos los soportes preparados con material A sufrieron daños durante los procesos de inmovilización, los cubos presentaron un deterioro más significativo en comparación con las piezas diseñadas para el reactor de lecho rotatorio. Debido a este daño, los datos presentados en la tabla anterior están subestimados, ya que se basan en las áreas de las piezas enteras. Sin embargo, los valores estimados para las piezas del reactor *SpinChem* son más cercanos a los valores reales en comparación con los de los cubos. Según estas estimaciones, la cantidad de bacterias inmovilizadas en los experimentos con cubos fue un orden de magnitud menor que la cantidad utilizada en los otros experimentos de inmovilización, que fue de 5×10^{10} UFC.

Además, aunque en el reactor *SpinChem* se logró una inmovilización teórica de bacterias comparable a la utilizada en los ensayos con otras técnicas de inmovilización, el volumen de reacción empleado fue diez veces mayor. Estas diferencias resultaron en que, en los ensayos de inmovilización en matrices obtenidas por impresión 3D, la cantidad de bacterias por gramo de sustrato fuera un orden de magnitud menor que en los ensayos con otras técnicas, lo que podría explicar las conversiones más bajas obtenidas.

La obtención de estos datos estimativos permite normalizar la producción de los compuestos AG y DHA por cantidad de catalizador en los distintos preparados inmovilizados obtenidos a lo largo de este capítulo. Este dato será utilizado en la siguiente sección de conclusiones parciales, para llevar a cabo una comparación de las distintas estrategias de inmovilización bacteriana abordadas en este trabajo.

Los resultados descritos en esta sección de la Tesis demuestran la potencialidad de utilizar estructuras obtenidas por impresión 3D para la inmovilización de *Gluconobacter* con fines biocatalíticos, habiendo obtenido en todos los casos los productos de la biotransformación de glicerol. El material utilizado en esta instancia demostró ser adecuado para la inmovilización de la bacteria, pero presentó limitaciones relacionadas a su resistencia mecánica. Su aplicación como estructuras cuboidales en matraces Erlenmeyer fue poco exitosa, observándose un daño estructural significativo durante las reacciones. Alternativamente, la preparación de estructuras hechas a medida para un reactor de lecho rotatorio permitió disminuir el daño a la matriz durante los procesos de inmovilización y biotransformación. Sin embargo, cabe destacar que el traslado de las piezas desde la Universidad de Edimburgo hasta nuestro laboratorio resultó igualmente en un desgaste estructural que puede dar lugar a variabilidad entre los ensayos, generando diferencias en el área superficial disponible para la inmovilización bacteriana.

La versatilidad de la obtención de soportes de inmovilización por impresión 3D permite de manera simple sanear esta problemática, ya que es posible modificar la composición del material para mejorar sus propiedades mecánicas. De hecho, a partir de los resultados obtenidos en esta primera aproximación, el grupo de investigación del Dr. Dimartino sugirió la utilización de otro material, cuyas características y potencial serán descritos en la sección “Perspectivas futuras” de esta Tesis.

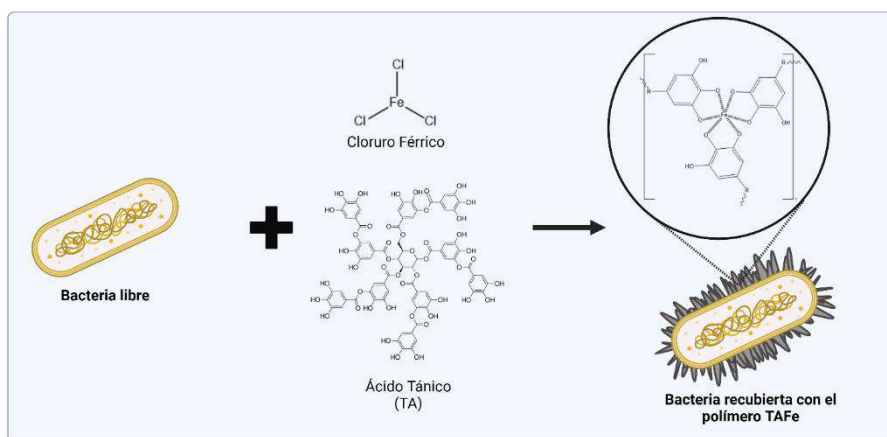
Inmovilización celular en esporas artificiales de TA y hierro

En la naturaleza una variedad de microorganismos, entre ellos algunas bacterias, forman esporas como estrategia de adaptación a condiciones ambientales desfavorables. Estas esporas bacterianas presentan una estructura compleja, incluyendo un recubrimiento rígido compuesto de varias capas que las protege de una amplia variedad de agentes externos⁴¹⁹. Es en esta adaptación en particular en la que los científicos se basaron para la preparación de esporas artificiales de bacterias, obteniendo organismos más resistentes y en algunos casos, con propiedades únicas como la capacidad de unir enzimas a su superficie. La obtención de este tipo de organismos presenta grandes implicancias en biocatálisis, ya que potencialmente mejora la estabilidad de los mismos, a la vez que permite la implementación de cascadas bacteria-enzima para la obtención de compuestos de relevancia.

Recientemente, el grupo de investigación del Dr. López-Gallego demostró la potencialidad de recubrir la bacteria Gram negativa *E. coli* con un polímero de TA y hierro⁴²⁰, denominado en adelante TAFE. El fin último de estas preparaciones fue inmovilizar enzimas en su superficie para la implementación de cascadas biocatalíticas para la obtención de aminoalcoholes. El protocolo constó de la mezcla de un pellet bacteriano con soluciones de TA y

FeCl_3 , lo que resultó en la formación instantánea de una cubierta polimérica. Mientras que el TA se une a la superficie bacteriana a través de interacciones con los LPS de la membrana externa, los grupos galilo del TA pueden generar enlaces de coordinación con los iones hierro, generando una malla que recubre las bacterias. Las esporas artificiales de *E. coli* obtenidas presentaron una mayor estabilidad a la temperatura y a ambientes con pH ácido. Asimismo, la cubierta generada aumentó la superficie efectiva de las bacterias en tres órdenes de magnitud, lo que aumentó la capacidad de carga de enzimas. Utilizando esta técnica se logró obtener el aminoalcohol 4-(aminometil)fenol a partir de 4-(hidroximetil)fenol en una cascada inmovilizada compuesta por una oxidoreductasa expresada por *E. coli*, y una transaminasa inmovilizada en su superficie.

Durante la estancia de investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Biocatálisis Heterogénea del CIC BiomaGUNE mencionada anteriormente, se buscó expandir la aplicación de esta técnica a bacterias del género *Gluconobacter* (Esquema 24).



Esquema 24. Estrategia de encapsulación bacteriana por polimerización *in situ* con el polímero TAFE, generando como resultado esporas artificiales.

Esta estrategia no solamente puede ser beneficiosa para la preparación de cascadas biocatalíticas célula-enzima, sino que también presenta el potencial de mejorar la reusabilidad de las bacterias a través de una mejora en la estabilidad. Asimismo, dado que la encapsulación sería de célula única, es posible que las restricciones difusionales asociadas a la inmovilización sean menores a las experimentadas con otras técnicas de inmovilización que generar preparados más voluminosos, como la inmovilización en hidrogeles. Los experimentos de encapsulación fueron llevados a cabo utilizando la cepa Gox como catalizador de célula entera. Esta decisión fue tomada en base a resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, en los que se acopló exitosamente la oxidación del glicerol por parte de esta bacteria, con la aminación reductiva de la DHA para producir serinol⁵⁸. De esta forma, de ser exitoso el proceso de inmovilización, los preparados inmovilizados obtenidos podrían ser ensayados para la producción de DHA, así como también la producción de serinol a través de una co-inmovilización de Gox con la enzima transaminasa PfATA. En esta sección de la Tesis se detallará el

proceso de obtención de las bacterias recubiertas y su capacidad de oxidar el glicerol a DHA. La implementación de esta estrategia para la obtención de un catalizador combinado de Gox y PfATA será abordado en el Capítulo 4.

Para llevar a cabo la inmovilización de Gox a través de la encapsulación en el polímero de TAFE se mezclaron 20 mg de células con las soluciones de TA y FeCl_3 . El procedimiento de recubrimiento fue llevado a cabo dos veces en cada pellet, de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en esta condición según Iturralde *et al.*⁴²⁰. Las bacterias recubiertas con el polímero se denominaron GoxTAFE. Para confirmar la formación del recubrimiento sobre la superficie bacteriana, se llevó a cabo la observación de las mismas por TEM (Figura 50). A nivel de morfología, las micrografías permitieron observar en ambos casos bacilos con un largo aproximado de 1,5 μm . Sin embargo, a nivel de la estructura de la membrana externa se observó una clara diferencia entre las bacterias control (Gox) (Figura 50a) y las bacterias recubiertas (GoxTAFE) (Figura 50b). Las bacterias recubiertas presentaron protuberancias en su membrana externa en forma de “pelos”, consistentes con las observadas para *E. coli* por parte de nuestros colaboradores. En contraste, las células control presentaron una superficie lisa, lo que demuestra que el cambio observado se encuentra asociado a la formación del polímero.

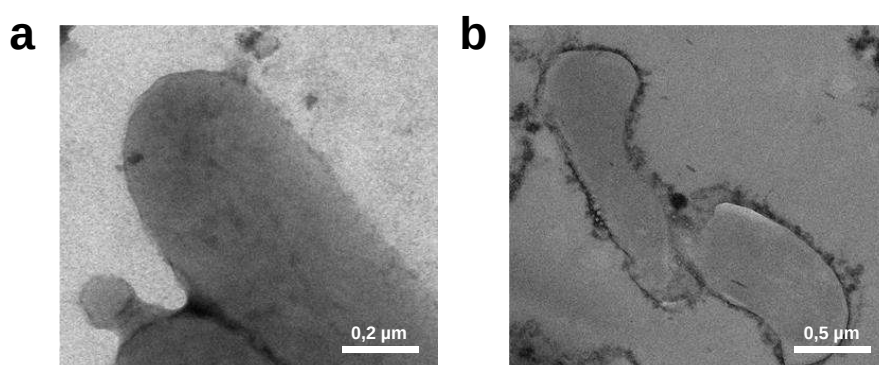


Figura 50. Imágenes obtenidas por TEM de Gox sin recubrimiento (a) y GoxTAFE (b).

La correcta formación del polímero fue también verificada indirectamente por microscopía confocal de fluorescencia, a través de la unión de la proteína GFP-His a la superficie de las bacterias recubiertas. Para visualizar las bacterias por este tipo de microscopía se recurrió nuevamente al mutante Gox-mCherry, que fue recubierto siguiendo el mismo protocolo, y posteriormente incubado con una solución de GFP-His para obtener Gox-mCherryTAFE. Esta proteína recombinante posee una cola de histidina por la cual puede anclarse a la superficie de las bacterias recubiertas, a través de un desplazamiento de ligandos en los complejos tris-galoil, para formar nuevos complejos de coordinación entre las histidinas de las colas y los iones Fe^{2+} que forman el polímero⁴²⁰. De esta forma se logra obtener bacterias decoradas con esta proteína. La fluorescencia de las proteínas mCherry (expresada por Gox-mCherry) y GFP-His puede ser luego aprovechada para visualizar la localización de ambos componentes del sistema a través de microscopía confocal (Figura 51).

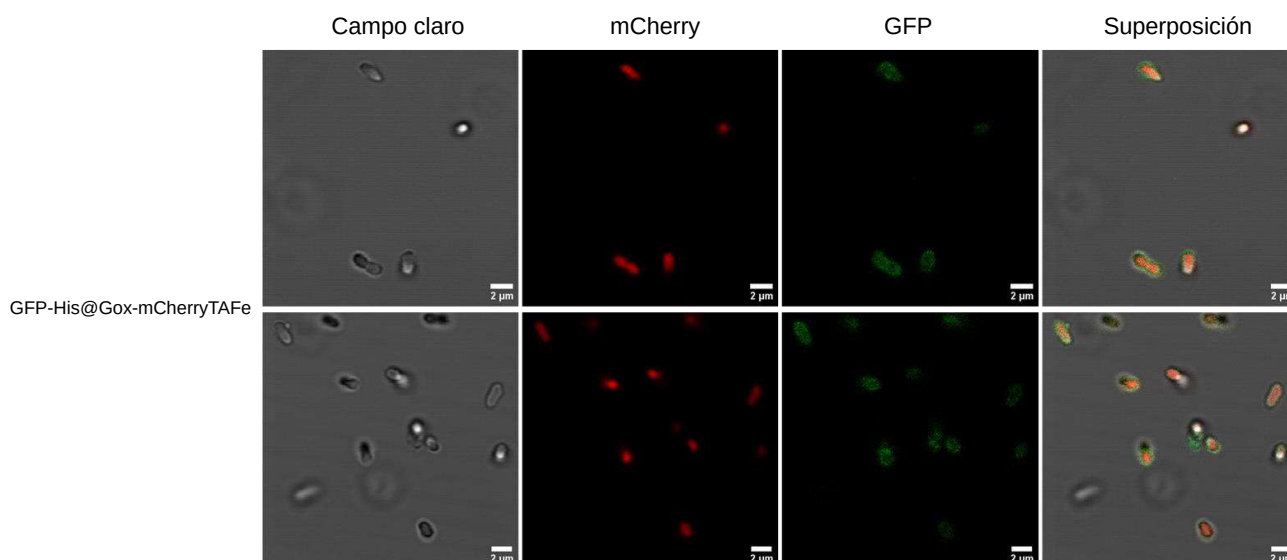


Figura 51. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de la proteína GFP-His inmovilizada en la superficie del mutante fluorescente Gox-mCherry recubierto con un polímero de TA y hierro (Gox-mCherryTAFE).

Una primera observación de las bacterias en campo claro permitió observar nuevamente la clásica morfología de Gox, que se corresponde con bacilos con un tamaño aproximado de 1 a 2 µm de largo (Figura 51, Columna “Campo claro”). Posteriormente se logró también observar exitosamente la fluorescencia de las bacterias mutantes excitando la muestra con un filtro para mCherry. Las mismas presentaron un brillo de aspecto parejo en toda su estructura, debido a la gran cantidad de mCherry sobreexpresada en su interior (Figura 51, Columna “mCherry”). Por otro lado, al excitar la muestra con un filtro para GFP se logró observar agrupaciones de pequeños puntos brillantes que se corresponden con la fluorescencia emitida por la proteína GFP-His (Figura 51, Columna “GFP-His”). Al realizar una superposición de los tres tipos de imágenes se pudo observar que efectivamente existe una co-localización de GFP-His con mCherry, y que la ubicación de la fluorescencia es consistente con la unión de la GFP-His a la superficie de la bacteria. Estos resultados son similares a los obtenidos para *E. coli* por nuestros colaboradores, e indican una correcta formación del polímero alrededor de la bacteria.

Con la finalidad de evaluar si el recubrimiento con el polímero tuvo un efecto en la capacidad de conversión de glicerol de GoxTAFE, se llevó a cabo una reacción partiendo nuevamente de 50 g/L de sustrato en agua (Figura 52). Los resultados demostraron que el proceso de inmovilización impactó en la capacidad de producción de DHA de las bacterias, obteniendo $11,5 \pm 1,3$ g/L del producto en 24 h, frente a un $51,3 \pm 2,0$ g/L obtenido por las células libres en las mismas condiciones. Esto implica una reducción del 77% de la capacidad de producción de DHA causada por la inmovilización. El bajo consumo de glicerol observado es consistente con la cantidad de producto obtenido, y permite descartar efectos significativos que puedan estar asociados a la retención de sustratos o productos por el recubrimiento generado. No obstante, esta baja en la productividad podría verse explicada por la aparición de limitantes en la difusión de uno o ambos compuestos a raíz de la formación del polímero que recubre la célula. En esta misma línea, con el paso del tiempo de reacción se observó además la formación de agregados

perceptibles a simple vista que podrían estar teniendo un efecto negativo en la transferencia de masa. Este efecto también fue observado por nuestros colaboradores, y fue subsanado añadiendo un paso de bloqueo con BSA luego de la polimerización. Esta estrategia aún no ha sido evaluada para Gox y podría mejorar las conversiones en caso de que la disminución en la producción de DHA esté asociada a la formación de estos cúmulos.

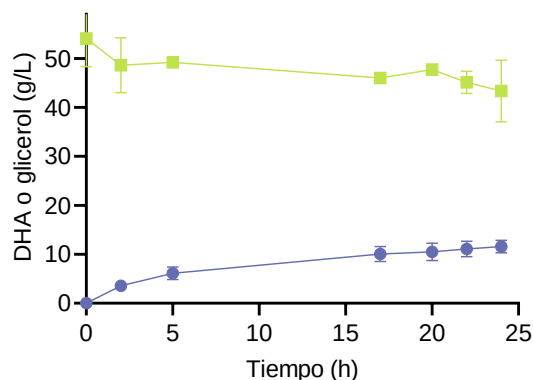


Figura 52. Cinética de producción de DHA y consumo de glicerol por GoxTAFE.

Para determinar si el recubrimiento TAFE es capaz de otorgar protección a las bacterias en usos consecutivos, se llevaron a cabo conversiones sucesivas de 50 g/L de glicerol en ciclos de 24 horas (Figura 53). Los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos observados para las células en reposo (Figura 53a). De estos resultados se desprende que la encapsulación con el polímero TAFE no mejora la reusabilidad de las células, ya que los porcentajes de actividad remanente de producción de DHA bajaron de forma más pronunciada para el caso de las conversiones sucesivas con GoxTAFE (Figura 53b). Mientras que las células en reposo libres de Gox mantuvieron un $77,6 \pm 5,6\%$ de actividad en la producción de DHA luego del segundo uso, en el caso de las preparaciones GoxTAFE la actividad remanente observada fue de $57,1 \pm 1,1\%$.

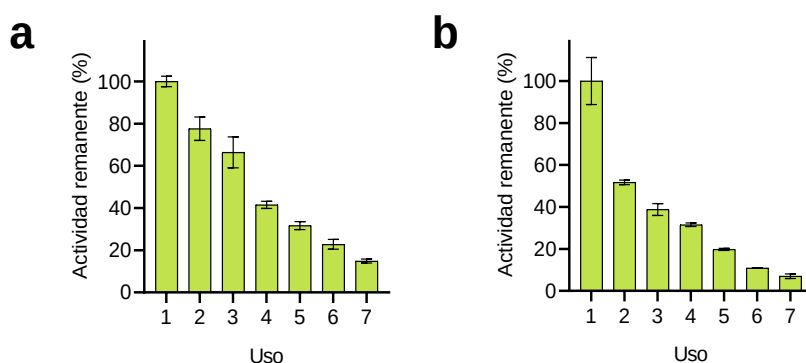


Figura 53. Ensayos de reutilización de células libres de Gox (a) y células GoxTAFE (b) en reacciones sucesivas de oxidación de 50 g/L de glicerol. Cada uso fue de 24 horas. Actividad remanente de producción de DHA (Verde).

Esta disminución en la actividad remanente más pronunciada observada en el caso de las preparaciones GoxTAFE entre el primer y segundo uso, puede nuevamente verse asociada a la agregación de las bacterias recubiertas. En este caso la agregación puede haber causado una disminución más significativa entre los primeros dos usos, en combinación con el desgaste normal que se ve del catalizador al ser sometido a un proceso de reutilización, observado en el control. La disminución más paulatina observada para la actividad remanente del catalizador GoxTAFE a partir del uso 3 se asemeja más a la observada para las células libres. Esto podría indicar que la agregación no cambia significativamente después de este punto, y la pérdida de actividad se debe mayoritariamente al desgaste del catalizador. Cabe destacar sin embargo, que en experimentos análogos realizados por nuestros colaboradores en presencia de 100 mM de tampón HEPES, la reusabilidad de las células en reposo aumentó frente a la de las células libres⁴²⁰. Esto indica que, frente a ciertas condiciones experimentales, la cubierta generada sí resulta estabilizante para las células.

Los resultados anteriormente mencionados constituyen el primer reporte de inmovilización de una cepa de *Gluconobacter* por encapsulación en el polímero TAFE. Si bien este recubrimiento no aportó ventajas para la producción de DHA, la capacidad comprobada de inmovilización de GFP-His en su superficie abre la puerta a la generación de catalizadores combinados bacteria-enzima para la implementación de cascadas biocatalíticas. Esta aproximación será abordada en el siguiente capítulo de esta Tesis.

3.4. Conclusiones parciales

En este capítulo de la Tesis se buscó explorar alternativas novedosas para la inmovilización de Gfr y Gox, con potencial de aplicación a otras especies de *Gluconobacter*. Un análisis del estado del arte de la inmovilización de las bacterias de este género demostró que las matrices basadas en polímeros naturales son hasta el momento la opción más utilizada, particularmente aquellas basadas en geles de alginato. Esta matriz es biocompatible, económica, y sencilla de utilizar, pero presenta como limitantes su baja resistencia mecánica y la aparición de restricciones difusionales luego de la inmovilización. Estas falencias comprometen las productividades y dificultan la aplicabilidad de las bacterias inmovilizadas en reacciones industriales, por lo que la búsqueda de alternativas a este tipo de matrices es altamente pertinente.

Las estrategias abordadas durante este capítulo fueron diversas, empleando materiales novedosos que dieron lugar a resultados variados, demostrando la importancia de una correcta selección de la matriz de inmovilización en el resultado final de una biotransformación con *Gluconobacter*. Tomando la inmovilización en esferas de alginato como referencia, a continuación se presentarán las conclusiones obtenidas de la aplicación de cada una de estas estrategias no tradicionales, destacando sus ventajas y principales desafíos asociados. Para facilitar la comparación, se realizó un compendio de los resultados obtenidos en cada uno de los casos (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados de la inmovilización de Gfr y Gox en la matriz alginato y en distintas matrices no tradicionales

Técnica de inmovilización	Cepa inmovilizada	Cantidad de bacterias inmovilizadas (masa)	Máxima producción de AG hasta meseta (Tiempo)	Máxima producción de DHA hasta meseta (Tiempo)	Productividad AG (g/L.mg de biomasa)	Productividad DHA (g/L.mg de biomasa)	Ref.
Atrapamiento en Alginato	Gfr	5×10^{10} (20 mg)	$6,7 \pm 0,4$ (71 h)	$4,4 \pm 0,2$ (71 h)	$0,3 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,01$	Este trabajo
	Gox	5×10^{10} (20 mg)	-	$43,5 \pm 2,6$ (140 h)	-	$2,2 \pm 0,1$	⁵⁸
Recubrimiento con SiNPs	Gfr	5×10^{10} (20 mg)	$6,1 \pm 0,3$ (21 h)	$2,0 \pm 0,1$ (21 h)	$0,3 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$	Este trabajo

Tabla 19. Resultados de la inmovilización de Gfr y Gox en la matriz alginato y en distintas matrices no tradicionales. **(Continuación)**

Técnica de inmovilización	Cepa inmovilizada	Cantidad de bacterias inmovilizadas (masa)	Máxima producción de AG hasta meseta (Tiempo)	Máxima producción de DHA hasta meseta (Tiempo)	Productividad AG (g/L.mg de biomasa)	Productividad DHA (g/L.mg de biomasa)	Ref.
Atrapamiento en matriz híbrida A4S4	Gfr	5 x10 ¹⁰ (20 mg)	7,7 ± 0,4 (95 h)	8,4 ± 0,1 (95h)	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01	Este trabajo
	Gox	5 x10 ¹⁰ (20 mg)	-	50,4 ± 3,4 (169 h)	-	2,7 ± 0,2	Este trabajo
Adsorción a matrices obtenidas por impresión 3D	Gfr	4,4 x10 ⁹ (7,3 x10 ⁸ células/cubo) (1,76 mg)*	0,3 ± 0,1 (15 h)	2,3 ± 0,2 (39 h)	0,2 ± 0,06	1,3 ± 0,1	Este trabajo
		3,1x 10 ¹⁰ (7,6 x10 ⁹ células/pieza) (12,4 mg)*	Exp 1: 0,1 Exp 2: 0,5	Exp 1: 1,1 Exp 2: 0,7	Exp 1: 0,01 Exp 2: 0,04	Exp 1: 0,09 Exp 2: 0,06	Este trabajo
Encapsulación en polímero TAFe	Gox	5 x10 ¹⁰ (20 mg)	-	10,1 ± 1,6 (17 h)	-	0,5 ± 0,08	Este trabajo

*Cálculo realizado en base a la relación 20 mg = 5 x10¹⁰ UFC previamente establecido.

El recubrimiento de Gfr con SiNPs resultó en un entramado de células y nanopartículas visualizado por SEM, que impactó en la capacidad de la bacteria de oxidar el glicerol. Mientras que la producción de AG se mantuvo similar a la observada para los preparados de alginato, la producción de DHA bajó a menos de la mitad de la obtenida con el catalizador de referencia. Este efecto, cuya causa aún se desconoce, puede resultar ventajoso de cara a la producción de AG, otorgando sobrenadantes de reacción enriquecidos en este compuesto que faciliten su purificación. La formación del compuesto AG fue más rápida para el caso de las bacterias recubiertas con SiNPs, lo que implica que la formación del entramado no estaría generando grandes restricciones difusionales. Sin embargo, el recubrimiento no resultó estabilizante para las células, ya que el ensayo de reutilización mostró resultados semejantes a los de las células libres, perdiendo casi totalmente su capacidad de oxidación de glicerol después del primer uso. Futuros estudios de implementación de esta estrategia podrían centrarse en la preparación de co-inmovilizados célula-enzima para la implementación de cascadas biocatalíticas, considerando la capacidad de las SiNPs de encapsular enzimas que se encuentran en solución durante su síntesis. Esta aproximación presentaría como ventaja que no es necesario que la enzima a encapsular posea colas de histidina.

La incorporación de los materiales nanoestructurados MT y SiNPs a una matriz clásica de alginato presentó en todas las condiciones ensayadas una mejora en la resistencia mecánica del material final obtenido. Este aumento en la resistencia estuvo acompañado de cambios a nivel microscópico a nivel de la porosidad de las matrices. Entre estas distintas matrices resultantes, la matriz A4S4 se destacó por su reusabilidad aumentada, y su capacidad de disminuir la pérdida de células al medio, produciendo además sobrenadantes de reacción libres de debris. La misma pudo ser utilizada con éxito para inmovilizar tanto Gfr como Gox, generando preparados con desempeños semejantes en la bioconversión del glicerol a los obtenidos a partir de alginato. Por los resultados obtenidos, esta matriz puede considerarse una alternativa sencilla a las matrices exclusivamente conformadas por alginato.

Una primera aproximación a la inmovilización de Gfr en matrices obtenidas por impresión 3D mostró el potencial de esta bacteria para crecer en adherencia y oxidar glicerol a los compuestos de interés. Se probaron dos enfoques: el primero consistió en la inmovilización de la bacteria en piezas cúbicas, mientras que el segundo utilizó piezas diseñadas específicamente para un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio. En el primer ensayo, realizado en matraces, Gfr inmovilizada en cubos demostró su capacidad para producir AG y DHA a partir de glicerol, aunque las estructuras cuboidales no resistieron las condiciones operativas y perdieron su integridad. Como alternativa, se desarrollaron piezas diseñadas para su uso en el reactor de lecho rotatorio, donde la integridad del material fue preservada gracias a que las piezas estaban contenidas en un cilindro hueco de metal. En esta configuración, se registró nuevamente la producción de AG y DHA, aunque las productividades en función de la biomasa inmovilizada obtenidas por aproximación en el experimento del reactor de lecho rotatorio presentaron un orden de magnitud menos en comparación con los resultados obtenidos para otras técnicas de inmovilización. Sin embargo, aunque la concentración de sustrato fue igual en todos los experimentos, el volumen de reacción empleado fue mayor. En consecuencia, la concentración de células utilizada en el ensayo fue más de 10 veces menor, lo que explica esta disminución en la productividad. Futuros experimentos deberán centrarse en la posibilidad de aumentar la cantidad de células inmovilizadas, ya sea modificando la estructura del material a utilizar o poniendo a punto las condiciones de inmovilización. Una vez conseguido esto se deberá evaluar las capacidades de reutilización de este tipo de catalizadores.

De los experimentos de inmovilización por adherencia a superficies generadas por impresión 3D se observó una tendencia que indicaría que el crecimiento de Gfr en estas condiciones favorece la formación de DHA frente a la de AG a partir de glicerol. Estos resultados podrían indicar que existen cambios metabólicos que podrían estar asociados tanto a la actividad enzimática como a la formación de la matriz externa característica de los biofilms, que podría estar impactando en la producción de AG. En consecuencia, resultaría interesante estudiar la posibilidad de extender el protocolo estudiado para Gox, ya que esta cepa presenta una alta producción de DHA, sin acumulación de AG¹³⁸. Este tipo de inmovilización en adherencia podría ser una opción para la obtención de altas concentraciones de este compuesto.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio de la formación de esporas artificiales de *Gluconobacter* obtenidas a partir de la formación del polímero TAFE. La especie estudiada en este caso fue Gox, de cara a la posibilidad de inmovilizar enzimas en la superficie de estas esporas. Esta técnica de polimerización *in situ*, descrita previamente para levaduras como *S. cerevisiae*⁴²¹ y la bacteria *E. coli*⁴²⁰, pudo ser trasladada de forma exitosa a Gox. La misma logró la modificación de su superficie con estructuras semejantes a pelos que pudieron ser visualizados por TEM. Si bien esta técnica presentó una disminución en la capacidad de conversión de glicerol por parte de Gox, nuestros colaboradores demostraron que en presencia de HEPES las esporas generadas resultan estabilizantes para las células. Asimismo, demostramos la capacidad de inmovilizar proteínas con colas de histidina la superficie de las esporas, a través de la visualización de la proteína modelo GFP-His por microscopía confocal. Como se mencionó anteriormente, la posibilidad de inmovilizar enzimas en la superficie de Gox resulta prometedora, ya que permite acoplar la oxidación de sustratos por la bacteria, con otras reacciones enzimáticas. En particular, nuestro grupo de investigación demostró que la oxidación de glicerol a DHA por Gox puede ser acoplada a la aminación reductiva de este producto para obtener serinol a partir de la acción de la transaminasa PfATA⁵⁸. En ese entendido, la obtención de esporas artificiales de Gox con la capacidad de inmovilizar este tipo de enzimas en su superficie resulta ideal para la preparación de catalizadores híbridos que lleven a cabo cascadas biocatalíticas.

Las técnicas de inmovilización novedosas descritas en esta sección son factibles de ser utilizadas en una variedad de microorganismos principalmente, por su similitud, en otras bacterias del género *Gluconobacter*. El desarrollo de estas nuevas matrices con propiedades variadas permite ampliar el rango de aplicación de la inmovilización de estas bacterias en procesos industriales, pudiendo facilitar la obtención de una gran variedad de productos.

CAPÍTULO 4:

***Gluconobacter* como herramienta en cascadas biocatalíticas**

CAPÍTULO 4: *Gluconobacter* como herramienta en cascadas biocatalíticas

4.1. Introducción

Antecedentes del uso de células de *Gluconobacter* en cascadas biocatalíticas artificiales

Existen una variedad de ejemplos en la literatura en los que se han utilizado células enteras o enzimas de *Gluconobacter* como biocatalizadores que integran cascadas artificiales para la obtención de diversos compuestos. Las mismas son cascadas tanto *in vivo* como *in vitro*, combinando exclusivamente enzimas^{422–426} o bacterias enteras^{88,114,237,261}, o incluso implementando cascadas de tipo célula-enzima^{58,156,164,173}. En este trabajo se hará un especial énfasis en el uso de *Gluconobacter* como bacteria entera, en cascadas que emplean combinaciones de bacterias o de bacterias y enzimas libres. A continuación se presentan diversos ejemplos de este tipo de aplicaciones, que evidencian la versatilidad de estos microorganismos como catalizadores en cascadas biocatalíticas.

Entre los ejemplos de cascadas artificiales empleando exclusivamente bacterias enteras como catalizadores se encuentra el trabajo de Siemen *et al.* para la obtención del edulcorante 5-KF a partir de sacarosa⁸⁸. En un trabajo previo del mismo grupo de investigación se generó un mutante de *G. oxydans* 621H que sobreexpresa una fructosa deshidrogenasa perteneciente a otra cepa de *Gluconobacter*, *G. japonicus* NBRC3260, posibilitando la producción de 5-KF desde fructosa⁸⁷. Para la obtención del edulcorante 5-KF desde sacarosa, se combinó la cepa mutante anteriormente mencionada con una nueva mutante de *G. oxydans* 621H, que sobreexpresa la enzima SacC de *Zymomonas mobilis* ZM4. SacC es una sacarasa extracelular que puede catalizar la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa. Al co-cultivar estas dos cepas en una proporción de 1:1, la cascada produjo una conversión a 5-KF del 92,5% a partir de un medio que contenía sacarosa, y una conversión del 82% a partir de un extracto de remolacha azucarera. En este caso la cascada se implementó en un formato *1-Pot*, con células en crecimiento. Otro producto que puede ser obtenido a partir de una cascada artificial que involucra bacterias enteras del género *Gluconobacter* es la producción de A2-KLG. Wang *et al.* plantearon una cascada de dos pasos en formato *1-Pot* que involucra los biocatalizadores *G. oxydans* y *K. vulgare*²³⁷. En la cascada planteada *G. oxydans* H24 cataliza primero la oxidación de D-sorbitol en L-sorbosa que luego es oxidada por *K. vulgare* para obtener A2-KLG. A través de la implementación de un mecanismo de percepción de quórum y el agregado de *B. megaterium* a la reacción (para mejorar el crecimiento y rendimiento de *K. vulgare*) se logró obtener $68,80 \pm 4,18$ g/L del producto A2-KLG. La producción de A3-HP a partir de glicerol es también posible a partir de una cascada artificial en *2-Pot* que combina células de las bacterias *L. reuteri* y *G. oxydans*, según un trabajo reportado por Dishisha *et al.*²⁶¹. En un primer paso el glicerol es biotransformado a 1,3-PDO y 3-HP por células en reposo de *L. reuteri*. En un segundo paso, el 1,3-

PDO obtenido durante el primer paso es convertido también en 3-HP por células en reposo de *G. oxydans*. A partir de la implementación de esta cascada se logró obtener una concentración de 3-HP de 23,6 g/L. Como último ejemplo de cascada artificial que emplea bacterias enteras de *Gluconobacter* como biocatalizadores se encuentra la producción de A3,4-DHB a partir de xilosa, reportado por Zhang *et al.*¹¹⁴. En dicho trabajo se plantea una cascada de 4 pasos en *1-Pot*, utilizando únicamente dos bacterias. En primera instancia la xilosa es oxidada a ácido xilónico por *G. oxydans* 621H. Seguidamente, el ácido xilónico es convertido por una cepa mutante de *E. coli* para obtener 3,4-dihidroxi butanal. Finalmente, en un tercer paso también catalizado por *G. oxydans* 621H el 3,4-dihidroxi butanal es oxidado para obtener A3,4-DHB. Mediante el empleo de esta cascada se lograron obtener 3,26 g/L del compuesto objetivo, que resultó ser una de las mayores concentraciones de este compuesto a partir de una síntesis verde de este compuesto.

Otro tipo interesante de cascada biocatalítica del que se encuentran ejemplos del empleo de *Gluconobacter* son las llamadas cascadas célula-enzima. Este tipo de cascadas combina los beneficios de los catalizadores de célula entera con los de los catalizadores enzimáticos, permitiendo así ampliar significativamente la variedad de compuestos de interés que se pueden obtener a través de síntesis verdes. Este tipo de cascadas pueden presentarse de distintas formas, ya sea combinando enzimas extracelulares con células enteras en suspensión, decorando las membranas de las células con enzimas o a través de la integración de ambos tipos de biocatalizadores en matrices de inmovilización⁴²⁷.

La combinación de bacterias del género *Gluconobacter* con enzimas libres para la obtención de productos de valor agregado a partir de desechos industriales es un ejemplo de implementación de este tipo de cascadas célula-enzima y presenta varios antecedentes en la literatura. Un ejemplo de la aplicación de una cascada de este tipo fue reportada por Hou *et al.* para la producción de los ácidos glucónico y xilónico a partir de rastrojo de maíz¹⁷³. Un paso inicial de hidrólisis enzimática del subproducto con celulasas permite liberar los azúcares xilosa y glucosa, que en un siguiente paso serán oxidados a sus correspondientes ácidos por *G. oxydans* DSM 2003. Con esta tecnología los autores reportaron una producción de 118,9 g/L de ácido glucónico y 59,3 g/L de ácido xilónico. Un reporte reciente de Cheng *et al.* describe una tecnología similar, pero enfocándose particularmente en la producción de ácido glucónico a partir de rastrojo de maíz¹⁵⁶. Luego de un pretratamiento con ácido, el subproducto fue sometido a hidrólisis enzimática utilizando celulasas. Posteriormente, el hidrolizado fue tratado con una mezcla de *G. oxydans* NL71 y *Candida tropicalis* para obtener como productos ácido glucónico y proteína microbiana. La combinación de estos microorganismos permite obtener ácido glucónico más puro, ya que la xilosa es consumida por *C. tropicalis*, disminuyendo la contaminación con ácido xilónico. La biomasa de *C. tropicalis* obtenida puede ser luego comercializada como proteína microbiana, resultando en un producto adicional de la síntesis. Los autores reportaron la obtención de 95,8 g/L de ácido glucónico y 9,0 g/L de proteína microbiana a partir de un litro de hidrolizado enzimático. Alternativamente, en un reporte de Jiang *et al.* se combina una hidrólisis enzimática previa de un desecho de la producción de papa con una posterior producción de ácido glucónico por *G. oxydans* DSM 2003¹⁶⁴. En dicho trabajo, la pulpa de papa fue hidrolizada enzimáticamente con el agregado de

celulasas y pectinasas, y posteriormente se evaluó la conversión de la glucosa libre obtenida en ácido glucónico por *G. oxydans* DSM 2003. La implementación de esta cascada resultó en la producción de 546,48 g de ácido glucónico por cada kilogramo de pulpa de papa seca que se utilizó como material de partida.

En los ejemplos presentados en esta sección queda demostrada la versatilidad de las bacterias del género *Gluconobacter* para obtener compuestos de interés cuando se utilizan en combinación con otros catalizadores de célula entera o enzimas en cascadas biocatalíticas. Nuestro grupo de investigación se embarcó hace unos años en el diseño de cascadas biocatalíticas basadas en *Gluconobacter* y transaminasas para la obtención de compuestos aminados⁵⁸. A continuación, se presentarán las generalidades de este tipo de enzimas, y su potencial y antecedentes en la obtención de productos de relevancia biotecnológica como parte de cascadas biocatalíticas con *Gluconobacter*.

Las enzimas transaminasas y su potencialidad para la obtención de productos aminados en cascadas acopladas a *Gluconobacter*

Las enzimas transaminasas (EC 2.6.1.X) catalizan la aminación asimétrica de cetonas, en presencia del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP), desde un donante de amino a un aceptor⁴²⁸. Dado su mecanismo de acción, el cofactor PLP es regenerado luego de cada ciclo catalítico²⁶⁶. Frecuentemente, este tipo de enzimas se presenta como un homodímero con su sitio activo ubicado en la interfase entre ambos monómeros⁴²⁹. El mismo está compuesto por dos bolsillos de distinto tamaño, cuya estructura impactará en la especificidad de la enzima. En base a esto, las transaminasas se clasifican en α - y ω -transaminasas⁴³⁰. Mientras que las α -transaminasas actúan sobre grupos aminos o cetonas en posición en alfa a un grupo ácido carboxílico, 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. Este tipo de transaminasas pueden además actuar sobre sustratos que no poseen grupos carboxilo, como aminos y cetonas.

En general las transaminasas presentan una gran aplicabilidad en la producción de fármacos y productos naturales, debido a permiten la obtención de aminos quirales⁴³¹. La síntesis de este tipo de aminos resulta de especial interés, ya que componen una gran variedad de fármacos relevantes como la Sitagliptina, el Cinacalcet, el Formoterol, la Cipargamina, el Niraparib, la Rivastigmina y el Dilevalo²⁶⁶.

Particularmente, la enzima PfATA (2.6.1.113) es una enzima ω -transaminasa proveniente del organismo *Pseudomonas fluorescens*. La misma se compone por cuatro cadenas aminoacídicas iguales que conforman un homotetrámero, con un peso molecular total de 210 kDa (Figura 54)⁴³². En esta estructura, el cofactor PLP se encuentra posicionado en la interfase entre dos subunidades, lo que da lugar a cuatro sitios de unión a PLP por molécula.

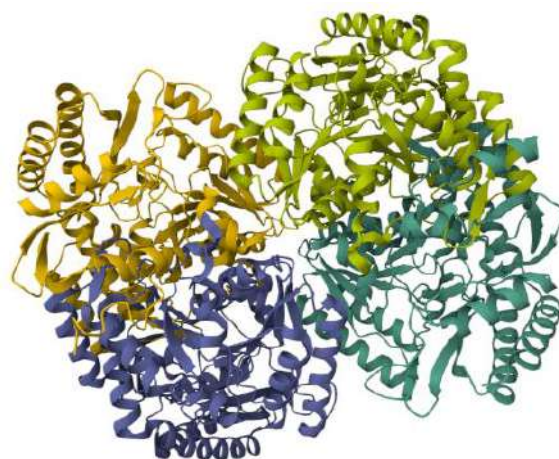


Figura 54. Estructura tridimensional del homotetrámero que compone la enzima transaminasa PfATA de *Pseudomonas fluorescens* (PDB ID: 6S54).

Como se mencionó en la sección anterior, nuestro grupo de investigación logró acoplar la oxidación del glicerol hacia DHA catalizada por Gox, con la aminación reductiva de la DHA por la PfATA para producir serinol⁵⁸. En el reporte antes mencionado se combinaron ambos biocatalizadores en un formato *1-Pot*, llevando a cabo una co-inmovilización de los mismos en esferas de alginato. Primero se inmovilizó PfATA a través de una cola de histidina en microesferas de agarosa-IDA-Co²⁺ y el producto resultante se mezcló con un pellet bacteriano de Gox. Luego se incorporó la mezcla resultante a una solución de alginato al 3% y se formaron esferas. Dentro de las preparaciones híbridas, la bacteria catalizó la oxidación del glicerol a DHA y luego este producto fue sometido a una aminación reductiva por la enzima PfATA en presencia de L-alanina, para producir serinol y piruvato como subproducto. Con esta tecnología se produjeron 36 mM de serinol a partir de glicerol puro después de 44 h. Este reporte demostró la capacidad de combinar estos dos biocatalizadores para obtener exitosamente la molécula proquiral serinol. Sin embargo, existen aún oportunidades de mejora en la configuración de la cascada empleada. Los problemas difusionales presentados por la inmovilización en alginato y la baja estabilidad mecánica del catalizador híbrido, abren las puertas a nuevos experimentos en los que analizar distintas configuraciones de operación de la cascada. Asimismo, en base a los resultados obtenidos durante el primer capítulo de esta Tesis, resulta de interés estudiar la potencialidad de estos biocatalizadores para obtener aminas quirales a partir de derivados de glicerol en reacciones en cascada.

En este capítulo de la Tesis se abordará el acoplamiento de Gox con la enzima transaminasa PfATA inmovilizada, para la síntesis de compuestos aminados a partir de glicerol y algunos de sus derivados mediante cascadas biocatalíticas. Se evaluarán diversas estrategias de inmovilización, explorando diferentes arquitecturas y formatos de cascada para mejorar el desempeño del proceso.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Gluconobacter* utilizadas fueron Gox y Gox-mCherry. Las mismas fueron mantenidas en placas de medio de glucosa-agar (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5) a 30 °C, con el agregado de kanamicina 50 µg/mL para el caso del mutante Gox-mCherry. La cepa *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido pET28b_Pf-ωTA⁴³³ se encontraba disponible en el cepario del Laboratorio de Biocatálisis Heterogénea del CICBiomagUNE (San Sebastián, España). La misma se mantuvo en placas de LB agar (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7,5) con el agregado de ampicilina 100 µg/mL.

4.2.2. Reactivos generales

El NaCl, glicerol, K₂HPO₄, HCl y el NaH₂PO₄ fueron de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). El extracto de levadura y la triptona fueron de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). La peptona fue de *PanReac AppliChem* (Barcelona, España). El reactivo MgSO₄·7H₂O fue de *J.T. Baker* (Pensilvania, EE. UU.). El KH₂PO₄ y el FeCl₃ fueron de *Macron Chemicals* (Pensilvania, EE. UU.). El TMOS fue de *Merck* (Darmstadt, Alemania). El imidazol, la L-alanina y el isopropil-beta-D-tio-galactopiranosido (IPTG) fueron de *Fisher Scientific* (Massachusetts, EE. UU.). Las microesferas de Agarosa-IDA-Co²⁺ fueron de *Agarose Bead Technologies* (Madrid, España). El PLP, el HEPES-Na, y el TA fueron de *Sigma* (Illinois, EE. UU.). La ampicilina, el piruvato, la feniletilamina (FEA), la kanamicina y la PEI 1300 MW fueron de *Sigma-Aldrich* (Misuri, EE. UU.). El derivado de glicerol EGE fue proporcionado por el Dr. Fernando López-Gallego.

4.2.3. Obtención de extracto crudo de PfATA

Se llevaron a cabo precultivos de *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido pET28b_Pf-ωTA en medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) suplementado con ampicilina 100 µg/mL. Los mismos se dejaron crecer por 16 h a 250 rpm y 37°C. Posteriormente, 10 mL de precultivo fueron utilizados para inocular 500 mL de medio LB (triptona 10 g/L, 10 g/L NaCl, extracto de levadura 5 g/L, pH 7,5) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) en un matraz de 2 L. El cultivo se dejó crecer a 250 rpm y 37°C, hasta alcanzar un valor de DO_{600 nm} de 0,6. La expresión de PfATA se indujo agregando 500 µL de IPTG 0,01 M e incubando el cultivo a 21 °C por 16 h. El medio de crecimiento fue alicuotado cada 50 mL y centrifugado por 15 min a 4°C y 4000 rpm. Los pellets obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Para la obtención del extracto crudo se resuspendieron dos de los pellets anteriormente mencionados en 5 mL de tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM. La suspensión celular fue sonicada por 20 min (amplitud 20%, 2 s on, 3 s off) con un sonicador *Sonopuls HD 4100* de *Bandelin* (Berlín, Alemania). Posteriormente, se centrifugó el

extracto obtenido por 20 min a 10000 rpm y 4 °C. El pellet fue descartado y el sobrenadante constituyó el extracto crudo de PfATA. El mismo se almacenó a 4 °C hasta su uso.

4.2.4. Purificación de PfATA

Se ofrecieron 7,5 mL de extracto crudo de PfATA a 1 g de agarosa-IDA-Co²⁺ y se incubaron en agitador rotatorio a 4 °C por 10 min. Se descartó el *flow through* y se eluyó la proteína incubando la matriz con 2 mL de un tampón HEPES 100 mM + PLP 0,1 mM + imidazol 500 mM durante 5 min a 4 °C. Al finalizar la reacción se eluyó por gravedad, obteniendo una solución de PfATA purificada.

4.2.5. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

La determinación de la concentración proteica de las distintas fracciones obtenidas en los procesos de purificación e inmovilización se llevó a cabo utilizando la técnica de Bradford con un kit de *Bio-Rad* (California, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

4.2.6. Preparación de SiNPsTAFE

Se llevó a cabo una síntesis de SiNPs como la mencionada anteriormente en el apartado 3.2.3 “Síntesis de SiNPs para la obtención de preparados híbridos”. Se agregaron 50 µL de TA (40 mg/mL) a 500 µL de una suspensión de 120 mg/mL de SiNPs en agua y se mezcló con vórtex durante 10 s. Posteriormente, se agregaron 50 µL de FeCl₃ (10 mg/mL) y se mezcló la suspensión con vórtex durante 10 s. Se centrifugaron las SiNPsTAFE obtenidas a 10000 rpm y 4 °C por 4 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se lavaron las SiNPs tres veces con 500 µL de HEPES 50 mM, pH 8,0.

4.2.7. Liofilizado de muestras de SiNPs y SiNPsTAFE

Se prepararon SiNPs y SiNPsTAFE de acuerdo con lo detallado en la sección “4.2.6. Preparación de SiNPsTAFE”. En este caso los lavados, fueron llevados a cabo con 500 µL agua. Cada vez que se agregó agua se centrifugaron las distintas nanopartículas a 13000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Los pellets obtenidos fueron incubados a -80 °C durante 16 h. Los pellets congelados se colocaron en un liofilizador *Lyoquest* de *Telstar* (Barcelona, España) a -55 °C y 1 mBar por 16 h.

4.2.8. Análisis por STEM-HAADF y STEM-EDS de SiNPs y SiNPsTAFE

La microscopía electrónica de transmisión en modo de barrido (STEM) se realizó en un microscopio *Titan* corregido para sonda de *ThermoFisher* (Massachusetts, EE. UU.) operado a 300 kV, equipado con una fuente de emisión de electrones de alta luminosidad X-FEG y un corrector de aberración esférica Cs de *CEOS* (Heidelberg, Alemania) para el sistema de condensador, lo que permite obtener un tamaño de sonda subangstrómico. Las imágenes de

campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) se obtuvieron con un detector HAADF de *Fischione* (Pensilvania, EE. UU.). Finalmente, para analizar la composición química de los materiales, se obtuvieron espectros de dispersión de energía de rayos X (EDS) y mapas de composición elemental utilizando un detector *Ultim Max* de Oxford Instruments (Abingdon, Reino Unido). La preparación de muestras y la adquisición de imágenes fue llevada a cabo por el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España).

4.2.9. Análisis por FTIR de SiNPs, SiNPsTAFE y TA

Se llevaron a cabo análisis por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de muestras de SiNPs, SiNPsTAFE, y TA, utilizando un espectrómetro infrarrojo *IR-Prestige 21* de *Shimadzu* (Kioto, Japón). Los espectros fueron obtenidos en el rango entre 4000 y 500 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas mezclando 200 mg de KBr con 30 mg de SiNPs o SiNPsTAFE liofilizadas, o TA en polvo. Cada vez, utilizando un mortero, se obtuvo una mezcla fina que fue empleada para generar discos de 13 mm utilizando una prensa hidráulica *CrushIR* de *PIKE Technologies* (Wisconsin, EE. UU.) a una presión de 10 toneladas, con una bomba de vacío. Estos análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio del Dr. Eduardo Méndez (UdelaR, Montevideo, Uruguay).

4.2.10. Análisis por XPS de SiNPs y SiNPsTAFE

Los análisis por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos x (XPS) de las nanopartículas se realizaron en un espectrómetro *Versaprobe III* de *ULVAC* (Chigasaki, Japón) utilizando una fuente de rayos X monocromática de aluminio (línea K α , 1487 eV). El instrumento se calibró antes de la medición usando la línea 3d5/2 de Ag a 368,26 eV. Las muestras se fijaron con clips de cobre, y se realizó la alineación en Z para optimizar la altura de la muestra. Para la neutralización de carga, se aplicaron tanto neutralización de iones como de electrones. La cuantificación elemental se realizó en un barrido topográfico con energía de paso de 224 eV y un incremento de 0,5 eV por paso, mientras que las regiones de alta resolución se adquirieron con una energía de paso de 69 eV y un incremento de 0,125 eV por paso, con un tiempo por paso de 50 ms. Los datos fueron analizados utilizando el software CasaXPS (v2.3.16 PR 1.6), y las energías se calibraron tomando el enlace C-C sp³ fijado a 285 eV. El ajuste de los espectros Fe 2p se realizó siguiendo el protocolo descrito por Biesinger *et al*⁴³⁴. Estos análisis fueron llevados a cabo por el grupo de investigación del Dr. Fernando López-Gallego (CicBiomaGUNE, San Sebastián, España).

4.2.11. Inmovilización en superficie de PfATA en SiNPs y SiNPsTAFE

Se ofrecieron 2 mL de extracto crudo de PfATA a pellets de SiNPs y SiNPsTAFE correspondientes a 500 μL de una suspensión de 120 mg/mL de nanopartículas. Las suspensiones generadas se incubaron durante 1 h a 4 °C en agitación utilizando un agitador rotatorio. Luego de la inmovilización se centrifugaron las suspensiones de nanopartículas a 5000 rpm y 4 °C por 2 minutos. El pellet se lavó tres veces con 2 mL de tampón HEPES 50 mM + PLP 0,1 mM. Se evaluó la actividad enzimática y concentración proteica del sobrenadante y el pellet obtenido.

4.2.12. Medidas de actividad PfATA

La actividad de la enzima PfATA, de suspensiones estándar de los derivados enzimáticos inmovilizados se llevó a cabo por un ensayo colorimétrico en placa de 96 pocillos. La mezcla reactiva fue HEPES 100 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM + Piruvato 2 mM + FEA 2 mM. Las medidas se realizaron siempre por triplicado, agregando 5 µL de muestra y 200 µL de mezcla reactiva en cada pocillo. La medida se llevó a cabo durante 10 minutos a 30°C en un lector de placas *Epoch 2* de *BioTek* (Vermont, EE. UU.).

Una unidad de enzima (UI/mL) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de FEA en acetofenona por minuto, por mL de suspensión enzimática. La ecuación utilizada para obtener este valor se observa a continuación:

$$\frac{UI}{mL} = \frac{Pendiente \cdot V_{Total}}{\epsilon_{Acetofenona} \times b \times V_{Muestra}}$$

Dónde:

- Pendiente, es la pendiente registrada durante la medida de actividad.
- V_{Total} , es el volumen total de la reacción de medida de actividad, en este caso 0,205 mL.
- $\epsilon_{Acetofenona}$, es el coeficiente de absortividad molar del producto de la reacción, en este caso $12 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.
- b , es el paso óptico utilizado durante la medida, en este caso 0,56 cm.
- $V_{Muestra}$, es el volumen de solución o suspensión enzimática utilizado para medir.

4.2.13. Evaluación por SDS-PAGE de fracciones de inmovilización

Las muestras a ser analizadas por esta técnica fueron diluidas de acuerdo a lo necesario en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM y posteriormente diluidas al medio en tampón de carga *2x Laemmli Sample Buffer* suplementado con 2-mercaptoetanol de *Bio-Rad* (California, EE. UU.). Posteriormente las muestras fueron calentadas en termobloque a 100 °C por 10 minutos. Las mismas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12%. El marcador de peso molecular utilizado fue *Precision Plus Protein Dual Color Standard (#1610374)* de *Bio-Rad* (California EE. UU.). El tampón de corrida utilizado fue Tris/Glicina/SDS de *Bio-Rad* (California, EE. UU.). Para obtener la fracción correspondiente a las proteínas que se inmovilizaron en las SiNPsTAFE se incubó el derivado en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM + imidazol 500 mM a 24 °C + imidazol 500 mM durante 16 horas. El gel fue teñido con azul de Coomassie para su visualización.

4.2.14. Aminación de EHA utilizando una fracción soluble de PfATA

La reacción fue llevada a cabo en tubos de 1,5 mL mezclando 475 µL de la fracción purificada de PfATA (6,4 UI/mL) obtenida utilizando el protocolo detallado en la sección “4.2.4. Purificación de PfATA” con 25 µL de EHA (500 mM en 50% ACN) y 22,25 mg de L-Alanina, lo que resultó en una concentración inicial de sustrato de ~25 mM y 0,5 M del aminoácido. La reacción se incubó a 800 rpm en un *thermoshaker* a 30 °C por 48 h. Muestras del tiempo inicial y final de la reacción fueron analizadas por GC-FID y GC-MS de acuerdo con lo especificado en las secciones “1.2.5. Preparación general de muestras para análisis por GC”, “1.2.6. Análisis por GC-FID convencional” y “1.2.7 Análisis por GC-MS”.

4.2.15. Obtención de productos aminados en cascadas biocatalíticas en formato 2-Pot

A partir de sobrenadantes de reacciones de oxidación de glicerol y EGE por Gox (conversiones reportadas en el Capítulo 1) se preparó una mezcla reactiva conteniendo sustrato (DHA o EHA) 20 mM en tampón HEPES 100 mM, pH 8,0 + L-Alanina 0,5 M + PLP 0,1 mM con 1,5 UI PfATA@SiNPsTAFE. Las reacciones se incubaron en *thermoshaker* a 1000 rpm y 30°C durante 48 h. Se llevaron a cabo controles sin catalizador. Muestras del tiempo inicial y final de la reacción fueron analizadas por GC-FID de acuerdo con lo especificado en las secciones “4.2.17. Análisis por GC-FID convencional” y “4.2.18. Análisis por GC-MS”.

4.2.16. Inmovilización de PfATA en GoxTAFE

Se añadieron 4 mL de extracto crudo a 2 mg de GoxTAFE, obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección “3.2.15. Inmovilización bacteriana a partir de la formación de esporas artificiales”, y se incubó la suspensión durante 1h a 4°C en un agitador rotativo. Luego de la incubación se llevaron a cabo 3 lavados con 1 mL de tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM, cada vez centrifugando a 5000 rpm por 2 min y descartando el sobrenadante. El pellet de PfATA@GoxTAFE se almacenó en hielo hasta su uso posterior.

4.2.17. Biotransformación de glicerol por PfATA@GoxTAFE

Se resuspendieron 2 mg de PfATA@GoxTAFE en 3 mL de en el medio de reacción (HEPES 100 mM, pH 8,0 + glicerol 0,54 M, L-Alanina 0,5 M + PLP 0,1 mM). La reacción se llevó a cabo en matraces de 25 mL, con agitación a 200 rpm a 30 °C por 24 h. Periódicamente se tomaron muestras que fueron analizadas por GC-FID de acuerdo con lo especificado en la sección “4.2.17. Análisis por GC-FID convencional”.

4.2.18. Análisis por GC-FID convencional

Las muestras fueron preparadas de acuerdo con lo determinado previamente en la sección “1.2.5. Preparación general de muestras para análisis por GC”. Se preparó una curva de calibración de serinol ($T_{Ret} = 12,8$ min) con

concentraciones entre 4 y 550 mM (Figura A14). Los análisis fueron llevados a cabo de acuerdo con lo especificado en la sección “1.2.6. Análisis por GC-FID convencional”.

4.2.19. Análisis por GC-MS

Las muestras fueron preparadas de acuerdo con lo determinado previamente en la sección “1.2.5. Preparación general de muestras para análisis por GC”. Se analizó un estándar de serinol para determinar su patrón de masas. Los análisis fueron llevados a cabo de acuerdo con lo especificado en la sección “1.2.7 Análisis por GC-MS”.

4.3. Resultados y discusión

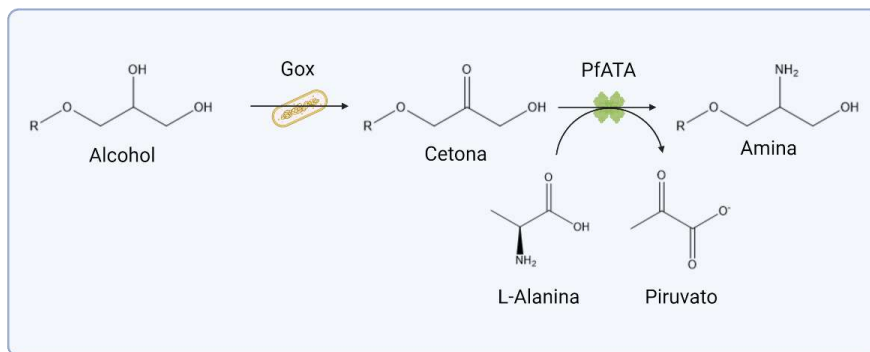
La gran versatilidad de las bacterias del género *Gluconobacter* como catalizadores de célula entera puede ser potenciada a través de su acoplamiento con otros biocatalizadores, posibilitando la obtención de nuevos productos con aplicaciones interesantes. Particularmente, su combinación con enzimas transaminasas permite la síntesis de compuestos aminados con especial relevancia como bloques de síntesis en la industria farmacéutica.

Durante el primer capítulo de este trabajo de Tesis se reportó la capacidad de Gox de oxidar los derivados de glicerol EGE y 3FGE a sus correspondientes cetonas, EHA y 3FHA. Estas cetonas son potencialmente modificables a través de aminación reductiva, pudiendo resultar en amins quirales de alto valor. La potencialidad de combinar Gox con la enzima transaminasa PfATA para la obtención del producto proquiral serinol a partir de glicerol ya fue establecida con anterioridad por nuestro grupo de investigación⁵⁸. De estos resultados surge la posibilidad de continuar estudiando esta combinación de biocatalizadores, para obtener otras moléculas aminadas a partir de las cetonas anteriormente mencionadas. Adicionalmente, los resultados obtenidos en el capítulo anterior demostraron la posibilidad de obtener esporas artificiales de Gox con la capacidad de inmovilizar en su superficie proteínas con colas de histidina. Esta técnica permite el desarrollo de nuevos biocatalizadores combinados con arquitecturas mejoradas que potencialmente faciliten la obtención de las moléculas aminadas de interés a partir de la combinación de Gox y PfATA. Su ya mencionada relevancia como bloques de síntesis en la industria farmacéutica, hace del desarrollo de nuevas estrategias para su síntesis un área de investigación altamente pertinente.

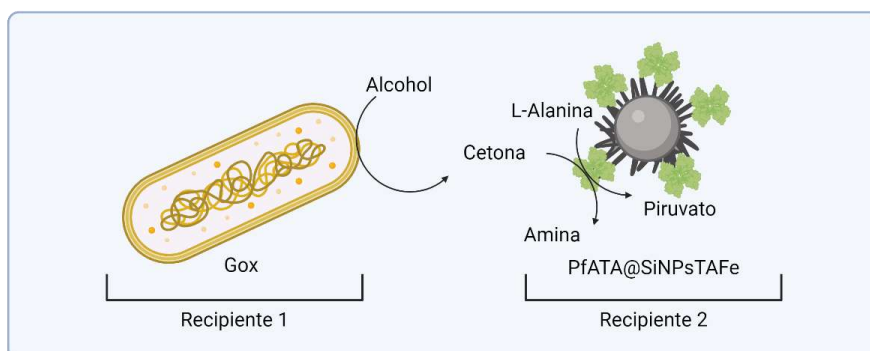
En base a esto, en este último capítulo de la Tesis se buscó estudiar nuevas posibilidades de implementación de la cascada ya establecida (Esquema 25a), variando tanto su arquitectura como sus sustratos. Concretamente, se planteó el diseño de dos cascadas con formatos distintos (Esquema 25b y c).

La primera de ellas fue una cascada de tipo *2-Pot* en la que en una primera instancia se llevaría a cabo la oxidación de los sustratos por acción de células en reposo de Gox. Luego, en un segundo paso las cetonas serían sometidas a una aminación reductiva por la enzima PfATA inmovilizada en una matriz nanoestructurada novedosa. Por otro lado, se diseñó una cascada de tipo *1-Pot* en la que el catalizador a utilizar sería una espora artificial de Gox, preparada según se detalló en el Capítulo 3 de esta Tesis, en cuya superficie se inmovilizaría la enzima PfATA a través de una cola de histidina. A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de la implementación de ambas cascadas.

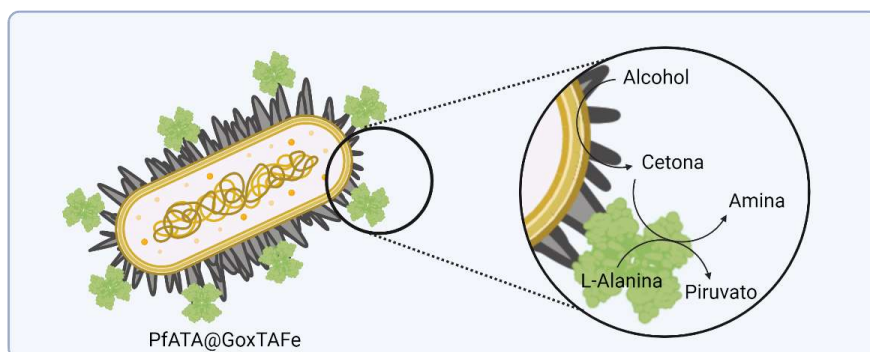
a Cascada para la obtención de moléculas aminadas utilizando Gox y PfATA



b Estrategia 2-Pot para la obtención de moléculas aminadas



c Estrategia 1-Pot para la obtención de moléculas aminadas

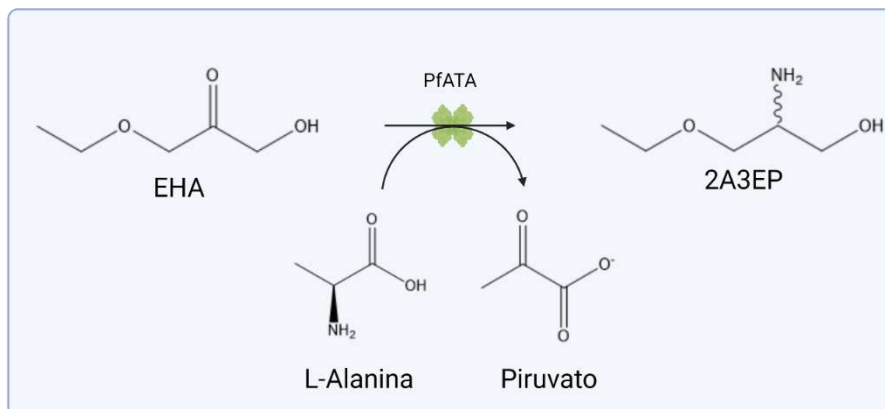


Esquema 25. Obtención de moléculas aminadas a partir de glicerol y sus derivados. a) Cascada biocatalítica para la obtención de moléculas aminadas a partir de glicerol y derivados, combinando Gox y PfATA. b) Estrategia 2-Pot. c) Estrategia 1-Pot. Gox: *G. oxydans*. PfATA: Transaminasa de *Pseudomonas fluorescens*. PfATA@SiNPsTAFE: PfATA inmovilizada en la superficie de nanopartículas de sílica recubiertas con el polímero TAFE (SiNPsTAFE). PfATA@GoxTAFE: PfATA inmovilizada en la superficie de esporas artificiales de Gox (GoxTAFE).

Cascada en formato 2-Pot para la preparación de compuestos aminados a partir de glicerol y EGE

Como ya fue mencionado anteriormente, en el primer capítulo de esta Tesis se demostró que las células en reposo de Gox pueden oxidar de forma exitosa los sustratos derivados de glicerol EGE y 3FGE, en una reacción sin precedentes en la literatura. Mientras que la biotransformación a 3FHA presentó rendimientos discretos, la producción de EHA demostró tener un mayor potencial, alcanzando una conversión cercana al 30% del enantiómero S del EGE a EHA, en las condiciones estudiadas. Al igual que la DHA obtenida a partir de glicerol, la

cetona EHA presenta la potencialidad de ser modificada enzimáticamente por acción de la enzima PfATA para la obtención de su correspondiente amina quiral, denominada 2-amino-3-etoxipropan-1-ol (2A3EP) (Esquema 26).



Esquema 26. Potencial aminación reductiva de EHA catalizada por PfATA para formar la amina quiral 2A3EP.

En este entendido, como una primera aproximación a la síntesis en cascada de la amina 2A3EP, y dados los buenos resultados obtenidos durante los experimentos con células en reposo para la obtención de EHA en agua, se seleccionó esta modalidad de biotransformación para el primer paso de la cascada. Para el segundo, que consta de la aminación reductiva de la EHA, se decidió utilizar la enzima PfATA inmovilizada, utilizando condiciones de reacción previamente establecidas⁴⁰⁵.

En particular, la inmovilización de PfATA ha demostrado en el pasado ser una aproximación útil para mejorar su estabilidad y reusabilidad. De hecho, nuestro grupo de investigación ha abordado anteriormente su inmovilización mediante unión a la superficie de diversas matrices preexistentes, así como su encapsulamiento en SiNPs y la formación de CLEAs⁴⁰⁵. De la batería de estrategias analizadas en este trabajo previo, los CLEAs presentaron los mejores resultados. Sin embargo, el uso de BSA y PEI para proteger la enzima incrementa los costos de producción, mientras que el uso del agente entrecruzante glutaraldehído, por su toxicidad, convierte esta estrategia de inmovilización en una opción menos sostenible desde el punto de vista ambiental. Entre las demás alternativas estudiadas, las matrices preexistentes basadas en agarosa también presentaron buenos resultados, especialmente aquellas funcionalizadas con IDA-Co²⁺. No obstante, este tipo de matrices comerciales pueden resultar costosas y muchas veces requieren del empleo de métodos de funcionalización con tiempos de incubación prolongados, y en algunos casos, el empleo de reactivos tóxicos. Alternativamente el atrapamiento en SiNPs es una estrategia más sencilla y efectiva, que presentó buenos rendimientos de inmovilización. Sin embargo, por sus características no otorgó estabilidad a la estructura proteica. Adicionalmente, a excepción de las matrices funcionalizadas con IDA-Co²⁺, la mayoría de las estrategias abordadas requirió de una purificación previa de la enzima, ya que la interacción con los soportes fue inespecífica. Esto no solamente complejiza los procesos de inmovilización, sino que prolonga el tiempo de preparación del catalizador.

De cara a una posible aplicación industrial de PfATA inmovilizada, factores como el costo de la matriz, la sencillez del proceso de inmovilización, y la mejora en las propiedades del catalizador deben ser tomados en cuenta para la selección de la estrategia a utilizar. Por este motivo, se buscó desarrollar una nueva estrategia de inmovilización de fácil implementación, mediada por unión por afinidad para evitar la unión inespecífica de proteínas, y que presente un mínimo impacto en la actividad de PfATA. Capitalizando sobre el conocimiento del grupo de investigación en la síntesis de SiNPs, y los nuevos conocimientos adquiridos en la formación del polímero de TAFE utilizado para generar las esporas artificiales de Gox, se planteó generar un nuevo material híbrido de inmovilización para PfATA. El mismo se basó en generar SiNPs con un recubrimiento del polímero TAFE, con la potencialidad de inmovilizar la enzima de interés a través de una cola de histidina. Este nuevo soporte de inmovilización se denominó SiNPsTAFE y su preparación, caracterización y posterior aplicación para la inmovilización de PfATA se describen a continuación.

Síntesis y caracterización de SiNPsTAFE

La preparación de las SiNPsTAFE involucró un primer paso de síntesis de SiNPs, en el que se empleó el mismo protocolo descrito en el Capítulo 3 para la preparación de los materiales híbridos A4S1 y A4S4. Las nanopartículas obtenidas fueron observadas por STEM-HAADF. La microscopía STEM-HAADF se vale de un detector anular de alto ángulo para obtener imágenes con alta resolución y contraste, basadas en la variación del número atómico de los elementos presentes en la muestra, siendo los más pesados los que presentan mayor señal³⁸⁴. A partir de una serie de imágenes, se llevaron a cabo medidas del diámetro de las SiNPs, obteniendo un diámetro promedio de 728 ± 290 nm (Figura 55). Este tamaño es similar al reportado por Jackson *et al.* para esta síntesis³¹.

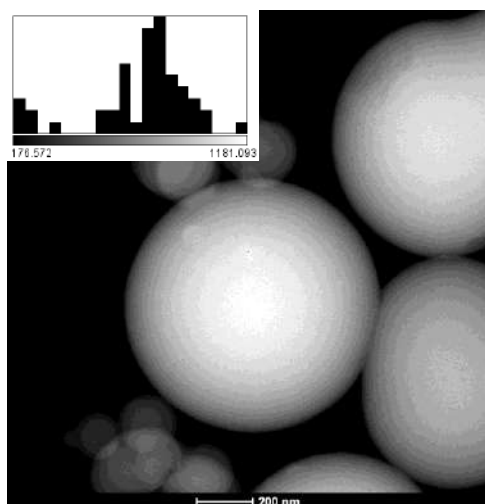


Figura 55. Imagen obtenida por STEM-HAADF de las SiNPs utilizadas como base para la posterior obtención de las SiNPsTAFE. Recuadro: Histograma representativo del diámetro (nm) de las nanopartículas obtenidas. Promedio: 728 ± 290 nm, $n=50$.

Utilizando como base el protocolo utilizado para generar las esporas de Gox, se agregó a la suspensión de nanopartículas obtenida soluciones de TA y FeCl_3 , lo que generó un cambio inmediato en su coloración, tomando un tono grisáceo (Figura 56b).

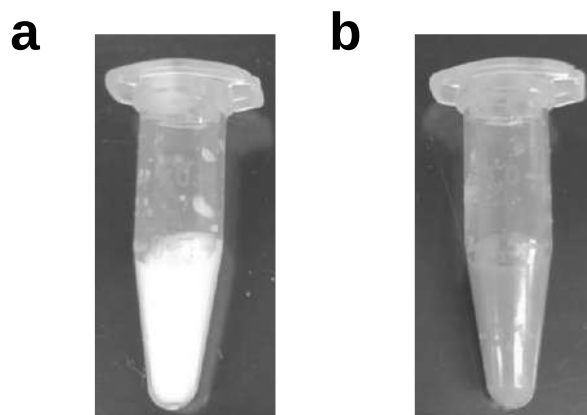


Figura 56. Síntesis de SiNPsTAFE. a) Suspensión de SiNPs de partida. b) Suspensión de SiNPs luego del agregado del TA y FeCl₃ (SiNPsTAFE).

Este cambio de color se mantuvo luego de la realización de una serie de lavados, lo que resultaba compatible con una potencial modificación de la superficie de las SiNPs. Con el fin de evaluar las propiedades del material obtenido luego de la reacción de polimerización, se llevaron a cabo una variedad de técnicas de caracterización. La primera parte del análisis consistió en la microscopía de transmisión de barrido (STEM) de las nanopartículas antes y después de su modificación (Figura 57). Para la obtención de imágenes se emplearon dos técnicas distintas: la microscopía STEM-HAADF y la STEM-EDS. Esta última técnica proporciona información detallada sobre la composición elemental de la muestra, generando un mapa que facilita la identificación y distribución espacial de los elementos en la misma⁴³⁵. Frecuentemente, las imágenes obtenidas con ambas técnicas se combinan, superponiendo los mapas elementales sobre las imágenes de alta resolución, lo que permite una visualización precisa de la distribución de los elementos en la proyección bidimensional del preparado.

En el caso particular de las SiNPs y las SiNPsTAFE, esta combinación de estrategias de microscopía STEM permite no solamente observar posibles cambios morfológicos o de organización a partir de la formación del polímero, sino que permite determinar su ubicación en la estructura.

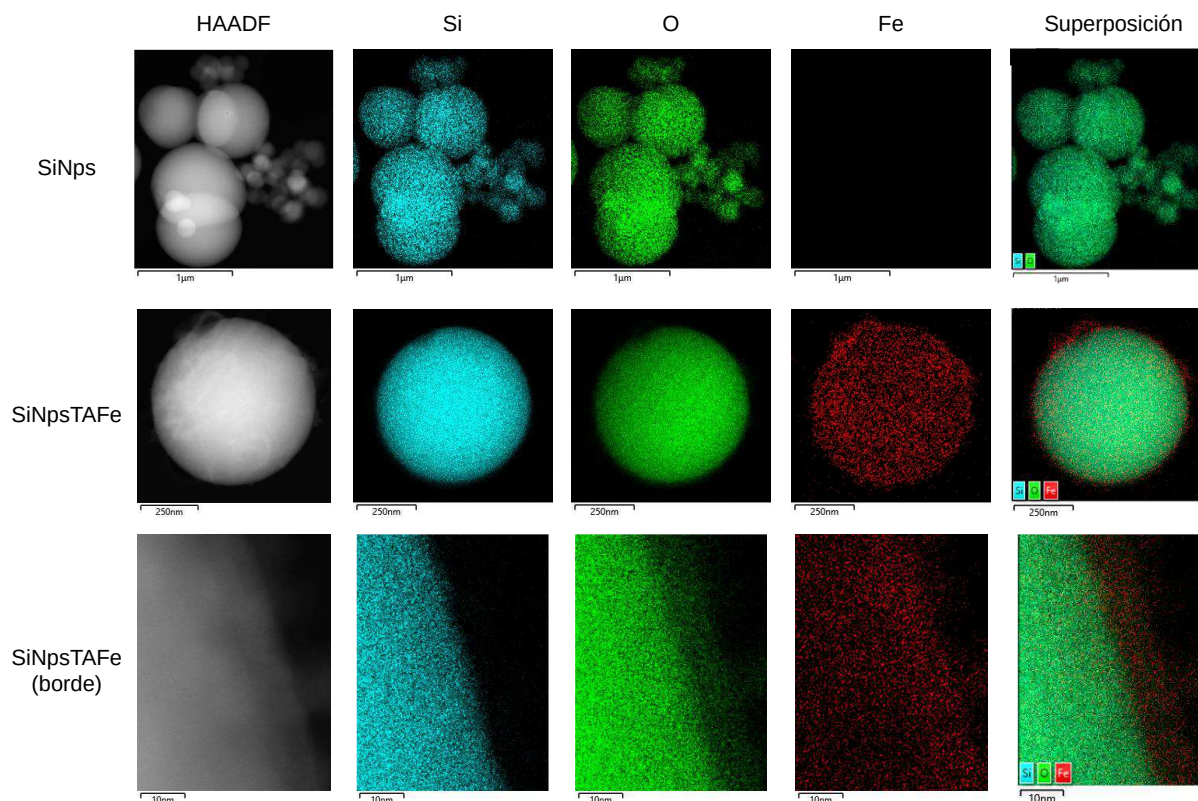


Figura 57. Imágenes obtenidas por microscopía STEM-HAADF y STEM-EDS de las nanopartículas antes (SiNPs) y después (SiNPsTAFE) de la formación del polímero TAFE. HAADF: Imagen obtenida por STEM-HAADF. Si (K α 1): Ubicación espacial de los átomos de silicio en la estructura, obtenida por STEM-EDS. O (K α 1): Ubicación espacial de los átomos de oxígeno en la estructura, obtenida por STEM-EDS. Fe (K α 1): Ubicación espacial de los átomos de hierro en la estructura, obtenida por STEM-EDS. Superposición: Superposición de las imágenes obtenidas por STEM-EDS.

Las imágenes obtenidas por STEM-HAADF de las SiNPsTAFE mostraron en todos los casos morfologías esféricas, de aspecto similar a las SiNPs (Figura 57). El análisis de la composición elemental de las muestras realizado por STEM-EDS confirmó la formación del polímero TAFE alrededor de la estructura de las nanopartículas. Para llevarlo a cabo, se analizaron las señales correspondientes a la presencia de átomos de silicio, oxígeno y hierro. Por su composición, se esperaba que las SiNPs presentaran señales correspondientes a silicio y oxígeno, mientras que la presencia del polímero TAFE debería verse evidenciada por la presencia de los átomos de oxígeno presentes en el TA, y los átomos de hierro que coordinan la unión entre las moléculas de TA. Efectivamente, mientras que las SiNPs solamente presentaron señales de silicio y oxígeno, las SiNPsTAFE demostraron tener en su superficie átomos de hierro, lo que implica la formación de la malla de TAFE. Una imagen tomada del borde de una de estas nanopartículas permitió observar al detalle la organización de los átomos, que concuerda con la formación de esta estructura (Figura 57, fila “SiNPsTAFE (borde)”). Mientras que los átomos de silicio solamente se concentran en la estructura que conforma la nanopartícula, los de oxígeno se observan con abundancias distintas a lo largo de la muestra. En este caso, se observa una mayor densidad de átomos de oxígeno en lo que se corresponde con la estructura de la nanopartícula, que hacia el extremo disminuye, lo que concuerda con la presencia del TA que

forma parte del polímero. Finalmente, la señal de átomos de hierro se observa con una densidad menor, recubriendo toda la estructura, lo que nuevamente se condice con la presencia de iones hierro en el polímero TAFE. La formación de este polímero se hace aún más evidente al observar la superposición de imágenes tomadas por STEM-EDS, en el que la señal de los átomos de hierro se observa como un halo que rodea la estructura de la nanopartícula.

La modificación exitosa de la superficie de las nanopartículas también fue confirmada por otras dos técnicas espectroscópicas complementarias, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).

La técnica de FTIR se basa en la irradiación de la muestra con luz infrarroja, lo que resulta en un espectro que muestra la absorción o transmitancia de la luz a los distintos números de onda⁴³⁶. Este espectro aporta información de la naturaleza de la muestra, permitiendo identificar los grupos funcionales presentes y los tipos de enlaces químicos entre los átomos⁴³⁷, permitiendo en este caso determinar la composición y funcionalización de las nanopartículas³⁸⁴. En este caso, resulta especialmente útil para detectar la presencia del TA que compone el polímero TAFE, ya que contiene grupos hidroxilos, carbonilos y enlaces C-O en sus anillos aromáticos, estructuras que son detectables por esta técnica. No obstante, es posible que la técnica de FTIR no permita detectar con precisión y de forma directa la presencia de hierro en la superficie de las nanopartículas. Esto se debe a que generalmente los enlaces Fe-O presentan señales muy débiles, cercanas al número de onda 600 cm^{-1} , siendo frecuentemente enmascaradas por otras señales. Sin embargo, en general, la formación de complejos con metales resulta en corrimientos en las bandas correspondientes a otros grupos químicos, la disminución en la intensidad de las mismas o incluso la aparición de nuevas bandas, permitiendo inferir de manera indirecta su presencia en la muestra. De hecho, Espina *et al.* observaron estos fenómenos en un análisis de complejos TAFE realizado por FTIR, donde se logró evidenciar la presencia del hierro no solo por la aparición de una señal a 600 cm^{-1} sino también debido a la ocurrencia de estos fenómenos⁴³⁸.

Se analizaron las nanopartículas antes y después de la formación del polímero, junto con una muestra de TA (Figura 58). El análisis de la muestra de TA se llevó a cabo con la finalidad de determinar el espectro de IR de este compuesto, pudiendo identificar sus señales características para luego poder determinar su presencia en la superficie de las nanopartículas. El espectro obtenido para el TA se condice con el reportado por Espina *et al.*⁴³⁸. Se observaron bandas en el rango de $1200\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ atribuibles a vibraciones de estiramiento en los enlaces C-O, C-C, y a vibraciones de deformación en el plano de C-H y de torsión de los grupos C-OH. A su vez, en el rango de $1300\text{ a }1400\text{ cm}^{-1}$, se observaron bandas atribuibles principalmente a vibraciones de deformación C-H en el plano y de torsión de C-OH, con posible contribución de las vibraciones C-C del anillo aromático. La señal atribuible a la vibración de los grupos carbonilo (C=O) se observó en la región de los 1700 cm^{-1} .

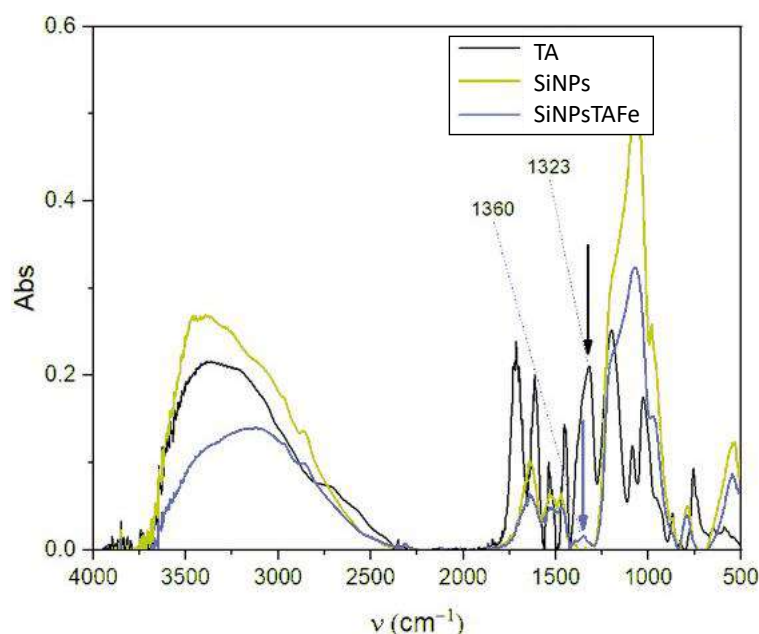


Figura 58. Análisis por FTIR de muestras de TA (negro), SiNPs (verde) y SiNPsTAFE (violeta). Las flechas indican el pico presente en las muestras de TA y SiNPsTAFE, y ausente en la de SiNPs que indicaría la presencia del polímero en la superficie de las SiNPsTAFE.

Por otro lado, el análisis de las SiNPs antes de la formación del polímero también resultó en las señales esperadas para este tipo de estructuras, de acuerdo por lo reportado por Panwar *et al.*⁴³⁹. En el rango de 1000 a 1250 cm^{-1} se observó una banda que se corresponde con las vibraciones asociadas con el estiramiento asimétrico del enlace Si-O-Si, esta banda suele ser la más intensa, y por tanto característica, de la sílica. En el rango 950-970 cm^{-1} se observó una banda adjudicada al estiramiento del enlace Si-OH, y finalmente en el rango entre 780 y 800 cm^{-1} se encuentra una banda asociada al estiramiento simétrico del enlace Si-O-Si. La señal observada cerca del número de onda 1630 cm^{-1} puede asociarse a la deformación del enlace O-H del agua adsorbida en la superficie de las nanopartículas. Finalmente, las bandas más anchas observadas entre 3200 y 3600 cm^{-1} pueden corresponder a grupos Si-OH o al estiramiento del enlace O-H del agua adsorbida.

En base a los resultados obtenidos para el TA y las SiNPs, y tomando en cuenta las observaciones realizadas por Espina *et al.* en su análisis de los complejos TAFE, es posible llevar a cabo un análisis certero del espectro de FTIR obtenido para la muestra de SiNPsTAFE. El espectro resultante fue a primera vista muy similar al obtenido para las SiNPs antes de la síntesis del polímero. Esto tiene sentido ya que la concentración relativa de las nanopartículas en la muestra es mayor a la esperada para el recubrimiento de TAFE. En este nuevo espectro, se observa claramente la banda característica de las estructuras de sílica entre 1000 y 1250 cm^{-1} , lo que enmascara las posibles señales atribuibles al TA en ese rango. Por otro lado, mientras que se observa la aparición de una banda cercana a los 600 cm^{-1} que podría asociarse con la presencia de un enlace Fe-O, no se puede determinar que la misma esté asociada a la presencia de ese tipo de enlace ya que se observa una banda similar en la muestra de SiNPs antes de la modificación de su superficie. Como se había mencionado anteriormente, las señales generadas

por los enlaces Fe-O tienden a ser muy bajas y son frecuentemente enmascaradas por otras señales. En este caso, es probable que la banda corresponda a la deformación del enlace O-Si-O, que suele presentarse en el rango entre 400 y 500 cm^{-1} . La aparición de esta banda en las dos muestras de nanopartículas descarta la posibilidad de una detección directa del hierro en la muestra. Sin embargo, el espectro de las SiNPsTAFE presenta una señal a 1360 cm^{-1} que se encuentra ausente en la muestra de SiNPs, y que podría resultar del corrimiento de la señal anteriormente observada a 1323 cm^{-1} en el espectro del TA. Dado que en ese rango se presentan bandas atribuibles a los enlaces que componen los anillos del TA, y que es a través de sus OH que se generan los enlaces de coordinación con los iones Fe, la aparición de esta banda corrida podría corresponderse con la presencia del polímero TAFE en la superficie de las nanopartículas. Esta hipótesis se ve soportada por los resultados obtenidos por Espina *et al.* en donde también se observa un corrimiento de estas señales de aproximadamente 36 cm^{-1} hacia mayores números de onda luego de la formación del complejo TAFE. Cabe destacar que en dicho trabajo mencionan la aparición de un nuevo pico a 1085 cm^{-1} como uno de los principales cambios en el espectro del TA luego de formar un complejo con hierro. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas SiNPsTAFE este pico probablemente esté enmascarado por las señales principales asociadas a la presencia de sílica.

Los resultados obtenidos por FTIR fueron complementados por XPS, ya que esta técnica resulta más útil para detectar la presencia de hierro en la muestra. De hecho, este tipo de espectroscopía no solo permite detectar su presencia, sino que además posibilita la determinación del estado de oxidación del metal en el polímero. Este dato resulta especialmente relevante, ya que como se observó anteriormente en Iturralde *et al.*, el estado de oxidación del hierro en el polímero TAFE influye directamente en la formación de los enlaces de coordinación con las colas de histidina durante la inmovilización de enzimas⁴²⁰.

Los resultados de la composición superficial de las SiNPsTAFE obtenidos por XPS corroboraron la presencia del polímero TAFE (Tabla 20). La detección de altos porcentajes de carbono y oxígeno es consistente con la presencia de las moléculas de TA en la superficie de las nanopartículas. Además, se logró identificar un porcentaje de átomos de Fe en la superficie, lo cual es otro indicativo de la formación exitosa del polímero. Las señales correspondientes a nitrógeno y silicio son atribuibles a los componentes de las nanopartículas base, compuestas por SiO_2 y PEI, un polímero rico en nitrógeno.

Tabla 20. Análisis por XPS de la composición superficial de las SiNPsTAFE.

	Elemento				
	C (%)	O (%)	Fe (%)	N (%)	Si (%)
SiNPsTAFE	52,5	38,5	2,9	4,8	1,3

Adicionalmente, se realizó un análisis para determinar el estado de oxidación del hierro presente en la superficie de las SiNPsTAFE. De manera consistente con los hallazgos reportados previamente por nuestros colaboradores sobre el polímero formado en la superficie de *E. coli*, el polímero formado sobre las SiNPsTAFE contiene

predominantemente iones de hierro en su estado de oxidación Fe^{2+} , con una menor proporción de iones de hierro en su estado de oxidación Fe^{3+} (Tabla 21, Figura A15). De acuerdo con los cálculos presentados en Iturralde *et al.*, llevados a cabo según la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), la presencia de iones Fe^{2+} favorece significativamente la quelación de los anillos imidazol, ya que la complejación de estos anillos es energéticamente más favorable cuando el complejo tris-galoil está coordinado con Fe^{2+420} . Los cálculos de DFT demostraron que la energía de unión es de 12,5–14,6 kcal/mol más baja en comparación con los complejos con Fe^{3+} , lo que sugiere una mayor estabilidad y afinidad de los imidazoles hacia Fe^{2+} en el contexto del polímero. Esto es beneficioso, ya que mejora las capacidades del material para inmovilizar proteínas con colas de histidina.

Tabla 21. Análisis por XPS del estado de oxidación del hierro presente en la superficie de las SiNPsTAFE.

	Elemento			
	Fe^{2+}		Fe^{3+}	
	BE (ev)	%	BE (ev)	%
SiNPsTAFE	709,6	81,9	711,5	18,1

Para determinar el efecto de la incorporación del polímero en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas y conocer su superficie en más profundidad, se llevaron a cabo análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta. La técnica de DLS es un enfoque común para el análisis del tamaño y la distribución de tamaño de nanopartículas. Consiste en medir la interferencia de luz basada en el movimiento browniano de las nanopartículas en suspensión, correlacionando su velocidad (coeficiente de difusión) con su tamaño mediante la ecuación de Stokes-Einstein³⁸⁴. Permite determinar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas y su distribución de tamaños. Por otro lado, las medidas de potencial zeta dan una idea sobre la carga superficial de las partículas en una suspensión, lo que permite evaluar cómo estas interactúan entre sí⁴⁴⁰. Un potencial zeta elevado ($>|30|$ mV) indica que las partículas tienen una carga superficial significativa que las mantiene separadas, favoreciendo así la estabilidad del sistema. En contraste, un potencial zeta bajo ($<|30|$ mV) sugiere que la carga superficial es insuficiente para mantener las partículas separadas, lo que podría llevar a su aglomeración y afectar negativamente la dispersión y estabilidad de la suspensión.

Dado que el medio en donde se encuentran las nanopartículas puede impactar en los resultados obtenidos por estas dos técnicas, se debió tener en cuenta la aplicación futura de las SiNPsTAFE para seleccionar las condiciones para llevar a cabo la medida. Considerando que el objetivo de las mismas era ser utilizadas para inmovilizar la enzima PfATA en su superficie, y teniendo en cuenta sus condiciones óptimas de operación, se decidió llevar a cabo las medidas en tampón HEPES 50 mM y pH 8,0. Asimismo, considerando que la enzima PfATA requiere del cofactor PLP para llevar adelante la catálisis, se llevaron a cabo experimentos con el agregado del mismo. En general, la presencia del cofactor durante la inmovilización de una enzima resulta beneficioso para mantener su estructura y actividad. De hecho, para el caso de algunas transaminasas, se ha demostrado que la presencia del PLP durante la inmovilización permite mantener su estructura cuaternaria⁴⁰⁵. Dado que tanto la

inmovilización como las reacciones se llevan a cabo en un exceso de cofactor, es altamente relevante estudiar el comportamiento de las nanopartículas en estas condiciones. Entonces, se llevó a cabo el análisis por DLS (Figura 59) y potencial zeta de suspensiones de las nanopartículas en estudio en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 con y sin suplementación de PLP (0,1 mM).

Con respecto a los análisis por DLS, los resultados obtenidos difirieron para ambos tipos de nanopartículas, observándose a su vez cambios en el tamaño medido del diámetro hidrodinámico asociados a la presencia del cofactor PLP (Figura 59, Tabla 22). En ausencia de PLP, el diámetro hidrodinámico de las SiNPs presentó una población mayoritaria con un valor obtenido de ~ 1316 nm, con un promedio de 1195 ± 348 nm. Por su parte, luego del agregado del cofactor se observó una población mayoritaria con un valor de ~ 466 nm, con un promedio de diámetros obtenidos de 864 ± 288 nm. En ambos casos, los resultados se encuentran en un rango que concuerda con los resultados obtenidos por STEM-HAADF de estas nanopartículas. Los datos demuestran una tendencia hacia la disminución aparente del tamaño del diámetro hidrodinámico de las SiNPs con el agregado de PLP, acompañado de un aumento en el índice de polidispersidad (IP).

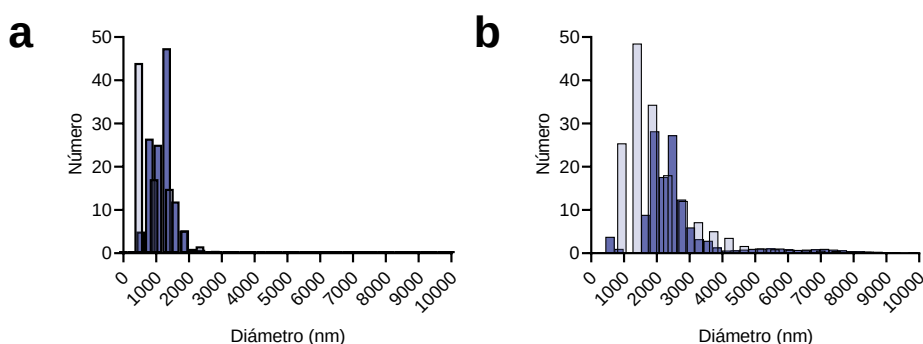


Figura 59. Medidas de diámetro hidrodinámico de las SiNPs (a) y SiNPsTAFé (b) obtenidas por DLS, en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 en presencia (violeta claro) o ausencia (violeta oscuro) del cofactor PLP (0,1 mM).

Por su parte, se observó un cambio de signo en el potencial zeta de las SiNPs al entrar en contacto con el PLP que puede asociarse con la unión del cofactor cargado negativamente a la superficie de las nanopartículas (Tabla 22). En ausencia de PLP, las SiNPs presentaron una carga positiva asociada a la presencia de la PEI, mientras que en presencia del cofactor, su carga superficial fue negativa. Esto es consistente con lo reportado por Velasco-Lozano *et al.*, que demostraron que la carga negativa presente en el PLP genera una fuerte interacción iónica con la PEI⁴⁴¹. Dado que las SiNPs fueron preparadas en base a este polímero aminado cargado positivamente, la unión del PLP a estas nanopartículas resulta factible, explicando el cambio en la carga superficial observado.

Tabla 22. Resultados del análisis por DLS y potencial zeta de las SiNPs y SiNPsTAFE en tampón HEPES 50 mM, en presencia y ausencia de PLP (0,1 mM).

Muestra	Medio de medida					
	HEPES 50 mM, pH 8,0			HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM		
	Diámetro (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	Diámetro (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
SiNPs	1195 ± 348	0,216 ± 0,068	18,36 ± 6,43	864 ± 288	0,377 ± 0,114	- 17,50 ± 7,03
SiNPsTAFE	2691 ± 1643	0,288 ± 0,109	- 17,50 ± 7,03	2429 ± 1318	0,340 ± 0,167	-28,19 ± 5,48

IP: Índice de polidispersidad.

Por su parte, el agregado del polímero TAFE generó un aumento del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, observado tanto en ausencia como en presencia del cofactor. Para el caso de las SiNPsTAFE medidas en HEPES 50 mM, pH 8,0 se observaron poblaciones mayoritarias de nanopartículas que presentan un diámetro hidrodinámico con valores en el rango de los 1935 nm y 2480 nm, con un promedio observado de 2691 ± 1643 nm. El aumento en el tamaño de las SiNPsTAFE luego del agregado del polímero con respecto a las SiNPs es un efecto esperado, ya que el recubrimiento no solamente aumenta el diámetro hidrodinámico de las mismas, sino que potencialmente puede generar agregación. De hecho, se observa una mayor dispersión hacia mayores tamaños de partículas, llegando hasta poblaciones de ~5000 nm. En presencia de PLP se observó una población mayoritaria de SiNPsTAFE con un diámetro hidrodinámico de ~1400 nm, con un promedio de 2429 ± 1318 nm. Nuevamente, al incorporar PLP se observó la misma tendencia hacia la disminución en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, con un aumento en el índice de polidispersidad que presentaron las SiNPs. Sin embargo, se puede observar que en ausencia de PLP la superficie de las SiNPsTAFE presentó una carga negativa, que en este caso es atribuible a la presencia del polímero TAFE. Estos resultados concuerdan con el cambio de potencial zeta reportado por Ejima *et al.* en el recubrimiento de nanopartículas de sílica aminadas comerciales con un polímero de TAFE en condiciones similares⁴⁴².

Inmovilización de PfATA en SiNPsTAFE

Una vez caracterizadas las nuevas nanopartículas recubiertas con el polímero TAFE, se procedió a evaluar su potencial para la inmovilización de enzimas en su superficie. Aunque ya existen antecedentes en la literatura sobre la preparación de nanopartículas de sílica combinadas con TA para la inmovilización de enzimas, la mayoría de los estudios utilizan el TA como molde para precipitar la sílica^{443–445}. Además de requerir de síntesis más prolongadas, la inmovilización de enzimas en este tipo de materiales se da principalmente por fenómenos de adsorción. En contraste, y según lo mejor de nuestro conocimiento, la preparación de nanopartículas de sílica recubiertas con un polímero de TAFE para obtener derivados enzimáticos con fines biocatalíticos no ha sido explorada hasta el momento.

Del estudio de las SiNPsTAFE se determinó que presentan mayoritariamente Fe^{2+} en su superficie, que puede establecer fuertes enlaces de coordinación con las colas de histidina de enzimas que las contengan. A su vez, las nanopartículas presentan una carga superficial negativa que podría ser utilizada para inmovilizar enzimas por adsorción iónica, considerando que la enzima debe presentar una carga positiva en las condiciones de la inmovilización.

En particular, de acuerdo a los objetivos de esta Tesis, la enzima seleccionada para llevar a cabo estos ensayos fue la transaminasa PfATA. Esta enzima fue expresada en *E. coli* y presenta una cola de histidina que facilita su purificación e inmovilización, y en este caso, puede formar enlaces de coordinación con los Fe^{2+} presentes en la superficie de las SiNPsTAFE. Por su parte, para determinar si en las condiciones del experimento se podría generar además una adsorción iónica entre la enzima y las SiNPsTAFE, se determinó el punto isoeléctrico de la misma. Partiendo de la secuencia aminoacídica de la PfATA depositada por Roura Padrosa *et al.*⁴³², disponible en PDB (Nº de acceso: 6S54), se ingresó la misma en herramienta web de *Expasy* (https://web.expasy.org/compute_pi/), donde se obtuvo una predicción del punto isoeléctrico de 5,92. Dado que el protocolo de inmovilización propuesto para esta enzima utiliza un tampón a pH 8,0, en estas condiciones la enzima presentaría una carga neta negativa. En base a esto, se esperaba que la interacción principal de la PfATA con las SiNPsTAFE fuera la generación de quelatos metálicos entre los Fe^{2+} y las colas de histidina, ya que una adsorción iónica en estas condiciones no se vería favorecida.

Para proceder con la inmovilización, se llevó a cabo la producción de PfATA en *E. coli* BL21 para la obtención de un extracto crudo de la enzima (Tabla 23).

Tabla 23. Obtención de extracto crudo de PfATA a partir de un cultivo inducido de *E. coli* BL21 transformado con el plásmido pET28b-Pf-wTA.

Actividad (UI/mL)	Volumen (mL)	Actividad total (UI)	Concentración proteica (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI/mg)
12,83 ± 0,27	10	128,30	6,35 ± 0,25	12,71	2,08

Se ofrecieron 25,6 UI de PfATA a un pellet correspondiente a 60 mg de SiNPsTAFE. Se incubó la enzima con las nanopartículas por 1h a 4 °C en un agitador rotatorio y luego del procedimiento de inmovilización se llevaron a cabo tres lavados con tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM. Las distintas fracciones obtenidas a lo largo del proceso de inmovilización fueron analizadas y los resultados se observan en la Tabla 24. El derivado obtenido fue denominado PfATA@SiNPsTAFE.

Tabla 24. Estudio de la inmovilización de PfATA en SiNPsTAFE (PfATA@SiNPsTAFE).

Fracción	Actividad (UI/mL)	Volumen en (mL)	Act. Total (UI)	Conc. proteica (mg/mL)	Proteína total (mg)	Act. Específica (UI/mg)	Inmovilización (%) ^a	Rendimiento (%) ^b
Aplicado	12,83 ± 0,27	2,00	25,66	6,35 ± 0,25	12,71	2,08	-	-
Sobrenadante	0,88 ± 0,21	2,00	1,76	4,42 ± 0,31	8,84	0,87	-	-
Lavado 1	0,15 ± 0,03	2,00	0,29	0,34 ± 0,03	0,69	2,55	-	-
Lavado 2	0,06 ± 0,02	2,00	0,12	0,04 ± 0,04	0,09	3,22	-	-
Lavado 3	0,02 ± 0,02	2,00	0,05	-	-	-	-	-
PfATA@SiNPsTAFE	3,85 ± 0,18	2,00	7,69	-	-	-	91,3%	32,8%

^aInmovilización: ((Act. total ofrecida – Act. total SBN – Act. Total Lavados)/Act. total ofrecida) . 100

^bRendimiento: (Act. Total recuperada en preparado)/ Act. total ofrecida – Act. total SBN – Act. Total Lavados) . 100

En las condiciones del experimento, la inmovilización en SiNPsTAFE mostró un porcentaje de inmovilización del 91,3%, mientras que el rendimiento de inmovilización fue de 32,8%. A nivel de proteína total, se logró inmovilizar un 24,3% en la superficie de las nanopartículas. Estos resultados indican que la mayoría de las enzimas se inmovilizaron en la superficie de las SiNPsTAFE. Sin embargo, se observó una pérdida de actividad enzimática que podría deberse a fenómenos de inactivación o a problemas de difusión de sustratos y productos, posiblemente causados por efectos de *crowding* en el entorno de inmovilización. Cabe destacar, que las condiciones de la inmovilización *per se* (agitación, 1 h, 4 °C) no tuvieron un efecto negativo en la actividad del extracto enzimático. Un control realizado del extracto crudo incubado en las mismas condiciones de inmovilización demostró que inicialmente se contaba con 12,83 ± 0,27 UI/mL y al final con 13,06 ± 0,32 UI/mL. En base a esto, es posible que la pérdida de actividad haya estado principalmente asociada a la unión de las enzimas al soporte, y lo que esto pueda causar en su estructura y función. Con respecto al rendimiento de inmovilización en base a proteínas, se puede decir que este valor concuerda con lo esperado ya que se partió de un extracto crudo de *E. coli*, generando una interacción específica por la formación de quelatos metálicos. En ese entendido, la mayoría de las proteínas de este extracto correspondían a proteínas de *E. coli* que no deberían presentar interacciones con la matriz de inmovilización. El derivado obtenido, PfATA@SiNPsTAFE, presentó una actividad de 128 UI/g de soporte.

Para complementar las observaciones obtenidas a partir de las medidas de actividad y concentración proteica de las distintas fracciones de la inmovilización, se llevó a cabo un análisis por electroforesis SDS-PAGE de las mismas (Figura 60). Asimismo, se llevó a cabo un ensayo de desorción de la enzima de las superficies de las SiNPsTAFE, incubándolas en presencia de imidazol. El sobrenadante obtenido fue también analizado por SDS-PAGE. Este ensayo permitió estudiar más en profundidad la naturaleza de la interacción entre las SiNPsTAFE y la enzima.

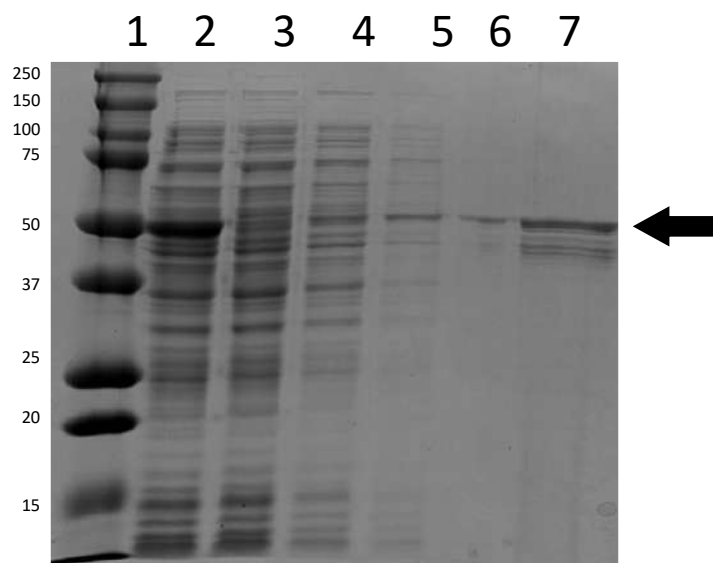


Figura 60. Análisis por SDS-PAGE utilizando un gel al 12% de la inmovilización de PfATA en la superficie de SiNPsTAFE. 1: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (#1610374) (*Bio-Rad*). 2: Aplicado. 3: Sobrenadante de inmovilización. 4: Lavado 1. 5: Lavado 2. 6: Lavado 3. 7: Eluido SiNPsTAFE luego de incubar 16 h en tampón HEPES 50 mM, pH 8,0 + PLP 0,1 mM + imidazol 500 mM, 24 °C. La flecha indica la altura esperada para la banda correspondiente a los monómeros de PfATA (~53 kDa).

La presencia de la enzima PfATA es evidenciable en un gel de este tipo por la observación de una única banda de sobreexpresión con un peso de ~53 kDa, que se corresponde con el peso esperado para los monómeros que la componen⁴⁰⁵. La muestra correspondiente al sobrenadante de inmovilización (Figura 60, carril 3) presentó una disminución notoria en la banda asociada la PfATA con respecto al aplicado (Figura 60, carril 2), mientras que la intensidad del resto de las bandas pareció conservarse. Las muestras pertenecientes a los lavados también mostraron la presencia de cantidades discretas de PfATA (Figura 60, carriles 4 y 5). Por su parte, la muestra correspondiente al eluido de las SiNPsTAFE (Figura 60, carril 7) demostró que la unión de la enzima a las nanopartículas es específica. La presencia de una sola banda principal de un peso cercano a los 53 kDa parece indicar que la principal interacción que gobierna la unión entre la enzima y la superficie de la nanopartícula es a través de las colas de histidina presentes en la primera. Estos resultados fueron consistentes con aquellos de las medidas de actividad y concentración proteica.

Los resultados obtenidos hasta esta etapa demuestran que la metodología de inmovilización desarrollada es una alternativa atractiva para la inmovilización de enzimas con colas de histidina, como en el caso de la PfATA. La matriz obtenida puede ser sintetizada *de novo* en el laboratorio de forma sencilla y rápida. A su vez, permite llevar a cabo los procedimientos de inmovilización y purificación en un solo paso, en tiempos cortos. El derivado obtenido se demostró activo, por lo que fue ensayado para la producción de compuestos aminados desde glicerol y EGE en una cascada biocatalítica en combinación con Gox. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Utilización del derivado PfATA@SiNPsTAFE para la obtención de productos aminados utilizando cascadas biocatalíticas en formato 2-Pot

Como ya fue mencionado en la introducción de este capítulo, en un trabajo anterior del grupo de trabajo se probó la capacidad de obtener el producto aminado serinol a partir de una cascada artificial que combina una oxidación del glicerol por Gox, seguida de una aminación reductiva de la DHA obtenida previamente para producir el compuesto objetivo utilizando la PfATA⁵⁸. Este segundo paso de la cascada procede en presencia de L-Alanina como donante de amino, generando piruvato como coproducto (Esquema 25a). En base a estos resultados y los obtenidos en el Capítulo 1 de este trabajo de tesis, se decidió estudiar si el producto de oxidación del EGE, la EHA, podía ser aminado por la enzima PfATA para dar lugar a su correspondiente amina quiral (2A3EP) en una cascada semejante. En particular, se buscó utilizar el derivado PfATA@SiNPsTAFE en combinación con Gox, en una cascada de tipo 2-Pot.

Para verificar la factibilidad de la aminación de la EHA utilizando esta enzima, se realizó un ensayo preliminar partiendo del sustrato obtenido por síntesis química, empleando una fracción purificada de PfATA soluble como catalizador. La mezcla de reacción incluyó además el cofactor PLP y L-alanina como donador del grupo amino. Las muestras recogidas al inicio y al final de la reacción se analizaron mediante GC-FID. Dado que no se disponía de un estándar de 2A3EP, el tiempo de retención del compuesto no era conocido, lo que obligó a realizar un análisis exhaustivo de los distintos picos presentes en los cromatogramas para evidenciar su formación.

Es importante señalar que, tanto en este análisis como en los subsecuentes, no se tomaron en cuenta los picos con tiempos de retención de 4,6 y 12,3 minutos, ya que aparecían consistentemente en todas las corridas y fueron considerados artefactos. Además, todas las reacciones llevadas a cabo en tampón HEPES 100 mM, pH 8,0, con PLP 0,1 mM y L-alanina 0,5 M, presentaron un pico no identificado con un tiempo de retención de 6,1 minutos, posiblemente atribuible a algún componente del medio de reacción. Por este motivo, dicho pico tampoco fue considerado en los análisis cromatográficos posteriores.

El sobrenadante de la reacción de aminación de la EHA por PfATA soluble demostró la disminución del pico correspondiente al sustrato luego de 48 h de reacción, con tiempo de retención 6,7 min (Figura 61). Este fenómeno se vio acompañado por la aparición de dos picos a los 11,6 min y 12,1 min que potencialmente podían corresponder al producto de la aminación reductiva de la EHA. El primer pico (11,6 min) está presente tanto en la muestra correspondiente al tiempo inicial (Figura 61, cromatograma color rojo) como en la de tiempo final, mientras que el segundo (12,1 min) solamente se observa en el cromatograma del tiempo final (Figura 61, cromatograma color azul). Sin embargo, cabe destacar que debido a que la muestra correspondiente al tiempo inicial de reacción se tomó luego de poner en contacto el sustrato con la enzima, es posible que se pueda observar una señal del producto esperado en esta muestra. Se observa además un pico con un tiempo de retención de 10,2

min que se corresponde con el glicerol. Dado que la EHA utilizada en esta oportunidad fue obtenida por síntesis química, la presencia de glicerol se debe a que el mismo fue el material de partida de la reacción.

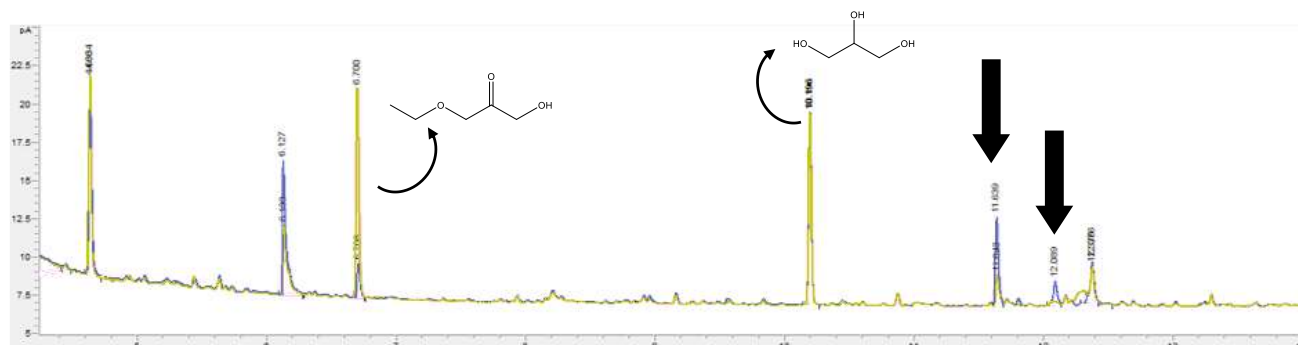


Figura 61. Cromatogramas correspondientes a la reacción de aminación reductiva del sustrato EHA por PfATA libre. Tiempo inicial (cromatograma verde). Tiempo final, 48 h (cromatograma violeta). Se indican con flechas los dos picos que potencialmente podrían corresponder al producto aminado 2A3EP. EHA ($T_{Ret} = 6,7$ min), Glicerol ($T_{Ret} = 10,2$ min).

Dado que se contaba con un estándar de EHA, se llevó a cabo la cuantificación del sustrato en ambas muestras analizadas para determinar el consumo del mismo por parte de la enzima (Figura 62). De los $20,14 \pm 0,17$ mM de sustrato que inicialmente se encontraban en la reacción, solo $4,59 \pm 1,72$ fueron recuperados luego de 48 h. Esto implicaría una potencial conversión del 77,2% sustrato durante la reacción.

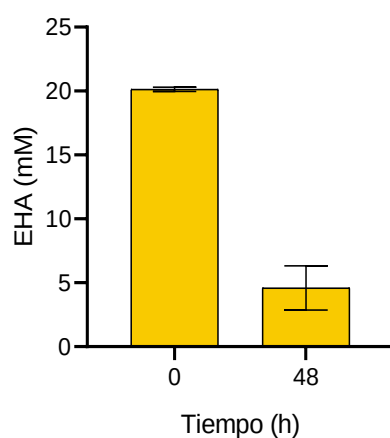


Figura 62. Consumo del sustrato EHA durante la reacción de aminación reductiva utilizando PfATA soluble como catalizador.

La reducción del pico del sustrato y la aparición de dos picos nuevos fueron resultados alentadores en esta primera aproximación. En base a esto, se decidió llevar a cabo un nuevo experimento para la obtención del compuesto aminado 2A3EP, pero utilizando el derivado PfATA@SiNPstAFe como catalizador (Figura 63). La EHA utilizada fue obtenida a partir de la oxidación de EGE por Gox, por lo que el experimento correspondió a la cascada artificial en formato 2-Pot propuesta al inicio de esta sección (Esquema 25).

Asimismo, se llevó a cabo en paralelo una reacción de aminación reductiva de DHA, también producida por oxidación de glicerol por Gox, para la obtención de serinol utilizando PfATA@SiNPsTAFE. Como se mencionó con anterioridad, distintas versiones de esta cascada artificial fueron previamente reportadas con éxito por nuestro grupo de investigación⁵⁸, aunque en este caso el catalizador enzimático utilizado fue sintetizado por primera vez durante este trabajo de Tesis. Cada reacción contó además con un control en el que no se agregó catalizador.

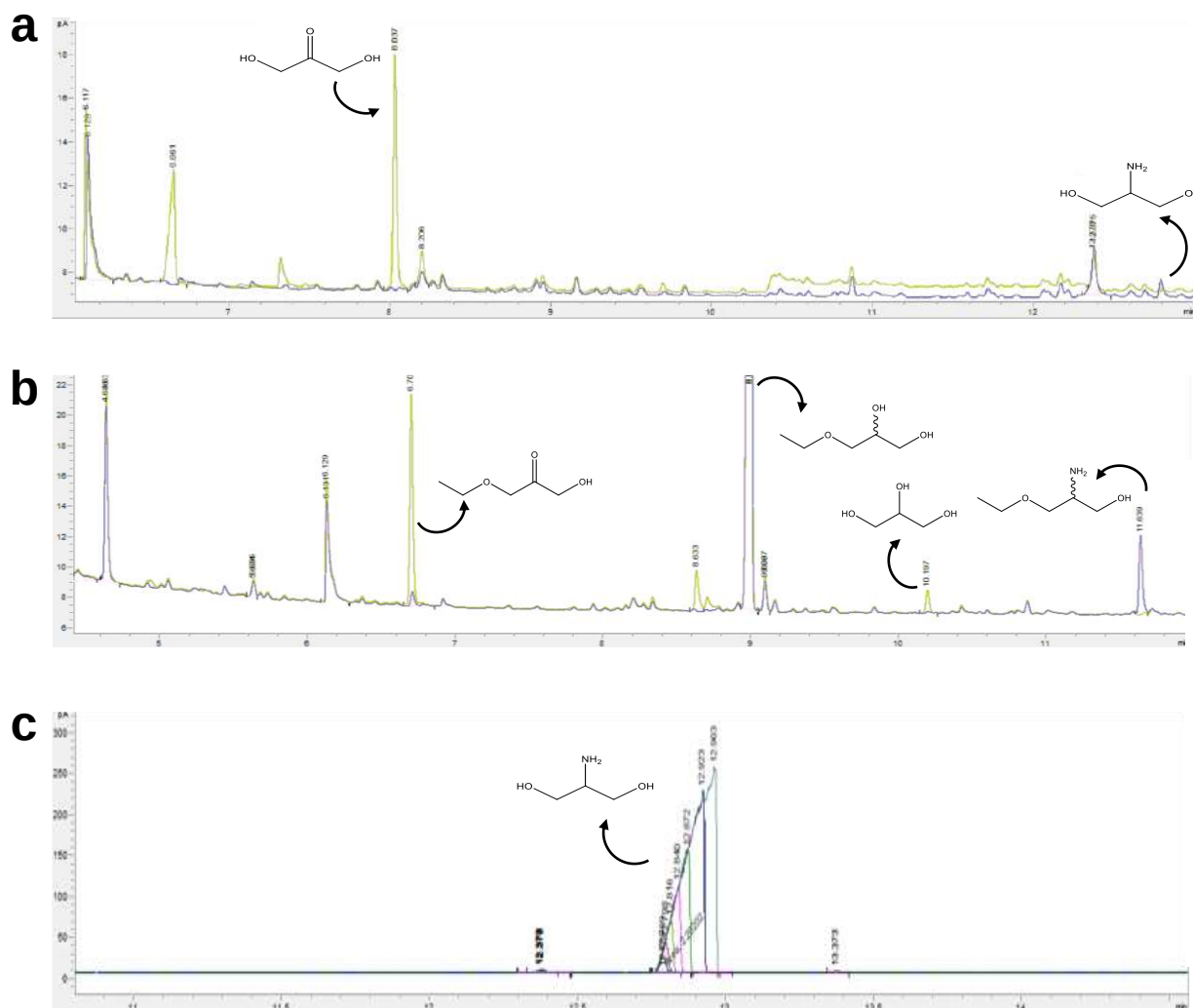


Figura 63. Análisis por GC-FID de reacciones de aminación reductiva de DHA y EHA utilizando PfATA@SiNPsTAFE. Los sustratos fueron obtenidos a partir de la oxidación de glicerol y EGE por células en reposo de Gox. Tiempo inicial (cromatograma verde). Tiempo final, 48 h (cromatograma violeta). a) Aminación reductiva de DHA. b) Aminación reductiva de EHA. c) Estándares de serinol con concentraciones que cubren el rango 4,2 mM a 548,8 mM. Glicerol ($T_{Ret} = 10,2$ min). DHA ($T_{Ret} = 8,0$ min). Serinol ($T_{Ret} = 12,8$ min). EGE ($T_{Ret} = 9,0$ min). EHA ($T_{Ret} = 6,7$ min). 2A3EP ($T_{Ret} = 11,6$ min).

Luego de 48 h de reacción se logró detectar por GC-FID picos consistentes con la formación de serinol (Figura 63a) y 2A3EP (Figura 63b). Cabe destacar que durante estos experimentos, y a diferencia del experimento anterior empleando enzima soluble, la muestra de tiempo inicial de reacción se tomó previo a mezclar el sustrato con el

derivado PfATA@SiNPsTAFE. Por esta razón, la aparición de picos nuevos que no se presenten en la muestra de tiempo inicial pueden ser adjudicados a la acción del catalizador.

Para el caso de la producción de serinol, el análisis de un estándar del compuesto por GC-FID (Figura 63c) permitió determinar su tiempo de retención (12,7 min a 12,9 min, dependiendo de la concentración), que es consistente con el tiempo de retención obtenido para el nuevo pico que aparece en el cromatograma correspondiente al tiempo final de la reacción (12,8 min). Interesantemente, se observó en el cromatograma del tiempo inicial de la reacción un pico no determinado con un tiempo de retención de 6,6 min que no se encuentra presente en el cromatograma correspondiente al final de la reacción.

Para el caso de la producción de 2A3EP, producto de la aminación de la EHA, se puede observar el pico correspondiente al sustrato (6,7 min), acompañado de un pico a los 9,0 min que se corresponde con la presencia del remanente de EGE que no fue oxidado por Gox en el primer paso de la cascada (Figura 63b). Se puede observar además un pico a los 10,2 min que se corresponde con trazas de glicerol, provenientes de la síntesis química del EGE. Analizando las diferencias entre los cromatogramas correspondientes al tiempo inicial y final de la reacción, se observa un pico a los 8,6 min que no pudo ser identificado y solo se observa al comienzo de la reacción. Además, se evidencia la aparición de un nuevo pico con un tiempo de retención de 11,6 min que coincide con el tiempo de retención de uno de los posibles productos obtenidos en el experimento anterior realizado con la enzima soluble (Figura 61). Dado que en este caso la muestra de tiempo inicial fue tomada antes de que la enzima y el sustrato interactúen, se puede observar como el pico se encuentra ausente durante el tiempo inicial y aparece luego de 48 h en la muestra de tiempo final. Esto implica que es posible que dicho pico se corresponda con la formación de 2A3EP, sin embargo, la técnica de GC-FID no permite identificar la molécula. Por esta razón, para confirmar la identidad del producto obtenido, se llevó a cabo un análisis por GC-MS (Figura 64). El análisis del espectro de masas obtenido para el pico del producto observado presentó señales que son consistentes con la molécula esperada 2A3EP, confirmando la capacidad del catalizador PfATA@SiNPsTAFE para aminorar la EHA producida por Gox en la cascada 2-Pot planteada.

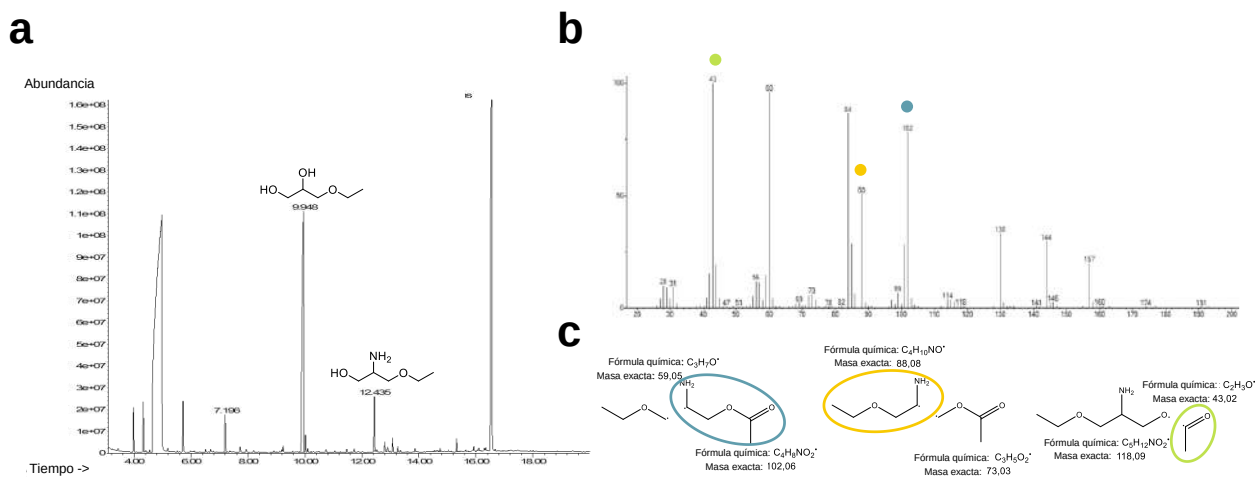


Figura 64. Análisis por GC-MS de una muestra obtenida a las 48 h de la reacción de aminación reductiva de EHA utilizando PfATA@SiNPstAFé. a) Cromatograma obtenido. b) Espectro de masas del pico correspondiente a 2A3EP. c) Estructuras correspondientes a los iones que permitieron su identificación.

Una vez establecida la capacidad del derivado PfATA@SiNPstAFé para aminorar tanto la DHA como la EHA, se llevó a cabo la cuantificación de sustratos y productos obtenidos durante las reacciones, con la finalidad de establecer los porcentajes de conversión alcanzados en cada caso (Figura 65). Para el caso de la aminación reductiva de la DHA, se observó que el medio inicial de la reacción estaba libre de glicerol, ya que este fue completamente oxidado por Gox en el paso previo de la cascada. Inicialmente, tanto en la reacción como en el control sin catalizador, se partió de una concentración de DHA de $20,9 \pm 1,3$ mM (Figura 65a y b). Luego de 48 h en presencia del derivado PfATA@SiNPstAFé se observó una desaparición de la totalidad de la DHA, y la aparición de $2,0 \pm 0,1$ mM de serinol. El balance de masas de la reacción obtenida no es el esperado, ya que cada mol de DHA debería ser transformado en un mol de serinol, cuando en realidad se observó una conversión del 10%. En el control sin catalizador también se observó una reducción de la cantidad inicial de sustrato, que pasó de $20,9 \pm 1,3$ mM a $13,7 \pm 3,2$ mM. Esto quiere decir que en las condiciones del experimento, un 34,8% del sustrato deja de ser detectable luego de 48 h sin intervención del catalizador.

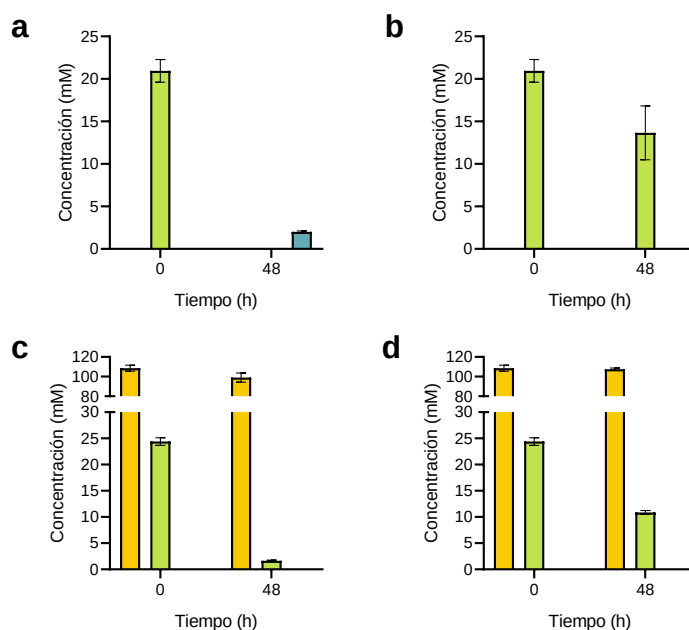


Figura 65. Aminación reductiva de los sustratos DHA y EHA utilizando PfATA@SiNPsTAFE. Los sustratos fueron obtenidos en un paso previo, a partir de la oxidación de glicerol y EGE por células en reposo de Gox (Capítulo 1). a) Reacción de aminación reductiva de DHA. b) Control de reacción de aminación reductiva de DHA, sin catalizador. c) Reacción de aminación reductiva de EHA. d) Control de reacción de aminación reductiva de EHA, sin catalizador. Alcohol (glicerol o EGE) (amarillo). Cetona (DHA o EHA) (verde). Serinol (azul). La producción de 2A3EP no se muestra ya que no se contaba con un estándar para cuantificarla.

Este fenómeno puede estar ligado a la estabilidad de la DHA en las condiciones de reacción, ya que está reportado que la DHA es más estable a valores menores a pH 5,0⁴⁴⁶, mientras que la reacción de aminación reductiva fue llevada a cabo a pH 8,0. Asimismo, se sabe que la DHA es capaz de reaccionar con los aminoácidos a través de la conocida reacción de Maillard para formar melanoidinas. En una serie de trabajos recientes, Sun *et al.* estudiaron la reacción de la DHA con diversos aminoácidos, entre ellos la alanina, en distintas condiciones de reacción^{447–449}. En estos ensayos se observó formación de color a diversos pH entre 4,4 y 7,4. Adicionalmente, el mismo grupo reportó en un trabajo de Zhang *et al.* el teñido de lana, que constituye una fibra natural proteica, a través de la reacción de Maillard por el agregado de DHA⁴⁵⁰. En este trabajo, se ensayaron valores de pH entre 5,5 y 8,5, obteniendo buenos resultados en las condiciones más alcalinas. En base a estos reportes, es posible que parte de la DHA haya reaccionado con la alanina presente en la mezcla reactiva. De todas formas, durante la reacción catalizada hay una desaparición completa del sustrato, que no es equivalente a la disminución observada en el control, sumada a la conversión al producto serinol. Esto indicaría que el agregado del catalizador puede también afectar la concentración de DHA, por ejemplo a través de su retención en la matriz. De hecho, los grupos aminos de la PEI que compone el core de sílica de las SiNPsTAFE podrían formar bases de Schiff con los carbonilos de la DHA, reacción que se ve favorecida a pH ligeramente básico como el que se llevó a cabo la reacción. Asimismo, tanto la L-Alanina como los potenciales productos secundarios de la reacción de Maillard podrían reaccionar con el serinol, causando una disminución en la concentración obtenida. Futuros experimentos deberán centrarse en

esclarecer este fenómeno, pudiendo determinar correctamente los destinos de la DHA y el serinol en el sistema planteado. Cabe destacar además que en esta oportunidad no fue monitoreada la aparición de piruvato en la reacción. Dado que el mismo se obtiene en cantidades equimolares con respecto al serinol, llevar a cabo una cuantificación del mismo en el futuro podría ayudar a esclarecer los balances de masa, proporcionando una visión más completa del comportamiento del sistema.

La aminación de la EHA, por otro lado, se llevó a cabo exitosamente en presencia de EGE, dado que en este caso la oxidación previa de dicho compuesto por Gox no fue completa (Figura 65c). Como se mencionó anteriormente, se pudo determinar la concentración de EHA mediante una curva de calibración obtenida con un estándar sintético del compuesto (Figura A2e). Sin embargo, no se disponía de un estándar para la amina 2A3EP, por lo que no fue posible realizar una estimación precisa de la concentración de dicho producto. El análisis de la concentración del sustrato muestra que, comenzando con una concentración inicial de $24,4 \pm 0,7$ mM, después de 48 horas de reacción se detectó un remanente de $1,7 \pm 0,1$ mM. Esto indica un consumo del 93% de la EHA, que sugeriría una formación aproximada de 22 mM de 2A3EP. Sin embargo, la similitud estructural de la molécula de EHA con la de DHA es tal, que es factible que esta primera también pueda reaccionar tanto con la L-Alanina como con la PEI presente en las SiNPsTAFE, generando una disminución aparente del sustrato que no se vea acompañado con la formación de producto. De hecho, los resultados obtenidos para el control sin catalizador respaldan esta hipótesis, donde de los $24,4 \pm 0,7$ mM de EHA iniciales, se recuperaron solamente $10,8 \pm 0,4$ mM después de 48 horas (Figura 65d). Esto implica que el 55% de la EHA dejó de ser detectable al final del experimento en ausencia del derivado enzimático, indicando la ocurrencia de posibles reacciones secundarias que requerirán de experimentos adicionales para su identificación. Nuevamente, el monitoreo de la producción de piruvato en el futuro podría aportar información valiosa que permita estimar con mayor certeza la cantidad de amina formada.

Los resultados obtenidos durante esta etapa no solo demuestran la potencialidad de la enzima PfATA de aminorar el compuesto EHA, reacción para la que a lo mejor de nuestro conocimiento no se encontraron precedentes en la literatura, sino que también indican la posibilidad de utilizar el derivado PfATA@SiNPsTAFE para dicha reacción. A su vez, el derivado pudo ser también utilizado para la aminación reductiva de la DHA, complementando los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo de investigación⁵⁸. Se destaca además, la capacidad del derivado de trabajar con sustratos obtenidos a partir de la oxidación de EGE y glicerol por Gox. Sin embargo, la existencia de potenciales reacciones secundarias entre los sustratos DHA y EHA con la L-Alanina, o sus posibles interacciones con la matriz de SiNPsTAFE parecen limitar los rendimientos de las reacciones de aminación reductiva. Futuros esfuerzos deberán centrarse en confirmar la existencia de estas reacciones y en tal caso encontrar condiciones operativas en las que se pueda disminuir su ocurrencia, sin perjudicar los rendimientos productivos.

Cascada en formato *1-Pot* para la preparación de serinol a partir de glicerol utilizando esporas artificiales de Gox con PfATA inmovilizada en su superficie

La posibilidad de obtención de serinol desde glicerol en una cascada en formato *1-Pot* ya había sido establecida por nuestro grupo de investigación anteriormente⁵⁸. En ese trabajo previo se combinó en una misma esfera de alginato un derivado inmovilizado de PfATA basado en un soporte comercial de agarosa-IDA-Co²⁺ con Gox, resultando en un catalizador híbrido capaz de producir el compuesto aminado. Sin embargo, a pesar de poder utilizar dicha preparación exitosamente con glicerol puro y crudo, y presentando a su vez cierta reusabilidad, la aparición de problemas difusionales y de estabilidad operacional relacionados al alginato limitaron los rendimientos obtenidos.

La inmovilización de enzimas en la superficie de las bacterias aparece como una estrategia interesante que potencialmente permite disminuir la ocurrencia de restricciones difusionales, a la vez que otorga una amplia área superficial para la inmovilización. Es por esta razón que la generación de una variante recubierta de Gox capaz de unir PfATA en su superficie podría permitir la obtención de altas productividades de serinol. Capitalizando sobre los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta Tesis, en donde se generaron esporas artificiales de Gox (GoxTAFE) con la capacidad de unir enzimas con colas de histidina en su superficie, se procedió a generar un nuevo catalizador híbrido para la obtención de serinol en formato *1-Pot* (PfATA@GoxTAFE).

Inmovilización de PfATA en la superficie de esporas artificiales de Gox (GoxTAFE)

Se llevó a cabo la inmovilización de la enzima PfATA en la superficie de las bacterias recubiertas con el polímero TAFE, obtenidas utilizando el protocolo descrito en el capítulo anterior de esta Tesis. El procedimiento de inmovilización de la enzima en las esporas artificiales fue análogo al utilizado para su inmovilización en la matriz SiNPsTAFE. Se ofrecieron un total de 45,59 UI de la enzima a 2 mg de GoxTAFE, y se incubó la suspensión por 1 h a 4 °C en agitación. Al finalizar el procedimiento de inmovilización se logró retener un total de 1,10 UI, lo que se correspondió con una actividad de 0,55 UI/mg de bacteria. Se obtuvo un porcentaje de inmovilización del 26,39%, acompañado de un rendimiento del 8,70% (Tabla 25). Del análisis de las distintas fracciones de inmovilización se observa que la mayoría de la actividad ofrecida se encontró en el sobrenadante. Esto puede deberse a que el tiempo de inmovilización no haya sido el suficiente o alternativamente, la superficie de inmovilización provista por la cantidad de GoxTAFE utilizada no fue suficiente para inmovilizar la totalidad de las enzimas. En cuanto al rendimiento de la inmovilización, se observó una disminución en la actividad expresada en comparación con la actividad teórica esperada, un comportamiento similar al registrado al emplear las SiNPsTAFE como matriz. Nuevamente, este efecto puede estar asociado principalmente con fenómenos de *crowding* o con efectos de inactivación de la enzima.

Tabla 25. Estudio de la inmovilización de PfATA en la superficie de GoxTAFE para generar el catalizador híbrido PfATA@GoxTAFE.

Fracción	Actividad (UI/mL)	Volumen (mL)	Act. Total (UI)	Conc. proteica (mg/mL)	Proteína total (mg)	Act. Específica (UI/mg)	Inmovilización (%) ^a	Rendimiento (%) ^b
Aplicado	11,4 ± 1,0	4,00	45,59	8,54 ± 0,01	34,15	1,33	-	-
Sobrenadante	8,22 ± 0,50	4,00	32,89	7,28 ± 0,08	29,11	1,12	-	-
Lavado 1	0,62 ± 0,03	1,00	0,62	0,47 ± 0,04	0,47	1,32	-	-
Lavado 2	0,03 ± 0,02	1,00	0,03	0,06 ± 0,02	0,06	0,50	-	-
Lavado 3	0,01 ± 0,00	2,00	0,02	0,03 ± 0,01	0,06	0,33	-	-
PfATA@GoxTAFE (2 mg/mL)	1,10 ± 0,09	1,00	1,10	-	-	-	26,39	8,70

^a Inmovilización: ((Act. total ofrecida – Act. total SBN – Act. Total Lavados)/Act. total ofrecida) . 100

^b Rendimiento: (Act. Total recuperada en preparado)/ Act. total ofrecida – Act. total SBN – Act. Total Lavados) . 100

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la inmovilización demostró que, en concordancia con las medidas de actividad realizadas, una cantidad significativa de la enzima resultó en el sobrenadante (Figura 66, carril 3) y en el primer lavado (Figura 66, carril 4). Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos a partir de las medidas de actividad y de concentración proteica.

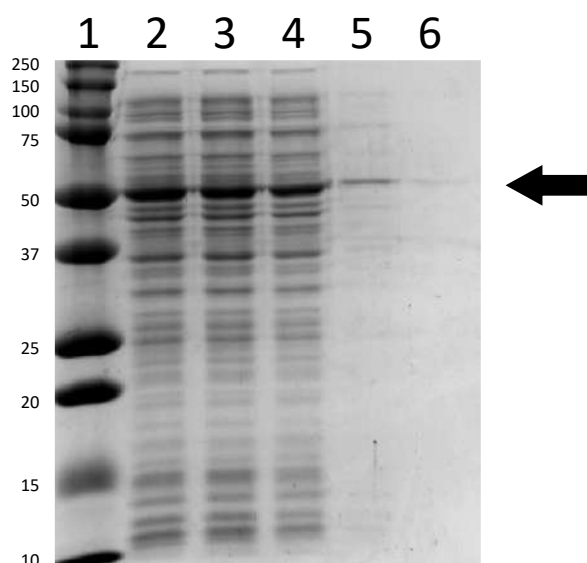


Figura 66. Análisis por SDS-PAGE en un gel al 12% de la inmovilización de PfATA en la superficie de GoxTAFE. 1: Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (#1610374) (*Bio-Rad*). 2: Aplicado (dilución 1/10). 3: Sobrenadante de inmovilización (dilución 1/10). 4: Lavado 1 (sin diluir). 5: Lavado 2 (sin diluir). 6: Lavado 3 (sin diluir). La flecha indica la altura esperada para la banda correspondiente a los monómeros de PfATA (~53 kDa).

Los resultados obtenidos durante esta etapa confirman la posibilidad de obtener preparados híbridos activos de PfATA@GoxTAFE. No obstante, el protocolo de inmovilización aún ofrece margen para su optimización. De todos

modos, dado que esta fue una primera aproximación a la obtención de estos preparados, se decidió ensayar su capacidad de conversión de glicerol a serinol en formato *1-Pot*.

Utilización del preparado híbrido PfATA@GoxTAF_e para la obtención de serinol utilizando una cascada biocatalítica en formato *1-Pot*

Se partió de 500 mM de glicerol (~50 g/L), en un tampón de reacción HEPES 100 mM, pH 8,0 suplementado con L-alanina 0,5 M y PLP 0,1 mM, la reacción se llevó a cabo en un matraz de 25 mL con 3 mL de medio de reacción.

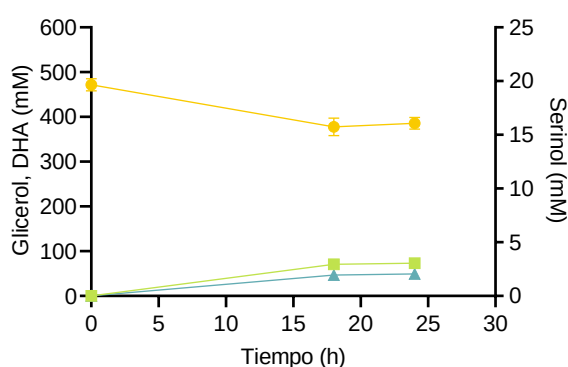


Figura 67. Reacción de producción de serinol con PfATA@GoxTAF_e como catalizador. El medio de reacción fue HEPES 100 mM, pH 8,0 + Glicerol 500 mM, L-Alanina 0,5 M + PLP 0,1 mM. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y 200 rpm. Glicerol (amarillo). DHA (verde). Serinol (azul).

En las condiciones del experimento, el catalizador híbrido PfATA@GoxTAF_e presentó una producción de DHA de $73,49 \pm 6,11$ mM luego de 24 h, acompañada de una producción de serinol de $1,97 \pm 0,21$ mM (Figura 67). La concentración de serinol obtenida en esta primera aproximación fue discreta en comparación a la obtenida anteriormente con el sistema basado en alginato y microesferas de agarosa, en el que se obtuvieron 36 mM del compuesto⁵⁸. Sin embargo, el valor de los resultados obtenidos con esta técnica radica en lo novedoso de la aproximación, donde se utilizó una estrategia sin precedentes en la literatura para la combinación de los biocatalizadores PfATA y Gox. Futuros experimentos deberán centrarse en poner a punto el protocolo de inmovilización de la enzima, potencialmente ajustando la cantidad de esporas artificiales ofrecidas como soporte. En la misma línea, se deberá estudiar el efecto de parámetros clave en la reacción como distintas concentraciones de glicerol inicial y de distintas concentraciones del catalizador híbrido PfATA@GoxTAF_e.

4.4. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en este capítulo han proporcionado nuevas estrategias para la inmovilización de la enzima PfATA, complementando los enfoques previos del grupo de investigación. Se han desarrollado dos técnicas innovadoras: la inmovilización de PfATA en nanopartículas de sílica funcionalizadas con un polímero de TA y hierro (SiNPSTaFe) y en esporas artificiales de Gox generadas a partir del mismo polímero (GoxTAFE). Ambas metodologías han facilitado la implementación de cascadas artificiales entre Gox y PfATA, con el objetivo de obtener moléculas aminadas.

La combinación de SiNPs con TA para la inmovilización enzimática ya había sido reportada en la literatura, pero a través de la preparación de nanopartículas utilizando el TA como molde, formando parte del núcleo de la nanopartícula y permitiendo la inmovilización de enzimas principalmente por adsorción. En este trabajo, se propuso un enfoque innovador, donde las SiNPs fueron sintetizadas y luego recubiertas con un polímero de TAFE, lo que permitió la inmovilización de enzimas con colas de histidina en la superficie de las nanopartículas obtenidas (SiNPSTaFe). Tanto la síntesis del material de partida, como el procedimiento de recubrimiento para obtener las SiNPSTaFe fueron sencillos y rápidos. La caracterización de este material, realizada mediante microscopía STEM-HAADF y STEM-EDX, confirmó su morfología y composición, mientras que la presencia del polímero en la superficie fue validada a través de FTIR y XPS. Además, se evaluaron el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas mediante DLS y potencial zeta.

La inmovilización de PfATA sobre las SiNPSTaFe resultó en buenos rendimientos, a través de una metodología simple que no requirió largos tiempos de incubación. Esta estrategia aprovecha las colas de histidina para formar enlaces de coordinación con el hierro presente en el polímero, permitiendo la inmovilización y purificación de la enzima en un solo paso. De esta manera, se trabajó directamente con el extracto crudo de la enzima, eliminando etapas adicionales de purificación y reduciendo significativamente los tiempos de preparación del biocatalizador.

Los preparados de PfATA@SiNPSTaFe demostraron ser funcionales y se utilizaron con éxito en una cascada 2-Pot, combinando la acción de Gox y el derivado enzimático para sintetizar los compuestos aminados serinol y 2A3EP, a partir de glicerol y EGE, respectivamente. La identidad de ambos productos fue confirmada mediante GC-MS. Aunque la síntesis de serinol a partir de glicerol ya había sido reportada por nuestro grupo en configuraciones anteriores de cascadas con Gox y PfATA, este es el primer informe sobre la síntesis de 2A3EP utilizando esta combinación de catalizadores.

La estrategia de inmovilización desarrollada es versátil y puede aplicarse a otras enzimas que posean colas de histidina, lo que la convierte en una opción adaptable para futuras aplicaciones en biocatálisis.

Además, se logró implementar una cascada *1-Pot* para la síntesis de serinol, utilizando esporas artificiales de Gox recubiertas con el polímero TAFE (GoxTAFE), con PfATA inmovilizada en su superficie. Este es el primer reporte de la combinación de Gox con una enzima exógena inmovilizada en su superficie para llevar a cabo una cascada biocatalítica. Aunque los resultados obtenidos en esta configuración no superaron los resultados previos en la síntesis *1-Pot* de serinol por nuestro grupo, se identificaron áreas clave para mejorar el rendimiento del catalizador híbrido que serán exploradas en futuros trabajos.

En conclusión, las técnicas de inmovilización desarrolladas han representado un avance significativo para la inmovilización de PfATA, facilitando la obtención de moléculas aminadas mediante su acción combinada con Gox en distintos tipos de cascadas biocatalíticas. Las metodologías propuestas tienen el potencial de ser extrapoladas a otros microorganismos y reacciones, posicionando este trabajo como un punto de partida para futuras investigaciones en biocatálisis y la mejora de procesos industriales.

Perspectivas futuras

Perspectivas futuras

En esta sección de la Tesis Doctoral se discutirán las brechas de conocimiento y los desafíos que han surgido en el estudio de la preparación de nuevos biocatalizadores basados en *Gluconobacter*. También se propondrán alternativas para superar algunas de las limitaciones encontradas durante el desarrollo de la Tesis. Además, se sugerirán potenciales líneas de investigación para avanzar en el entendimiento de *Gluconobacter* como herramienta biotecnológica.

Modificación de la expresión génica de *Gluconobacter*

La Introducción General de esta Tesis ha abordado de manera profunda la importancia y el interés de *Gluconobacter* como biocatalizador industrial. Sus ventajas como tal alientan a continuar explorando su potencial, que indudablemente puede ser capitalizado mediante estrategias de modificación génica.

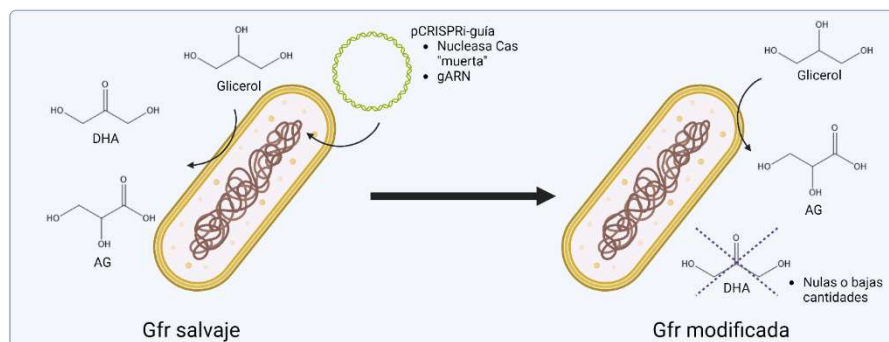
Como fue mencionado anteriormente, el constante desarrollo de nuevas tecnologías basadas en CRISPR ha permitido modificar genomas bacterianos de manera precisa y eficiente, lo que posibilita la afinación de la expresión génica y la consecuente generación de biocatalizadores de célula entera verdaderamente vanguardistas. Cada tecnología basada en CRISPR ofrece ventajas únicas y presenta desafíos distintivos²². Al comprender las complejidades de cada herramienta, los investigadores pueden tomar decisiones informadas al seleccionar el método más adecuado para sus especies bacterianas específicas y aplicaciones biocatalíticas.

Tras el análisis de ejemplos relevantes de herramientas CRISPR aplicadas para mejorar la biocatálisis bacteriana, la técnica CRISPRi surge como una de las tecnologías más prometedoras. Dado que el enfoque seguido en esta Tesis para la modificación genómica de *Gluconobacter* con herramientas de CRISPR resultó desafiante, nos planteamos la posibilidad de abordarlo mediante esta tecnología particular. A continuación, se muestran los avances obtenidos en este sentido.

Modificación de la expresión génica en *Gfr* utilizando una tecnología basada en CRISPRi

Como se mencionó previamente en la introducción del Capítulo 2 de esta Tesis, la modificación de la expresión génica utilizando CRISPRi es una alternativa interesante, y en ocasiones más sencilla, a la modificación genómica permanente utilizando CRISPR. Esto se debe a que la técnica solo requiere de la expresión de una nucleasa dCas y una guía que se encargará de dirigir a esta primera a una región específica del genoma del huésped, bloqueando la expresión de un gen objetivo. Esta estrategia prescinde de moldes de reparación y eventos de recombinación homóloga, ya que no se generan cortes en el ADN que deban ser reparados. Por el contrario, el efecto sobre el fenotipo se reduce a un impedimento estérico generado por la presencia de la nucleasa dCas en una región del genoma que impide el correcto funcionamiento de la maquinaria de transcripción sobre un gen en particular.

Esta estrategia, por sus características, podría ser una alternativa a la propuesta inicialmente en esta Tesis, para la que se encontraron una serie de limitaciones. En este caso, a través del uso de una dCas se podría llevar a cabo el silenciamiento del gen *sldBA*, lo que llevaría a una menor producción de la enzima mPDHP por parte de Gfr y una potencial reducción en la producción de DHA a partir de glicerol (Esquema 27).



Esquema 27. Estrategia para el silenciamiento del gen *sldBA* en Gfr utilizando la tecnología CRISPRi. La introducción del plásmido pCRISPRi-guía permitiría la expresión de una nucleasa Cas “muerta” que se ubicaría en el ADN de la bacteria impidiendo la transcripción del gen objetivo. El resultado sería un mutante con la capacidad de producir AG a partir de glicerol, con nula o mínima producción de DHA.

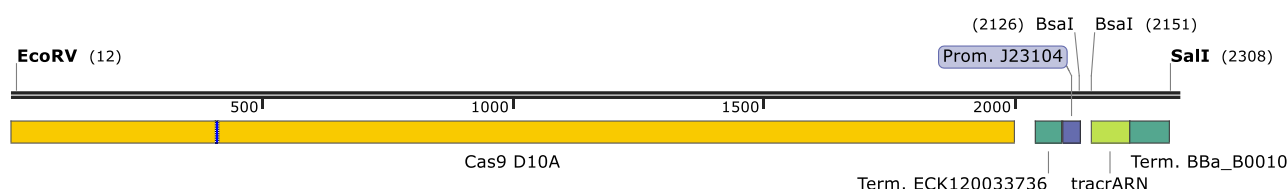
Existen algunos ejemplos en la literatura de la modulación de la expresión génica en acetobacterias utilizando CRISPRi, dos de los cuales se enfocan en bacterias del género *Gluconobacter*. En uno de ellos, los autores adaptaron un sistema endógeno del tipo I-E en *G. oxydans* WSH-003, cuya nucleasa Cas estaba naturalmente mutada y por ende sin la capacidad de generar cortes en el ADN. Gracias a esto, la sola expresión de las guías bastó para observar el efecto en la disminución de la expresión génica¹⁴⁸. Por su parte, en el segundo y más reciente ejemplo los autores utilizan la nucleasa Cpf1 en su forma salvaje, ya que se presenta inactiva al ser expresada en *G. oxydans* CGMCC 1.0110²⁹¹. A pesar de no presentar actividad nucleasa en el huésped, en el trabajo se comprobó que la misma se asocia con la guía y se dirige a la sección del ADN donde la misma presenta complementariedad, disminuyendo la expresión génica por impedimento estérico.

Entre las nucleasas catalíticamente inactivas disponibles, la más utilizada es la doble mutante de Cas9 (dCas9), en la que se combinan las mutaciones D10A y H840A, inactivando los dominios RuvC y HNH⁴⁵¹. Hasta el momento, esta nucleasa inactiva no ha sido expresada en *Gluconobacter* con la finalidad de modificar su expresión génica.

Utilizando como base el plásmido pCRISPR-guía, que contiene un cassette de expresión para la nickasa Cas9 D10A y sitios BsaI seguidos de una secuencia de tracrARN para el clonado y posterior expresión de guías, se puede desarrollar un plásmido con potencial aplicación en CRISPRi. Este objetivo se puede lograr modificando el cassette de expresión para la nickasa dCas9 D10A a través de la incorporación de la mutación H840A. De esta forma se podría obtener un nuevo plásmido (pCRISPRi-BsaI) que permitiría la expresión de dCas9. Ese plásmido luego podría ser modificado agregando distintas guías que permitan la regulación específica de ciertos genes, obteniendo un nuevo plásmido denominado pCRISPRi-guía.

Con el objetivo de explorar este nuevo enfoque de modificación génica de *Gluconobacter*, se planteó el diseño *in silico* y construcción del plásmido pCRISPRi-guía. La metodología implementada se detalla en la sección “Anexos”.

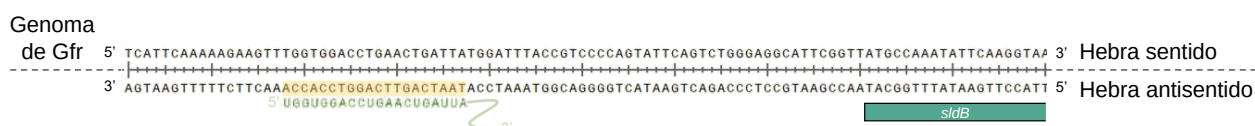
Para construir el plásmido pCRISPRi-BsaI se recurrió nuevamente a la obtención de una secuencia sintética que contuviese la mutación H840A. El diseño de esta secuencia se llevó a cabo teniendo en cuenta los sitios de restricción disponibles en el plásmido pCRISPR-BsaI. Se observó que cortando con las enzimas EcoRV y Sall se podía llevar a cabo la sustitución de la región final del cassette de expresión para la nickasa Cas9 D10A por un fragmento de ADN sintético que incluya la mutación H840A (Esquema 28). Asimismo, dado que el cassette de expresión para la guía también se encuentra comprendido en el sector del plásmido a escindir, se decidió modificar el promotor existente por el promotor J23104 debido a su comprobado funcionamiento en Gfr.



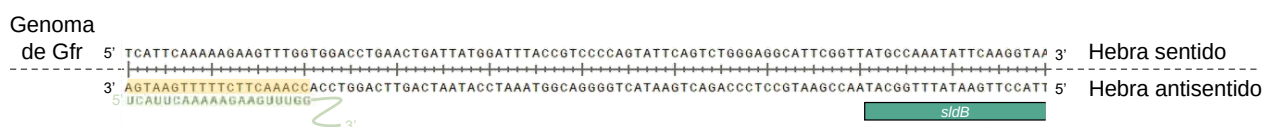
Esquema 28. Secuencia sintética diseñada conteniendo un fragmento del cassette de expresión de la nickasa Cas9 D10A y un cassette de expresión para sgARN. El fragmento del cassette de expresión para la nickasa incluye la mutación H840A (marcada en azul) y el terminador ECK120033736. El cassette de expresión para el sgARN contiene el promotor J23104 y el terminador BBa_B0010 flanqueando la secuencia codificante para el sgARN. Esta secuencia contiene dos sitios de corte para la enzima BsaI que permiten el clonado de distintas guías (crARN), seguido de la secuencia que codifica para el tracrARN. La secuencia sintética presenta en sus extremos 5' y 3' sitios de corte para las enzimas EcoRV y Sall, respectivamente, para su posterior clonado en el plásmido pCRISPR-BsaI para generar el plásmido pCRISPRi-BsaI. tracrARN: ARN transactivador.

En el diseño de estrategias de implementación para CRISPRi, es frecuente desarrollar múltiples guías para asegurar la eficacia del sistema^{452,453}. Esto se debe a que el posicionamiento del complejo dCas-gARN en el genoma impacta sensiblemente sobre el nivel de represión alcanzado. Las guías pueden ubicarse tanto en el promotor como en distintas secciones de la secuencia codificante⁴⁵⁴. En el trabajo reciente de Wang *et al.* anteriormente mencionado, en el que se implementó un sistema de CRISPRi en *G. oxydans* CGMCC 1.0110, se ensayaron guías que hibridaban en distintos sectores de un cassette de expresión para la proteína mCherry²⁹¹. Se observó que aquellas que presentaron mayor nivel de represión fueron aquellas que hibridaron a la altura del promotor, sobre la hebra antisentido. Tomando en consideración esta información, utilizando la herramienta en línea *CRISPR GEN Tools* (<http://www.rgenome.net/>) se diseñaron dos guías que hibridaran en los primeros 100 pb *upstream* del codón inicial del gen *sldB*, con la hebra antisentido (Esquema 29).

a



b



Esquema 29. Sitios de hibridación de las guías diseñadas para llevar a cabo el silenciamiento del gen *sldBA* por CRISPRi. a) Representación gráfica del sitio de hibridación de la guía 1 (G1). b) Representación gráfica del sitio de hibridación de la guía 2 (G2). En negro se observa el ADN genómico, en verde se observa el sgARN. La secuencia del crARN, que hibrida con el ADN de Gfr, se visualiza en letras. La secuencia del tracrARN se representa como una línea curva. sgARN: ARN de guía simple. tracrARN: ARN transactivador.

Una vez seleccionadas las secuencias para las guías se debió llevar a cabo el diseño de los oligos que las codificaran, a los que se añadieron además secuencias complementarias a los extremos cohesivos generados en la digestión del plásmido pCRISPRi-Bsal por la enzima Bsal, para su posterior clonado en este el plásmido (Tabla 26).

Tabla 26. Secuencias de los oligos que constituyen las guías para generar la interrupción de la expresión génica del gen *sldBA* utilizando la dCas9.

Nombre		Secuencia ^a
Guía 1	Oligo 1	5' <u>TAGCT</u> GGTGGACCTGAACTGATTA 3'
	Oligo 2	5' <u>AAACT</u> AATCAGTTCAGGTCCACCA 3'
Guía 2	Oligo 1	5' <u>TAGCT</u> CATTCAAAAAGAAGTTTGG 3'
	Oligo 2	5' <u>AAACCC</u> AACTTCTTTTGAATGA 3'

^aLas secuencias subrayadas indican las secuencias complementarias a los extremos cohesivos generados en la digestión del plásmido pCRISPRi-Bsal por la enzima Bsal.

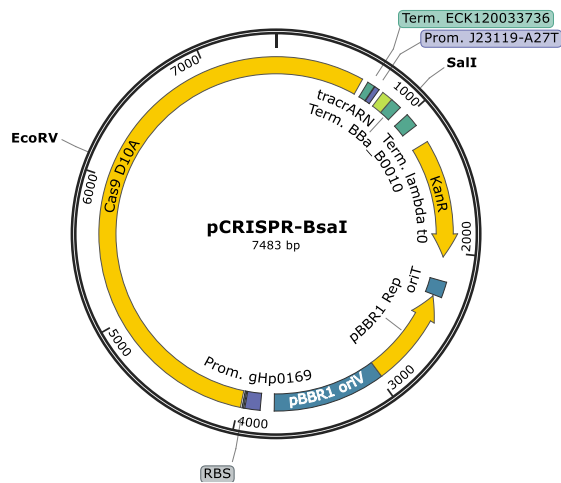
Nuevamente, mediante la implementación del protocolo de *annealing* y posterior clonado de los oligos en el plásmido pCRISPRi-Bsal logra obtener los plásmidos pCRISPRi-G1 y pCRISPRi-G2.

Una vez realizado el diseño *in silico* de los plásmidos necesarios para llevar a cabo la interrupción de la expresión del gen *sldB*, se comenzó con la construcción de los mismos. El fragmento sintético previamente diseñado fue obtenido dentro del plásmido pTWIST-CRISPRi, flanqueado por sitios de restricción Sall y EcoRV. Por este motivo se debió llevar a cabo una digestión del mismo con las enzimas antes mencionadas, para liberar el fragmento de interés. Por otro lado, también se debió llevar a cabo la digestión del plásmido pCRISPR-Bsal con las mismas enzimas, con la finalidad de obtener la sección del plásmido que contiene el origen de replicación, el cassette de resistencia a kanamicina y el comienzo del cassette de expresión de la nickasa Cas9 D10A.

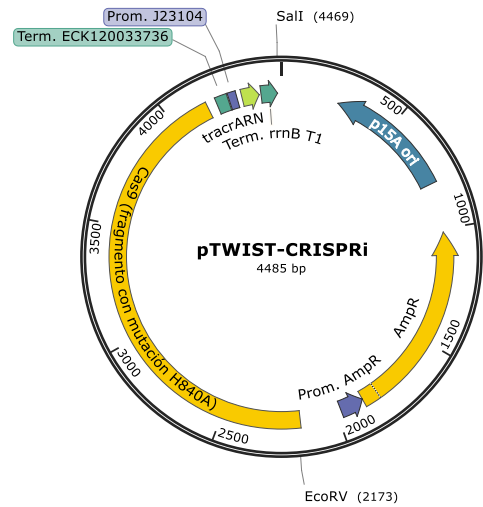
Para el caso de la digestión del plásmido pCRISPR-BsaI se esperaban dos bandas, una de 5177 pb, conteniendo el comienzo del cassette de expresión de la nickasa Cas9 D10A, el origen de replicación y el marcador de selección, y otra de 2306 pb que se correspondía con la sección del plásmido a reemplazar. Por otro lado, para la digestión del plásmido pTWIST-CRISPRi se esperaba una banda de 2296 pb correspondiente a la secuencia sintética que incluye la mutación H840A junto con el cassette para el clonado de guías, y otra de 2189 pb que corresponde al resto del plásmido.

La digestión de ambos geles se llevó a cabo de acuerdo con lo esperado. En el caso del plásmido pCRISPR-BsaI se escindió del gel la banda de mayor tamaño y se purificó para su posterior ligación con el fragmento sintético previamente diseñado. Con respecto a la digestión del plásmido pTWIST-CRISPRi, debido a que su digestión con las enzimas EcoRV y Sall genera dos fragmentos muy similares en tamaño, se debió llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, por un tiempo más largo, para permitir la separación de las bandas (Figura 68d). Una vez separadas las bandas se debió escindir la banda de mayor tamaño, que se correspondía con el fragmento sintético deseado. Debido a que no se logró una separación entre ambos fragmentos que permitiese escindir fácilmente la banda de 2296 pb, existía la posibilidad de contaminación con el fragmento de 2189 pb. Igualmente, la banda obtenida se purificó y el producto fue utilizado para una ligación junto con el producto de purificación de la banda de 5177 pb del plásmido pCRISPR-BsaI.

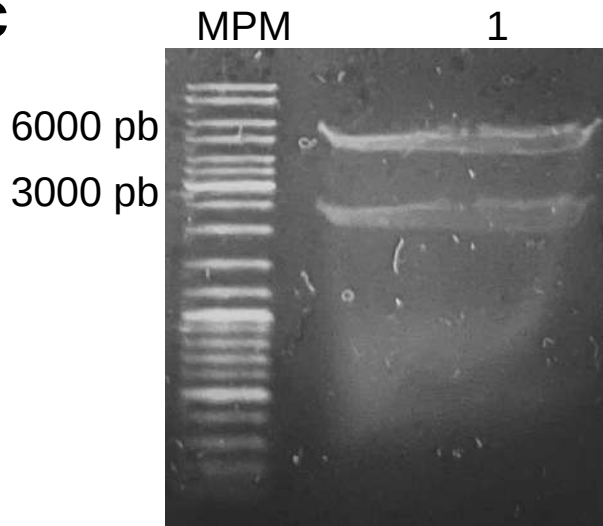
a



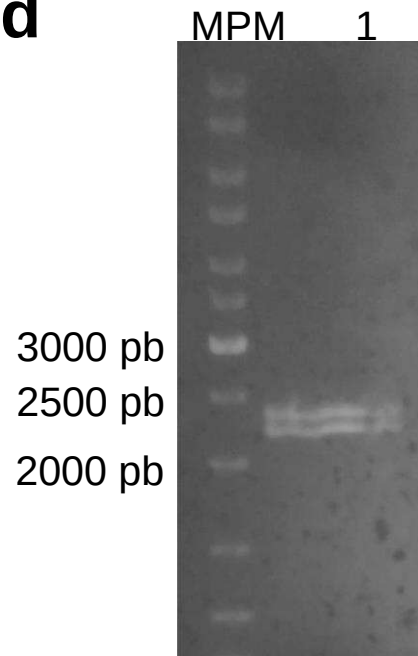
b



c



d



e

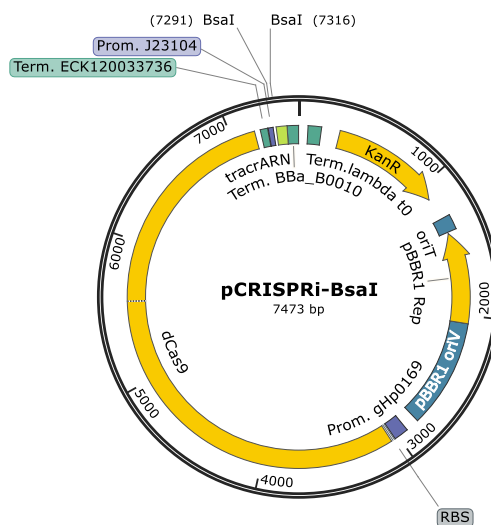


Figura 68. Construcción del plásmido pCRISPRi-BsaI. a) Mapa del plásmido parental pCRISPR-BsaI mostrando los sitios de restricción para las enzimas EcoRV y SalI. b) Mapa del plásmido parental pTWIST-CRISPRi mostrando los sitios de restricción EcoRV y SalI. c) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pCRISPR-BsaI digerido con las enzimas de restricción SalI y EcoRV. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: pCRISPR-BsaI digerido. d) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del plásmido pTWIST-CRISPRi digerido con las enzimas de restricción SalI y EcoRV. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: pTWIST-CRISPRi digerido. e) Mapa del plásmido objetivo pCRISPRi-BsaI.

El producto de ligación fue utilizado para transformar *E. coli* DH5α y posteriormente se obtuvieron 7 clones. Como se mencionó anteriormente, las transformantes podían contener el plásmido deseado (pCRISPRi-BsaI) o, en caso de que hubiese habido contaminación con la banda de 2189 pb, un plásmido alternativo (Figura 69b). Dado que el fragmento de 2189 pb contiene un cassette de expresión para el antibiótico ampicilina, resultó sencillo determinar la existencia de transformantes que poseyeran el plásmido alternativo.

Se llevaron a cabo estrías de 7 de los transformantes en placas separadas de LB-kanamicina (50 µg/mL) y LB-ampicilina (100 µg/mL). Aquellas bacterias que tuvieran la capacidad de crecer en presencia de kanamicina, pero no en presencia de ampicilina potencialmente contendrían el plásmido pCRISPRi-BsaI. Por el contrario, aquellas que crecieran tanto en presencia de kanamicina como de ampicilina debían presentar el plásmido alternativo no deseado. Entre los transformantes estriados, solo uno tuvo la capacidad de crecer en presencia de ambos antibióticos (Figura A16), por lo que se descartó. Los 6 clones restantes fueron cultivados para extraer los plásmidos que contenían y se llevó a cabo una digestión de los mismos con las enzimas EcoRV y BamHI. Estas enzimas fueron seleccionadas ya que para el plásmido alternativo no posee sitio de corte para esta enzima, mientras que el plásmido pCRISPR-BsaI sí, generando un patrón de bandas diferencial.

Los resultados obtenidos fueron en todos los casos concordantes con la correcta obtención del plásmido pCRISPRi-BsaI, presentando un patrón de dos bandas de 5468 pb y 2005 pb (Figura 69).

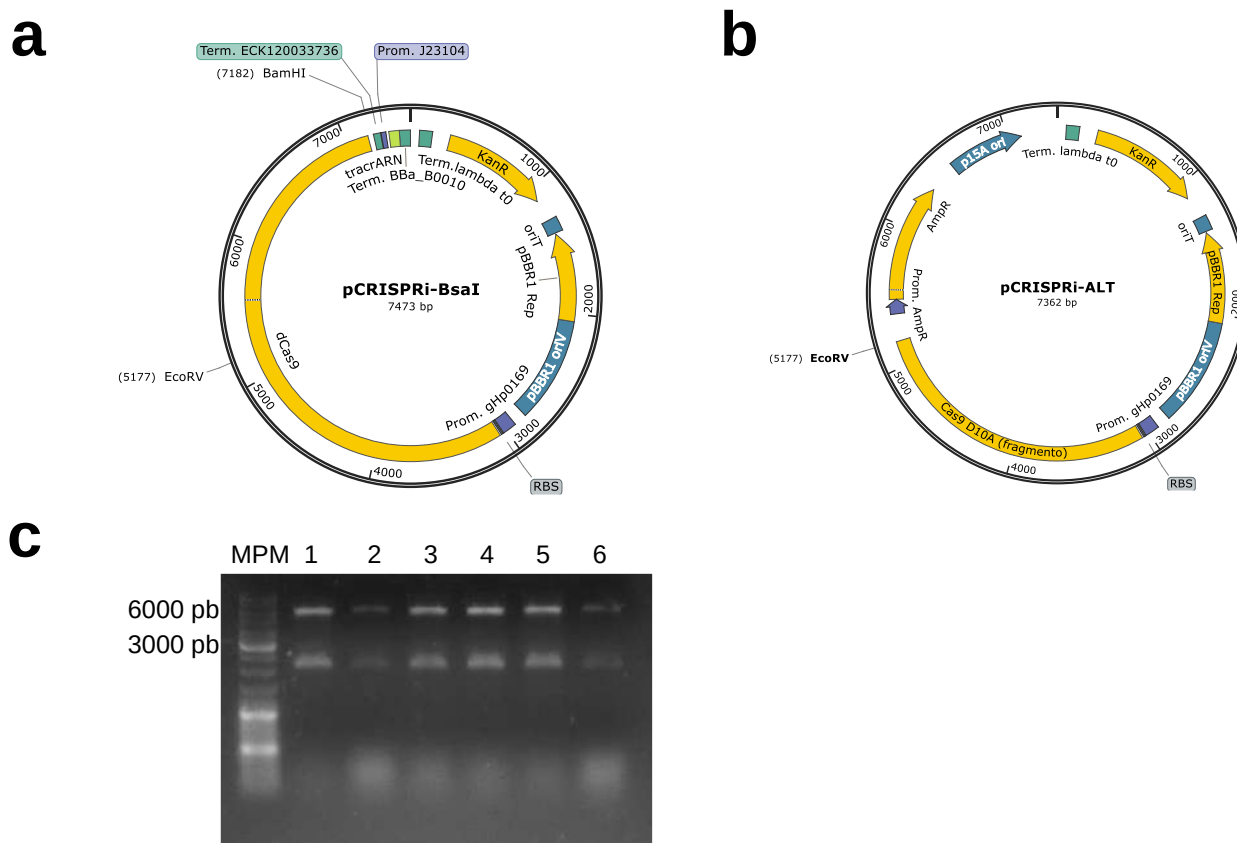


Figura 69. Verificación de la construcción pCRISPRi-BsaI. a) Mapa del plásmido objetivo pCRISPRi-BsaI mostrando los sitios de restricción para las enzimas EcoRV y BamHI. b) Mapa del plásmido alternativo pCRISPRi-ALT, producto de una ligación incorrecta, mostrando los sitios de restricción para la enzimas EcoRV. c) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los resultados obtenidos para el ensayo de restricción de los plásmidos obtenidos a partir de los clones 1, 2, 4, 5, 6, y 7, digeridos con las enzimas de restricción EcoRV y BamHI. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. Carril 1: Clon 1. Carril 2: Clon 2. Carril 3: Clon 4. Carril 5: Clon 5. Carril 6: Clon 7.

Para confirmar la presencia de la mutación H840A, y con ello la construcción correcta del plásmido pCRISPRi-BsaI, los plásmidos obtenidos a partir de los clones 1, 2, 4, 5, 6, y 7 fueron secuenciados. Los resultados obtenidos fueron positivos en todos los casos. El plásmido obtenido para el clon 1, cuya secuencia se presenta en el anexo (Figura A17), se denominó pCRISPRi-BsaI y se utilizó para continuar con los experimentos.

Para clonar las guías en el plásmido pCRISPRi-BsaI (Figura 70a) se llevó a cabo la desfosforilación y digestión del mismo con la enzima BsaI y, paralelamente, se llevó a cabo la hibridación de los oligos que conforman las guías diseñadas (Figura 70b i e ii), utilizando además una kinasa para fosforilar el producto obtenido.

Actualmente se está llevando a cabo el clonado de las guías en el plásmido para obtener los plásmidos objetivo pCRISPRi-G1 y pCRISPRi-G2. Estos plásmidos serán luego utilizados para transformar Gfr y evaluar la capacidad de los sistemas diseñados para llevar a cabo el silenciamiento del gen *sldBA*.

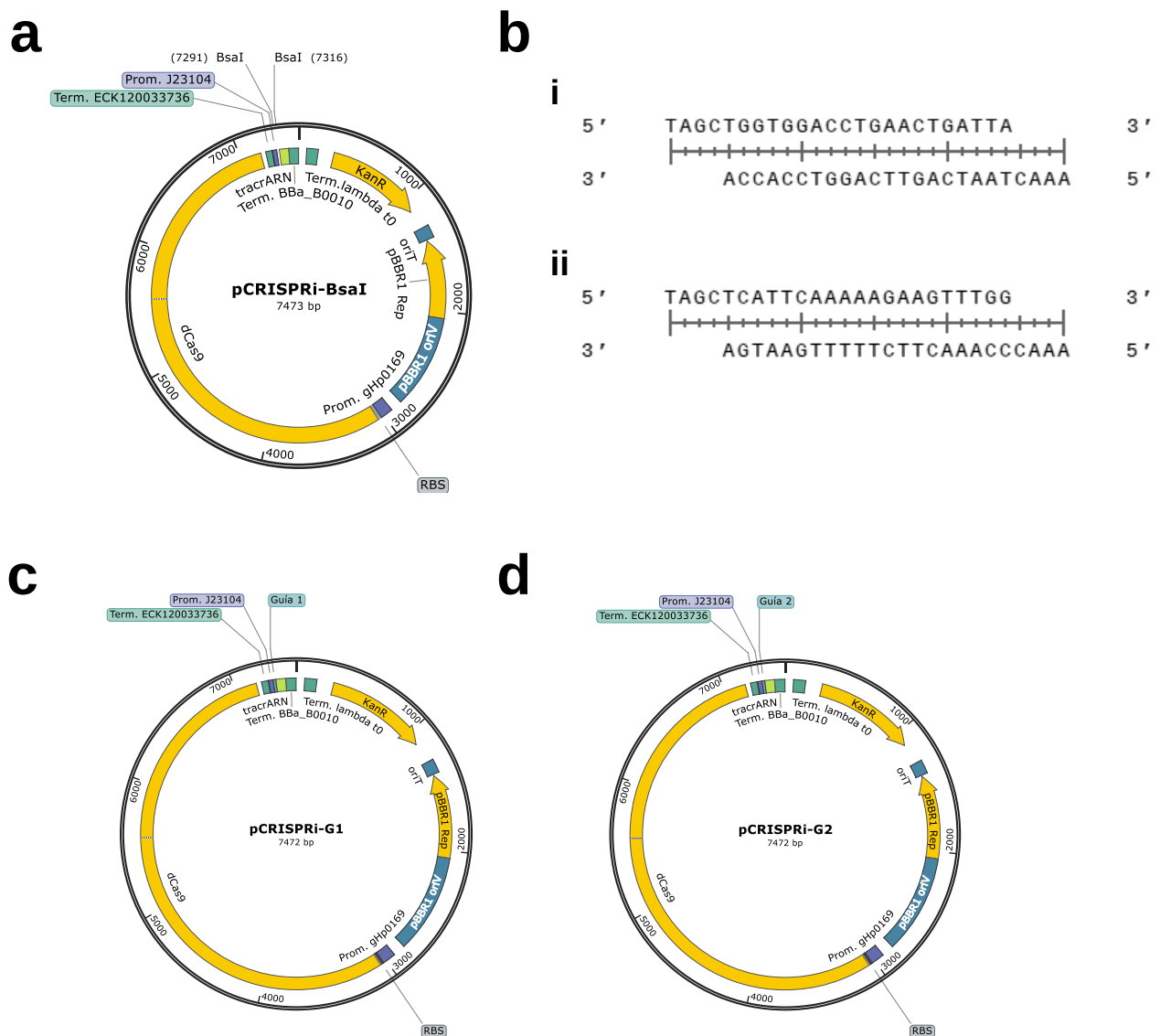


Figura 70. Construcción de los plásmidos pCRISPRi-G1 y pCRISPRi-G2. a) Mapa del plásmido parental pCRISPRi-BsaI mostrando los sitios de restricción para la enzima BsaI. b) Oligos hibridados que componen las guías G1 (i) y G2 (ii). c) Mapa del plásmido objetivo pCRISPRi-G1. d) Mapa del plásmido objetivo pCRISPRi-G2.

Los avances obtenidos hasta el momento para esta estrategia nos motivan a continuar trabajando en esta dirección. Por este camino, es posible evitar los problemas a los que nos enfrentamos al abordar la modificación genómica de *Gluconobacter* utilizando una metodología basada en CRISPR. No obstante, lo más significativo ha sido el conocimiento adquirido a lo largo de este proceso, el cual indudablemente impulsará y acelerará futuras investigaciones y supone una base sólida sobre la cual se construirán los próximos avances en el campo.

Nuevos materiales para la inmovilización de *Gluconobacter*

En biocatálisis, se evalúan continuamente nuevas estrategias y materiales de inmovilización con el fin de aumentar los rendimientos espacio-temporales, mejorar la resistencia de los biocatalizadores ante las condiciones operativas y habilitar nuevas aplicaciones. En este trabajo de Tesis, se investigaron y caracterizaron diversas estrategias de inmovilización empleando soportes no tradicionales. Algunas de estas estrategias serán exploradas y ampliadas a otros biocatalizadores en el futuro. No obstante, cabe destacar que en el marco de esta investigación se comenzó a explorar ciertos soportes que, debido a su fase preliminar de estudio, no se incluyeron anteriormente en el cuerpo del manuscrito.

En particular, a partir de los resultados obtenidos con los soportes fabricados mediante impresión 3D y los problemas de integridad observados con el material A, se probó un nuevo material previamente desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Simone Dimartino de la Universidad de Edimburgo (Reino Unido). Este nuevo material posee características que mejoran su resistencia.

Por otro lado, durante una estancia corta de investigación en el laboratorio de la Dra. Natalia Ferraz, en el Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la Universidad de Uppsala (Suecia), se exploró una estrategia novedosa de inmovilización que combina sílica y nanocelulosa-PEI.

A continuación, se mostrarán los avances obtenidos para estas dos prometedoras estrategias de inmovilización.

Desarrollo de nuevas matrices de inmovilización 3D

Los resultados obtenidos con Gfr inmovilizado en el material A, descritos en el Capítulo 3 de esta Tesis, fueron prometedores. Sin embargo, uno de los problemas detectados fue la limitada resistencia mecánica de este material. Aunque su integridad se mantuvo durante los procedimientos de inmovilización y biotransformación en el reactor de lecho rotatorio, tanto su transporte como su manipulación fuera del reactor provocaron la ruptura del material. Esto redujo el área superficial disponible para la inmovilización posterior de las bacterias y probablemente afectó la uniformidad de los resultados obtenidos.

El grupo del Dr. Simone Dimartino contaba con una formulación previamente diseñada con una resistencia superior (Tabla 27). A este nuevo material se le llamó material B y se utilizó para imprimir piezas para su utilización en el *SpinChem*.

Tabla 27. Composición del material B en el que fueron impresos las piezas para la inmovilización de Gfr.

	Componente	% (v/v)
Monómero 1	Benzilmetacrilato	27
Monómero 2	Butilmetacrilato	9
Entrecruzante	Dipentaeritritol pentaacrilato	24
Porógeno	Ciclohexanol y dodecanol	40

Esta nueva formulación está compuesta por los monómeros benzilmetacrilato y butilmetacrilato, lo que confiere un carácter hidrofóbico a su superficie. A diferencia de las interacciones de carácter electrostático esperadas con el material A, se anticipó que las interacciones establecidas por las bacterias con el material B fueran predominantemente hidrofóbicas. Estas interacciones serían favorecidas por los LPS de la membrana externa de Gfr, que contienen una región hidrofóbica. Por su parte, el uso del agente entrecruzante dipentaeritritol pentaacrilato, con cinco grupos funcionales metacrilato, maximiza el entrecruzamiento durante la polimerización en la impresión 3D, resultando en un material más rígido y resistente.

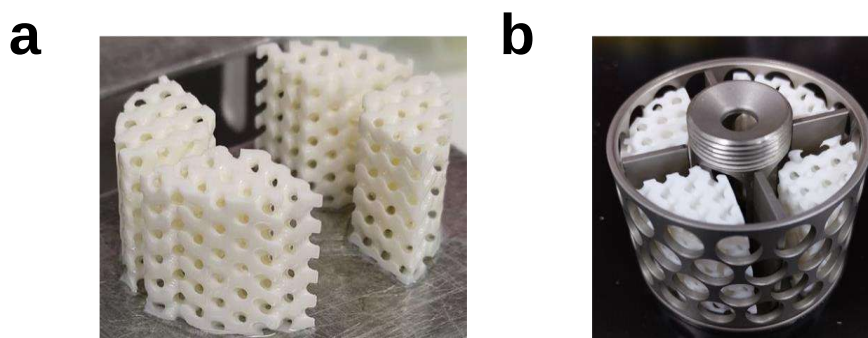


Figura 71. a) Piezas obtenidas por impresión 3D impresas en material B para su uso en el reactor *SpinChem* de lecho rotatorio. b) Piezas ubicadas en la celda del reactor *SpinChem*.

Las piezas impresas en el material B presentaron una mayor dureza, evidenciada por el nulo daño observado en su estructura durante el transporte desde el laboratorio del Dr. Dimartino hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay (Figura 71a). Las mismas pudieron ser colocadas correctamente en el lecho del reactor *SpinChem* sin pérdidas de integridad, dada su más sencilla manipulación (Figura 71b).

Se llevó a cabo una biotransformación preliminar utilizando estas nuevas piezas utilizando el protocolo descrito anteriormente para el material A. La metodología utilizada se detalla en la sección “Anexos”.

A pesar de que las piezas obtenidas a partir de material B presentaron mejores características físicas que aquellas obtenidas con el material A, la conversión de glicerol a DHA y AG fue nuevamente discreta. La misma fue comparable con la obtenida anteriormente con el material A, obteniendo 0,51 g/L de DHA y 0,04 g/L de AG en las condiciones del experimento (Figura 72).

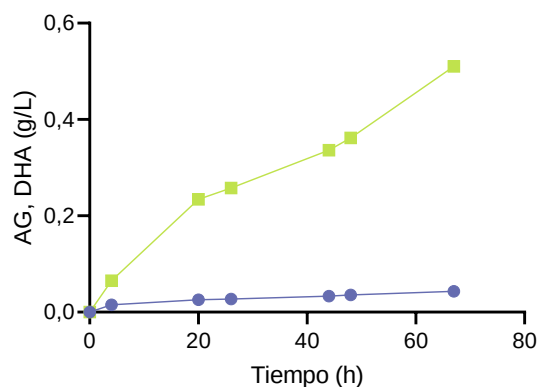


Figura 72. Biotransformación de glicerol a DHA y AG por Gfr inmovilizado en piezas para *SpinChem* obtenidas a partir del material B. DHA (verde). AG (violeta).

Estos resultados preliminares deberán ser corroborados a través de la realización de réplicas experimentales, a la vez que se deberá confirmar la formación del biofilm por SEM. Estos datos permitirán ayudar a determinar el porqué de las bajas concentraciones de producto obtenidas. No obstante, la obtención de preparados activos de *Gluconobacter* en este material es un avance prometedor, que motiva a seguir explorando el desarrollo de biocatalizadores fabricados mediante matrices de inmovilización obtenidas por impresión 3D.

Nanocelulosa y sílica como matriz de inmovilización de *Gluconobacter*

El interés creciente en la sostenibilidad ha destacado a las fibras nanocelulósicas derivadas de madera (CNFs) por su versatilidad y aplicaciones. Estas CNFs se obtienen mediante la desintegración mecánica de fibras de madera, combinada con tratamientos químicos y enzimáticos, logrando nanofibras con alta área superficial, resistencia y propiedades personalizables⁴⁵⁵.

Las CNFs forman suspensiones coloidales estables en agua y pueden procesarse para crear películas, aerogeles e hidrogeles. Estas características las hacen atractivas para aplicaciones en biomedicina y biocatálisis. En particular, la funcionalización de CNFs permite adaptar sus propiedades y mejorar su interacción con sistemas biológicos. Esto las convierte en un soporte prometedor para la inmovilización de bacterias o enzimas, aumentando su eficiencia y potencial de uso en aplicaciones industriales.

En el laboratorio de la Dra. Natalia Ferraz se había sintetizado previamente una CNF modificada con PEI (CNF-PEI)⁴⁵⁶. La misma se obtiene de la reacción de la CNF con un catalizador químico en presencia de tolueno y PEI (Figura 73a). El resultado son fibras de nanocelulosa funcionalizadas con el polímero aminado (Figura 73b y c), que potencialmente podrían ser utilizadas para generar un material de inmovilización interesante tanto para bacterias del género *Gluconobacter* como para enzimas como la PfATA.

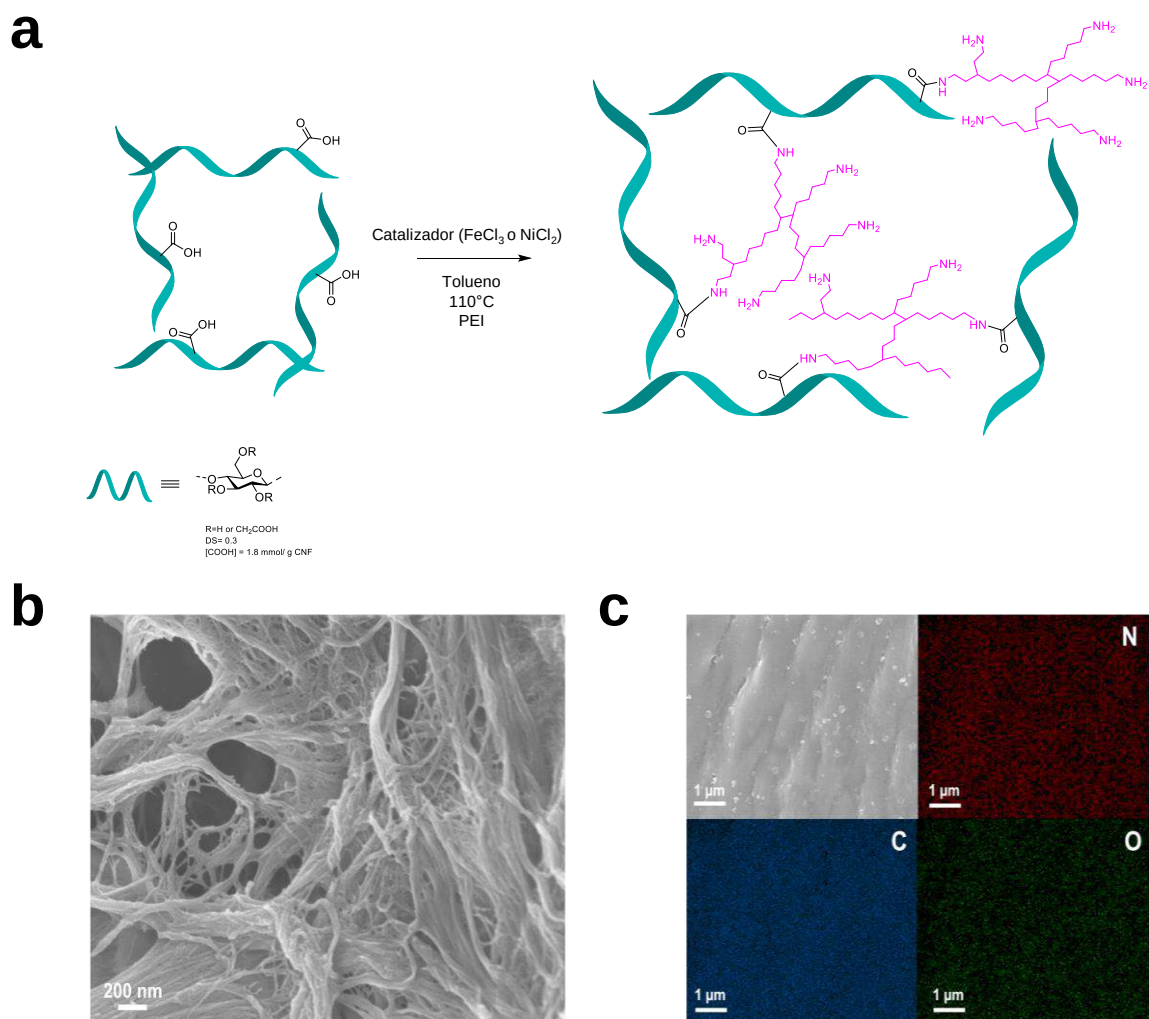


Figura 73. a) Síntesis química de CNF-PEI a partir de CNF. b) Imagen obtenida por SEM de CNF-PEI. Las barras de escala representan 200 nm. b) Imágenes representativas del escaneo de carbono, oxígeno y nitrógeno mediante SEM-EDS de CNF-PEI y la imagen correspondiente de SEM (las barras de escala representan 1 μm). Los paneles b y c de esta imagen fueron tomados de Tikhomirov *et al.*⁴⁵⁶.

En el marco de esta colaboración, se buscó determinar si era posible llevar a cabo la precipitación de sílica sobre la CNF-PEI. Para ello se llevaron a cabo distintos ensayos variando la cantidad de tetraetil ortosilicato (TEOS) hidrolizado (0,63 M) utilizado como fuente de sílica, a una misma cantidad de CNF-PEI en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0. La metodología utilizada se detalla en la sección “Anexos”.

Los materiales obtenidos (CNF-PEI-Si) luego de cada síntesis fueron luego evaluados por SEM-EDS para determinar tanto los posibles cambios en la morfología de las fibras como su composición elemental (Figura 74).

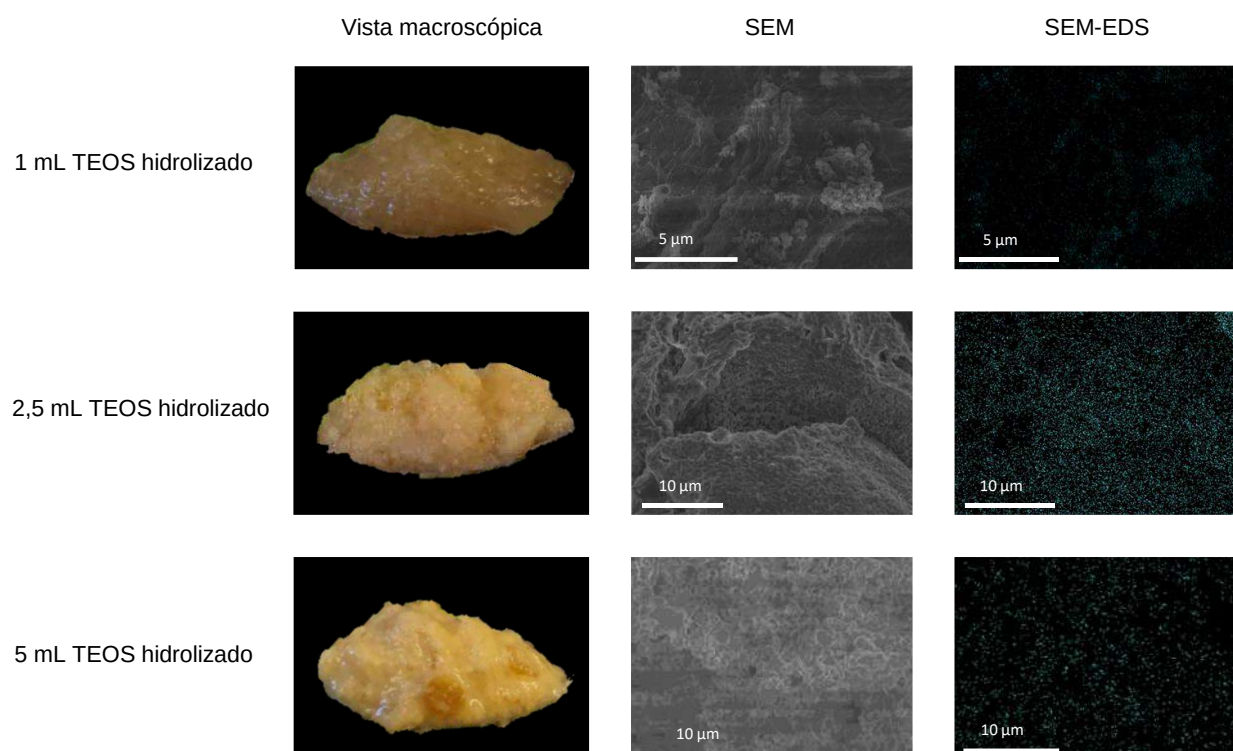


Figura 74. Precipitación de sílica utilizando CNF-PEI variando la cantidad de TEOS hidrolizado en la síntesis. Vista macroscópica: imágenes tomadas de las fibras de CNF-PEI-Si resultantes para los distintos volúmenes de TEOS hidrolizado empleados. SEM: Imágenes obtenidas por SEM de los distintos materiales obtenidos. SEM-EDS: Imágenes obtenidas por SEM-EDS, Si (K α 1): Ubicación espacial de los átomos de silicio en los distintos materiales obtenidos.

A simple vista se observaron cambios luego de la precipitación de la sílica, generando geles blanquecinos (Figura 74, columna “vista macroscópica”). La observación microscópica de las distintas síntesis demostró la posibilidad de generar estructuras silíceas en la superficie de las fibras de CNF-PEI, que fueron dependientes del volumen de TEOS hidrolizado utilizado. Las cantidades mayores de TEOS dieron lugar a un material con un mayor porcentaje de sílica en su superficie, que se observó homogéneo en las imágenes tomadas por SEM (Figura 74, columna “SEM”). Por su parte, al disminuir la cantidad de TEOS hidrolizado utilizado, el material obtenido fue menos homogéneo y presentó cúmulos de estructuras similares a SiNPs (Figura 74, columna “SEM”).

La presencia de los átomos de Si en la superficie fue confirmado en todos los casos por SEM-EDS (Figura 74, columna “SEM-EDS”). El ratio Si:N obtenido a partir del análisis por EDS de los distintos materiales aumentó con el aumento de TEOS hidrolizado en la reacción (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis por EDS de la superficie de los distintos materiales obtenidos luego de la precipitación de sílica sobre CNF-PEI, resultando en distintos tipos de CNF-PEI-Si.

Volumen de TEOS hidrolizado (mL)	Elemento				Ratio Si:N
	C (%)	O (%)	Si (%)	N (%)	
1	54,90	10,23	3,70	1,74	0,5:1
2,5	42,31	19,55	10,63	3,93	2,7:1
5	44,95	20,51	16,19	3,31	5:1

Los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta Tesis en el apartado sobre inmovilización de Gfr en sílica biomimética demostraron la formación de asociaciones entre la superficie bacteriana y las SiNPs. Por la naturaleza de los componentes de estos nuevos materiales de síntesis, sería probable que la precipitación de sílica en CNF-PEI en presencia de las bacterias diera lugar a una malla compuesta de las fibras de CNF-PEI-Si y Gfr. Esto podría ser una alternativa interesante a las bacterias recubiertas en SiNPs, ya que no solamente podría presentar propiedades estabilizantes, sino que debido a sus propiedades físicas similares a un gel, su separación de las reacciones sería más sencilla.

En una primera aproximación a la inmovilización de Gfr utilizando esta estrategia, se llevó a cabo la precipitación de sílica en presencia de la bacteria y la CNF-PEI, utilizando las condiciones en las que la mayoría de la CNF-PEI quedó recubierta de sílica (5 mL de TEOS hidrolizado). Luego del procedimiento de inmovilización se obtuvo un pellet blanquecino, donde Gfr parece haberse incorporado a las fibras de CNF-PEI-Si (Figura 75).

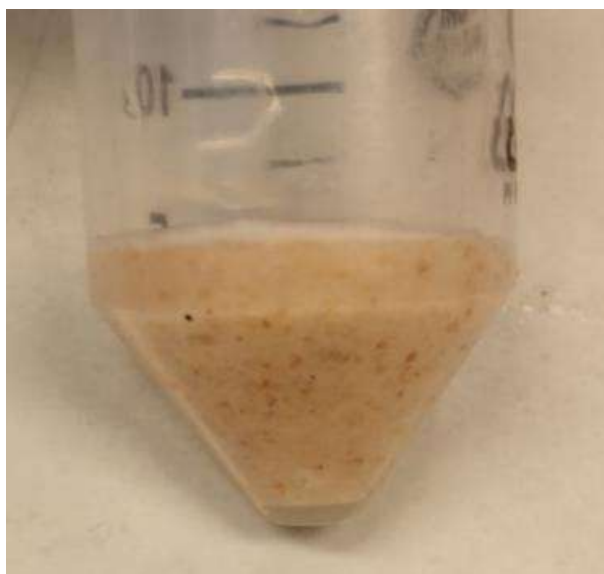


Figura 75. Pellet obtenido luego de la precipitación de sílica en presencia de CNF-PEI y Gfr.

Debido a que la estancia de investigación tuvo una duración de una semana no se pudo continuar con la caracterización del inmovilizado obtenido. Sin embargo, la colaboración surgida con el grupo de la Dra. Natalia

Ferraz continúa y futuros experimentos de caracterización del preparado serán llevados a cabo próximamente. Los mismos se enfocarán en observar las estructuras obtenidas por SEM. Adicionalmente se deberá poner a punto el protocolo de inmovilización, ajustando por ejemplo la carga bacteriana añadida a la síntesis. Posteriormente se deberá ensayar la capacidad del material obtenido para la conversión de glicerol y sus posibilidades de reutilización.

***Gluconobacter* como herramienta para el avance de la química verde**

La biotecnología industrial aún no ha capitalizado completamente los beneficios de las biotransformaciones catalizadas por *Gluconobacter*. Todavía existe mucho margen para explorar la contribución de este género bacteriano a la generación de procesos más verdes y sostenibles. La valorización de subproductos industriales o el uso de desechos podría marcar una diferencia significativa en la sostenibilidad de los procesos productivos que cataliza. Además, mediante la combinación de cepas de *Gluconobacter* con otros biocatalizadores y organocatalizadores, se ampliará aún más la variedad de productos valiosos obtenidos de estos procesos biocatalíticos^{58,127}. El conocimiento acumulado en todos estos campos indudablemente mejorará la aplicación biotecnológica de las cepas de *Gluconobacter*.

Los avances en el diseño de procesos utilizando bacterias del género *Gluconobacter* se han acelerado en los últimos 10 años, sin embargo, aún son necesarios más progresos para mejorar los rendimientos volumétricos de los compuestos objetivo. Anticipamos que futuras contribuciones en el modelado cinético de reacciones catalizadas por *Gluconobacter* ayudarán a identificar mejor los parámetros críticos para resolver transformaciones deficientes o no viables a nivel industrial. Además, la implementación de metodologías como el Diseño de Experimentos (DoE) podría optimizar condiciones de reacción y acelerar la identificación de variables clave en los procesos. Desde el punto de vista de las distintas modalidades de operación, hay escasos informes sobre biotransformaciones en flujo continuo, que podrían contribuir sustancialmente a las perspectivas verdes de los procesos. Abordar problemas de inhibición del producto o del sustrato mediante la modificación genética de los biocatalizadores o el diseño de procesos, también podría mejorar las productividades.

En cuanto a la estabilidad, una característica clave en los biocatalizadores, el principal reto consiste en desarrollar estrategias de inmovilización que mantengan o incluso mejoren las tasas de conversión. Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que el uso de nuevas matrices de inmovilización impresas en 3D, diseñadas con geometrías optimizadas que favorecen la transferencia de masa, podrían ser altamente compatibles con cepas de *Gluconobacter*. Además, el desarrollo de matrices híbridas avanzadas, con capacidades mejoradas y superficies con nuevas funcionalizaciones, permitirá la creación de biocatalizadores con una mayor aplicabilidad en una amplia gama de reacciones. A su vez, innovadoras técnicas como la preparación de esporas artificiales, capaces de anclar enzimas en su superficie, abren la posibilidad de obtener una mayor diversidad de productos a partir de

Gluconobacter. Esto potenciaría el diseño de bioprocesos más versátiles y eficientes, facilitando la conversión de una variedad más amplia de sustratos con mayores rendimientos y menores limitaciones técnicas.

La integración de estos enfoques, sumado a la modificación génica para la mejora de biocatalizadores, podría impulsar la aplicación de las biotransformaciones a gran escala de *Gluconobacter*, alineándose con un enfoque más verde y sostenible de producción de moléculas de interés biotecnológico. Además, para avanzar hacia un futuro más sostenible en la producción industrial, es necesario abordar una evaluación integral de los procesos *upstream* y *downstream*. En esta línea, aun cuando los biocatalizadores ofrecen beneficios ambientales significativos, comprender completamente su contribución a la sostenibilidad requiere una evaluación exhaustiva. Esto implicaría no solo abordar los efectos ambientales asociados con la producción de *Gluconobacter*, sino también optimizar y facilitar la separación de los productos. Este trabajo de Tesis ha sentado las bases para un posterior abordaje de la cuantificación de la sostenibilidad de procesos catalizados por *Gluconobacter* en el que nuestro grupo de investigación se encuentra trabajando. En el futuro será necesario identificar y centrarnos en áreas críticas para valorar y maximizar los beneficios de las biotransformaciones catalizadas por cepas de *Gluconobacter* y avanzar hacia procesos más verdes y sostenibles.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

Las biotransformaciones microbianas aún no ofrecen soluciones universales para una industria sintética cada vez más ecológica. Sin embargo, los avances en bioprocesos, ingeniería microbiana y el uso de organismos no convencionales han comenzado a crear un conjunto de herramientas para el desarrollo de nuevas y mejoradas biotransformaciones. Las cepas de *Gluconobacter* presentan ventajas notables como biocatalizadores, y tienen potencial como chasis microbiano para numerosas biotransformaciones.

Las técnicas de inmovilización de células han sido utilizadas durante décadas, pero en los últimos 10 años ha resurgido un notable interés por explorar nuevas estrategias que faciliten la implementación de procesos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente (Fuente: Scopus, “*Whole cell immobilization*”). Este renovado interés puede explicarse por la creciente demanda de la industria de adoptar prácticas más ecológicas, reducir el uso de sustancias químicas nocivas y optimizar la eficiencia en la reutilización de biocatalizadores. Además, los avances en nanobiotecnología y materiales han permitido mejorar las propiedades de soportes que proveen mejores estabildades y funcionalidades de los biocatalizadores inmovilizados, haciendo más viable su aplicación en procesos industriales ecológicos.

En este contexto, los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral resultan oportunos y relevantes, ya que proponen estrategias innovadoras de inmovilización de biocatalizadores de *Gluconobacter*, un microorganismo reconocido por su capacidad de realizar oxidaciones selectivas interesantes, abordando brechas de conocimiento y aportando soluciones que favorecen la sostenibilidad.

En la Introducción de esta Tesis se llevó a cabo una revisión exhaustiva del estado del arte del biocatalizador *Gluconobacter*, con un análisis crítico de su potencial en las reacciones de biotransformación de glicerol (Ripoll & Betancor, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2021)⁴⁵⁷, además de un resumen de las herramientas disponibles y potenciales para optimizar su rendimiento como biocatalizador (Ripoll *et al.*, *Biotechnology Advances*, 2023)⁷². El análisis del estado del arte demostró la necesidad de contar con herramientas como la inmovilización o la ingeniería genética para aumentar los rendimientos espacio-temporales de este biocatalizador.

En el Capítulo 1, se estudiaron condiciones de reacción con células en reposo, que servirían como punto de partida para las reacciones con los biocatalizadores inmovilizados. Además, se desafió a Gox con nuevos sustratos sintéticos estableciéndose por primera vez la capacidad de este biocatalizador de producir dos nuevas cetonas, EHA y 3FHA (Ripoll *et al.*, manuscrito en preparación). Esto refuerza su versatilidad y capacidad para generar intermediarios útiles para la síntesis de moléculas quirales. Los resultados de este capítulo demostraron además la capacidad de Gfr de producir concentraciones sin precedente de AG para células en reposo suspendidas solamente en agua, lo que simplifica el procesamiento *downstream* del bioproceso. Algunos resultados obtenidos

en este capítulo fueron utilizados en el marco de otra biotransformación con Gox: la conversión de sorbitol a L-sorbosa. Estos hallazgos han sido integrados en un artículo que se encuentra bajo revisión (Pirrotti, Soriano, Ripoll *et al.*, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*).

Por su parte el Capítulo 2 proporcionó mutantes de las cepas de *Gluconobacter* bajo estudio que sirvieron como herramienta de caracterización de los inmovilizados a estudiarse con posterioridad (Ripoll *et al.*, *Polymers*, 2023)³⁷. Aun cuando los esfuerzos por modificar *Gluconobacter* mediante técnicas basadas en CRISPR, prácticamente sin precedentes en la literatura para este microorganismo, no resultaran exitosos, los mismos abrieron líneas de investigación que se encuentran en desarrollo en el Grupo de Tecnología de Proteínas. Además, se han adquirido nuevas capacidades en el grupo y revisado el estado del arte con un enfoque sin precedentes en donde se estudió la aplicación de herramientas CRISPR para la mejora de biotransformaciones bacterianas (Mulet, Ripoll & Betancor, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2023)²².

El Capítulo 3, se enfocó en la preparación de inmovilizados utilizando soportes novedosos no aplicados hasta el momento a la inmovilización de *Gluconobacter*. Partiendo del estudio del biocatalizador inmovilizado en matrices tradicionales, se demostraron las ventajas de utilización de matrices híbridas para la integración del biocatalizador, lo que aportó mejor resistencia mecánica, menos pérdida del biocatalizador desde la matriz y mejoras en la estabilidad operacional (Ripoll *et al.*, *Polymers*, 2023)³⁷. Se estableció, además la factibilidad por primera vez, de integrar *Gluconobacter* a matrices obtenidas por impresión 3D, probándolas en un formato de reactor de lecho rotatorio en la biotransformación de glicerol por Gfr (Ripoll *et al.*, manuscrito en preparación). En esta sección, además, se demostró por primera vez la inmovilización unicelular de bacterias de este género, produciendo esporas artificiales de TAFE que abrieron la posibilidad de generación de catalizadores combinados bacteria-enzima para la implementación de cascadas biocatalíticas exploradas en el Capítulo 4.

Finalmente, el Capítulo 4 extendió la aplicación de inmovilizados no tradicionales de *Gluconobacter* a su integración en sistemas de biocatalizadores actuando en tándem. Así, se desarrolló un catalizador heterogéneo que acopló *Gluconobacter* embebido en una espora de TAFE con una transaminasa inmovilizada en superficie (Iturralde, Ripoll *et al.*, *Advanced Functional Materials*, 2024)⁴²⁰. Este tipo de inmovilizados constituye una de los puntos calientes de estudio de inmovilización de biocatalizadores⁴⁵⁸ y ha sentado las bases para profundizar en su estudio en el Grupo de Tecnología de Proteínas. Además, la integración de un nuevo material basado en modificación de SiNPs con el polímero TAFE (SiNPsTAFE) permitió estudiar un nuevo tipo de inmovilización de transaminasa, que acoplada a la transformación de Gox posibilitó la síntesis de la amina quiral 2A3EP en una cascada artificial inédita.

En conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral han contribuido en gran medida al avance del conocimiento en estrategias novedosas y nuevas arquitecturas de inmovilización de *Gluconobacter* y por extensión de

biocatalizadores microbianos en general. Además, han fortalecido el desarrollo de tecnologías más verdes para la síntesis de compuestos de interés industrial.

Anexos

Anexos Capítulo 1

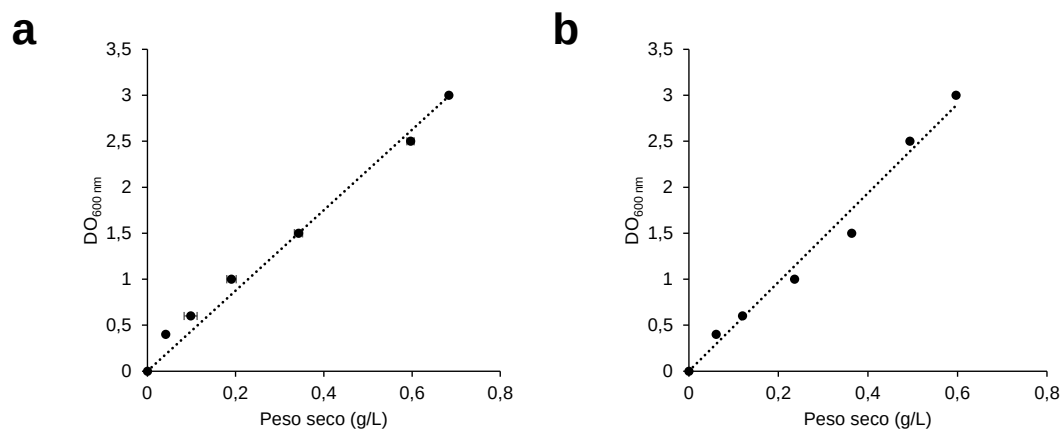


Figura A1. Gráficos de $DO_{600\text{ nm}}$ vs peso seco de células de (a) Gox ($y=4,3751$, $R^2=0,9939$) y (b) Gfr ($y=4,8398x$, $R^2=0,9935$).

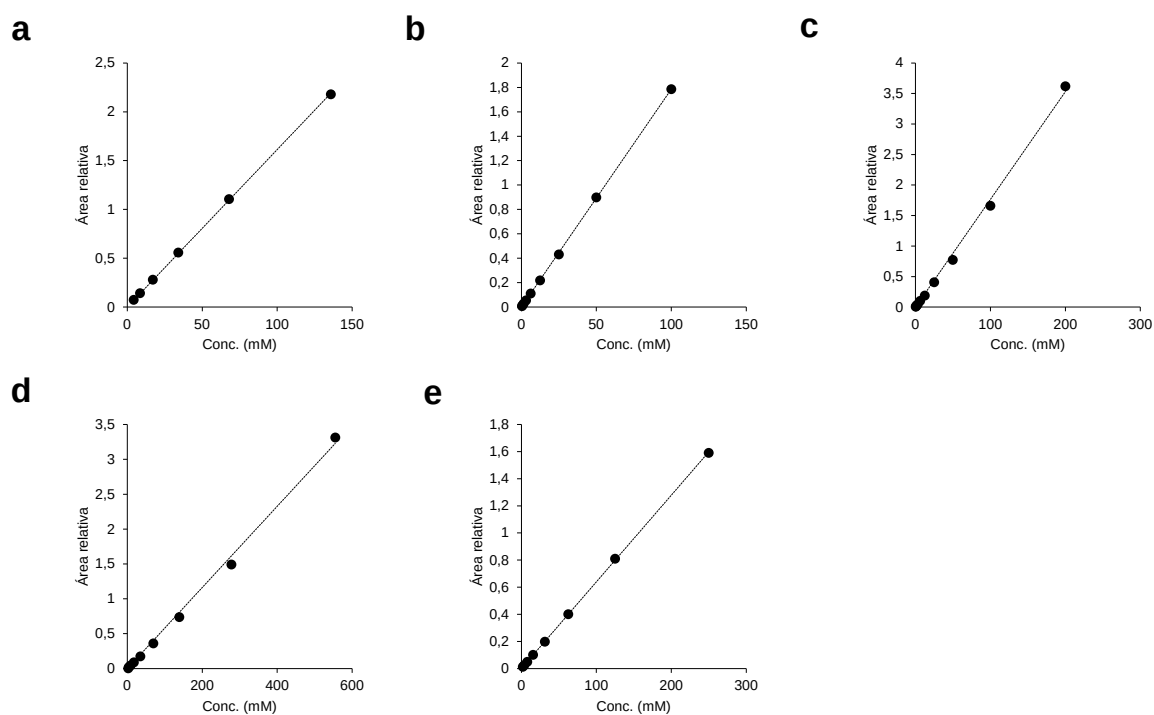


Figura A2. Curvas de calibración de GC-FID para (a) glicerol ($y=0,0161x$, $R^2=0,9999$), (b) EGE ($y=0,0178x$, $R^2=0,9999$), (c) 3FGE ($y=0,0177x$, $R^2=0,998$), (d) DHA ($y=0,0058x$, $R^2=0,9979$), (e) EHA ($y=0,0064x$, $R^2=0,9999$).

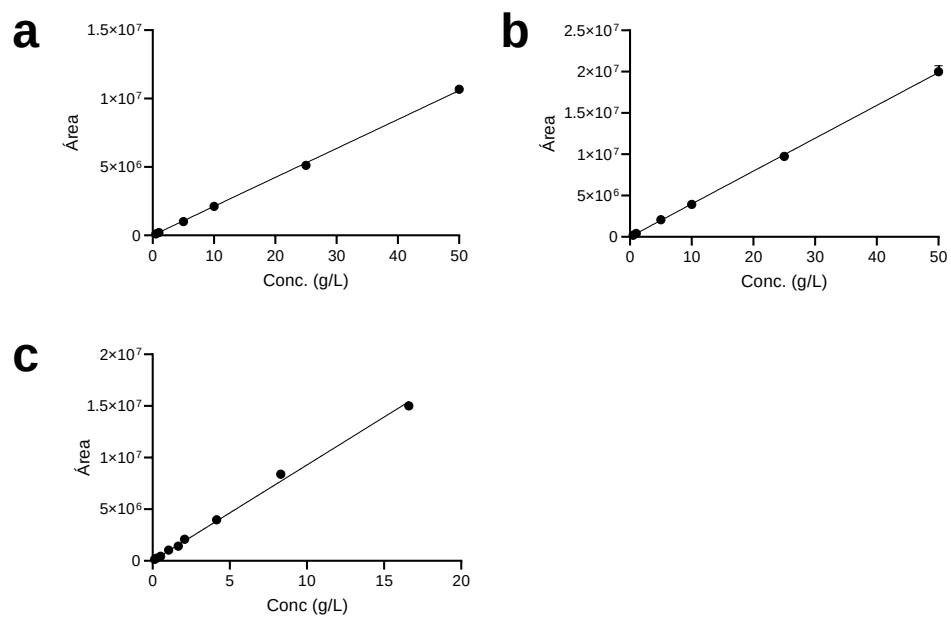


Figura A3. Curvas de calibración de HPLC para (a) glicerol (RID) ($y = 211728x$, $R^2=0,9997$), (b) DHA (PDA) ($y=397773x$, $R^2=0,9999$), (c) AG (PDA) ($y=928138x$, $R^2=0,9978$).

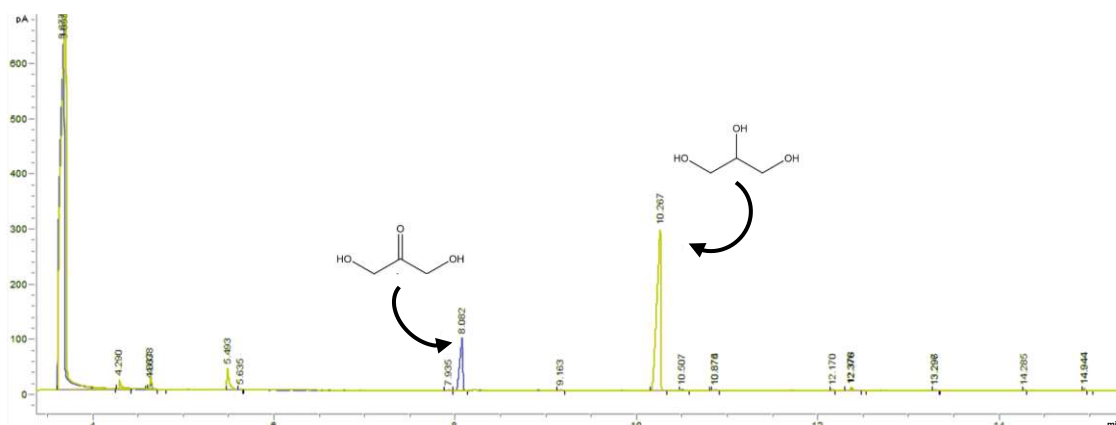
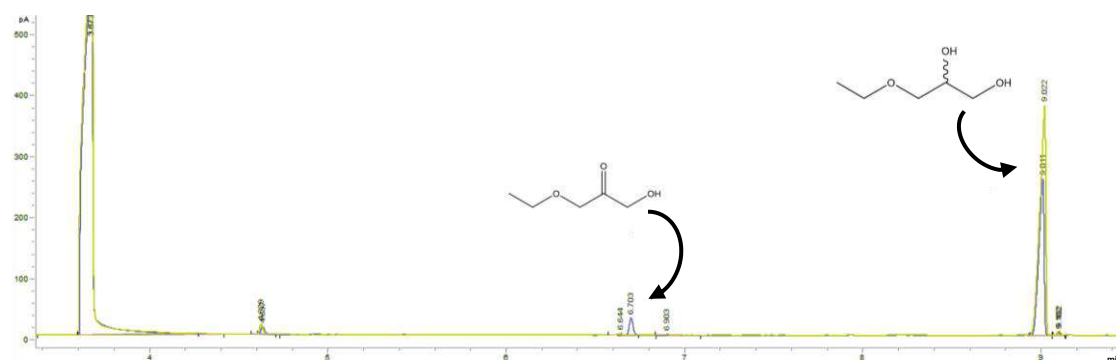
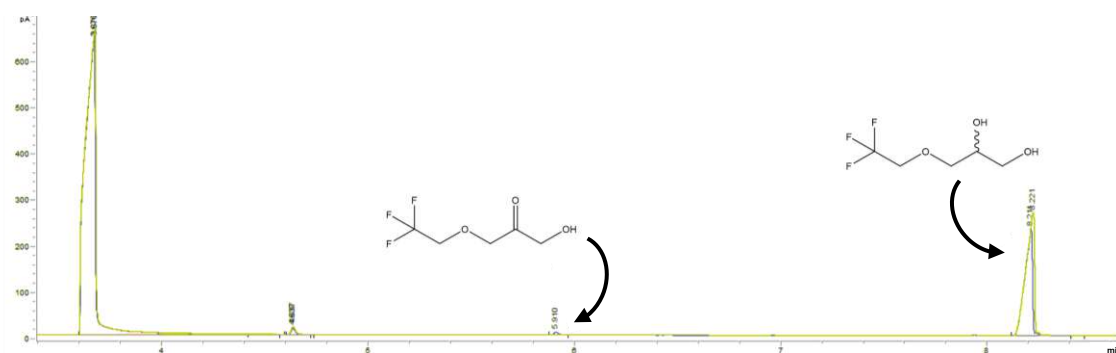
a**b****c**

Figura A4. Cromatogramas a tiempo inicial ($T=0$ h, verde) y tiempo final ($T=56$ h, violeta) de reacciones de oxidación de glicerol y sus derivados por células en reposo de Gox. a) Oxidación de glicerol ($T_{Ret}=10,2$ min) a DHA ($T_{Ret}=8,0$ min). b) Oxidación de EGE ($T_{Ret}=9,0$ min) a EHA ($T_{Ret}=6,7$ min). Oxidación de 3FGE ($T_{Ret}=8,2$ min) a 3FEHA ($T_{Ret}=5,9$ min).

Anexos Capítulo 2

```

Clone_3-CR 10 20 30 40 50
TTNGATCGAA TTCGAGCTCC GTCCAACGCA TGAGAAAGCC CCCGGAAGAT

Clone_3-CR 60 70 80 90 100
CACCTTCCGG GGGCTTTTTT ATTGCGGCCCT TTGACAGCTA GCTCAGTCTT

Clone_3-CR 110 120 130 140 150
AGGTATTATG CTAGCCGAAA AAGTGCATCT TCTCGCAACA GGCGGCTTTA

Clone_3-CR 160 170 180 190 200
GAGCTAGAAA TAGCAAGTTA AAATAAGGCT AGTCCGTTAT CAACTTGAAA

Clone_3-CR 210 220 230 240 250
AAGTGGCACC GAGTCGGTGC CCAGGCATCA AATAAAACGA AAGGCTCAGT

Clone_3-CR 260 270 280 290 300
CGAAAGACTG GGCCCTTTCGT TTTATCTGTT GTTTGTCGGT GAACGCTCTC

Clone_3-CR 310 320 330 340 350
GTCGACCTGC AGGCATGCAA GCTTGGCGCC GCGTCGTGAC TGGGAAAACC

```

Figura A5. Producto de secuenciación del plásmido extraído del Clon 3 obtenido luego del clonado de la guía en el plásmido pCRISPR, generando el plásmido pCRISPR-guía. En azul se resalta la secuencia esperada concordante con la inserción de la guía.

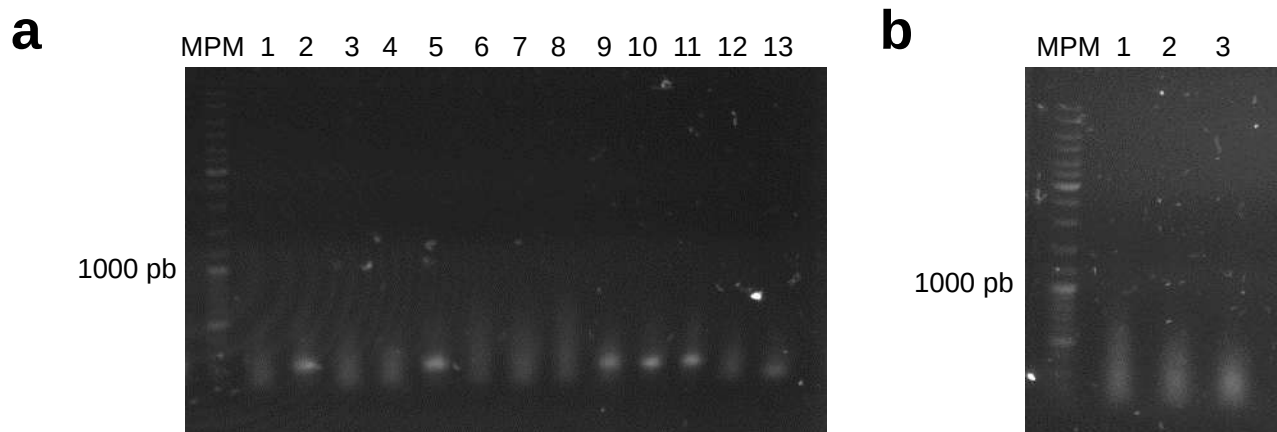


Figura A6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos obtenidos a partir de reacciones de PCR de colonia de las potenciales transformantes del plásmido pMYMH464-B5. MPM: *GeneRuler DNA Ladder Mix #0331 (ThermoScientific)*. a) Carril 1: Clon 13. Carril 2: Clon 14. Carril 3: Clon 15. Carril 4: Clon 16. Carril 5: Clon 17. Carril 6: Clon 18. Carril 7: Clon 19. Carril 8: Clon 20. Carril 9: Clon 21. Carril 10: Clon 22. Carril 11: Clon 23. Carril 12: Clon 24. b) Carril 1: Clon 26. Carril 2: Clon 27. Carril 3: Clon 29.

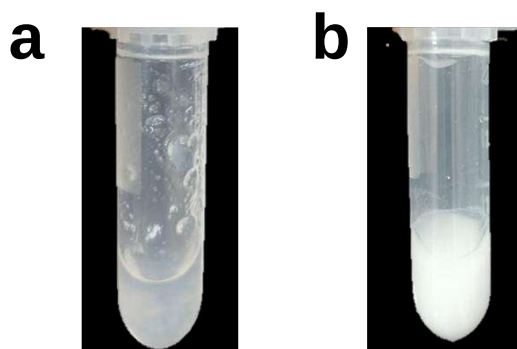


Figura A7. Reacción control de formación de SiNPs con un volumen de reacción de 0,59 mL (a). A modo comparativo, se muestra además una reacción llevada a cabo en las mismas condiciones, modificando únicamente la molaridad del tampón fosfato de sodio, pH 8 de 5 a 100 mM (b).

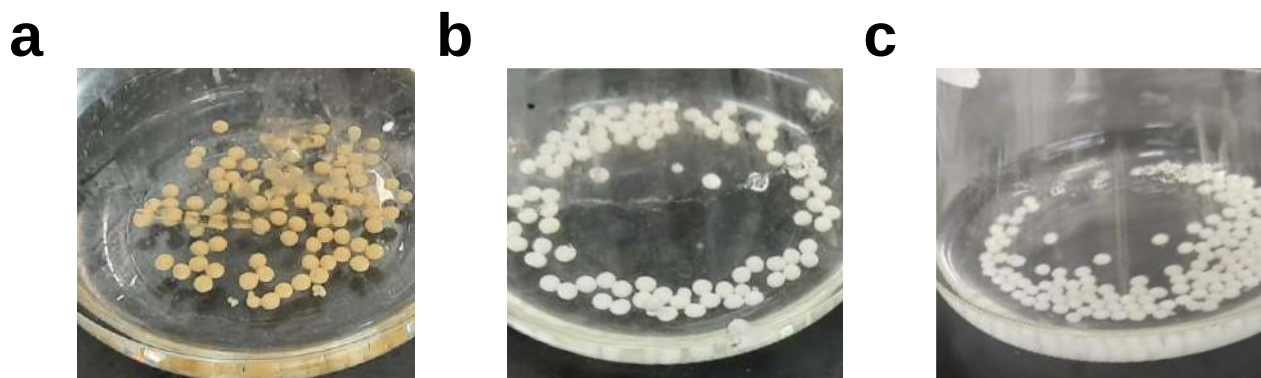


Figura A8. Evaluación del cambio de color después de 24 h en preparaciones A4S4. a) Gfr inmovilizado en A4S4 en presencia de 200 g/L de glicerol. b) Gfr inmovilizado en A4S4 en agua sin glicerol. c) preparados A4S4 libres de bacterias en presencia de 200 g/L de glicerol.

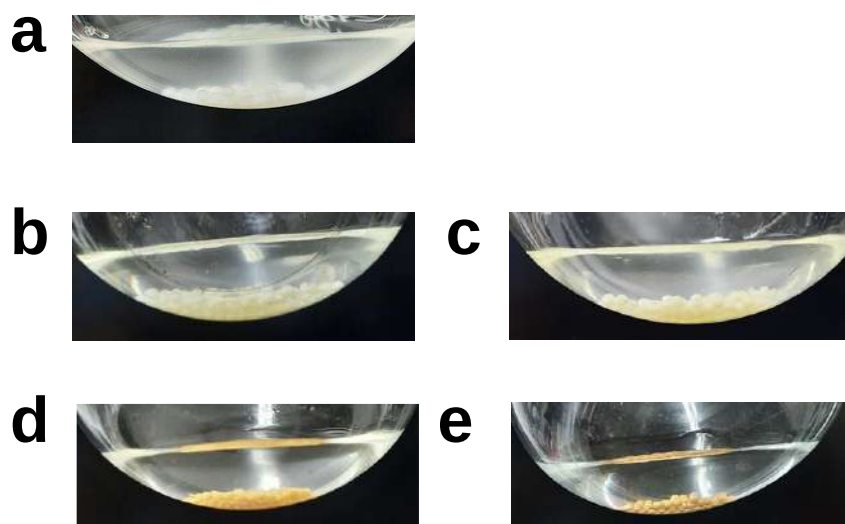


Figura A9. Sobrenadantes de reacción después de 170 h de reacciones de conversión de glicerol realizadas por diferentes preparaciones inmovilizadas de Gfr. a) A4. b) A4M1. c) A4M4. d) A4S1. e) A4S4.



Figura A10. Preparaciones inmovilizadas de Gox en el material A4S4 luego de 24 h de uso.



Figura A11. Preparaciones inmovilizadas de Gox en el material A4S4 al comienzo del primer uso (a) y al finalizar el uso 7 (b).



Figura A12. Vista del tubo en el que se enviaron los cubos de Material A desde la Universidad de Edimburgo. Se observa el desprendimiento de partículas del material, causado durante el transporte hacia el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay.

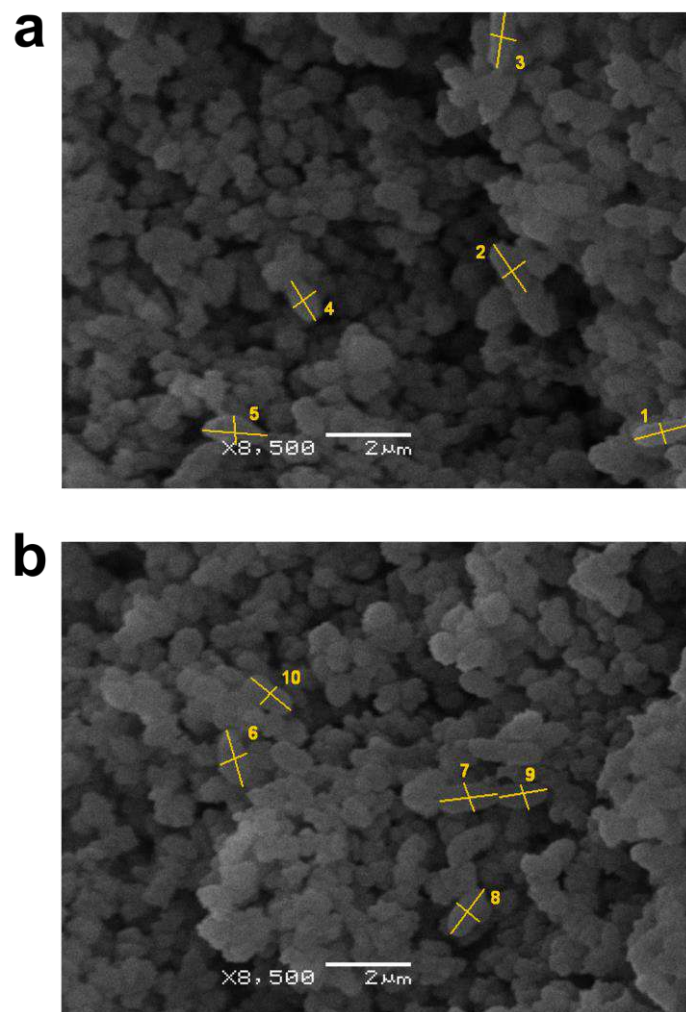


Figura A13. Estimación del tamaño por medio de Gfr a través de la determinación del ancho y largo de las bacterias observadas en dos imágenes obtenidas por SEM. El programa utilizado fue *ImageJ*. La numeración de las bacterias se corresponde con los datos presentados en la Tabla A1.

Tabla A1. Estimación del tamaño promedio de Gfr a través de las mediciones obtenidas utilizando el programa *ImageJ*. La numeración de las bacterias se corresponde con los datos presentados en la Figura A13.

Bacteria	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	1,348	0,497
2	1,306	0,633
3	1,292	0,598
4	1,065	0,633
5	1,493	0,653
6	1,354	0,657
7	1,335	0,688
8	1,274	0,661
9	1,109	0,588
10	1,173	0,544
Promedio (μm)	1,27 $\pm$ 0,13	0,61 $\pm$ 0,06
Área superficial estimada (μm^2)	0,62	
Área superficial estimada (cm^2)	6,2E-09	

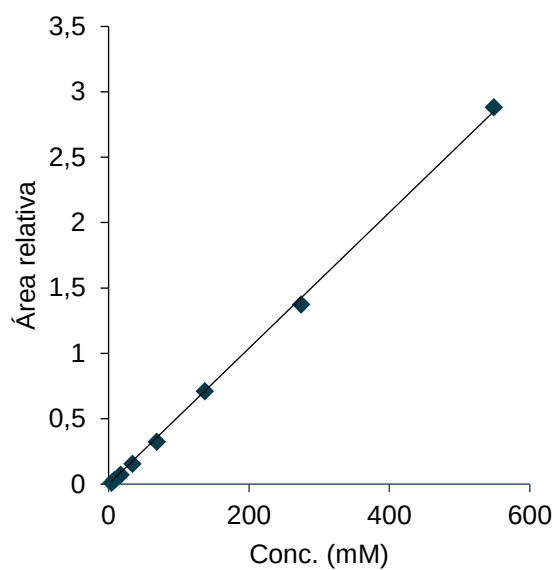


Figura A14. Curva de calibración de GC-FID para serinol ($y=0,0052x$, $R^2=0,9995$).

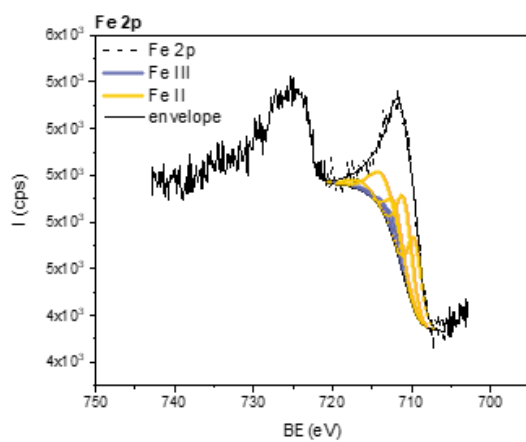


Figura A15. Evaluación por XPS del estado de oxidación de los iones hierro en la superficie de las SiNPsTAFE.

Anexos Perspectivas futuras

A1. Modificación genética de Gfr por CRISPRi

A1.1. Cepas bacterianas

Tanto las cepas bacterianas utilizadas como su metodología de mantenimiento fueron las mismas que se detallan en la sección “2.2.1. Cepas bacterianas”.

A1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados durante estos experimentos fueron los detallados en las secciones “2.2.2. Reactivos generales” y “2.2.3. Reactivos de biología molecular”.

A1.3. Construcción de plásmido pCRISPRi-Bsal

La construcción del plásmido pCRISPRi-Bsal se llevó a cabo a partir del plásmido pCRISPR-Bsal y el plásmido pTWIST-CRISPRi. Los mismos fueron digeridos con las enzimas Sall y EcoRV. La obtención de los productos de digestión se realizó a partir de una corrida previa en geles de agarosa al 0,8% o al 1% donde se cortaron las bandas de interés y posteriormente fueron purificadas. A continuación, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos purificados del plásmido pCRISPR y el pTWIST-CRISPRi. La construcción obtenida fue denominada pCRISPRi-Bsal y fue verificada por secuenciación como se detalla más adelante en la sección “A1.5. Secuenciación de plásmidos”.

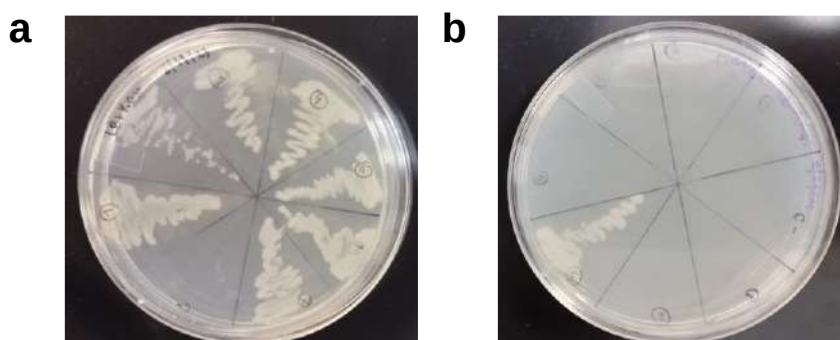


Figura A16. Estrías de los clones obtenidos luego de la transformación de *E. coli* DH5α con el potencial plásmido pCRISPRi-Bsal. a) Estrías en medio LB-kanamicina (50 µg/mL): Clones 1 a 7 y control negativo de crecimiento (*E. coli* DH5α sin plásmido). b) Estrías en medio LB-ampicilina (100 µg/mL): Clones 1 a 7 y control negativo de crecimiento (*E. coli* DH5α sin plásmido). La capacidad de crecer únicamente en kanamicina y no en ampicilina indica la presencia del plásmido correcto. La capacidad de crecer en presencia de ambos antibióticos implica la presencia del plásmido alternativo no esperado.

A1.4. Generación y clonado de guías en plásmido pCRISPRi-Bsal para obtener los plásmidos pCRISPRi-G1 y pCRISPRi-G2

El diseño de las guías (G1 y G2) se llevó a cabo utilizando la herramienta en línea *CRISPR RGEN Tools* (<http://www.rgenome.net/>) (Tabla 27). El protocolo para la generación de los oligos, su *annealing* y posterior clonado en el plásmido pCRISPR fue tomado de los recursos informáticos del Laboratorio del Dr. Feng Zhang, disponibles en la web del repositorio *Addgene*²⁹². Los oligos fueron sintetizados por la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur). La enzima de restricción utilizada fue Bsal.

A1.5. Secuenciación de plásmidos

La secuenciación del plásmido pCRISPRi-Bsal fue llevada a cabo por la empresa *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur). Los cebadores utilizados para llevar a cabo las reacciones de secuenciación se observan en la Tabla A2.

Tabla A2. Cebadores para secuenciación de plásmidos pCRISPR-guía, pCRISPRi-Bsal.

Cebadores		
Nombre	Secuencia	Descripción
Primer_CRISPRi_FWD	5' CATGAAGCAACTCAAGCGCC 3'	Cebador sentido para secuenciación de la mutación generada en el plásmido pCRISPRi-Bsal
Primer_CRISPRi_REV	5' GAATCCTGCCTTGTCAGCT 3'	Cebador antisentido para secuenciación de la mutación generada en el plásmido pCRISPRi-Bsal

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      485      495      505      515      525      535
pCRISPRi_C1 CTTACAGAAC GGCCGTGATA TGTACGTTGA TCAGGAGCTG GACATCAACC GCTTGTCTGA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      545      555      565      575      585      595
pCRISPRi_C1 CTACGACGTG GACCCGATCG TGCCGCAGAG CTTTCTCAAG GATGACAGTA TTGATAACAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      605      615      625      635      645      655
pCRISPRi_C1 AGTTCTTACC CGCTCGGACA AGAACCCTGG AAAGAGCGAC AATGTACCGT CAGAGAGGGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      665      675      685      695      705      715
pCRISPRi_C1 GGTGAAGAAA ATGAAGAATT ACTGGCGTCA GCTCTCAAT GCAAAACCTGA TTACACAGCG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      725      735      745      755      765      775
pCRISPRi_C1 CAAATTGAC AACCTTACCA AGGCGGAGCG CGGCGGACTT TCAGAGCTGG ACAGGCAGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      785      795      805      815      825      835
pCRISPRi_C1 ATTCATTAG CGTCAGCTTG TGGAGACGCG TCAGATTACA AAACACGTAG CCCAGATCCT

```

Figura A17. Producto de secuenciación del plásmido extraído del Clon 1 obtenido luego del clonado del fragmento que contiene la mutación H840A en el plásmido pCRISPR-BsaI, generando el plásmido pCRISPRi-BsaI que contiene la secuencia de la nucleasa dCas9. En azul se resalta la mutación esperada concordante con inserción del fragmento.

A2. Inmovilización de Gfr en soportes obtenidos por impresión 3D utilizando un reactor de lecho rotatorio (Material 2)

A2.1. Cepa bacteriana

La cepa bacteriana utilizada fue Gfr. La misma fue mantenida como se detalla en la sección “1.2.1. Cepas bacterianas”

A2.2. Reactivos

Los reactivos utilizados durante estos experimentos fueron los detallados en la sección “3.2.2. Reactivos generales”.

A2.3. Inmovilización de Gfr y conversión de glicerol en el reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

El protocolo de inmovilización de Gfr fue el mismo que el detallado en la sección “3.2.11. Inmovilización en soportes obtenidos por impresión 3D utilizando un reactor de lecho rotatorio”

A2.4. Biotransformación de glicerol a AG y DHA por preparados inmovilizados utilizando soportes obtenidos por impresión 3D en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio

El protocolo de conversión de glicerol fue el mismo que el detallado en la sección “3.2.19. Biotransformación de glicerol a AG y DHA por preparados inmovilizados utilizando soportes obtenidos por impresión 3D en un reactor *SpinChem* de lecho rotatorio”.

A3. **Inmovilización de Gfr en CNF-PEI-Si**

A3.1. Cepa bacteriana

La cepa bacteriana utilizada fue Gfr. La misma fue mantenida como se detalla en la sección “1.2.1. Cepas bacterianas”.

A3.2. Reactivos

La CNF-PEI fue sintetizada por el grupo de investigación de la Dra. Natalia Ferraz (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia). El TEOS fue de Merck (Darmstadt, Alemania). El resto de los reactivos utilizados durante estos experimentos fueron los detallados en la sección “3.2.2. Reactivos generales”.

A3.3. Preparación de CNF-PEI-Si

Se mezcló una suspensión de CNF-PEI (7,0 g de suspensión al 1,43 % en peso, 0,100 g de c-CNF seco, 0,042 mmol de PEI) junto con 20 mL de tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0 en un tubo de 50 mL. La mezcla se homogeneizó adecuadamente. Posteriormente, se incorporaron 1, 2,5 o 5 mL de TEOS previamente hidrolizado 0,63 M (mezcla de 942 μ L de TEOS + 6 mL de HCl 1 mM) y se agitó la mezcla durante 5 minutos. Tras la agitación, la suspensión fue sometida a centrifugación durante 25 minutos a 3800 rpm. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada, repitiendo el mismo protocolo de centrifugación de 25 minutos a 3800 rpm después de cada lavado.

A3.4. Análisis por SEM-EDS de los materiales CNF-PEI-Si

Los materiales CNF-PEI-Si fueron analizados por SEM-EDS para detectar Si. Las suspensiones de los materiales (en THF) se secaron al aire, se colocaron sobre un soporte de carbono y se recubrieron con una capa delgada de

oro/paladio utilizando un recubridor por pulverización catódica *Polaron SC7640* de *Thermo VG Scientific* (Massachusetts, EE. UU.). Las muestras fueron analizadas con un microscopio *SEM Zeiss LEO 1550* con detector SE2 y un detector de dispersión de energía EDS de *Zeiss* (Oberkochen, Alemania). Estos análisis fueron llevados a cabo por el grupo de investigación de la Dra. Natalia Ferraz (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia).

A3.5. Inmovilización de Gfr en CNF-PEI-Si

Para la inmovilización de la bacteria Gfr en la matriz CNF-PEI-Si se mezcló en un tubo de 50 mL un pellet bacteriano de 20 mg, 3,5 g de una suspensión de CNF-PEI al 143% (aproximadamente 0,05 g, 0,01 mmol de PEI), 10 mL de tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0 y 5 mL de TEOS hidrolizado 0,63 M (mezcla de 942 μ L de TEOS + 6 mL de HCl 1 mM). La mezcla se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se centrifugó la suspensión durante 15 minutos a 3800 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó, y se realizaron dos lavados con 15 mL de agua destilada, repitiendo el protocolo de centrifugación después de cada lavado.

Anexos Publicaciones

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se publicaron cinco artículos científicos, que incluyen tres revisiones y dos trabajos de investigación. De estos, tres fueron publicados como primera autora, y los dos restantes como segunda.

Además, se cuenta con un artículo de investigación actualmente en revisión, y otros dos en fase de preparación.

A continuación, se presentan las versiones publicadas de los cinco trabajos mencionados.



Opportunities for the valorization of industrial glycerol *via* biotransformations

Magdalena Ripoll^{1,2} and Lorena Betancor¹

Industrial biotechnology faces the challenge of providing significant economic advantages using sustainable processes either to establish new processes, to displace established processes or valorize industrial waste. Crude glycerol obtained as a by-product of biodiesel production has very low market value but can be valorized *via* microbial bioconversions. This work revises efforts made by the scientific community to optimize the crude glycerol microbial biotransformation into dihydroxyacetone, one of the most valuable compounds obtained from this feedstock. Attention to the many aspects of process optimization to increase productivity has been addressed that are also transversal to other glycerol biotransformations to obtain improved yields.

Addresses

¹ Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Montevideo, 11100, Uruguay

² Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

Corresponding author: Betancor, Lorena (betancor@ort.edu.uy) Email address: ripoll_m@ort.edu.uy (M. Ripoll)

Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry 2021, 28:100430

This review comes from a themed issue on **SI G & S Chem**

Edited by **Klaus Kümmerer** and **Zhimin Liu**

<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100430>

2452-2236/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Biotransformations are green bioprocesses generally advantageous over conventional chemical methods since they often achieve high catalytic efficiencies, selectivity and easy or no downstream processing. Furthermore, biotransformations are carried out under mild conditions with lower energy requirements, offering environmentally clean technologies [1].

Interest in bioprocesses have escalated in the past 10 years. However, the contribution of biocatalysis and biotransformations to green chemistry has been timidly acknowledged in the literature and poorly translated into industry (Figure 1). It is timely then, that both the scientists and technologists tackle the problems that reduce the pace of implementation of industrial biotransformations. Such problems often arise from lower conversion efficiencies compared to established

technologies and/or less cost-effective processes. In this regard, process intensification in bioprocesses is of paramount importance for an optimal design that complies with quality standards, enhances the conversion efficiencies, reduces costs, and considers environmental aspects [2–4].

Both green chemistry and industrial biotechnology share the challenge of providing significant economic advantages using sustainable processes to displace processes that are currently being used with wide industrial acceptance, or include new waste recovery processes that integrate the concept of biorefinery for a circular economy [5]. Moreover, its use in the valorization of industrial by-products may have a paramount importance in the economic viability and sustainability of these processes.

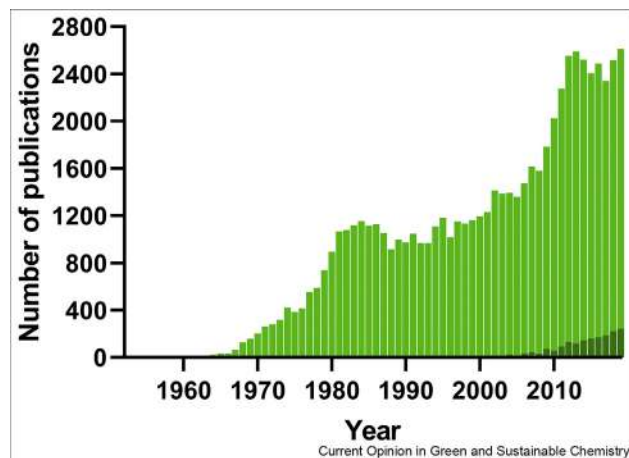
One of the identified sources of greenhouse gas emissions is the use of fossil fuels, directly related to global warming and climate change. Among other policies, countries have committed to ramp up the use of renewable energy sources with biodiesel representing a significant potential for sustainability and economic growth [6]. However, industrial and productive changes often sweep along problems that paradoxically threatens the sustainability of the proposed solutions. Circularity in industrial processes accounts for many of these problems, especially in the biodiesel industry where production from edible biomass has been surmounted by second or third generation biofuel production [7].

In this review, we focus on biotechnological solutions for the valorization of a major by-product of the biodiesel industry (raw or industrial glycerol) as a reference that could be extended to other industrial processes related to the contribution of biotransformations to more sustainable processes.

Industrial glycerol: a problem with biotechnological solutions

Biodiesel is a renewable alternative to fossil fuels produced from vegetable oils and animal fats through transesterification processes with alcohol, generally catalyzed by NaOH or KOH. Glycerol is the main by-product from this industry, generated in a 10:1 ratio [8,9] (Figure 2). Crude glycerol obtained after the transesterification process is heavily contaminated, reaching maximum purity levels of 60–80% [10]. Owing to its large supply and low demand, crude glycerol has

Figure 1

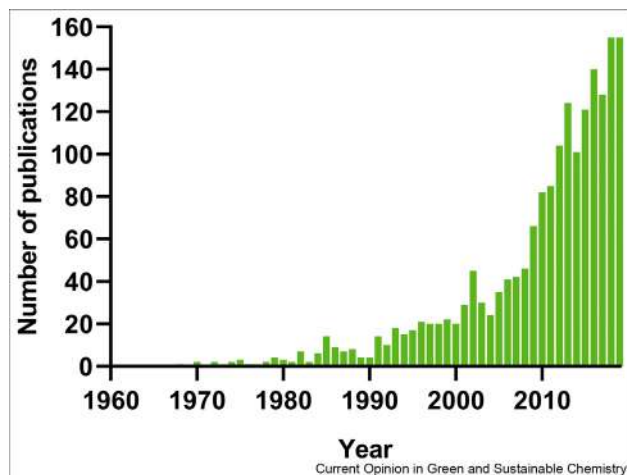


Publications related to biotransformations (light green) and biotransformations + green chemistry (dark green). Source: Scopus. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

very poor market value. In turn, obtaining pure glycerol from this residue for the use in the chemical or food industries (>99%) is very expensive [8]. Moreover, owing to market fluctuations, glycerol prices frequently drop dramatically forcing companies to take nonenvironmentally friendly actions such as disposal *via* incineration [11].

The increasing quota of biodiesel in fuels aimed by numerous countries has aggravated the aforementioned problems encouraging scientists to find ways to valorize

Figure 3

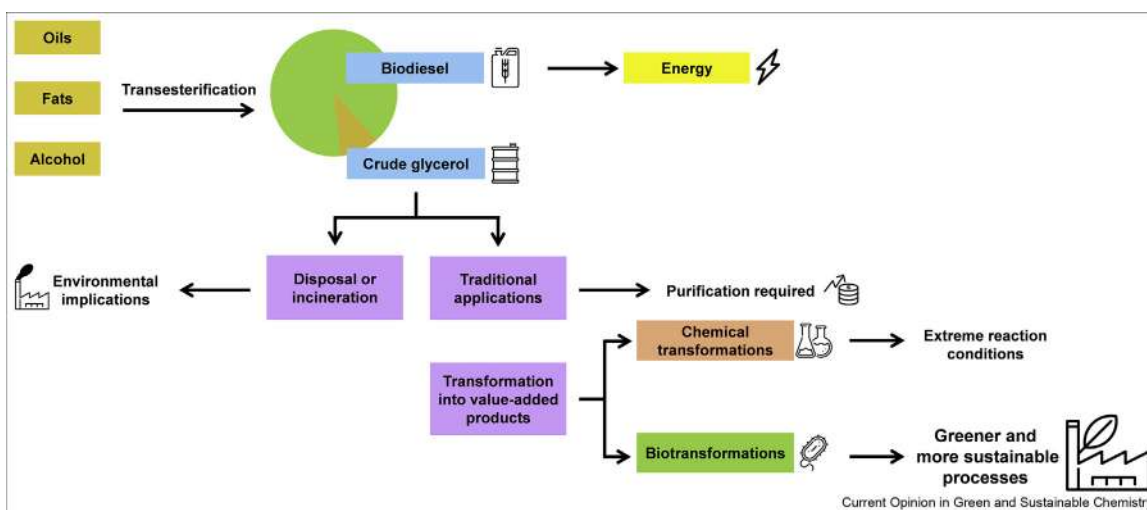


Publications related to biotransformations and glycerol. Source: Scopus.

this product. Solutions may not only address the waste problem but also improve the economic equation of biodiesel production. Crude glycerol valorization can be achieved through its conversion to other high value-added products, although it is imperative to use clean and sustainable approaches. One of the main lines of investigation studying glycerol valorization has been the use of biotransformation technologies whose reports have grown exponentially the last decade (Figure 3).

In fact, most of the high value-added compounds obtained from crude glycerol are the product of microbial bioconversions. Table 1 summarizes the most recent

Figure 2



Crude glycerol origin and possibilities for its utilization.

Table 1

Recent publications in crude glycerol bioconversions to value-added products using microorganisms.

Product	Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
Malic acid	<i>Aspergillus niger</i> PJR1	Growing cells (batch fermentation in shake flask)	160	83.23 ± 1.86	192	[12]
	<i>Aspergillus niger</i> PJR1	Growing cells (batch fermentation)	161.56	92.64 ± 1.54	92	[13]
1,3-Propanediol	<i>L. reuteri</i> CH53	Growing cells in fed-batch fermentation (5 L, volume 3 L)	450 g/L crude glycerol + 450 g/L glucose, 21 mL/h	68.32 ± 0.84	54	[14]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> PD41	Growing cells (batch fermentation with acid pretreated liquor (0.5% v/v) as co-substrate, shake flask)	30	20.88	24	[15]
	Mixed culture from mangrove sediment	Growing cells in batch fermentation (10 L fermenter, volume 3.5 L)	60	20.95	70	[16]
	Mixed culture from mangrove sediment	Growing cells in fed-batch fermentation (10 L fermenter, volume 3.5 L)	Starting 20 g/L, daily pulses of 30 g/L. Equivalent to 140 g/L in 5 days	30.94	120	[16]
	Microbial consortium	Growing cells in continuous fermentation (2 L fermenter, volume 1 L)	130 g/L and a dilution rate of 0.096 h ⁻¹	57.86	11	[17]
	<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC 116 (ATCC 6013)	Growing cells in batch ultrasound-assisted fermentation (100 mL serum bottle, 50 mL volume)	7.5	1.72	12	[18]
	Sludge of a mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor used for the treatment of poultry slaughterhouse wastewater	Anaerobic fluidized bed reactor with biomass immobilized in extended clay particles	10	4.43	9.24	[19]
	<i>K. pneumoniae</i> BLh-1	Growing cells in an exponential fed-batch culture. Anaerobiosis.	15 g/L. Feeding with crude glycerol started after 4 h. Growth rate fixed at 0.105 h ⁻¹	38.5	27	[20]
2,3-Butanediol	<i>K. pneumoniae</i> SRP2 and <i>K. variicola</i> SRP3	Growing cells (batch fermentation, shake flask)	37.5	27.87	96	[21]
	<i>R. ornithinolytica</i> B6 overexpressing budABC	Growing cells in fed-batch fermentation, 3 L fermenter with 1 L volume	50 g/L. When the residual glycerol concentration dropped below 20 g/L, 100 mL of a glycerol stock solution (540–600 g/L) was supplied	78.1	126	[22]
Glyceric acid	<i>A. tropicalis</i> CHM061701	Resting cells in shake flask (50 mL, 250 mL flask)	125 g/L + 10% methanol	4.5	48	[23]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Product	Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
Butyrate	<i>A. methanolic</i> NBRC104435	Growing cells in batch fermentation (300 mL flask, 30 mL volume)	30 g/L + 1% methanol	12.8	96	[24]
	<i>G. frateurii</i> NBRC 103465	Resting cells in shake flask (30 mL, 250 mL flask)	25 g/L	0.62 ± 0.18	45	[25]
	<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC 116 (ATCC)	Growing cells in batch ultrasound-assisted fermentation (100 mL serum bottle, 50 mL volume)	7.5	1.25	12	[18]
Citric acid	<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 5029	Growing cells in batch fermentation in shake flasks (250 mL flask, 50 mL volume)	170	79.0	528	[26]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> NG40/UV5	Growing cells in fed-batch fermentation (10 L fermenter, 5 L volume)	Non-declared	100 ± 3.4	96	[27]
	<i>Y. lipolytica</i> AJD pADUTGut1/2 from	Growing cells in batch fermentation (5 L fermenter, 2 L volume)	150	33.4	144	[28]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> SKY7	Growing cells in fed-batch fermentation	Starting carbon concentration 10–13 g/L, when concentration went below 2 g/L, a carbon feed was added to initial concentration	18.70	96	[29]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20460	Growing cells in batch fermentation (250 mL conical flasks, 50 mL volume)	45	27.8	142	[30]
Isocitric acid	<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5031	Growing cells in shake flasks (250 mL flasks, 50 mL volume)	70 g/L + 2.0 g/L phenolic compounds + NaCl 0.5 w/w%	54.0	233	[31]
	<i>Y. lipolytica</i> AJD pADUTGut1/2 from	Growing cells in batch fermentation (5 L fermenter, 2 L volume)	150	42.5 ± 2.4	144	[28]
Erythritol	<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 5029	Growing cells in batch fermentation in shake flasks (250 mL flask, 50 mL volume)	170	65.8	528	[26]
	<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5031	Growing cells in shake flasks (250 mL flasks, 50 mL volume)	70	8.8	164	[31]
Lipids	<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 5029	Growing cells in batch fermentation in shake flasks (250 mL flask, 50 mL volume)	170	2.54	408	[26]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> SKY7	Growing cells in fed-batch fermentation	Starting carbon concentration 10–13 g/L, when concentration went below 2 g/L, a carbon	14.78	96	[29]

Table 1 (continued)

Product	Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM4444	Growing cells in batch fermentation (250 mL conical flasks, 50 mL volume)	feed was added to initial concentration 92 ± 12	12.5	330	[30]
	<i>Y. lipolytica</i> AJD GUT1/SCT1	Growing cells in batch fermentation (5 L fermenter, 0.8 L volume)	150	2.5	96	[32]
	<i>Y. lipolytica</i> SM7	Growing cells in batch fermentation (5 L fermenter)	89 g/L + 30 g/L citric acid + 100 µg/L biotin	15	100	[33]
	<i>R. glutinis</i> NRRL YB-252	Growing cells in batch fermentation (250 mL conical flasks, 50 mL volume)	80	7.2	216	[34]
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IIP32 MTCC 25056	Growing cells in fed-batch fermentation (15 L fermenter, 12 L volume)	20 g/L + one feeding pulse to 20 g/L after 45 h	5.6	192	[35]
	<i>R. mucilaginosa</i> ATCC 66034	Growing cells in shake flasks (500 mL flasks, 100 mL volume)	50 g/L in deproteinized potato wastewater	4.76 ± 0.25	120	[36]
	<i>Candida viswanathii</i> Y-E4	Growing cells in shake flasks (500 mL flasks, 100 mL volume)	75	13.6	168	[37]
	<i>Y. lipolytica</i> SKY7	Growing cells in fed-batch fermentation (3 L volume)	25 g/L, when concentration reached below 5 g/L, pulse to 20–25 g/L	19.47	96	[38]
	<i>Rhodotorula gracilis</i> ATCC 10788	Growing cells in batch mode (5 L fermenter, 3.5 L volume)	30 g/L in potato wastewater	3.45 ± 0.38	120	[39]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> SKY7	Growing cells in shake flasks	40 g/L + 20 g/L sludge	15.49	96	[40]
	<i>N. albidus</i> (C. albidus KCTC 17541)	Growing cells in fed-batch fermentation (2 L fermenter, 1 L volume)	5 g/L + yeast extract 0.5 g/L, 10 times concentrated onion hydrolysate 25 mL, every 24 h	7.2	168	[41]
Mannitol	<i>Y. lipolytica</i> FMCC Y75	Growing cells in batch fermentation (250 mL conical flasks, 50 mL volume)	40	12.1	120	[34]
	<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5031	Growing cells in shake flasks (250 mL flasks, 50 mL volume)	70	13.4	188	[31]
Itaconic acid	<i>Aspergillus niveus</i> MG183809.1	Growing cells in shake flasks (100 mL volume)	40 g/L + 30 g/L algal biomass hydrolysate	31.55 ± 1.25	168	[42]
Lactic acid	<i>Lactobacillus casei</i> NCIM 2125	Growing cells in shake flasks (250 mL flasks, 100 mL volume)	15	2.69 ± 0.05	40	[43]
	<i>E. coli</i> EcoB-170			115	35	[44]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Product	Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
Arabitol	<i>K. phaffii</i> Glpard	Growing cells in fed-batch mode (fermenter, 1 L volume)	30 g/L and pulse to 90 g/L at 10 h			
		Growing cells in fed-batch mode (3 L fermenter, 1 L volume)	80 (in one -pulse)	30	46	[45]
	<i>K. phaffii</i> Glp	Growing cells in batch mode (5 L fermenter, 3.5 L volume)	100	7.02	60	[45]
		<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y69	Growing cells in shake flasks (250 mL flasks, 50 mL volume)	47.5	360	[34]
Carotenoids	<i>Rhodotorula glutinis</i> LOCKR13	Growing cells in shake flasks (500 mL flasks, 100 mL volume)	50 g/L in deproteinized potato wastewater	0.00646 ± 0.00053	120	[36]
	<i>Rhodotorula gracilis</i> ATCC 10788	Growing cells in batch mode (5 L fermenter, 3.5 L volume)	30 g/L in potato wastewater	0.00573 ± 0.00028	120	[39]
PHB	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Growing cells in shake flasks (1 L flasks, 200 mL volume)	20	5.26	36	[46]
P(3HB-co-3HV)	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Growing cells in shake flasks (1 L flasks, 200 mL volume)	20 g/L + valeric acid in four equal pulse installments of 1 g/L at an interval of 8 h (from 12 h to 36 h)	4.84	36	[46]
Propionic acid	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> DSM 20273	Growing cells in static bottles (2 L bottles, 1 L volume)	25.2	8.49 ± 1.40	312	[47]
	Sludge of a mesophilic UASB reactor used for the treatment of poultry slaughterhouse wastewater	Anaerobic fluidized bed reactor with biomass immobilized in extended clay particles	15	2.70	2	[19]
	Sludge of a mesophilic UASB reactor used for the treatment of poultry slaughterhouse wastewater	Anaerobic fluidized bed reactor with biomass immobilized in grounded tire particles (1139 cm ³ volume)	5	5.1	0.5	[48]
Succinic acid	<i>E. coli</i> K-12	Immobilized cells in alginate in shake flasks (50 mL volume)	30	117.99	4	[49]
	<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	In-situ fibrous bed bioreactor with immobilized bacteria (2.5 L fermenter)	120 g/L + When residual glycerol was below 15 g/L, about 80–100 mL of 700 g/L crude glycerol was fed to supplement the carbon source	209.7	322	[50]
	Isolate AKR177	Growing cells in fed-batch mode (350 mL reactors, 140 mL volume)	67 g/L + When residual glycerol was below 5 g/L, pulse feed to 20 g/L	86.9	264	[51]
	<i>Enterobacter</i> sp. LU1		27.5	20.27 ± 0.6	120	[52]

Table 1 (continued)

Product	Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
	<i>A. succinogenes</i> (ATCC 55618™)	Growing cells in serum bottles (100 mL bottles, 20 mL volume) Immobilized cells in agar in batch fermentation (1 L fermenter, 700 mL volume)	10	10.8	240	[53]
	<i>Enterobacter</i> sp. LU1	Growing cells in fed-batch mode (2 L fermenter, 1.8 L volume)	50 + pulse to 30 g/L at 186 h. Pulses involved also the addition of lactose.	69.0 ± 2.50	288	[54]
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655 with <i>M. formicicum</i> JF-1	Growing cells in rubber-stoppered infusion bottles (250 mL bottles, 100 mL)	6.4	2.35	96	[55]
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655 + formate removing inoculum	Growing cells in rubber-stoppered infusion bottles (250 mL bottles, 100 mL)	2.64	0.86	168	[56]

works on the biotransformations of crude glycerol. We have intentionally excluded dihydroxyacetone (DHA) as it will be discussed more in detail in the next section. Considering the literature of the last 4 years, the most popular target products are mainly 1,3 propanediol, succinic acid, and lipids apart from DHA. These all marketable compounds are mainly produced by *Gluconobacter*, *Klebsiella*, and *Clostridium*, whereas species of yeasts and genetically modified *Escherichia coli* are starting to emerge. Moreover, studies on bacterial consortiums of unknown origin have been recently reported for some of the products. The studies demonstrate an ongoing need for process optimization to achieve improved yields as many of the reports are explorative studies at laboratory scale using batch fermentation technology in flasks.

In the next section of the review, we will draw the reader's attention to the last efforts made by the scientific community to optimize the crude glycerol microbial biotransformation into DHA, one of the most valuable compounds obtained from this feedstock. Taken as a case study, the glycerol biotransformation into DHA serves to address the sensible points that are transversal to other glycerol biotransformations to obtain improved yields.

DHA

DHA is a ketotriose found in some plants as a result of glycerol oxidation [57]. It is the simplest ketose known, with no chiral centers and no optical activity [58]. It is

widely known as it is one of the main ingredients of sunless tan lotions [59], therapeutic agent [60,61], and a valuable building block for the synthesis of industrially relevant compounds [57]. Moreover, DHA can be used as a donor in synthetic reactions using aldolases as catalysts for the stereoselective formation of C–C bonds [62].

DHA synthesis can be carried out by chemical or biotechnological methods [63]. The chemical synthesis of this compound proceeds through catalytic oxidation of glycerol or through formaldehyde condensation with calcium carbonate. The latter proceeding in a nonhomogeneous fashion, resulting in the formation of other additional compounds, with poor reaction yields [60]. Furthermore, DHA can be synthesized by biotechnological means that mainly consist in the partial oxidation of glycerol to DHA by acetic acid bacteria such as *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter melanogenus*, and *Acetobacter xylinum*. Currently, industrial synthesis of DHA is carried out by growing cells of bacteria of the species *G. oxydans* [57]. This synthesis was patented by Merck in 1998 [64]. In recent years, several alternatives to the patented bioprocess were studied (Table 2). Bioconversions using whole cells in growing phase necessitate complex reaction media. This not only brings up the production costs but also makes downstream processing more challenging. To solve this problem, Poljungreed and Boonyarattanakalin studied the production of DHA by *Gluconobacter*

Table 2

Recent publications in DHA production using microorganisms.

Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 621	Resting cells in water, (batch fermentation in shake flask)	50	30.96	96	[66]
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 621	Whole cells immobilized in alginate (batch fermentation in shake flask)	50	15.6	96	[66]
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 621	Free cell extract (batch fermentation in shake flask)	30	19.92	96	[66]
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 621	Cell extract immobilized in alginate (batch fermentation in shake flask)	30	9.6	96	[66]
<i>Gluconobacter oxydans</i> MTCC 904	Growing cells (batch fermentation with mechanical shaking and sonication, shake flask)	20	11.64	24	[67]
<i>Gluconobacter oxydans</i> MTCC 904	Whole cells immobilized in polyurethane foam (batch fermentation with mechanical shaking and sonication, shake flask)	20	12.46	24	[67]
<i>G. thailandicus</i> TBRC 3351	Growing cells in crude glycerol (shake flask)	60	39.9 ± 3.96	72	[68]
<i>G. thailandicus</i> TBRC 3351	Growing cells in treated crude glycerol (shake flask)	60	56.1 ± 1.87	72	[68]
<i>G. thailandicus</i> TBRC 3351	Growing cells in crude glycerol (batch reactor 7 L, volume 3 L)	60	53.8 ± 4.25	108	[68]
<i>G. thailandicus</i> TBRC 3351	Growing cells in treated crude glycerol (7 L batch reactor, volume 3 L)	60	61.9 ± 2.57	138	[68]
<i>G. thailandicus</i> TBRC 3351	Growing cells in treated crude glycerol (7 L fed-batch reactor, volume 4 L)	Concentration fixed between 10 and 30 g/L	65.05 ± 4.52	156	[68]
<i>G. frateurii</i> NBRC 103465	Resting cells in phosphate buffer (shake flask)	25	18.12 ± 1.94	45	[25]
<i>G. oxydans</i> NBRC 14819	Resting cells in phosphate buffer (shake flask)	50	45.62 ± 5.71	45	[25]
<i>G. oxydans</i> NBRC 14819	Resting cells in water (shake flask)	50	42.10 ± 2.32	20	[25]
<i>Gluconobacter oxydans</i> MTCC 904	Whole cells immobilized in polyurethane foam	20	17.83	120	[69]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904		20	16.24	60	[70]

Table 2 (continued)

Organism	Technology	Starting crude glycerol concentration (g/L)	Highest yield achieved (g/L)	Approximate time for highest yield (hs)	Reference
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Growing cells (batch fermentation in shake flask) Whole cells immobilized in polyurethane foam (batch fermentation in shake flask)	20	17.83	60	[70]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Resting cells in phosphate buffer (batch fermentation in shake flask)	20	16.32	60	[70]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Growing cells (repeated batch fermentation in shake flask)	20 g/L initial concentration, 2 additional pulses of 15 g/L	35.0	204	[70]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Whole cells immobilized in polyurethane foam (repeated batch fermentation in shake flask)	15 g/L initial concentration, 4 additional pulses of 15 g/L	65.64	288	[70]
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Resting cells in phosphate buffer (repeated batch fermentation in shake flask)	20 g/L initial concentration, 4 additional pulses of 20 g/L	47.90	216	[70]
<i>G. oxydans</i> ATCC 621	Cell extract immobilized in alginate (batch fermentation, shake flask)	30	8.90 ± 0.03	48	[71]
<i>G. oxydans</i> ATCC 621	Reused cell extract immobilized in alginate (batch fermentation, shake flask)	30	8.70 ± 0.06	24	[71]
Mixed culture from mangrove sediment	Growing cells in batch fermentation (10 L fermenter, volume 3.5 L)	60	20.95	70	[16]
Mixed culture from mangrove sediment	Growing cells in fed-batch fermentation (10 L fermenter, volume 3.5 L)	Starting 20 g/L, daily pulses of 30 g/L. Equivalent to 140 g/L in 5 days	30.94	120	[16]
Microbial consortium	Growing cells in continuous fermentation (2 L fermenter, volume 1 L)	130 g/L and a dilution rate of 0.096 h ⁻¹	57.86	11	[17]

frateurii BCC36199 in a simplified reaction media [65]. By replacing the yeast extract on the media with an inorganic source of nitrogen such as (NH₄)₂SO₄, they were able to increase the amount of DHA produced from 23.77 ± 1.30 g/L to 28.89 ± 0.17 g/L [65]. These findings could be further applied to crude glycerol bioconversions and contribute to the sustainability of the process.

Our group studied the DHA production from crude glycerol in a minimal medium but instead of growing cells. Resting cells of *G. oxydans* NBRC 14819 were used for the conversion of crude glycerol [25]. In bio-transformations with growing cells, secondary reactions are bound to happen due to the active bacterial metabolism further contaminating with by-products the already complex reaction media. The use of resting cells

surmounts this issue as they are in a nongrowing state in which secondary reactions are minimized. As a starting point, we carried out the biotransformation of pure glycerol to DHA in nonsterile conditions, with a minimum medium consisting of 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. Conversion kinetics were studied after 45 h starting from 50 g/L (*G. oxydans*) of crude glycerol. *G. oxydans* was able to produce 45.62 ± 5.71 g/L of DHA, proving that crude glycerol conversion to DHA can be also carried out in a minimum media. The promising results obtained with *G. oxydans* prompted our group to further simplify the reaction media for the conversion of crude glycerol to DHA by using only water. Similar results were obtained with regular water, achieving the production of 40.18 ± 0.04 g/L of DHA in the same time frame. We believe the process optimization undertaken in this work have significantly increased the implementation potential of this bioconversion.

Crude glycerol composition may vary depending on the origin of oils and fats, and the reaction conditions used during the transesterification process [10]. Mainly, this by-product is contaminated with ashes, fats, methanol, and chlorides [8]. The contaminants can affect the DHA production from this feedstock, so it is of great importance to develop simple processes that can remove these contaminants before bioconversions. In a recent study, Jittjang et al. treated crude glycerol derived from palm oil by ion exchange chromatography to remove NaCl, with a 74% removal yield [68]. DHA conversion studies carried out in shake flasks by *Gluconobacter thailandicus* TBRC 3351 indicated from treated glycerol achieved a $96 \pm 3.19\%$ yield instead of 70% in 72 h with the untreated substrate. As substrate inhibition is a well-known problem in DHA production [72], the authors attempted to produce DHA in fed-batch mode to improve the reaction yield. The reaction was carried out in an initial volume of 4 L in a 7 L reactor. Unfortunately, because of product inhibition, the DHA concentration achieved after 156 h (65.05 ± 4.52 g/L) was not significantly different to that of the batch reaction.

Product inhibition is another well-known problem of DHA production using microorganisms [73]. Nonetheless, this problem may be solved by bacterial immobilization, as it allows the continuous and repeated use of biocatalysts. In recent years, there have been a series of publications concerning the immobilization of *Gluconobacter* species for DHA production. These reports are promising as they describe immobilization techniques that can potentially be applied at an industrial level.

Dikshit et al. reported the immobilization of *G. oxydans* MTCC 904 using a novel approach in polyurethane foam cubes was studied to produce DHA [69,74]. In these reports, yields of 89.16% and 93.95% were achieved starting from 20 g/L of crude and pure glycerol,

respectively, fitting the predicted values quite closely [69].

In addition, Dikshit et al. described an improvement in DHA production by the same immobilized strain of *G. oxydans* when the fermentation media is subjected to sonication [67,70].

Another interesting approach for the production of DHA is the use of bacterial cell extract as a catalyst. Recently, Stasiak-Różańska et al. described the immobilization of cell extract of *G. oxydans* ATCC 621 in an alginate matrix for the bioconversion of crude glycerol [66,71]. Considering the downsides of biotransformations with whole cells, such as the need for a complex media or the need to maintain the metabolic activity of the cells at a high level, the utilization of an enzymatic extract comes as an interesting alternative. In this case, the authors proved that an immobilized enzyme extract of *G. oxydans* ATCC 621 could be used to produce 7.40 ± 0.03 g/L of DHA starting from 30 g/L of crude glycerol in 168 h. Furthermore, this immobilized preparations were able to be reused at least once, achieving a 6.50 ± 0.01 g/L of DHA, which represents a 87.8% of residual activity [71].

Concerning the genetic modification of bacteria for the biotransformation of glycerol to DHA, Tan et al. recently published a paper describing the overexpression of the glycerol transporter and GlyDH in *G. oxydans* 621H mutant strains to improve glycerol uptake and the subsequent biotransformation [75]. The mutant strains produced nearly 8 g/L of DHA more than the control strain, further demonstrating that an overexpression of GlyDH leads to higher DHA titers. This result was supported by a study of transcript levels and a measurement of GlyDH activity that confirmed higher values for the mutant strains.

The above analyzed examples are illustrative of the many approaches to improve DHA productivity in glycerol biotransformations. In all the works analyzed, authors claim that there is still room for improvement, which is encouraging regarding a sustainable and greener process. Moreover, the different approaches reviewed could be extended to other glycerol biotransformations to ample the possibilities of valorization of this by-product.

Future perspectives and conclusions

Industrial biotechnology has still yet to capitalize on the benefits of biotransformations. There is still plenty of room to explore the contribution of biocatalysis for greener and more sustainable processes. In fact, the authors believe that the lack of formal analysis (i.e. green metrics) to the principles of green chemistry may restrict the implementation of many biotransformations. Valorization of industrial by-products could make a significant difference in the sustainability of productive

processes. Moreover, if the means for valorization include environmentally friendly approaches such as biotransformations, benefits are even greater. In the case of industrial glycerol, numerous ongoing studies demonstrate the feasibility of its valorization which impacts the overall sustainability of biodiesel production. Advances on process design and biocatalysts for glycerol biotransformation have ramped up the last 10 years but more are still necessary to improve the volumetric yields of target compounds. For instance, there are scarce reports on in-flow biotransformations that could substantially contribute to the green prospects of the process. Addressing issues of product or substrate inhibition *via* genetic modification of the biocatalysts or process design, may also enhance productivities. Moreover, powerful tools such as biocatalysts immobilization or metabolic engineering should also be considered regarding their potential to augment space-time yields. Integration of all these approaches could fuel the application of industrial glycerol biotransformation at large scale with a greener and more sustainable approach.

Funding

This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [POS_NAC_2019_1_158182].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

LB and MR thank PEDECIBA and CLR for fruitful discussions.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- * of special interest
- ** of outstanding interest

1. Sheldon RA, Woodley JM: **Role of biocatalysis in sustainable chemistry**. *Chem Rev* 2018, **118**:801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
2. Bolivar JM, Valikhani D, Nidetzky B: **Demystifying the flow: biocatalytic reaction intensification in microstructured enzyme reactors**. *Biotechnol J* 2019, **14**:1–30. <https://doi.org/10.1002/biot.201800244>.
3. Fernandez Rivas D, Boffito DC, Faria-Albanese J, Glassey J, Afraz N, Akse H, Boodhoo KVK, Bos R, Cantin J, (Emily) Chiang YW, Commenge JM, Dubois JL, Galli F, de Mussy JPG, Harmsen J, Kalra S, Keil FJ, Morales-Menendez R, Navarro-Brull FJ, Noël T, Ogden K, Patience GS, Reay D, Santos RM, Smith-Schoettker A, Stankiewicz AI, van den Berg H, van Gerven T, van Gestel J, van der Stelt M, van de Ven M, Weber RS: **Process intensification education contributes to sustainable development goals. Part 1**. *Educ Chem Eng* 2020, **32**:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ece.2020.04.003>.
4. Leemans Martin L, Peschke T, Venturoni F, Mostarda S: **Pharmaceutical industry perspectives on flow chemo- and biocatalysis**. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.011>.
5. Ariste AF, Batista-García RA, Vaidyanathan VK, Raman N, Vaithyanathan VK, Folch-Mallol JL, Jackson SA, Dobson ADW, Cabana H: **Mycoremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons from a biorefinery wastewater and concomitant production of lignin modifying enzymes**. *J Clean Prod* 2020, **253**. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119810>.
6. Estevez R, Aguado-Deblas L, Bautista FM, Luna D, Luna C, Calero J, Posadillo A, Romero AA: **Biodiesel at the crossroads: a critical review**. *Catalysts* 2019, **9**. <https://doi.org/10.3390/catal9121033>.
7. Zuin VG: **Circularity in green chemical products, processes and services: innovative routes based on integrated eco-design and solution systems**. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2016, **2**:40–44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.008>.
8. Ayoub M, Abdullah AZ: **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* 2012, **16**:2671–2686. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.054>.
9. Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K, Sakaki K: **Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol**. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:7760–7766. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-09>.
10. Tan HW, Abdul Aziz AR, Aroua MK: **Glycerol production and its applications as a raw material: a review**. *Renew Sustain Energy Rev* 2013, **27**:118–127. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>.
11. Bagheri S, Julkapli NM, Dabdawb WAY, Mansouri N: **Biodiesel-derived raw glycerol to value-added products: catalytic conversion approach**. *Handb Compos Renew Mater* 2017, **1**–8:309–365. <https://doi.org/10.1002/9781119441632.ch52>.
12. Iyyappan J, Baskar G, Bharathiraja B, Saravanathamizhan R: **Malic acid production from biodiesel derived crude glycerol using morphologically controlled Aspergillus Niger in batch fermentation**. *Bioresour Technol* 2018, **269**:393–399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.002>.
13. Iyyappan J, Bharathiraja B, Baskar G, Kamalanaban E: **Process optimization and kinetic analysis of malic acid production from crude glycerol using Aspergillus Niger**. *Bioresour Technol* 2019, **281**:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.067>.
14. Ju JH, Wang D, Heo SY, Kim MS, Seo JW, Kim YM, Kim DH, Kang SA, Kim CH, Oh BR: **Enhancement of 1,3-propanediol production from industrial by-product by Lactobacillus reuteri CH53**. *Microb Cell Factories* 2020, **19**:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1275-x>.
15. Vivek N, Christopher M, Kumar MK, Castro E, Binod P, Pandey A: **Pentose rich acid pretreated liquor as co-substrate for 1,3-propanediol production**. *Renew Energy* 2018, **129**:794–799. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.01.055>.
16. Pan C, Tan GYA, Ge L, Chen CL, Wang JY: **Two-stage microbial conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol and polyhydroxyalkanoates after pretreatment**. *J Environ Manag* 2019, **232**:615–624. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.118>.
17. Zhou JJ, Shen JT, Wang XL, Sun YQ, Xiu ZL: **Stability and oscillatory behavior of microbial consortium in continuous conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018, **102**:8291–8305. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9244-6>.
- ** Use of a novel approach in glycerol biotransformation using microbial consortium and continuous conversion.
18. Sarma S, Anand A, Dubey VK, Moholkar VS: **Metabolic flux network analysis of hydrogen production from crude glycerol by Clostridium pasteurianum**. *Bioresour Technol* 2017, **242**:169–177. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.168>.

19. Paranhos AG de O, Silva EL: **Statistical optimization of H₂, 1,3-propanediol and propionic acid production from crude glycerol using an anaerobic fluidized bed reactor: interaction effects of substrate concentration and hydraulic retention time.** *Biomass Bioenergy* 2020, **138**:105575. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105575>.
 20. Morcelli A, Rech R, Klafke A, Pelegrini R, Ayub MAZ: **Exponential fed-batch cultures of *Klebsiella pneumoniae* under anaerobiosis using raw glycerol as a substrate to obtain value-added bioproducts.** *J Braz Chem Soc* 2018, **29**:2278–2286. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180104>.
 21. Rahman MS, (Charles) Xu C, Qin W: **Biotransformation of biodiesel-derived crude glycerol using newly isolated bacteria from environmental consortia.** *Process Biochem* 2017, **63**: 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.017>.
 22. Kim T, Cho S, Woo HM, Lee SM, Lee J, Um Y, Seo JH: **High production of 2,3-butanediol from glycerol without 1,3-propanediol formation by *Raoultella ornithinolytica* B6.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2017, **101**:2821–2830. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8094-y>.
 23. Wang B, Pu Y, Gerken HG, Xie Y, Lin L, Chen H, Lu Y: **Production of D-glyceric acid by a two-step culture strategy based on whole-cell biocatalysis of *Acetobacter tropicalis*.** *Chem Biochem Eng Q* 2018, **32**:135–140. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2017.1181>.
 24. Sato S, Kitamoto D, Habe H: **Preliminary evaluation of glyceric acid-producing ability of *Acidomonas methanolica* NBRC104435 from glycerol containing methanol.** *J Oleo Sci* 2017, **66**:653–658. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16236>.
 25. Jackson E, Ripoll M, Betancor L: **Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells.** *MicrobiologyOpen* 2019, **8**:1–10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.926>.
- Biotransformation of crude glycerol into DHA and glyceric acid in water including process intensification strategies for better yields.
26. Sarris D, Rapti A, Papafotis N, Koutinas AA, Papanikolaou S: **Production of added-value chemical compounds through bioconversions of olive-mill wastewaters blended with Crude glycerol by a *Yarrowia lipolytica* strain.** *Molecules* 2019, **24**: 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules24020222>.
 27. Morgunov IG, Kamzolova SV, Lunina JN: **Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Yeast on different renewable raw materials.** *Fermentation* 2018, **4**. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020036>.
 28. Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, Mirończuk AM: **Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*.** *Bioresour Technol* 2019, **271**:340–344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.118>.
 29. Kumar LR, Yellapu SK, Yan S, Tyagi RD, Drogui P: **Elucidating the effect of impurities present in different crude glycerol sources on lipid and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SKY7.** *J Chem Technol Biotechnol* 2020. <https://doi.org/10.1002/jctb.6531>.
 30. Diamantopoulou P, Filippousi R, Antoniou D, Varfi E, Xenopoulos E, Sarris D, Papanikolaou S: **Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends.** *FEMS Microbiol Lett* 2020, **367**:1–29. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa063>.
 31. Tzirita M, Kremmyda M, Sarris D, Koutinas AA, Papanikolaou S: **Effect of salt addition upon the production of metabolic compounds by *Yarrowia lipolytica* cultivated on biodiesel-derived glycerol diluted with olive-mill wastewaters.** *Energies* 2019, **12**. <https://doi.org/10.3390/en12193649>.
 32. Dobrowolski A, Drzymała K, Mituła P, Mirończuk AM: **Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica*.** *Bioresour Technol* 2020, **314**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123746>. 0–3.
 33. Magdoulis S, Guedri T, Rouissi T, Brar SK, Blais JF: **Sync between leucine, biotin and citric acid to improve lipid production by *Yarrowia lipolytica* on crude glycerol-based media.** *Biomass Bioenergy* 2020, **142**:105764. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105764>.
 34. Filippousi R, Antoniou D, Tryfinopoulou P, Nisiotou AA, Nychas GJ, Koutinas AA, Papanikolaou S: **Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid.** *J Appl Microbiol* 2019, **127**:1080–1100. <https://doi.org/10.1111/jam.14373>.
 35. Bansal N, Dasgupta D, Hazra S, Bhaskar T, Ray A, Ghosh D: **Effect of utilization of crude glycerol as substrate on fatty acid composition of an oleaginous yeast *Rhodotorula mucilagenosa* LIPL32: assessment of nutritional indices.** *Bioresour Technol* 2020, **309**:123330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123330>.
 36. Kot AM, Błażej S, Kieliszek M, Gientka I, Bryś J: **Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater.** *Appl Biochem Biotechnol* 2019, **189**:589–607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>.
 37. Guerfali M, Ayadi I, Sassi HE, Belhassen A, Gargouri A, Belghith H: **Biodiesel-derived crude glycerol as alternative feedstock for single cell oil production by the oleaginous yeast *Candida viswanathii* Y-E4.** *Ind Crop Prod* 2020, **145**: 112103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112103>.
 38. Kumar LR, Yellapu SK, Tyagi RD, Drogui P: **Purified crude glycerol by acid treatment allows to improve lipid productivity by *Yarrowia lipolytica* SKY7.** *Process Biochem* 2020, **96**: 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.010>.
 39. Kot AM, Błażej S, Kieliszek M, Gientka I, Piwowarek K, Brzezińska R: **Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes.** *Biocatal Agric Biotechnol* 2020, **26**:101634. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101634>.
 40. Ram SK, Tyagi RD, Drogui P: **Effect of sludge concentration and crude glycerol matrix as a substrate on the production of single-cell oil by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* SKY7.** *Fermentation* 2018, **4**. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020024>.
 41. Sathiyamoorthi E, Dikshit PK, Kumar P, Kim BS: **Co-fermentation of agricultural and industrial waste by *Naganishia albid* for microbial lipid production in fed-batch fermentation.** *J Chem Technol Biotechnol* 2020, **95**:813–821. <https://doi.org/10.1002/jctb.6271>.
 42. Gnanasekaran R, Dhandapani B, Iyyappan J: **Improved itaconic acid production by *Aspergillus niger* using blended algal biomass hydrolysate and glycerol as substrates.** *Bioresour Technol* 2019, **283**:297–302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.107>.
 43. Sumitha V, Christy Mathelin R, Sivanandham M: **Effect of major and minor nutrients on lactic acid production using biodiesel waste-derived crude glycerol as a carbon source by *Lactobacillus casei* NCIM 2125.** *Energy Sources, Part A Recover. Util Environ Eff* 2018, **40**:1322–1331. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1475519>.
 44. De Wang Y, Liao JY, Chiang CJ, Chao YP: **A simple strategy to effectively produce D-lactate in crude glycerol-utilizing *Escherichia coli*.** *Biotechnol Biofuels* 2019, **12**:1–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1615-4>.
 45. Melo NTM, Pontes GC, Procópio DP, Cunha GC de G, Eliodório KP, Paes HC, Basso TO, Parachin NS: **Evaluation of product distribution in chemostat and batch fermentation in lactic acid-producing *Komagataella phaffii* strains utilizing glycerol as substrate.** *Microorganisms* 2020, **8**:1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050781>.
 46. Gahlawat G, Soni SK: **Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner.** *Bioresour Technol* 2017, **243**:492–501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.139>.
 47. Ganigué R, Naert P, Candry P, de Smedt J, Stevens CV, Rabaey K: **Fruity flavors from waste: a novel process to**

- upgrade crude glycerol to ethyl valerate. *Bioresour Technol* 2019, **289**:121574. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121574>.
48. Nazareth TC, de Oliveira Paranhos AG, Ramos LR, Silva EL: **Valorization of the crude glycerol for propionic acid production using an anaerobic fluidized bed reactor with grounded tires as support material.** *Appl Biochem Biotechnol* 2018, **186**: 400–413. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2754-y>.
 49. Nik Nor Aziati AA, Mimi Sakinah AM: **Efficient production of succinic acid in immobilized fermentation with crude glycerol from *Escherichia coli*.** *Food Res* 2018, **2**:110–118. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(1\).156](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(1).156).
 50. Li C, Gao S, Yang X, Lin CSK: **Green and sustainable succinic acid production from crude glycerol by engineered *Yarrowia lipolytica* via agricultural residue based in situ fibrous bed bioreactor.** *Bioresour Technol* 2018, **249**:612–619. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.011>.
 51. Kuenz A, Hoffmann L, Goy K, Bromann S, Prüße U: **High-level production of succinic acid from crude glycerol by a wild type organism.** *Catalysts* 2020, **10**. <https://doi.org/10.3390/catal10050470>.
 52. Podleśny M, Kubik-Komar A, Kucharska J, Wyrostek J, Jarocki P, Targoński Z: **Media optimization for economic succinic acid production by *Enterobacter* sp. LU1.** *AMB Express* 2017, **7**. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0423-0>.
 53. Bumyut A, Champreda V, Singhakant C, Kanchanasuta S: **Effects of immobilization of *Actinobacillus succinogenes* on efficiency of bio-succinic acid production from glycerol.** *Biomass Convers Biorefinery* 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01069-2>.
 54. Podleśny M, Wyrostek J, Kucharska J, Jarocki P, Komoń-Janczara E, Targoński Z: **A new strategy for effective succinic acid production by *Enterobacter* sp. LU1 using a medium based on crude glycerol and whey permeate.** *Molecules* 2019, **24**:4543. <https://doi.org/10.3390/molecules24244543>.
 55. Kim NY, Kim SN, Bin Kim O: **Long-term adaptation of *Escherichia coli* to methanogenic co-culture enhanced succinate production from crude glycerol.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2018, **45**:71–76. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1994-0>.
 56. Kim NY, Lee CM, Kim SY, Bin Kim O: **Formate-removing inoculum dominated by *Methanobacterium congolense* supports succinate production from crude glycerol fermentation.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2019, **46**:625–634. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02154-w>.
 57. Khanna S, Goyal A, Moholkar VS: **Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects.** *Crit Rev Biotechnol* 2012, **32**:235–262. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.604839>.
 58. Ciriminna R, Fidalgo A, Ilharco LM, Pagliaro M: **Dihydroxyacetone: an updated insight into an important bioproduct.** *ChemistryOpen* 2018, **7**:233–236. <https://doi.org/10.1002/open.201700201>.
 59. Liu Z, Zheng Y, Shen Y: **Production of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by gluconobacter oxydans ZJM09112.** *J Microbiol Biotechnol* 2010, **20**:340–345. <https://doi.org/10.4014/jmb.0907.07011>.
 60. Stasiak L, Blazejak S: **Acetic acid bacteria - perspectives of application in biotechnology - a review.** *Pol J Food Nutr Sci* 2009, **59**:17–23.
 61. Zheng XJ, Jin KQ, Zhang L, Wang G, Liu Y-PP: **Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol.** *Braz J Microbiol* 2016, **47**:129–135. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.020>.
 62. Brovetto M, Gamenara D, Saenz Méndez P, Seoane GA: **C-C bond-forming lyases in organic synthesis.** *Chem Rev* 2011, **111**:4346–4403. <https://doi.org/10.1021/cr100299p>.
 63. Kong PS, Aroua MK, Daud WMAW: **Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: a feasibility evaluation.** *Renew Sustain Energy Rev* 2016, **63**:533–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.054>.
 64. Ohrem HL, Westmeier F: **Microbial process for the preparation of dihydroxyacetone with recycling biomass, 5770411;** 1998.
 65. Poljungreed I, Boonyarattanakalin S: **Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only.** *Lett Appl Microbiol* 2018, **67**:39–46. <https://doi.org/10.1111/lam.12881>.
 66. Stasiak-Róžańska L, Berthold-Pluta A, Dikshit PK: **Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from gluconobacter oxydans.** *Appl Sci* 2018, **8**. <https://doi.org/10.3390/app8122517>.
- Crude glycerol bioconversion using a novel approach involving crude extract immobilization.
67. Dikshit PK, Kharmawlong GJ, Moholkar VS: **Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*.** *Bioresour Technol* 2018, **256**:302–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.024>.
 68. Jittang S, Jiratthiticheep I, Kajonpradabkul P, Tiatongjitman T, Siriawatwechakul W, Boonyarattanakalin S: **Effect of NaCl removal from biodiesel-derived crude glycerol by ion exchange to enhance dihydroxyacetone production by *Gluconobacter thailandicus* in minimal medium.** *J Chem Technol Biotechnol* 2020, **95**:281–288. <https://doi.org/10.1002/jctb.6234>.
 69. Dikshit PK, Padhi SK, Moholkar VS: **Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone production.** *Bioresour Technol* 2017, **244**:362–370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.136>.
 70. Dikshit PK, Moholkar VS: **Batch and repeated-batch fermentation for 1,3-dihydroxyacetone production from waste glycerol using free, immobilized and resting gluconobacter oxydans cells.** *Waste Biomass Valorization* 2019, **10**: 2455–2465. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0307-9>.
 71. Stasiak-Róžańska L, Błażej S, Gientka I, Bzducha-Wróbel A, Lipińska E: **Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract.** *Electron J Biotechnol* 2017, **27**:44–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.003>.
 72. Ma L, Lu W, Xia Z, Wen J: **Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*.** *Biochem Eng J* 2010, **49**:61–67. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.011>.
 73. de la Morena S, Acedos MG, Santos VE, García-Ochoa F: **Dihydroxyacetone production from glycerol using *Gluconobacter oxydans*: study of medium composition and operational conditions in shaken flasks.** *Biotechnol Prog* 2019, **35**: 1–9. <https://doi.org/10.1002/btpr.2803>.
 74. Dikshit PK, Moholkar VS: **Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904.** *Bioresour Technol* 2016, **216**:1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.100>.
 75. Tan J, Yang X, Lu W: **Research of 1,3-dihydroxyacetone production by overexpressing glycerol transporter and glycerol dehydrogenase.** *Trans Tianjin Univ* 2019, **25**:549–558. <https://doi.org/10.1007/s12209-019-00207-w>.
- Improvement of *G. oxydans* biomass yield and substrate inhibition resistance by overexpression of a glycerol transporter.

Article

Bacteria-Polymer Composite Material for Glycerol Valorization

Magdalena Ripoll ^{1,2} , Nicolás Soriano ^{1,2}, Sofía Ibarburu ¹, Malena Dalies ¹, Ana Paula Mulet ¹ and Lorena Betancor ^{1,*} 

¹ Department of Biotechnology, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, Montevideo 11100, Uruguay; ripoll_m@ort.edu.uy (M.R.); ns222430@fi365.ort.edu.uy (N.S.); ibarburu@ort.edu.uy (S.I.); md209091@fi365.ort.edu.uy (M.D.); mulet@ort.edu.uy (A.P.M.)

² Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

* Correspondence: betancor@ort.edu.uy

Abstract: Bacterial immobilization is regarded as an enabling technology to improve the stability and reusability of biocatalysts. Natural polymers are often used as immobilization matrices but present certain drawbacks, such as biocatalyst leakage and loss of physical integrity upon utilization in bioprocesses. Herein, we prepared a hybrid polymeric matrix that included silica nanoparticles for the unprecedented immobilization of the industrially relevant *Gluconobacter frateurii* (Gfr). This biocatalyst can valorize glycerol, an abundant by-product of the biodiesel industry, into glyceric acid (GA) and dihydroxyacetone (DHA). Different concentrations of siliceous nanosized materials, such as biomimetic Si nanoparticles (SiNps) and montmorillonite (MT), were added to alginate. These hybrid materials were significantly more resistant by texture analysis and presented a more compact structure as seen by scanning electron microscopy. The preparation including 4% alginate with 4% SiNps proved to be the most resistant material, with a homogeneous distribution of the biocatalyst in the beads as seen by confocal microscopy using a fluorescent mutant of Gfr. It produced the highest amounts of GA and DHA and could be reused for up to eight consecutive 24 h reactions with no loss of physical integrity and negligible bacterial leakage. Overall, our results indicate a new approach to generating biocatalysts using hybrid biopolymer supports.

Keywords: hybrid polymers; biocatalysis; bacterial immobilization; nanomaterials; glycerol; *Gluconobacter*



Citation: Ripoll, M.; Soriano, N.; Ibarburu, S.; Dalies, M.; Mulet, A.P.; Betancor, L. Bacteria-Polymer Composite Material for Glycerol Valorization. *Polymers* **2023**, *15*, 2514. <https://doi.org/10.3390/polym15112514>

Academic Editors: Ricardo Faccio, Mariano Romero, Fernando Ferreira, Pablo Raimonda and Álvaro W. Mombrú

Received: 20 March 2023

Revised: 9 May 2023

Accepted: 10 May 2023

Published: 30 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Biotechnology offers a greener panorama in future product and material manufacturing as the industry is transitioning toward net-zero carbon processes [1]. In general, biotransformations necessitate improvements and optimization studies for feasible and effective applications. In bacterial biotransformations, the attachment of bacteria to a carrier material, known as immobilization, can improve productivity and production costs through stabilization of the catalyst, repeated utilization, and ease of separation [2–4]. Moreover, biotransformations catalyzed by immobilized bacteria are often carried out in cleaner backgrounds, simplifying downstream processing units [5–7].

An ideal immobilization matrix should possess physical durability, stability, hydrophilicity, inertness, easy functionalization, biocompatibility, resistance to microbial attack, and cost-effectiveness. Various organic and inorganic matrices are available for bacterial immobilization [8]. The inorganic matrices include sintered glass, ceramics, carbon-based materials, diatomite, and quartz, while the natural matrices include collagen, agar, agarose, cellulose, chitosan, and alginate, and synthetic matrices consist of polymers, such as acrylamide, polyurethane, and polyvinyl alcohol [9]. Both inorganic and organic materials may be used following different strategies for bacterial immobilization, such as coupling to solid surfaces, encapsulation, aggregation, and entrapment, which

are frequently used. Coupling involves attaching cells to a surface naturally or by adding binding agents. Encapsulation entails confining bacteria, where they are separated from the reaction medium by a barrier. Aggregation involves the formation of cell aggregates linked naturally or by the addition of flocculating or binding agents [10].

A thoughtful choice of the methodological approach and materials is crucial for the creation of efficient immobilized biocatalysts [11–13]. In terms of the materials used as supports, the selection must consider bioprocess conditions, such as pH, temperature, agitation, or additives, as they may affect said materials [14]. Additionally, the biocatalyst may be influenced by the nature of the immobilization matrix as it may change its biological properties [15]. Moreover, physical parameters, such as pore size or total surface area, directly impact the amount of biocatalyst immobilized as well as the partition of substrates and products affecting the productivity of biotransformations. Hence, the study of new supports for biocatalyst immobilization aiming for more efficient bioconversions is not only timely but also necessary to perfect bioprocesses for their industrial implementation.

Natural polymers such as agar, agarose, chitosan, cellulose, collagen, carrageenan, and alginate are non-toxic, biocompatible, and biodegradable, which brings them closer to the concept of ideal carriers or immobilization matrixes for biocatalysts [16]. They contribute to the sustainability of bioprocesses over synthetic non-biodegradable polymers, such as polystyrene, or inorganic processed materials, such as sintered glass. However, it is frequent that upon bacterial immobilization, biocatalytic activity decreases either by loss of activity or due to partition problems of the substrates and products [17]. Moreover, these polymers may degrade or present structural issues after sustained or repeated use, causing matrix rupture and bacterial leakage to the reaction medium. These problems might be alleviated by varying the physical properties of the immobilization material.

Recently, the use of combined or polymeric hybrid materials for the integration of biocatalysts has opened a myriad of possibilities in which each of the materials adds advantages to the final heterogeneous biocatalyst [18–21]. In particular, the integration of nanomaterials and polymers for bacterial immobilization, although scarcely reported so far, has very recently been demonstrated to improve the physical properties of the composite for specific applications [22].

In this work, we have investigated the preparation of hybrid polymeric materials of alginate and siliceous nanoparticles and their impact on the immobilization of a strain of *Gluconobacter*. This type of bacteria has industrial relevance as it catalyzes the incomplete oxidation of sugars and alcohols, generating products of chemical, pharmaceutical, and cosmetic interest [5,23–26]. To test the different support materials, we have selected the type strain *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 (Gfr) [27] that transforms and upgrades glycerol into dihydroxyacetone (DHA) and glyceric acid (GA) [23]. The biotransformation has industrial and environmental relevance, as glycerol is inevitably generated as a by-product of the biodiesel industry [28], and its valorization may help diminish the environmental problems associated with its disposal in line with the economics of the biofuel industry and the biorefinery concept. A cost-effective and sustainable process is a must in this transformation. It competes with the easier but contaminated waste disposal via incineration of the substrate [29], the high yield but multi-step biotechnological production of DHA with bacteria in the growing phase [30], and the chemical synthesis of GA, which presents low selectivity and requires heavy metal catalysts as well as extreme reaction conditions [31,32]. We, therefore, worked under the hypothesis that the use of a polymeric hybrid material would improve the properties of an immobilized biocatalyst of Gfr for a more sustainable biotransformation of glycerol into DHA and GA.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Glucose, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, HCl, and pure glycerol (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France). Peptone (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain). Yeast extract and agar (Oxoid, Basingstoke, UK). $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (J.T. Baker, PA, USA). KH_2PO_4 (Macron Chem-

icals, PA, USA). Tetramethyl orthosilicate (TMOS) (Merck, Darmstadt, Germany). Agarose (Bioron, Römerberg, Germany). Alginate (Sigma, Burlington, VT, USA). Montmorillonite (MT) (Aldrich, Burlington, VT, USA).

2.2. Bacterial Strains and Plasmids

Gluconobacter frateurii NBRC103465 (Gfr) was obtained from the National Institute of Technology and Evaluation (NITE) (Tokyo, Japan).

Plasmid MYMH 464 was a gift from Meng How Tan (Addgene plasmid #138068; <http://n2t.net/addgene:138068>; RRID:Addgene_138068). Plasmid pSEVA231-CRISPR was a gift from Víctor de Lorenzo (Addgene plasmid #138712; <http://n2t.net/addgene:138712>; RRID:Addgene_138712).

2.3. Plasmid Construction and Bacterial Modification

The p104-mCherry cassette was obtained from the MYMY464 plasmid and cloned into the pSEVA231-CRISPR vector using XbaI and BamHI enzymes. The construction was amplified in *E. coli* DH5 α and named p104-pSEVA231-mCherry. The fluorescent strain *G. oxydans* p104-pSEVA231-mCherry was generated by electroporation of the p104-pSEVA231-mCherry plasmid into electrocompetent *G. oxydans* cells. Positive clones were selected with 50 μ g/mL kanamycin.

2.4. Bacterial Inoculum Preparation

The Gfr precultures were prepared as described by Habe et al. [33] in 3 mL of glucose-containing medium (5 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, D-glucose 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6.5) and were incubated at 30 °C and 180 rpm for 16 h. Cultures of 250 mL were inoculated with 6 mL of Gfr preculture and incubated at 30 °C and 180 rpm in 1 L flasks containing growth medium with pure glycerol (glycerol 100 g/L, peptone 9 g/L, yeast extract 1 g/L, KH₂PO₄ 0.9 g/L, K₂HPO₄ 0.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6.0) [33]. At an OD_{600 nm} value of 1, a volume corresponding to 20 mg dry cell weight (DCW) was centrifuged for 15 min at 5000 rpm and 4 °C. The bacterial pellet was washed with 30 mM phosphate buffer (NaH₂PO₄ 4.14 g/L, K₂HPO₄ 5.23 g/L, pH 7.0), hereinafter referred to as washing buffer, to remove debris from the growth medium and finally centrifuged at 5000 rpm at 4 °C for 15 min again, discarding the supernatant. The bacterial pellets were stored at −20 °C until later use.

2.5. Silica Nanoparticles (SiNps) Synthesis

Silica nanoparticles were synthesized following a protocol described in previous work [34]. Briefly, a mixture of 20 mL of sodium phosphate buffer 100 mM pH 8.0, 5 mL of a 5% solution of polyethyleneimine (MW 1300), and 5 mL of previously hydrolyzed tetramethyl orthosilicate (TMOS) was prepared in a 50 mL tube. The hydrolyzation of TMOS was performed by adding 942 μ L of TMOS to 6 mL of HCl 1 mM and subsequently mixing the resulting solution using a vortex. The SiNps were immediately formed upon the addition of the hydrolyzed TMOS. To remove any remaining reactants present in the buffer, the SiNps suspension was centrifuged at 5000 rpm for 10 min and washed thrice with 30 mL of distilled water.

2.6. Bacterial Immobilization

For the preparation of the agar and agarose beads, 20 mg DCW (5×10^{10} UFC) was mixed with 3 mL of a 3% agar or agarose solution [35]. The homogeneous mixture was added dropwise to a beaker containing cold sunflower oil while stirring. The resulting beads (AR3 and AE3 for agar and agarose, respectively) were separated using a strainer and washed with hexane and washing buffer. For the preparation of the alginate beads, 20 mg DCW was mixed with 2 mL of 6% alginate and 1 mL of water (A4), 1 mL of montmorillonite (MT) at 30 or 120 mg/mL (A4M1 and A4M4), or SiNps (A4S1 and A4S4) at 30 or 120 mg/mL for a final alginate concentration of 4%. The alginate or hybrid mixtures containing the

cells were added dropwise using a syringe pump (20 $\mu\text{L/s}$) to 30 mL of CaCl_2 50 mM. The beads were incubated for 1 h at 4 $^\circ\text{C}$, separated using a strainer, and washed thoroughly with distilled water.

The dimensions of all the immobilized preparations were measured using ImageJ software (V 1.53e) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7. Scanning Electron Microscopy Analysis

The alginate bead morphology was studied using scanning electron microscopy (SEM). The beads were frozen, freeze-fractured in liquid nitrogen, and gold coated, as described by Simoni et al. [36]. The ice was removed from the fractured specimens by vacuum sublimation (freeze-drying) using a LyoQuest lyophilizer (Telstar, Barcelona, Spain). The samples were then visualized by high-resolution field emission environmental scanning electron microscopy using a Quanta FEG 250 microscope (FEI, OR, USA) under low vacuum conditions with a beam voltage of 10 kV and a magnification of $100\times$ or $1600\times$.

2.8. Texture Analysis

The analyses were carried out using a TA.XT.Plus texture analyzer from Stable Micro Systems. A total of 10 beads for each condition (4% alginate (A4), 4% alginate + 1% MT (A4M1), 4% alginate + 4% MT (A4M4), 4% alginate + 1% SiNps (A4S1), or 4% alginate + 4% SiNps (A4S4)) was tested. The probe was a cylindric P2, and the cell load was 5 kg. The test mode was compression, the pre-test speed was 5 mm/s, the test speed was 1 mm/s, and the post-test speed was 5 mm/s. The target mode was set to Strain (100%). The trigger type was set as Auto (Force), and the trigger force was 1 N. The break mode was set to Level and the break sensitivity was 10 g.

Statistical analyses of variance (ANOVA) were performed using Prism 8.0.1 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.9. Confocal Microscopy Analysis

The immobilized biocatalyst was analyzed by confocal microscopy using a confocal ZEISS LSM 800. Hybrid and alginate polymeric matrices containing the fluorescent strain *G. frateurii* p104–pSEVA231–mCherry were whole-mounted in distilled water. A $\times 63$ (1.3 numerical aperture) oil-immersion objective was used to acquire Z-stacks, and maximum intensity projections of the optical sections were created with ImageJ software (V 1.53e).

2.10. Conversion of Glycerol to GA and DHA

Pure glycerol conversions with resting cells in shake flasks were carried out as described in previous work using starting glycerol concentrations of 200 g/L in water [23]. Glycerol conversions with immobilized preparations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of 200 g/L glycerol in water. The inoculum of each reaction was 20 mg DCW immobilized in 3 mL of 3% agar or agarose (AR3 and AE3, respectively), 3 mL of 4% alginate (A4), 4% alginate + MT 1% (A4M1), 4% alginate + MT 4% (A4M4), 4% alginate + SiNps 1% (A4S1), or 4% alginate + SiNps 4% (A4S4). Samples were periodically withdrawn from the reactions and analyzed by HPLC. The turbidity of the reaction medium was determined by spectrophotometry at 600 nm using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Kyoto, Japan).

2.11. Reuse of Resting and Immobilized Cells

Resting as well as immobilized cells were reused in 24 h reactions. Each time, the cells and beads containing the immobilized cells were harvested from the reaction flasks using either centrifugation or a strainer in the case of the beads and washed once with 10 mL of distilled water. After the washing, the biocatalysts were placed in a 250 mL flask containing 30 mL of 200 g/L of glycerol in water for another round of reaction.

The residual activity was calculated after each use considering the obtained yield (g/L) of use 1 as 100%.

2.12. HPLC Analysis

During all the experiments, 400 μ L samples were taken periodically. The samples were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C. Each sample was subsequently filtered with a 0.22 μ m filter treated with 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) and analyzed by HPLC. The production of GA and DHA was analyzed using Shimadzu Nexera X2 HPLC equipment (Kyoto, Japan) with a diode array detector. The column was an Aminex[®] HPX-87C 300 $\times$ 7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with a pre-column loaded with a 4 $\times$ 3.0 mm SecurityGuard[™] cartridge from Phenomenex Carbo-H columns (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column was incubated at 70 °C, and the mobile phase was 5 mM sulfuric acid. Detection was carried out at 210 nm for GA, 271 nm for DHA, and 190 nm for glycerol, with a 0.6 mL/min flow rate for 19 min. The recorded retention times were GA (12.9 min), DHA (16.7 min), and glycerol (14.7 min). The samples were injected using a volume of 20 μ L. Calibration curves were constructed for GA (0.02–33 g/L), DHA (0.15–5 g/L), and glycerol (0.15–20 g/L). The samples were analyzed using LabSolutions software (V5.111) (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The data presented throughout the manuscript reflect the mean values of three independent experiments. The error bars represent the standard deviation.

3. Results and Discussion

Agar, agarose, and alginate are polymers commonly used as matrices in bacterial immobilization [35,37]. Their selection of inorganic or synthetic polymers is often based on the fact that they are affordable and chemically inert. Moreover, the obtention of immobilized biocatalysts with these polymers is achieved by a facile entrapment of bacteria upon mixing the biomass with an aqueous agar, agarose, or alginate solution and subsequent dropwise addition of the resulting mixture into a solution of CaCl₂ (for alginate) or cold sunflower oil (for agar and agarose).

It is worth noting that the CaCl₂ concentration may affect the alginate properties among other variables [38] (i.e., alginate concentrations, gelation temperatures, incubation times, etc.) that were fixed in this study in order to focus on the advantages of the combination of different materials.

In a previous study, we reported the unprecedented immobilization of *Gluconobacter oxydans* (Gox) in 3% agar (AR3) and 3% agarose (AE3). Gox is also able to catalyze the conversion of glycerol, but only to DHA. The work established that they were suitable matrices for DHA production and allowed the biocatalyst's repeated use in water, which was proven unfeasible with resting cells [5].

Herein, we evaluated AR3, AE3, and 4% alginate (A4) previous to the preparation of hybrid polymers for the immobilization of a different strain of *Gluconobacter*, Gfr, and its potential use in the preparation of not only DHA but also GA in the glycerol transformation. Despite alginate, agar, and agarose being well-known matrices for bacterial immobilization, to the best of our knowledge, there are no previous reports of them being used for Gfr immobilization and/or the production of GA. Therefore, it was necessary to evaluate the immobilization of this strain in the natural polymers by themselves.

Following the standard approach for entrapment in the different polymers described in the Methods, we obtained three different immobilized biocatalysts from 20 mg of dried cell weight. The number of beads obtained as well as the resulting beads' mean diameter and size and shape distribution varied within the matrixes and immobilization techniques (Figure S1, Table S1). These immobilized preparations were then tested in bioconversion reactions.

In a previous study, we established that elevated glycerol concentrations produce higher GA yields [23]. In accordance with those results, we selected a concentration of 200 g/L of glycerol to carry out the biotransformation with the immobilized preparations.

All the immobilized preparations were able to produce GA from 200 g/L of glycerol in water, although the conversions were lower than that obtained with resting cells (Figure 1). A decrease in product formation after immobilization is commonplace, as there may be partition issues that can affect substrate and product diffusion to and from the beads. However, immobilized biocatalysts are often protected against inactivating agents that can be present in a feedstock, such as crude glycerol. Therefore, further studies are necessary to evaluate the contribution of this technology to the process. Additionally, immobilization enables easier reusability and facile separation, which is a desirable characteristic in a biocatalyst with potential industrial application.

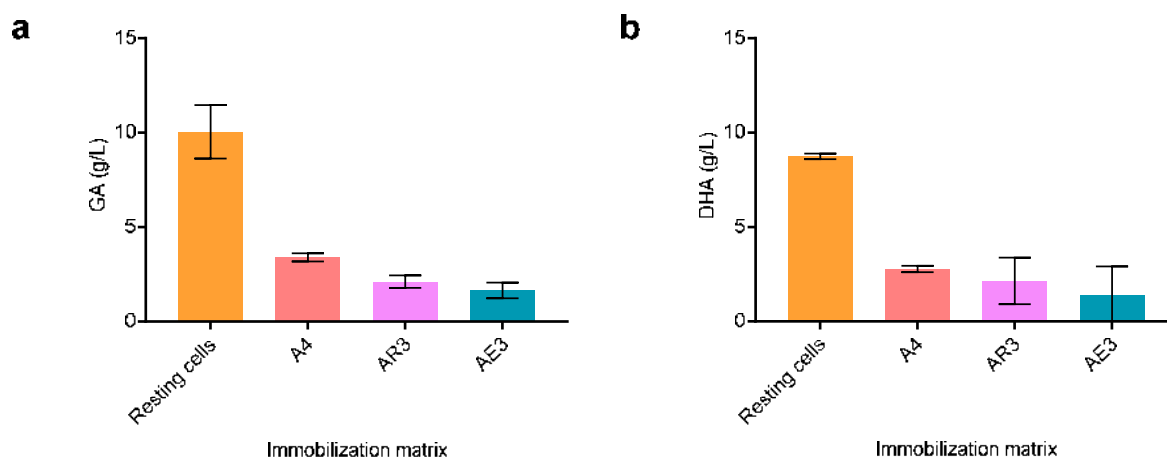


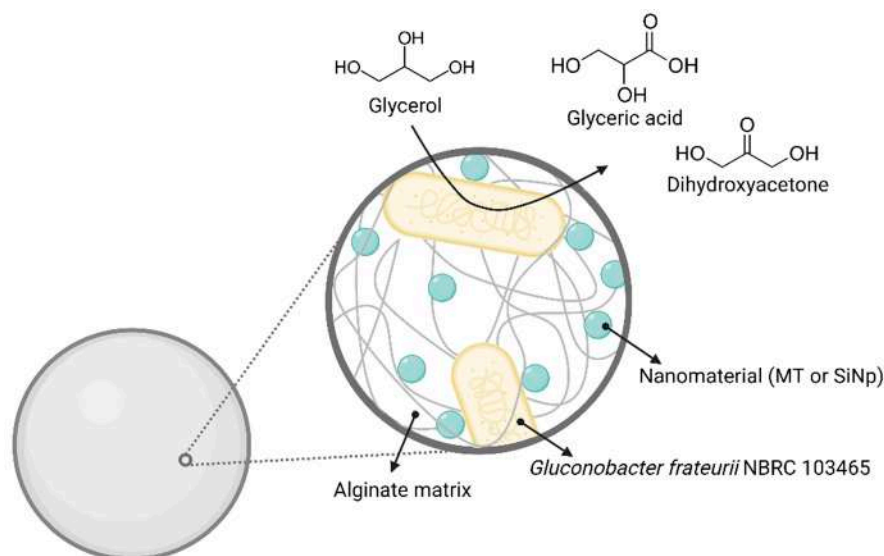
Figure 1. Glycerol conversion with *Gluconobacter frateurii* (Gfr) immobilized in different matrixes (a) Glyceric acid (GA) production in 20 h. (b) Dihydroxyacetone (DHA) production in 20 h. Reactions were performed in 30 mL of 200 g/L glycerol in water using 20 mg Dry Cell Weight (DCW) immobilized in the different supports.

After 20 h of reaction, GA production was slightly superior to A4 preparations, while DHA production was comparable between all the preparations (Figure 1). The standard deviation obtained in the production of DHA for agar and agarose seems significantly higher than that of the GA concentration. Given that these products are formed by different membrane-associated enzymes, glycerol dehydrogenase (GDH) for DHA and alcohol dehydrogenase (mADH) for GA, it is plausible that slight differences in the temperature during the immobilization process could have impacted GDH residual activity, thus producing beads with varying DHA producing abilities.

Altogether, the A4 preparations performed better than AR4 and AE4. Thus, this immobilization technique was selected for further experiments.

As mentioned before, oftentimes, natural polymer matrices are labile, making their sustained reuse difficult and causing bacterial leakage from the matrix to the medium. In fact, in a recent work, we observed that alginate preparations of *G. oxydans* lost their complete structural integrity after four repeated uses [39]. An interesting alternative to enhance the structural properties of hydrogels is the addition of nanostructured materials to the matrix. Examples of these nanomaterials are silica nanoparticles (SiNps) and clays, such as montmorillonite (MT) [40–44]. Through their addition to the alginate matrix, the mechanical resistance can be improved, avoiding matrix breakage. In addition, the incorporation of these silicious nanomaterials could contribute to a decrease in bacterial leakage through the formation of electrostatic interactions. Indeed, bacteria are known to adhere to the surface of MT [45–47], while the properties of biomimetic silica, such as a superficial charge, may contribute to bacterial adhesion [34,48]. It is worth noting that both materials are inherently green. MT is a natural clay, and the SiNps to be used are biomimetic, that is, synthesized without the need for an organic solvent and heat, and they

are smart, as they can disintegrate upon usage [49]. We, therefore, combined alginate and these two nanomaterials to immobilize Gfr to improve the matrix's properties (Scheme 1).



Scheme 1. Schematic representation of hybrid immobilized preparations combining alginate and nanomaterials. MT: montmorillonite, SiNp: Silica nanoparticle.

We evaluated the addition of SiNps and MT in two different concentrations (1% and 4% *w/v*), using alginate-only beads (A4) as a control. The immobilization protocol was the same as the one used for the A4 immobilized preparations, but with an initial step in which the bacterial pellets were mixed with the nanomaterials. The resulting preparations were named as follows: 4% alginate with 1% MT (A4M1), 4% alginate with 4% MT (A4M4), 4% alginate with 1% SiNps (A4S1), and 4% alginate with 4% SiNps (A4S4). All hybrid preparations presented similar sizes (3.6 ± 0.4 mm on average) and spherical shapes, with slight color differences associated with the addition of the nanomaterials (Figure 2).

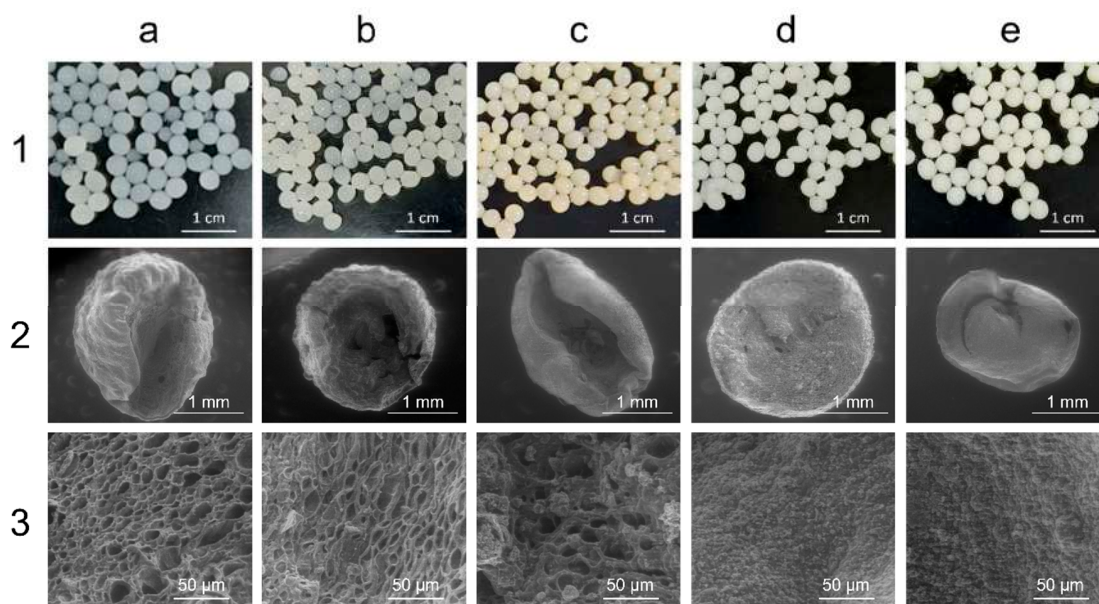


Figure 2. Gfr immobilization on hybrid materials. (1) Macroscopic appearance of (a) A4. (b) A4M1. (c) A4M4. (d) A4S1. (e) A4S4. (2) Scanning electron microscopy image (100 $\times$) of (a) A4. (b) A4M1. (c) A4M4. (d) A4S1. (e) A4S4. (3) Scanning electron microscopy image (1600 $\times$) of (a) A4. (b) A4M1. (c) A4M4. (d) A4S1. (e) A4S4.

Further characterization of the hybrid preparations was carried out by scanning electron microscopy (SEM). To prevent significant structural collapse, each bead was initially frozen and freeze-fractured using liquid nitrogen and subsequently dried by lyophilization, as described by Simoni et al. [36]. It is clear from the SEM analysis that the internal structure of the immobilized preparations changed upon the addition of the siliceous materials (Figure 2). Moreover, the micrographs showed that A4S1 and A4S4 were the preparations that collapsed the least (Figure 2, panels d2 and e2, respectively), while the other preparations showed clear signs of structural collapse (Figure 2, panels a2, b2, and c2). This indicates that the matrices containing SiNps are more rigid and might be more resistant, which is beneficial for bioconversion purposes. This observation may be linked to an increased number of hydrogen bonds between the two materials, as proposed by Yang et al. [50], who studied composite aerogels made of agarose and SiO₂ for thermal insulation applications. Additionally, the integration of agarose and alginate beads with Si materials could also be driven by polar interactions between the uncharged siloxane groups and the hydroxyl groups of the alginate biopolymer [51].

Close-ups of the cross-sections of the resulting beads revealed differences in the porosity of the matrices. Larger pores can be observed in the control A4 bead (Figure 2, panel a3), while the incorporation of MT resulted in less porosity, as clay particles can be seen clogging the pores. This decrease in porosity seems to be concentration-dependent, evidenced by the differences observed in the micrographs (Figure 2, panels b3 and c3). Similar results were obtained by Etcheverry et al. [51] when investigating agar and montmorillonite materials for the removal of pollutants and by Polat et al. in wound dressing applications [52]. Furthermore, the immobilized preparations that contained SiNps (A4S1 and A4S4) presented a distinctive morphology as no evident pores were seen in either of the micrographs (Figure 2, panels d3 and e3). A tighter matrix mesh can be correlated with greater mechanical resistance and may allow for a decrease in bacterial leakage, a common problem regarding alginate matrices [39].

Knowledge of the properties of polymers applied to the field of bioengineering is fundamental, as their physical properties have proven in the past to play a role in the mass transfer that occurs through the beads in response to external forces, their mechanical resistance, etc. We, therefore, proceeded to further characterize the mechanical properties of the hybrid alginate biocatalysts. All the preparations were assessed for their mechanical resistance. The force needed to break the preparations was evaluated using a texture analyzer (Figure 3).

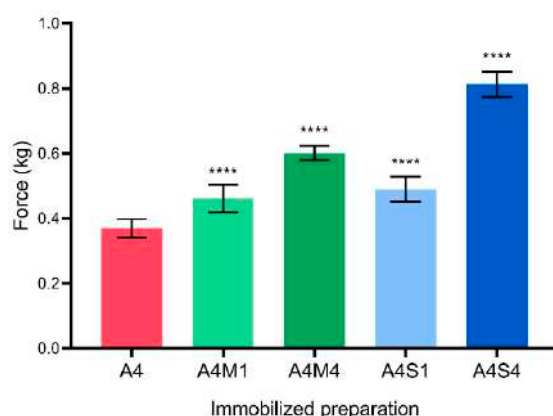


Figure 3. Resistance analysis of immobilized preparations performed using a texture analyzer. **** = p -value < 0.0001.

In all the cases, the addition of the nanostructured materials resulted in significantly more resistant hybrid preparations in comparison to the control (A4). The higher the percentage of MT and SiNps, the greater the resistance to rupture, and A4S4 was the immobilized preparation that presented the best results.

To evaluate the ability of the hybrid preparations to synthesize GA and DHA, glycerol conversion reactions were carried out at an initial substrate concentration of 200 g/L (Figure S2, Table 1). The initial velocities of the product formation differed amongst the immobilized preparations, especially in GA production with A4S1 and A4S4. Nevertheless, after 170 h, GA production was similar for every immobilized preparation, including the control (A4), reaching concentrations of about 8 g/L. DHA production, however, was better with the hybrid preparations including SiNps, as 9.7 ± 0.3 g/L and 10.8 ± 0.9 g/L were obtained with the A4S1 and A4S4 preparations, respectively. This could be explained by better resistance of the GDH enzyme (responsible for glycerol oxidation into DHA) to this immobilization matrix or by lesser diffusional restrictions imposed on the DHA by this material. It is noteworthy that after 24 h of reaction, the A4S1 and A4S4 preparations started presenting a yellow hue, which further intensified throughout the duration of the experiment and seems to be dependent on the SiNps concentration. Control experiments were carried out for 24 h in the absence of Gfr and the absence of glycerol with no change in color (Figure S3). This indicates that glycerol oxidation by Gfr caused the change in coloration, probably by promoting polyethyleneimine's amino group's oxidation remaining from the SiNps synthesis.

Table 1. GA and DHA production from glycerol with various alginate-based immobilized preparations of Gfr.

Immobilized Preparation	Initial Bead Diameter (mm)	Final Bead Diameter (mm) ^a	Maximum GA Yield (g/L) ^a	Maximum DHA Yield (g/L) ^a	Final DO _{600 nm} Value
A4	3.7 ± 0.5	3.5 ± 0.5	7.7 ± 0.5	4.8 ± 0.2	0.368 ± 0.042
A4M1	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.3	8.3 ± 0.5	6.1 ± 0.5	0.095 ± 0.021
A4M4	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.4	8.1 ± 0.6	5.6 ± 0.1	0.106 ± 0.031
A4S1	3.5 ± 0.3	2.8 ± 0.3	8.9 ± 0.2	9.7 ± 0.3	0.137 ± 0.154
A4S4	3.9 ± 0.4	2.7 ± 0.3	8.7 ± 0.8	10.8 ± 0.9	0.039 ± 0.007

^a After 170 h.

An evaluation by UV-VIS spectrophotometry of the reaction supernatants after 170 h of production showed that all the hybrid preparations delivered the cleanest reaction crudes (Figure S4, Table 1). On the contrary, the A4 preparations showed higher turbidity, probably due to matrix damage and bacterial leakage. These results are encouraging, as a cleaner reaction supernatant requires less downstream processing.

Given the better results obtained with the A4 immobilized preparations, an experiment was conducted to determine if the addition of SiNps to the alginate matrix contributes to the decrease in bacterial leakage from the immobilized preparations to the reaction medium. For this experiment, a glycerol conversion reaction was simulated, but the reaction medium was replaced with sterile water. In contrast to previous experiments, Gfr was immobilized in aseptic conditions in the A4 and A4S4 matrices. All the reagents and materials were sterilized before use. Samples of the reaction supernatants were taken after 24 h and plated, and the colony-forming units per mL (CFU/mL) obtained in each case were counted. The incorporation of SiNps into the A4S4 preparations contributed to diminishing bacterial leakage, as the UFC/mL detected in the hybrid supernatant (A4S4) was merely 10% of the total UFC/mL detected in the control supernatant (A4) (150 ± 71 UFC/mL and 1310 ± 297 UFC/mL, respectively). A plausible explanation for this phenomenon may be related to the establishment of ionic interactions between Gfr and the matrix. SiNps are positively charged due to polyethyleneimine, while the lipopolysaccharides present in the outer membrane of Gram-negative bacteria, such as Gfr, have a negative charge [34,48]. Moreover, the better physical resistance of this material linked to the tighter matrix mesh, as seen by SEM analysis, could be related to reduced pore sizes that diminish bacterial leakage. It is noteworthy that bacterial leakage from both preparations was low, as 20 mg of dry cell weight of bacteria equals approximately 5×10^{10} UFC.

To study whether the bacteria were integrated into the hybrid and non-hybrid polymer, both the A4 and A4S4 preparations were analyzed by confocal microscopy. For this experiment, a mutant of *Gluconobacter oxydans* (Gox) expressing mCherry fluorescent protein was used in the same immobilization experiments developed for Gfr. Both catalysts showed a similar homogeneous bacterial integration on the material. However, the images presented slight differences that seem to be related to the hardness of the catalysts, as a cleaner cut was achieved in the A4 preparations in comparison to that obtained in the A4S4 preparations (Figure 4). This similar bacterial distribution is consistent with the comparable DHA and GA conversion results that were previously demonstrated.

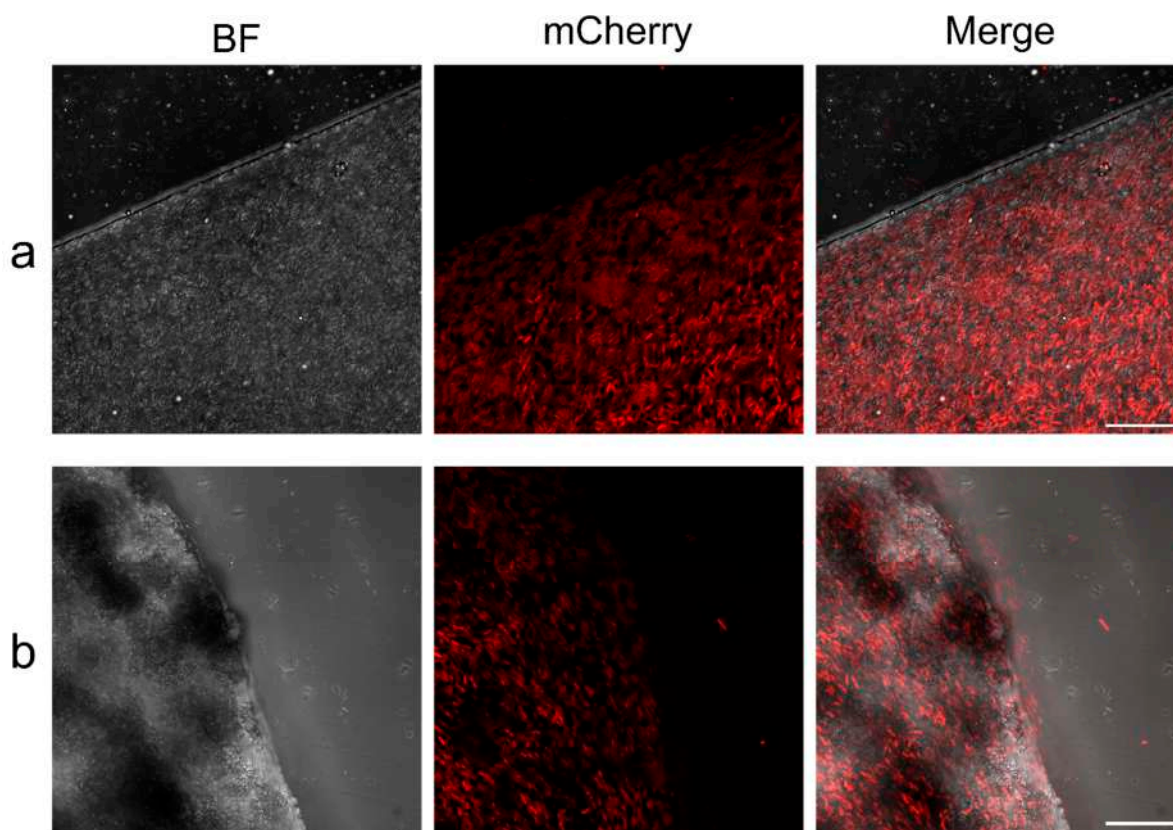


Figure 4. Confocal analysis of immobilized preparation of a fluorescent Gox within (a) A4 and (b) A4S4. BF: Brightfield, mCherry: mCherry fluorescent protein. Scale bar = 20 μ m.

Multiple or repeated batch transformation cycles are a paramount goal when designing immobilized biocatalysts for bioconversions. The possibility of reusing the same biocatalysts reduces costs, intensifying and increasing the sustainability of the process. One determinant property of the immobilized biocatalysts for this purpose is the mechanical resistance of the immobilization matrix, which while maintaining its physical integrity may protect the biological catalyst for longer periods from harsh conditions and its leakage to the reaction medium. We, therefore, studied the reusability of the A4S4 preparations in comparison with resting cells by evaluating the residual activity after 24 h glycerol conversion reactions (Figure 5). For each use, a comparison of the analysis of the substrates and products for t_0 and t_{24} h was conducted. The resting cells of Gfr could not be reused successfully, as both GA and DHA production diminished almost completely after the first use (Figure 5a). Regarding the immobilized preparations, a control was carried out with the A4 preparations. As previously mentioned, alginate matrices can sometimes be labile, hindering their reusability. In line with that, repeated glycerol conversion control reactions with the A4 preparations showed a sensible loss in both residual activity and structure. Residual GA production activity diminished to $23.1 \pm 5.6\%$ after the third consecutive use

and continued under 20% for the rest of the experiment (Figure 5b). Similar results were obtained for DHA, as its production diminished to $14.5 \pm 0.9\%$ after three uses and ceased completely after five uses. Moreover, the structural integrity of the A4 preparations was compromised after five consecutive uses, when the beads started to show clear signs of swelling and physical disruption. After eight uses, all the beads were damaged (Figure S5). In contrast, the A4S4 preparations were successfully reused in eight successive glycerol 24 h conversion reactions (Figure 5c). The reusability of the A4S4 preparations was vastly superior to that of the A4 preparations. The residual activity was maintained above 20% for GA in seven subsequent uses, slightly diminishing to $16.0 \pm 0.5\%$ after eight subsequent uses. The DHA residual activity was also maintained above 20% for six uses and diminished to $11.0 \pm 1.0\%$ after eight subsequent uses. Unlike the A4 preparations, there were no signs of swelling or damage to the immobilization matrix after eight consecutive uses. Remarkably, the average bead diameter for the A4S4 preparations descended from 3.9 ± 0.3 mm to 2.6 ± 0.3 mm (Table S2).

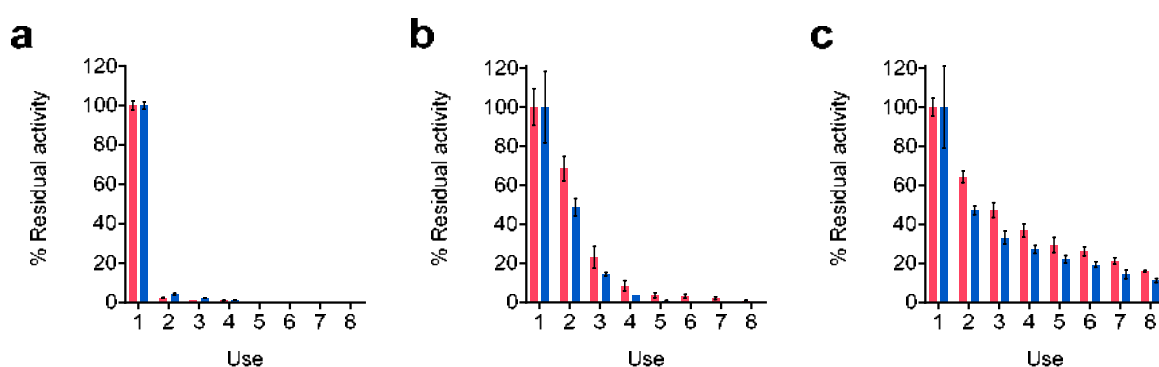


Figure 5. Reusability evaluation of Gfr-based biocatalysts. (a) Repeated conversion of pure glycerol using resting cells. (b) Repeated conversion of pure glycerol using A4 immobilized preparations. (c) Repeated conversion of pure glycerol using A4S4 immobilized preparations. Residual GA production activity (red), residual DHA production activity (blue). Each use lasted 24 h.

4. Conclusions

The industrial application of immobilized biocatalysts significantly depends on the proper design of the immobilization strategy and the material used as support. High activity and reusability are both desired properties when immobilizing biocatalysts. Biopolymers have several advantages as support for bacterial integration but often lack physical resistance, which ultimately impacts bioprocess productivity. Herein, we have demonstrated that several organic matrices allow the immobilization of Gfr, an efficient biocatalyst that can valorize glycerol into GA and DHA and which had not been heterogenized before nor used immobilized in the studied biotransformation. Moreover, in aiming to improve the biocatalyst properties, we have proven that the incorporation of nanosized siliceous materials into alginate immobilized preparations of Gfr enables better reusability, improved physical resistance, and significantly diminishes bacterial leakage. The immobilized preparation that combined alginate 4% with SiNps 4% (A4S4) was successfully used for glycerol conversion. The strategy described here provides a simple and effective approach for biotechnologists to create stable, solid-phase biocatalysts, not only for glycerol valorization but also for other bioconversions that seek to improve their sustainability. Moreover, we envision that the strategy developed here of integrating Si nanoparticles into alginate for biocatalyst immobilization could be extended to other natural polymer applications, such as tissue engineering, drug release systems, or a bioartificial medium for cell culture.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym15112514/s1>. Figure S1: Immobilized preparations of Gfr using different matrices; Figure S2: Glycerol bioconversions with Gfr immobilized preparations; Figure S3: Evaluation of color change after 24 h in A4S4 preparations; Figure S4: Reaction supernatants after 170 h of glycerol conversion reactions carried out by different Gfr immobilized preparations; Table S1: Immobilization of Gfr in natural polymers; Table S2: Diameter evaluation of A4 and A4S4 preparations before and after eight consecutive uses.

Author Contributions: Conceptualization, L.B.; Data curation, M.R., N.S., S.I. and A.P.M.; Formal analysis, M.R., N.S., S.I., M.D., A.P.M. and L.B.; Funding acquisition, L.B.; Investigation, M.R., N.S., S.I., M.D. and A.P.M.; Methodology, M.R. and L.B.; Project administration, L.B.; Supervision, L.B.; Writing—original draft, M.R. and L.B.; Writing—review and editing, M.R., A.P.M. and L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) under grants POS_NAC_2019_1_158182, FMV_1_2021_1_167184, and POS_FMV_2021_1_1010843 and also by PEDECIBA Química.

Data Availability Statement: Raw data is available upon request.

Acknowledgments: M.R. and N.S. would like to thank Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). L.B., M.R. and N.S. are grateful to PEDECIBA Química. L.B., M.R., N.S., S.I., M.D., and A.M. would like to thank Universidad ORT Uruguay and CBI + I (Biotechnological Center for Research and Innovation). Figure 2 and ETOC were created with BioRender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Philp, J. Bioeconomy and net-zero carbon: Lessons from Trends in Biotechnology, volume 1, issue 1. *Trends Biotechnol.* **2022**, *41*, 307–322. [CrossRef] [PubMed]
- van Schie, M.M.C.H.; Spöring, J.-D.; Bocola, M.; de María, P.D.; Rother, D. Applied biocatalysis beyond just buffers—From aqueous to unconventional media. Options and guidelines. *Green Chem.* **2021**, *23*, 3191–3206. [CrossRef] [PubMed]
- Žnidaršič-Plazl, P. Biocatalytic process intensification via efficient biocatalyst immobilization, miniaturization, and process integration. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *32*, 100546. [CrossRef]
- Wang, J.; Liang, J.; Ning, D.; Zhang, T.; Wang, M. A review of biomass immobilization in anammox and partial nitrification/anammox systems: Advances, issues, and future perspectives. *Sci. Total Environ.* **2022**, *821*, 152792. [CrossRef]
- Ripoll, M.; Jackson, E.; Trelles, J.A.; Betancor, L. Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol. *J. Biotechnol.* **2021**, *340*, 102–109. [CrossRef]
- Patel, S.K.; Kalia, V.C.; Joo, J.B.; Kang, Y.C.; Lee, J.-K. Biotransformation of methane into methanol by methanotrophs immobilized on coconut coir. *Bioresour. Technol.* **2020**, *297*, 122433. [CrossRef] [PubMed]
- Hu, Z.-C.; Bu, J.-L.; Wang, R.-Y.; Ke, X.; Zheng, Y.-G. 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.* **2019**, *188*, 297–309. [CrossRef]
- Zhang, J.; Wei, J.; Massey, I.Y.; Peng, T.; Yang, F. Immobilization of Microbes for Biodegradation of Microcystins: A Mini Review. *Toxins* **2022**, *14*, 573. [CrossRef]
- Berillo, D.; Al-Jwaid, A.; Caplin, J. Polymeric Materials Used for Immobilisation of Bacteria for the Bioremediation of Contaminants in Water. *Polymers* **2021**, *13*, 1073. [CrossRef]
- Karagoz, P.; Bill, R.M.; Ozkan, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. *Renew. Energy* **2019**, *143*, 741–752. [CrossRef]
- Popkov, A.; Su, Z.; Sigurdardóttir, S.B.; Luo, J.; Malankowska, M.; Pinelo, M. Engineering polyelectrolyte multilayer coatings as a strategy to optimize enzyme immobilization on a membrane support. *Biochem. Eng. J.* **2023**, *193*, 108838. [CrossRef]
- El-Shishtawy, R.M.; Al Angari, Y.M.; Alotaibi, M.M.; Almulaiky, Y.Q. Acrylic fabric and nanomaterials to enhance α -amylase-based biocatalytic immobilized systems for industrial food applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *233*, 123539. [CrossRef] [PubMed]
- Tang, Y.; Wang, P.; Zeng, H.; Rui, Z. Construction of porous chitosan macrospheres via dual pore-forming strategy as host for alkaline protease immobilization with high activity and stability. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *305*, 120476. [CrossRef] [PubMed]
- Güngörmüşler, M.; Cicek, N.; Levin, D.B.; Azbar, N. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *36*, 482–494. [CrossRef]
- Truong, V.K.; Bhadra, C.M.; Christofferson, A.J.; Yarovsky, I.; Al Kobaisi, M.; Garvey, C.J.; Ponamareva, O.N.; Alferov, S.V.; Alferov, V.A.; Perera, P.G.T.; et al. Three-Dimensional Organization of Self-Encapsulating *Gluconobacter oxydans* Bacterial Cells. *ACS Omega* **2017**, *2*, 8099–8107. [CrossRef]

16. Bilal, M.; Iqbal, H.M. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *130*, 462–482. [\[CrossRef\]](#)
17. Guisan, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells. In *Methods in Molecular Biology*, 3rd ed.; Guisan, J.M., Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2020; Volume 2100, ISBN 978-1-0716-0214-0.
18. Ricardi, N.C.; de Menezes, E.; Benvenuti, E.; Schöffner, J.D.N.; Hackenhaar, C.R.; Hertz, P.F.; Costa, T.M.H. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. *Food Chem.* **2018**, *246*, 343–350. [\[CrossRef\]](#)
19. Correa, S.; Puertas, S.; Gutierrez, L.; Asín, L.; De La Fuente, J.M.; Grazú, V.; Betancor, L. Design of stable magnetic hybrid nanoparticles of Si-entrapped HRP. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214004. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhai, R.; Chen, X.; Jin, M.; Hu, J. Synthesis of a polydopamine nanoparticle/bacterial cellulose composite for use as a biocompatible matrix for laccase immobilization. *Cellulose* **2019**, *26*, 8337–8349. [\[CrossRef\]](#)
21. López-Gallego, F.; Jackson, E.; Betancor, L. Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells. *Chem. A Eur. J.* **2017**, *23*, 17841–17849. [\[CrossRef\]](#)
22. Kamanina, O.; Arlyapov, V.; Rybochkin, P.; Lavrova, D.; Podsevalova, E.; Ponamoreva, O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD. *3 Biotech* **2021**, *11*, 331. [\[CrossRef\]](#)
23. Jackson, E.; Ripoll, M.; Betancor, L. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, e926. [\[CrossRef\]](#)
24. Han, J.; Hua, X.; Zhou, X.; Xu, B.; Wang, H.; Huang, G.; Xu, Y. A cost-practical cell-recycling process for xylonic acid bioproduction from acidic lignocellulosic hydrolysate with whole-cell catalysis of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* **2021**, *333*, 125157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Hu, Z.-C.; Zhao, Z.-Y.; Ke, X.; Zheng, Y.-G. Repeated production of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -l-sorbofuranose by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with a strategy of in situ exhaustive cell regeneration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1781–1789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Hua, X.; Du, G.; Xu, Y. Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer. *Bioresour. Technol.* **2019**, *283*, 326–331. [\[CrossRef\]](#)
27. Sato, S.; Umemura, M.; Koike, H.; Habe, H. Draft Genome Sequence of *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, a Glyceric Acid-Producing Strain. *Genome Announc.* **2013**, *1*, e00369-13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Kaur, J.; Sarma, A.K.; Jha, M.K.; Gera, P. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *27*, e00487. [\[CrossRef\]](#)
29. Ismaila, A.; Chen, H.; Shao, Y.; Xu, S.; Jiao, Y.; Chen, X.; Gao, X.; Fan, X. Renewable hydrogen production from steam reforming of glycerol (SRG) over ceria-modified γ -alumina supported Ni catalyst. *Chin. J. Chem. Eng.* **2020**, *28*, 2328–2336. [\[CrossRef\]](#)
30. Zeng, W.; Shan, X.; Liu, L.; Zhou, J. Efficient 1,3-dihydroxyacetone biosynthesis in *Gluconobacter oxydans* using metabolic engineering and a fed-batch strategy. *Bioresour. Bioprocess.* **2022**, *9*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
31. Mimura, N.; Muramatsu, N.; Hiyoshi, N.; Sato, O.; Yamaguchi, A. Continuous production of glyceric acid and lactic acid by catalytic oxidation of glycerol over an Au–Pt/Al₂O₃ bimetallic catalyst using a liquid-phase flow reactor. *Catal. Today* **2021**, *375*, 191–196. [\[CrossRef\]](#)
32. Ke, Y.; Zhu, C.; Li, J.; Liu, H.; Yuan, H. Catalytic Oxidation of Glycerol over Pt Supported on MOF-Derived Carbon Nanosheets. *ACS Omega* **2022**, *7*, 46452–46465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Habe, H.; Shimada, Y.; Fukuoka, T.; Kitamoto, D.; Itagaki, M.; Watanabe, K.; Yanagishita, H.; Sakaki, K. Production of Glyceric Acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 Using Raw Glycerol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 1799–1805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Jackson, E.; Ferrari, M.; Cuestas-Ayllon, C.; Fernández-Pacheco, R.; Perez-Carvajal, J.; de la Fuente, J.M.; Grazú, V.; Betancor, L. Protein-Templated Biomimetic Silica Nanoparticles. *Langmuir* **2015**, *31*, 3687–3695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Trelles, J.A.; Rivero, C.W. Whole Cell Entrapment Techniques. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan, J.M., Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2020; pp. 385–394.
36. Simoni, R.C.; Lemes, G.F.; Fialho, S.; Gonçalves, O.H.; Gozzo, A.M.; Chiaradia, V.; Sayer, C.; Shirai, M.; Leimann, F.V. Effect of drying method on mechanical, thermal and water absorption properties of enzymatically crosslinked gelatin hydrogels. *An. Acad. Bras. Ciências* **2017**, *89*, 745–755. [\[CrossRef\]](#)
37. Stasiak-Różańska, L.; Berthold-Pluta, A.; Dikshit, P.K. Valorization of Waste Glycerol to Dihydroxyacetone with Biocatalysts Obtained from *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 2517. [\[CrossRef\]](#)
38. Blandino, A.; Macías, M.; Cantero, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentra. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 686–689. [\[CrossRef\]](#)
39. Ripoll, M.; Velasco-Lozano, S.; Jackson, E.; Diamanti, E.; Betancor, L.; López-Gallego, F. One-pot biotransformation of glycerol into serinol catalysed by biocatalytic composites made of whole cells and immobilised enzymes. *Green Chem.* **2021**, *23*, 1140–1146. [\[CrossRef\]](#)
40. Zhang, X.; Huang, C.; Zhao, Y.; Jin, X. Preparation and characterization of nanoparticle reinforced alginate fibers with high porosity for potential wound dressing application. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 39349–39358. [\[CrossRef\]](#)
41. Hou, X.; Xue, Z.; Xia, Y.; Qin, Y.; Zhang, G.; Liu, H.; Li, K. Effect of SiO₂ nanoparticle on the physical and chemical properties of eco-friendly agar/sodium alginate nanocomposite film. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *125*, 1289–1298. [\[CrossRef\]](#)

42. Qu, B.; Luo, Y. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *152*, 437–448. [[CrossRef](#)]
43. Eshkol-Yogev, I.; Gilboa, E.; Giladi, S.; Zilberman, M. Formulation—Properties effects of novel dual composite hydrogels for use as medical sealants. *Eur. Polym. J.* **2021**, *152*, 110470. [[CrossRef](#)]
44. Júnior, L.M.; da Silva, R.G.; Anjos, C.A.R.; Vieira, R.P.; Alves, R.M.V. Effect of low concentrations of SiO₂ nanoparticles on the physical and chemical properties of sodium alginate-based films. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *269*, 118286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Li, S.; Jiang, C.; Chen, X.; Wang, H.; Lin, J. Lactobacillus casei immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 822–830. [[CrossRef](#)]
46. Su, M.; Han, F.; Wu, Y.; Yan, Z.; Lv, Z.; Tian, D.; Wang, S.; Hu, S.; Shen, Z.; Li, Z. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorous release and sorption on montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* **2019**, *181*, 105227. [[CrossRef](#)]
47. Ruan, B.; Wu, P.; Liu, J.; Jiang, L.; Wang, H.; Qiao, J.; Zhu, N.; Dang, Z.; Luo, H.; Yi, X. Adhesion of Sphingomonas sp. GY2B onto montmorillonite: A combination study by thermodynamics and the extended DLVO theory. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *192*, 111085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. El-Taboni, F.; Caseley, E.; Katsikogianni, M.; Swanson, L.; Swift, T.; Romero-González, M.E. Fluorescence Spectroscopy Analysis of the Bacteria-Mineral Interface: Adsorption of Lipopolysaccharides to Silica and Alumina. *Langmuir* **2020**, *36*, 1623–1632. [[CrossRef](#)]
49. Betancor, L.; Luckarift, H.R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 566–572. [[CrossRef](#)]
50. Yang, X.; Jiang, P.; Xiao, R.; Fu, R.; Liu, Y.; Ji, C.; Song, Q.; Miao, C.; Yu, H.; Gu, J.; et al. Robust Silica–Agarose Composite Aerogels with Interpenetrating Network Structure by In Situ Sol–Gel Process. *Gels* **2022**, *8*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Etcheverry, M.; Cappa, V.; Trelles, J.; Zanini, G. Montmorillonite-alginate beads: Natural mineral and biopolymers based sorbent of paraquat herbicides. *J. Environ. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 5868–5875. [[CrossRef](#)]
52. Polat, T.G.; Duman, O.; Tunç, S. Agar/ κ -carrageenan/montmorillonite nanocomposite hydrogels for wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 4591–4602. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Research review paper

New perspectives into *Gluconobacter*-catalysed biotransformations

Magdalena Ripoll^{a,b,*}, Jordy Alexis Lerma-Escalera^{c,d}, José Rubén Morones-Ramírez^{c,d},
Leonardo Rios-Solis^{e,f}, Lorena Betancor^{a,g,*}

^a Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, 11100 Montevideo, Uruguay

^b Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

^c Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, San Nicolás de los Garza, Mexico

^d Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apodaca, Mexico

^e Institute for Bioengineering, School of Engineering, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JL, United Kingdom

^f School of Natural and Environmental Sciences, Group of Biotechnology and Molecular Biology, The University of Newcastle, Devonshire Building, NE1 7RU, United Kingdom

^g Department of Bioengineering, Mc Gill University, McConnell Engineering Building, 3480 University, Room 350, Montreal, Quebec H3A 0E9, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Gluconobacter
Biotransformations
Whole-cell immobilisation
Genetic engineering
Industrial biotechnology
Process intensification
Green chemistry

ABSTRACT

Different from other aerobic microorganisms that oxidise carbon sources to water and carbon dioxide, *Gluconobacter* catalyses the incomplete oxidation of various substrates with regio- and stereoselectivity. This ability, as well as its capacity to release the resulting products into the reaction media, place *Gluconobacter* as a privileged member of a non-model microorganism class that may boost industrial biotechnology. Knowledge of new technologies applied to *Gluconobacter* has been piling up in recent years. Advancements in its genetic modification, application of immobilisation tools and careful designs of the transformations, have improved productivities and stabilities of *Gluconobacter* strains or enabled new bioconversions for the production of valuable marketable chemicals. In this work, the latest advancements applied to *Gluconobacter*-catalysed biotransformations are summarised with a special focus on recent available tools to improve them. From genetic and metabolic engineering to bioreactor design, the most recent works on the topic are analysed in depth to provide a comprehensive resource not only for scientists and technologists working on/with *Gluconobacter*, but for the general biotechnologist.

1. Introduction

Microbial biotechnology sustains a major part of industrial biotechnology and constitutes the fundamental force driving the development and implementation of bio-based industries. Biotransformations depend on the availability of suitable biocatalysts able to provide a wide spectrum of products at a large scale and microbial bioproduction has proved to be key to a bio-based manufacturing development harnessing enormous potential. Although there is a clear and understandable bias of industry to utilize well-known model microorganisms, there is yet an unexplored vast diversity of non-model organisms with unique features that may facilitate new or improved bioprocesses.

Acetic acid bacteria are important players in biotransformations (Qin

et al., 2022). As such, *Gluconobacter* strains have been frequently used in the last 20 years, exploiting their unique ability to incompletely oxidise sugars and alcohols. *Gluconobacter* is a distinct group of non-model microorganisms used as biocatalysts, leading the quantitative yields of oxidised products in reactions as industrially relevant as the preparation of vinegar (Es-Sbata et al., 2022), the vitamin C precursors L-sorbose and 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG) (Gao et al., 2020), the tanning lotion additive dihydroxyacetone (DHA) (Ripoll et al., 2021a) and 6-(N-hydroxyethyl) amino-6-deoxy-L-sorbofuranose (6-NSL), used for the production of the antidiabetic drug miglitol (Liu et al., 2021a). *Gluconobacter*-catalysed oxidation reactions often have the added advantage of exquisite selectivity (Ke et al., 2019b; Sayed et al., 2019), which attracts more interest to its study and exploration of further applications. Moreover, this class of acetic bacteria releases the resulting products

* Corresponding authors at: Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, 11100 Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: ripoll_m@ort.edu.uy (M. Ripoll), jose.moronesr@uanl.edu.mx (J.R. Morones-Ramírez), Leo.Rios@ed.ac.uk (L. Rios-Solis), betancor@ort.edu.uy (L. Betancor).

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108127>

Received 22 October 2022; Received in revised form 2 March 2023; Accepted 8 March 2023

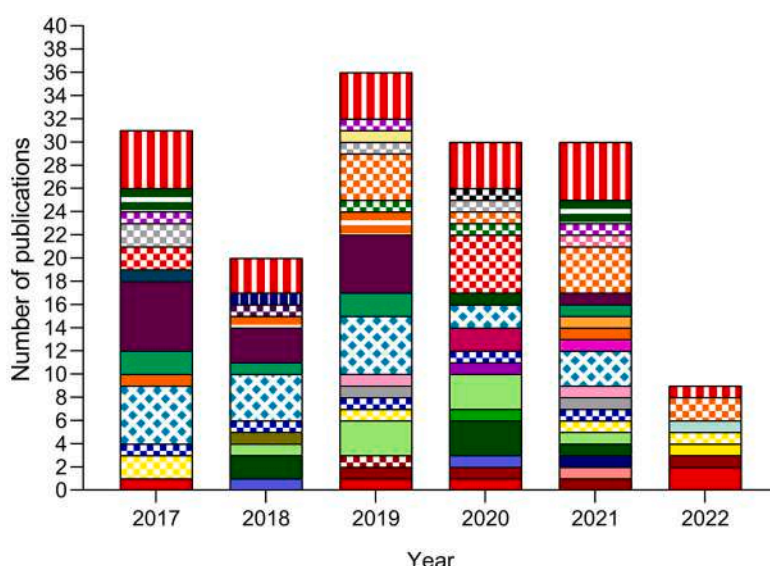
Available online 15 March 2023

0734-9750/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

into the cultivation medium transforming it into an excellent candidate for biotransformations. These advantages have recently prompted investigations on advancing the knowledge on its genetic manipulation and stabilization to leverage its phenotype to its full extent (Fricke et al., 2021b; Liu et al., 2021c). Particularly, the last 5 years have seen a significant increase in the wealth of products generated through *Gluconobacter* biotransformations (Fig. 1, Table 1).

Several previous reviews have focused on the physiology and application of *Gluconobacter* strains in specific biotransformations, which are often included in larger studies involving other acetic acid bacteria (da Silva et al., 2022; De Muynck et al., 2007; Deppenmeier and Ehrenreich, 2008; Fricke et al., 2021a; Macauley et al., 2001; Raspor and Goranović, 2008). It is worth noting that these reviews were mostly focused on *Gluconobacter oxydans*. However, the knowledge of this particular bacterium has significantly advanced and matured in the last decade opening up opportunities for examination and knowledge integration of diverse species of this microorganism.

The present work aims to contribute with a comprehensive analysis of the different approaches reported to improve the performance of *Gluconobacter* strains as biocatalysts. We will review what we consider the most currently relevant examples of process intensification in *Gluconobacter*-catalysed biotransformations. Particular attention will be given to the reaction design, including immobilisation strategies and bioreactor configuration, both emerging as key players impacting the productivities in *Gluconobacter*-catalysed reactions. Moreover, a special focus will also be put on recent molecular biology tools that promise to be game changers in the future application of this bacteria in new biotransformations. This review is not intended as an exhaustive summary of all *Gluconobacter*-catalysed reactions reports but instead aims to demonstrate the wealth of enabling strategies that benefit this particular type of biotransformation highlighting the pertinent examples that illustrate significant improvements in *Gluconobacter* technology.



Legends

2-keto-D-gluconic acid	Adipic acid	Glyceric acid	L-ribonate
2-keto-L-gulonic acid	Arabinonic acid	Galactonic acid	L-xylo-3- hexulose
3,4-DHBA	Bacterial cellulose	Gluconic acid	Mannonic acid
3-dehydroshikimate	Biolixiviant	Glycolic acid	Phenylacetaldehyde
3-hydroxypropionic acid	Butyric acid	HMFA	Phenylacetic acid
5-ketofructose	Coenzyme Q10	Isomaltomergalosaccharide	PQQ
6-hydroxyhexanoic acid	Dihydroxyacetone	L-erythrose	riboflavin
6-NSL	D-tagatose	Levan	Xylitol
Acetoin	Fructose	L-eythrulose	Xylonic acid
Acrylic acid	Furoic acid	L-sorbose	

Fig. 1. Products obtained through biotransformation using *Gluconobacter* strains as catalysts in the last 5 years (January 2017 to July 2022). This figure only includes products obtained by direct participation of wild type or mutant *Gluconobacter* strains or its bacterial extracts. All research articles considered present the highlighted products as the main target of the work, secondary products were not considered. In catalytic cascades with more than one biocatalyst, only the products obtained directly through *Gluconobacter*-catalysed reactions were considered, regardless of whether they were the final products of the cascade.

Table 1

Products obtained through biotransformation using *Gluconobacter* strains as catalysts in the last 5 years (January 2017 to July 2022). This table is intended not only as informative but also as a glossary for abbreviations and synonyms of product names and enzymes that are mentioned throughout the manuscript to avoid ambiguity.

Product	Acronym	Obtained from	Enzyme(s) involved in biotransformation	Observations	References
2-keto-D-gluconic acid	2-KDA	Glucose	mGlucDH (Glucose dehydrogenase) (Glucose to GlucA); gluconate-2-dehydrogenase (GlucA to 2-KDA)	Food additive, detergent, photographic developer, vitamin C and isovitamin C precursor.	(Dai et al., 2022; Kataoka et al., 2022; Zhou et al., 2017a; Zhou et al., 2020)
2-keto-L-gulononic acid	2-KLG	D-sorbitol or L-sorbose	mSldH (sorbitol to L-sorbose); L-sorbose dehydrogenase (SDH) (L-sorbose to L-sorbose) and L-sorbose dehydrogenase (SNDH) (L-sorbose to 2-KLG)	Vitamin C precursor.	(Chen et al., 2021; Chen et al., 2019; Gao et al., 2020; Li et al., 2022)
2,5-diketo-D-gluconic acid	2,5-DKG	Glucose	mGlucDH (Glucose dehydrogenase) (Glucose to GlucA); gluconate-2-dehydrogenase (GlucA to 2-KDA); 2KGADH (2- keto-gluconate dehydrogenase) (2-KDA to 2,5-KGA)	Vitamin C precursor.	(Zeng et al., 2019)
3,4-Dihydroxybutyric acid	3,4-DHBA	3,4- dihydroxybutanal (3,4-DHB)	Membrane-bound aldehyde dehydrogenase (mAlDH) (3,4-DHB to 3,4-DHBA)	Platform chemical.	(Zhang et al., 2021)
3-dehydroshikimate	3-DHS	Quinate	Membrane-bound quinate dehydrogenase (QDH) (quinate to 3-dehydroquinone (3-DHQ)) and type I 3-DHQ dehydratase (DHQase) (3-DHQ to 3-DHS)	Key intermediate for the synthesis of various compounds (e.g: antiviral drug oseltamivir).	(Nakamura et al., 2021)
3-hydroxypropionic acid	3-HPA	1,3-propanediol (1,3-PDO)	membrane-bound alcohol dehydrogenase (mADH) (1,3-PDO to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPAL) and membrane-bound aldehyde dehydrogenase (mAlDH) (3-HPAL to 3-HPA)	Platform chemical.	(Hua et al., 2020b; Zhu et al., 2018)
5-ketofructose	5-KF	Sucrose or fructose	Sucrase (sucrose to fructose and galactose) and fructose dehydrogenase (FDH) (fructose to 5-KF)	Non-nutritive sweetener.	(Adachi et al., 2020; Battling et al., 2020; Herweg et al., 2018; Hoffmann et al., 2020; Nguyen et al., 2021a; Siemen et al., 2018)
5-ketogluconic acid	5-KGA	Glucose	GlucDH (cytoplasmic glucose dehydrogenase) (Glucose to GlucA); GA5DH (cytoplasmic gluconate-5-dehydrogenase) (GlucA to 5-KGA)	Precursor of L-tartaric acid (industrially relevant compound).	(Zeng et al., 2019)
6-hydroxyhexanoic acid	6-HHA	1,6-hexanediol (1,6-HD)	ND	Platform chemical.	(Pyo et al., 2020)
6-(N-hydroxyethyl) amino-6-deoxy-L-sorbofuranose	6-NSL	N-2-hydroxyethyl glucamine (NHEG)	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSldH)) (NHEG to 6-NSL)	Miglitol (antidiabetic drug) precursor.	(Hu et al., 2020; Hu et al., 2019; Ke et al., 2019b; Ke et al., 2018, 2019a; Liu et al., 2021a; Liu et al., 2020a, 2020b)
Acetoin	–	2,3-butanediol	ND	Platform chemical used in cosmetics and pharmaceuticals, flavour enhancer.	(Zhou et al., 2018b)
Acrylic acid	–	1,3-PDO	alcohol dehydrogenase (1,3-PDO to 3-hydroxypropionaldehyde); 3-hydroxyacyl-(ACP) dehydratase and 3-hydroxydecanoyl-(ACP) dehydratase (3-hydroxypropionaldehyde to acrolein), aldehyde dehydrogenase (acrolein to acrylic acid)	Platform chemical used in superabsorbent polymers, plastics, synthetic rubbers, fibers, coatings, adhesives, leather finishing, and detergents.	(Zhao et al., 2022)
Adipic acid	–	1,6-HD	ND	Platform chemical.	(Pyo et al., 2020)
Arabinonic acid	AraA	Arabinose	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (Arabinose to AraA)	Precursor of erythrose and erythritol, used to produce polymers, composite cements and semiconductor processing materials and cosmetics. Can be used for medical applications.	(Fricke et al., 2022; Jin et al., 2019a; Liu et al., 2021b; Yao et al., 2017; Zhou et al., 2017a)
Bacterial cellulose	–	Glucose	Glucokinase (Glucose to Glucose-6-phosphate (G6P)); phosphoglucomutase (G6P to glucose-1-phosphate (G1P)); UDPG-pyrophosphorylase (G1P to UDP-glucose (UDPG)); cellulose synthase (polymerization of cellulose from UDP-glucose) (Lustri et al., 2015)	Biomaterial with industrial applications in food industry and biomedicine.	(Bandyopadhyay et al., 2018; Chandrasekaran et al., 2017; Dikshit and Kim, 2020; Du et al., 2021a; Tamahkar et al., 2019)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Product	Acronym	Obtained from	Enzyme(s) involved in biotransformation	Observations	References
Biolixiviant (acidic spent medium)	–	Sugars	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (sugars to organic acids)	Used for bioleaching for rare earth element recovery.	(Jin et al., 2019b; Schmitz et al., 2021)
Butyric acid	BA	Butanol	Alcohol dehydrogenase (mADH) (butanol to BA)	Synthetic raw material used in the fields of food, medicine, feed and agriculture.	(Hua et al., 2020a; Stewart et al., 2020)
Coenzyme Q10	CoQ10	–	Multiple enzymes	Used in food, cosmetic and pharmaceutical industries for treating heart diseases, cancer, diabetes, and Alzheimer's and Parkinson's diseases.	(Moghadami et al., 2021, Moghadami et al., 2019)
Dihydroxyacetone	DHA	Glycerol	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSIDH)) (Glycerol to DHA)	Tanning lotion additive.	(de la Morena et al., 2019b, de la Morena et al., 2019a, de la Morena et al., 2020; Dikshit et al., 2017, 2018; Dikshit and Moholkar, 2019; Hu et al., 2017; Jackson et al., 2019; Jittiang et al., 2020; Kataoka et al., 2021; Poljungreed and Boonyarattanakalin, 2017, 2018; Ripoll et al., 2021a, 2021b; Satirapipatkul et al., 2017; Stasiak-Różańska et al., 2018; Stasiak-Różańska et al., 2017; Tan et al., 2019; Tanamool et al., 2018) (Xu et al., 2021b)
D-tagatose	–	Galactitol	Unknown PQQ-dependant membrane-bound dehydrogenase	Rare sugar.	(Hoffmann et al., 2020)
Fructose	–	Sucrose	Invertase	Precursor of Non-nutritive sweetener 5-KF.	(Hoffmann et al., 2020)
Furoic acid	FA	Furfural	Unknown dehydrogenase	Used as a raw material in resin, plastic, food, pharmaceutical and perfume industries.	(Du et al., 2021b; Zhou et al., 2017b)
Galactonic acid	GaA	Galactose	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (Galactose to GaA)	Used in the pharmaceutical and cosmetics industries, and as an acidifier in food.	(Hua et al., 2021; Jin et al., 2019a; Yao et al., 2017; Zhou et al., 2019b; Zhou et al., 2017a, 2018a)
Gluconic acid	GlucA	Glucose	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (Glucose to GlucA)	Used in the dairy, beverage, and textile industries. Used in metal cleaning, dishwashing, laundry detergents, health products and cosmetics Used as an artificial sweetener and antibacterial agent.	(Banerjee et al., 2018; Jiang et al., 2017; Jin et al., 2019a; Ordóñez et al., 2017; Pal et al., 2019, Pal et al., 2017; Qin et al., 2021a; Yao et al., 2017; Zhou et al., 2019; Zhou et al., 2019c; Zhou et al., 2017a; Zhou and Xu, 2019a; Zhou et al., 2017b, 2018b) (Habe et al., 2021; Jackson et al., 2019)
Glyceric acid	GlyceA	Glycerol	Alcohol dehydrogenase (mADH) (glycerol to glyceraldehyde) and Aldehyde dehydrogenase (mAlDH) (glyceraldehyde to GlyceA)	Platform chemical with proved biological activity. Can be used for surfactant and bioplastic production.	(Hua et al., 2019b, Hua et al., 2018, 2019a)
Glycolic acid	GlycoA	Ethylene glycol	Alcohol dehydrogenase (mADH) (ethylene glycol to GlycoA)	Used in the production of chemicals such as adhesives, in metal cleaning, as a dye-stuff additive. Precursor of polyglycolic acid and poly (Lactic-co-Glycolic Acid).	(Hua et al., 2019b, Hua et al., 2018, 2019a)
5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid	HMFA	5-Hydroxymethylfurfural	Unknown membrane-bound dehydrogenase (5-Hydroxymethylfurfural to HMFA)	Platform chemical for biofuels, solvents, and building block for polymers	(Sayed et al., 2019)
Isomaltomegalosaccharide	IMS	Maltodextrin	Dextran dextrinase (DDase) (Maltodextrin to IMS)	Enhances water solubility of lipophilic compounds.	(Lang et al., 2022)
L-erythrose	–	Erythritol	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSIDH)) (erythritol to L-erythrulose); Cytoplasmic L-ribose isomerase (L-RI) (L-erythrulose to L-erythrose)	Rare aldotetrose with various pharmacological activities.	(Zou et al., 2017)
Levan	–	Fructose	Levansucrase (Fructose to levan)	Polysaccharide used in the food industry	(Hövels et al., 2020; Hundscheil et al., 2020b, Hundscheil et al., 2020a; Christoph S. Hundscheil et al., 2020; Jakob et al., 2020; Ua-Arak et al., 2017a, 2017b)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Product	Acronym	Obtained from	Enzyme(s) involved in biotransformation	Observations	References
L-erythrulose	–	Erythritol	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSIDH)) (erythritol to L-erythrulose)	Used as an ingredient in tanning agents	(Burger et al., 2019; Hua et al., 2020b)
L-ribonate	–	L-ribose	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSIDH)) (L-ribose to L-ribonolactone, further hydrolyzed spontaneously to L-ribonate)	Novel product obtained from oxidation with major polyol dehydrogenase	(Yakushi et al., 2018)
L-sorbose	–	D-sorbitol	Major polyol dehydrogenase (also known as glycerol dehydrogenase (GlycDH) and sorbitol dehydrogenase (mSIDH)) or GoSIDH (special, NADP ⁺ dependant)	Vitamin C precursor	(Azar and Alemzadeh, 2020; Hua et al., 2022; Kim et al., 2019; Liu et al., 2021d; Liu et al., 2022; Ma et al., 2019; Nguyen et al., 2021b; Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019d) (Xu et al., 2021b)
L-xylo-3-hexulose	–	Galactitol	Unknown PQQ-dependant membrane-bound dehydrogenase	Rare sugar	
Mannonic acid	MA	Mannose	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (Mannose to MA)	Used as a chemical, chelator, dispersant, and retardant for oil wells	(Jin et al., 2019a; Yao et al., 2017; Zhao et al., 2020; Zhou et al., 2017c)
Phenylacetaldehyde	PAI	2-phenylethanol (PE)	Alcohol dehydrogenase (PEA to PAI)	Aromatic compound used in the food and cosmetics industries	(Štefuca et al., 2019)
Phenylacetic acid	PAA	PE	Alcohol dehydrogenase (PEA to PAI); Aldehyde dehydrogenase (PAI to PAA)	Aromatic compound used in the food and cosmetics industries	(Mihal' et al., 2021; Mihal' et al., 2017; Štefuca et al., 2019)
Pyrroloquinoline quinone	PQQ	PqqA peptide	Complex biosynthetic pathway comprised of many enzymes (codified by <i>pqqABCDEFG</i> gene cluster)	Redox cofactor, its sodium salt is used as a dietary supplement	(Ma et al., 2021; Ma et al., 2017; Wan et al., 2017; Wang et al., 2021)
Riboflavin	–	–	Multiple enzymes	Water-soluble vitamin (B2) used as food additive or in pharmaceuticals	(Noman et al., 2020)
Xylitol	–	D-arabitol	Membrane-bound D-arabitol dehydrogenase (mArDH) (D-arabitol to L-xylulose); NAD-dependent xylitol dehydrogenase (XDH) (L-xylulose to Xylitol)	Pentahydroxy sugar alcohol, with applications in food and pharmaceuticals industries	(Zhang et al., 2018)
Xylonic acid	XA	Xylose	Glucose dehydrogenase (mGlucDH) (Xylose to XA)	Platform chemical with applications as cement water reducer, precursor for 1,4-butanediol, 1,2,4-tributantriol and 3,4-dihydroxybutyrate. Used in food industry as acidifier.	(Cao and Xu, 2019; Dai et al., 2020; Hahn et al., 2020; Han et al., 2021; He et al., 2021; Hou et al., 2018; Hua et al., 2020b; Jin et al., 2019a; Liu et al., 2021b; Mao et al., 2022; Miao et al., 2017; Shen et al., 2020; Xu et al., 2021a; Yao et al., 2017; Zhang et al., 2021; Zhou et al., 2019a; Zhou et al., 2017a, c, 2018a, c; Zhou and Xu, 2019b; Zhou et al., 2017d, 2018d)

2. Improvements through process design

Successful bioprocess development requires addressing existing challenges for improved yields of target products. Lack of process control, poor reaction engineering or problems of long-term operational stability are usual bottlenecks that impair the applicability of otherwise interesting bioconversions at laboratory scale. In this section, we have summarised recent methods that aimed towards more efficient processes involving *Gluconobacter* strains are summarised.

2.1. Bacterial immobilisation

Performing biocatalytic processes with whole cells at an industrial level presents several difficulties (Guisan et al., 2020). Generally, biocatalyst separation from the reaction media is difficult since it limits the possibilities of reuse and increases operational costs. Through immobilisation via integration in solid support or matrixes, these difficulties can

be circumvented, as the biocatalyst is confined in a region of space with retention of its catalytic activity enabling its continuous and repeated use and simpler separation (Berillo et al., 2021; Wang et al., 2022). Furthermore, enhanced biocatalyst stability is an additional advantage of bacterial immobilisation that contributes to increased accumulated productivities (Karagoz et al., 2019).

However, immobilisation can sometimes lead to diffusional problems, inactivation, or even an increase in process costs (Stojković and Žnidaršič-Plazl, 2020; Trelles and Rivero, 2020). Therefore, a careful selection of immobilisation matrix and strategy is essential for the development of an efficient biocatalyst. For instance, the selection must consider the bioprocess conditions in which the catalyst will be used as pH, temperature or additives may affect support materials (Gungor-musler-Yilmaz et al., 2016). Moreover, bacteria tend to be susceptible to the immobilisation matrix. Particularly, bacteria of the genus *Gluconobacter* have been observed to modify their behaviour as they self-organised in clusters aided by the secretion of an extracellular

polymeric material that occurs upon immobilisation in a poly(vinyl alcohol) cross-linked with N- vinyl matrix (Truong et al., 2017). Hence, the study of new strategies for the immobilisation of *Gluconobacter* strains aiming for more efficient bioconversions continues to be necessary.

Ideally, the immobilisation matrix should be physically resistant, stable, hydrophilic, inert, easily functionalised, biocompatible, resistant to microbial attack and cost-effective. A wide variety of inorganic and organic matrixes are available for bacterial immobilisation. Inorganic matrixes include sintered glass, ceramic, carbon-based materials or diatomite and quartz (Zhang et al., 2022). Meanwhile, examples of natural matrixes are collagen, agar, agarose, cellulose, chitosan and alginate, while synthetic matrixes are constituted by polymers such as acrylamide, polyurethane and polyvinyl alcohol (Berillo et al., 2021).

As for bacterial immobilisation strategies, coupling to solid surfaces, encapsulation, aggregation and entrapment are the most frequently used (Karagoz et al., 2019). Coupling, either by adhesion or adsorption, is the attachment of cells to a surface naturally or induced by the addition of binding agents. Encapsulation consists of bacterial confinement, in which the bacteria are separated from the reaction medium by a barrier. Aggregation involves the formation of cell aggregates linked together naturally or by the addition of flocculating or binding agents.

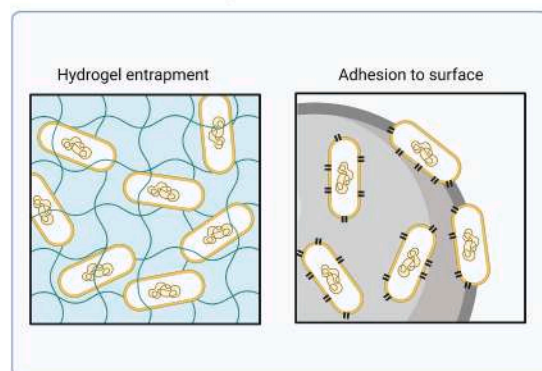
Over the years, numerous examples of the immobilisation of

Gluconobacter strains (Dikshit and Moholkar, 2019; Hekmat et al., 2007; Hu et al., 2020; Martin and Perlman, 1976a; Park et al., 1994; Stasiak-Róžańska and Błażej, 2012), are found in the literature, mainly of strains from the *G. oxydans* species used in biotransformations (Hua et al., 2019b; Raška et al., 2007; Shiraishi et al., 1989; Wu et al., 2010). It is worth noting that the cumulative knowledge on the immobilisation of *Gluconobacter* strains has not only been obtained from its use in bioconversions but also for the preparation of biosensors and microbial fuel cells (Gordegir et al., 2019; Martin and Perlman, 1976b; Plekhanova et al., 2021; Plekhanova et al., 2018; Stasiak-Róžańska et al., 2018; Zhou et al., 2019a). In this section of the review, recent efforts concerning immobilisation techniques for *Gluconobacter* strains are summarised focusing on biotransformations. Several examples are classified based on the nature of the immobilisation matrix, describing the immobilisation approach and advantages brought about to *Gluconobacter*-catalysed biotransformations as well as opportunities for improvements in the technology (Fig. 2).

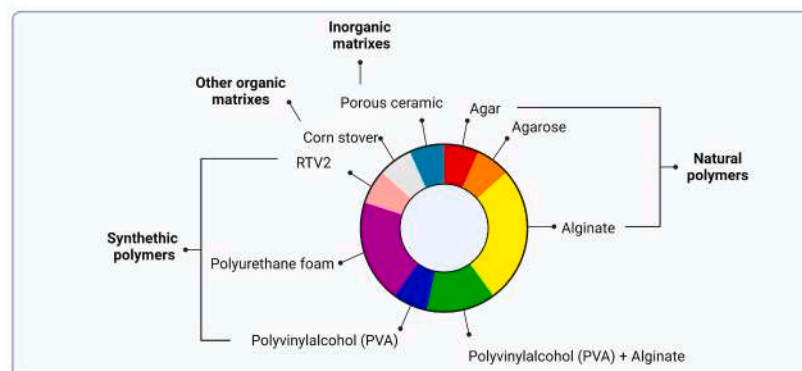
2.1.1. Natural polymers

Immobilisation by entrapment in hydrogels such as agar, agarose and alginate is a frequently used approach for heterogeneous biocatalyst preparation, with alginate being currently one of the preferred matrixes for *Gluconobacter* strains immobilisation (Fig. 2b). These immobilisation

a Immobilisation strategies



b Immobilisation matrixes



c Advantages and challenges of immobilisation

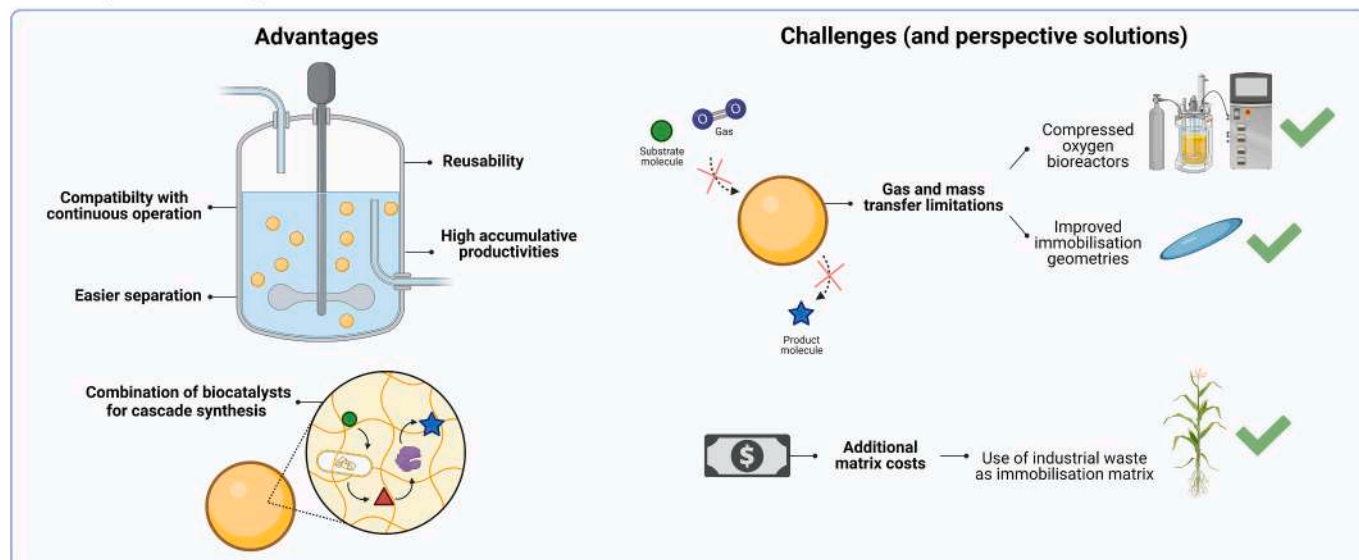


Fig. 2. *Gluconobacter* immobilisation. a) Common *Gluconobacter* immobilisation strategies. b) Immobilisation matrixes used for *Gluconobacter* immobilisation in the last 5 years. Agar ((Ripoll et al., 2021a); Agarose ((Ripoll et al., 2021a); Alginate ((Hua et al., 2020b; Ripoll et al., 2021b; Stasiak-Róžańska et al., 2018; Stasiak-Róžańska et al., 2017); Corn stover ((Hu et al., 2019); Polyurethane foam ((Dikshit et al., 2018, 2017; Dikshit and Moholkar, 2019); Polyvinyl alcohol (PVA) ((Mihal et al., 2017)); Polyvinyl alcohol (PVA) + Alginate ((Hua et al., 2019b; X. Zhou et al., 2019a); Porous ceramic ((Hu et al., 2017)); RTV2 ((Hu et al., 2020). c) Advantages and challenges of *Gluconobacter* immobilisation.

matrixes are affordable, biocompatible, chemically inert and easy to operate, mostly in mild conditions (Stasiak-Róžańska et al., 2018; Trelles and Rivero, 2020). Usually, the chosen format for bacterial immobilisation in these hydrogels is beads, as their preparation is simple, scalable and cost-effective (Hua et al., 2020b; Ripoll et al., 2021b). It involves the mixture of the biomass with an aqueous agar, agarose or alginate solution and a subsequent dropwise addition of the resulting mixture into a solution of CaCl_2 (for alginate) or cold sunflower oil (for agar and agarose). Then, the resulting beads can be easily separated from the liquid with a strainer. With this immobilisation technologies, products like DHA (Ripoll et al., 2021b; Ripoll et al., 2021a; Stasiak-Róžańska et al., 2018; Stasiak-Róžańska et al., 2017), and XA (Hua et al., 2020b) were recently obtained through *Gluconobacter* based preparations.

Given the fact that the biocatalytic machinery to partially oxidise substrates in *Gluconobacter* strains lays within the periplasmic bacterial membrane, Stasiak-Róžańska et al. used 4% alginate to immobilise not only whole cells, but also a bacterial extract prepared by ultrasonic disintegration of *G. oxydans* ATCC 621 (Stasiak-Róžańska et al., 2018; Stasiak-Róžańska et al., 2017). The resulting immobilised preparations were then successfully employed to biotransform crude glycerol into DHA in shake flasks. The immobilised bacterial cell extract was used for two production cycles, obtaining a maximum DHA production of 8.9 ± 0.03 g/L and 8.7 ± 0.06 g/L from 30 g/L of crude glycerol during the first and second cycle of utilisation, respectively. Glycerol consumption in the first cycle was quantitative, suggesting that it might have been transformed into different subproducts by other enzymes present in the extract, which include a variety of PQQ-dependant membrane-bound dehydrogenases and other cytosolic enzymes. Among these enzymes are mADH and ALDH which are two dehydrogenases responsible for glycerol oxidation into GlyceA, the former being PQQ-dependant and the latter being molybdopterin-dependant. Interestingly, during the second biotransformation cycle, glycerol was not totally consumed, which the authors argue that it can be related to a shortage in PQQ cofactor. In a later work, the authors compared the DHA production abilities of whole cells and bacterial extracts in free and immobilised form using 4% alginate as a matrix (Stasiak-Róžańska et al., 2018). Within the immobilised biocatalysts, the superiority of immobilised whole cells was demonstrated as a maximum of 15.6 ± 0.7 g/L of DHA was obtained from 50 g/L of crude glycerol in comparison to 5.0 ± 0.57 g/L obtained with the immobilised bacterial extract after 96 h and 20.7 ± 1.4 g/L of DHA with free cells after 96 h. The authors discuss that immobilisation may hinder the gas exchange between the reaction medium and the immobilised biocatalysts, as well as affect the mass transfer of substrates and products to and from within the immobilised preparations.

We have recently observed the same effect after *G. oxydans* NBRC14819 immobilisation in agar and agarose beads, two other natural hydrogels (Ripoll et al., 2021a). Crude glycerol conversion in shake flasks diminished significantly after immobilisation. While free resting cells could produce up to 36.1 ± 0.2 g/L of DHA, agar and agarose immobilised preparations produced 9.0 ± 2.3 g/L and 8.5 ± 1.1 g/L of DHA respectively, in the same 20-h time frame. However, quantitative conversions of 50 g/L of crude glycerol could be achieved with both immobilised preparations after approximately 150 h. Moreover, in contrast with free resting cells that could not be reused, the immobilised preparations could be reused up to 5 times, retaining residual activities of around 60% demonstrating operational stabilization provided through immobilisation.

Mass transfer limitation has in the past proved to impact biotransformations using immobilised bacteria in natural polymers. However, this problem has been solved by a careful selection of the reaction engineering. For instance, Hua et al. (Hua et al., 2020b) followed an elegant approach that increased oxygen partial pressure in the bioconversion of xylose into XA to help improve oxygen, substrates and nitrogen sources availability in 3% alginate immobilised *G. oxydans* NL71. The strategy improved the yields from 190.6 g/L to 292.1 g/L of XA.

Another interesting application for alginate based immobilisation matrixes is the preparation of hybrid heterogeneous catalysts for the implementation of catalytic cascades. Immobilised catalytic cascades, although challenging in their design as the technology has to contemplate the requirements of each biocatalyst, have the advantage of the proximal spatial disposition of the biocatalysts that may improve the overall catalytic rate. Moreover, it may facilitate the process as the reaction may be performed in one-pot, eliminating the need for isolation and purification steps of intermediates. In order to exploit these advantages, our group reported the co-immobilisation of *G. oxydans* NBRC14819 and Pf-ATA, an amine transaminase from *P. fluorescens*, for the one-pot biosynthesis of serinol from pure and crude glycerol (Ripoll et al., 2021b). Pf-ATA was first immobilised by chelation on Agarose-IDA microbeads and the resulting product was mixed with a *G. oxydans* bacterial pellet. The resulting mixture was then incorporated into a 3% alginate solution and beads were formed. Within the hybrid preparations, glycerol was oxidised to DHA by *G. oxydans* and then subsequently subjected to a reductive amination by Pf-ATA in the presence of L-Alanine, to yield serinol and pyruvate as a sub product. With this technology 36 mM of serinol were produced from pure glycerol after 44 h. By implementing artificial cascades such as the one described, the scope of products obtained from *Gluconobacter*-catalysed reactions can be broadened.

2.1.2. Synthetic polymers

Although natural polymers are by far the most studied material for bacterial immobilisation, the advancements in the chemistry and production of synthetic polymers has prompted their exploration in the field. For instance, polyurethane foam is a novel synthetic immobilisation matrix that has been recently studied by Dikshit et al. for immobilising *G. oxydans* MTCC 904 to synthesise DHA (Dikshit et al., 2017, 2018; Dikshit and Moholkar, 2019). This immobilisation matrix has high porosity and a large surface area that enables it to obtain a high cell density in a relatively small volume. Apart from including a low-cost matrix, the immobilisation protocol is fairly simple (Dikshit and Moholkar, 2016).

An improvement in DHA production was reported by Dikshit et al. after combining the *G. oxydans* immobilisation in polyurethane foam with the sonication of the fermentation media (Dikshit et al., 2018). In the aforementioned work, *G. oxydans* was again immobilised in polyurethane foam and sonicated at a 20% duty cycle together with the fermentation medium during the biotransformation. An increase in glycerol consumption of between 61.06 and 71.70% was observed at different initial crude glycerol concentrations (20–50 g/L). The authors attributed this enhancement of DHA production to conformational changes in the GlycDH enzyme induced by ultrasound since they proved that while sonication had no effects on cell morphology, it may have affected the secondary structure of the enzyme.

Using this immobilisation strategy, Dikshit et al. also carried out the biotransformation of crude glycerol to DHA in fed-batch mode. In the work, various pulse-feeding strategies in shake flasks were tested (Dikshit and Moholkar, 2019). In comparison with resting and free growing cells, the polyurethane foam immobilised cells showed a better DHA yield, achieving a glycerol conversion of 87.52% equivalent to 65.64 g/L of glycerol after 4 glycerol feeding pulses (15 g/L). Nonetheless, DHA production diminished with each glycerol pulse. The kinetic constants for each segment between pulses were determined by fitting the data to a pseudo 1st order rate equation, with results that were consistent with product inhibition.

Polyvinyl alcohol (PVA) is another interesting synthetic polymer that can be used for bacterial immobilisation as it is a cheap, non-toxic and durable hydrogel (Beji et al., 2020; Zhang et al., 2020). It constitutes an alternative to natural polymers such as carrageenan, pectate and alginate that generally present poor mechanical stability, as it is scarcely biodegradable and able to resist temperatures up to 55 °C and pH values between 3.1 y 8.5 (Schlieker and Vorlop, 2006). This matrix has been

recently used for biotransformations with a variety of microorganisms, alone or combined with other materials such as alginate and polyethylene glycol (Dolejš et al., 2019; Hou et al., 2020; Yang et al., 2019).

As an example in *Gluconobacter* strains, Mihal' et al. reported the immobilisation of *G. oxydans* NCIMB 8035 for the production of phenylacetic acid (PAA) from 2-phenylethanol (PE) (Mihal' et al., 2017). In the research, the LentiKats® technology was used, which involved the formation of lenticular shaped hydrogels that present lesser diffusional problems and allow easy separation from the reaction media due to their diameter (Schlieker and Vorlop, 2006). The biotransformation was carried out in non-growing conditions in an airlift bioreactor. Immobilisation in PVA proved beneficial for the cells, as it protected them from death induced by high concentrations of PE. However, an expected decrease in the rate of oxygen transfer as well as in the exchange rate of substrate and product to and from the biocatalyst was observed. Using the immobilised biocatalyst 7.17 g/L of PAA was obtained, which represents an 89.8% yield. The immobilised preparations could also be reused up to three times maintaining a 44% residual activity. In addition, it was demonstrated that the LentiKats® could be stored at 6 °C in a 1 M phosphate buffer solution for 28 days, with minor effects in their activity.

When immobilising in PVA, it is not uncommon to experience bead agglomeration. To avoid this phenomenon, alginate is frequently mixed with PVA, further improving the beads' surface (Hou et al., 2020; Tuyen et al., 2020; Wang et al., 2020). Hua et al. recently used this strategy to immobilise *G. oxydans* NL71 for producing glycolic acid (GlycoA) from ethylene glycol (Hua et al., 2019b). In the work, the immobilisation was carried out by preparing an aqueous solution of 9% PVA with 1–2% alginate and mixing it with the dried biomass. The mixture was then pumped into a crosslinking solution containing 5% boric acid and 1% CaCl₂, resulting in beads with a 2–3 mm diameter. After immobilisation, a decrease in the mass transfer was observed, much like with the natural hydrogels mentioned in the previous section of the review. Once again, this issue was overcome by increasing oxygen supplementation using an oxygen-compressed bioreactor, improving GlycoA production not only for immobilised cells but also free cells.

With the same approach Zhou et al. prepared PVA-alginate beads containing *G. oxydans* NL71 for the production of XA from xylose and overcame gas and mass transfer limitations with an appropriate bioreactor (Zhou et al., 2019a). Repeated use of this immobilised preparation in 28-h cycles started with 200 g/L of xylose was tested, obtaining approximately 1.6 kg of XA after eight cycles. Additionally, the beads could be used in a continuous system that incorporates bipolar membrane electrodialysis for obtaining XA instead of its sodium salt. With this approach, 329.2 ± 7.2 g/L of XA was accumulated in the electrodialysis acid chamber after 48 h.

As a final example of a synthetic polymer for the immobilisation of *Gluconobacter* strains, a kind of two-component silicone material called RTV2, was recently used to immobilise *G. oxydans* ZJB16009 for 6-NSL production (Hu et al., 2020). The immobilisation process required the preparation of RTV2 cubes by a multi-step process that began with mixing the material with NaCl and activated carbon. The mixture was then passed through a 80 mesh sieve and kept still after a 10 min agitation to allow solidification. Afterwards, cubical particles of side 2 mm were cut and washed in a pressurised water bath at 121 °C. The cubes were then aged by 1 mM H₂SO₄ for an hour and subsequently washed with water. After packing a bubble column bioreactor with the resulting particles, the bioreactor was sterilised and filled with sterile growth medium. Bacterial immobilisation was carried out by inoculating a seed culture into the medium and culturing the system for 24 h at 30 °C. The growth medium was then removed and the packed cubes were washed with sterile water. Using this protocol an estimated 4.0 g DCW/L were loaded in the bioreactor. Bacterial cells could be reused in up to nine 36-h cycles of 6-NSL production, with one 12-h in-situ regeneration cycle every 3 production cycles. An average of 42.6 g/L of 6-NSL (83.1% conversion rate) was achieved in each cycle.

2.1.3. Other organic immobilisation matrixes

Hu et al. immobilised *G. oxydans* ZJB16009 on corn stover particles for 6-NSL production (Hu et al., 2019). The immobilisation strategy involved cell adsorption to the lignocellulosic material, with a similar protocol to that discussed in the previous section for RTV-2 immobilisation. As corn stover bagasse is a residue of corn production, it is a cheap feedstock to use as an immobilisation matrix, which also contributed to the biorefinery concept (Li et al., 2015). In these optimal conditions, the immobilised preparations could be reused up to 4 times, maintaining a residual activity above 70%. After 4 rounds, an average production of 44.2 ± 1.5 g/L of 6-NSL per cycle was achieved, corresponding to a conversion rate of 88.4 ± 2.0%.

2.1.4. Inorganic matrixes

Several inorganic matrixes have also proven suitable for the immobilisation of *Gluconobacter* strains. Hu et al. also used porous ceramic for immobilising *G. oxydans* ZJB09113 to produce DHA from glycerol (Hu et al., 2017). Three different porous ceramics were tested, with pore sizes of 30, 40 and 50 µm, achieving a 10 mm diameter maximum DHA production using ceramics with 40 µm pores. With this strategy, approximate 4.8 g/L of cells were immobilised. The optimum pH value selected was pH 4.5, as DHA production is favoured at low pH and there is less probability of contamination with other bacteria. Several aeration rates were tested and 1.2 vvm proved to be optimal for glycerol bioconversion. The authors discussed that the optimal aeration rate for resting free cells was higher than that for immobilised cells. This is an advantage of bacterial immobilisation in porous ceramic carriers, as gas dispersion is benefited, thus extending the residence time of air in the bubble column bioreactor. The production of DHA was studied in the optimised condition with different glycerol and urea feeding strategies. Continuous feeding of a glycerol and urea solution achieved the highest DHA concentration (177.2 ± 6.8 g/L). In these conditions the cells could be reused up to 12 times, with an average production of 96.4 ± 4.1 g/L per cycle, which translates to a conversion rate of 94.8 ± 2.2%.

An in-depth analysis of the literature on immobilisation of *Gluconobacter* strains clearly demonstrates remarkable advantages of this technology for *Gluconobacter*-catalysed reactions. Improved operational stabilities and facilitation of downstream processing through easier separation from reaction media of the biocatalyst are the most common advantages although distinct improvements for specific reactions had been described. While the nature of the immobilisation matrix seems not to play a major role in the benefits provided by the heterogenisation of these bacteria so far, natural supports may prove advantageous in the future, when more comprehensive analyses of the sustainability of the processes are performed.

Another common challenge that is still to be solved in the immobilisation of *Gluconobacter* strains is caused by the inherent strict aerobic nature of these bacteria. This challenge moves forward the research on the field towards technological solutions that improve oxygen transfer limitations. Scientists have found solutions that are still to be perfected for improved productivities. We envision that immobilised preparations that successfully retain bacteria via for example covalent interaction between the outer membrane and an inert highly porous matrix, may be ideal for an optimal supply of oxygen to the bacteria during catalysis.

Undoubtedly, more efficient biotransformation processes will necessitate a better understanding of the interaction between bacteria and support as it would guide the design of a new generation of *Gluconobacter* immobilised preparations. For this reason, we believe it is essential to develop better characterization methodologies to provide information i.e., on the spatial distribution of the bacteria on the support or the molecules or chemical groups of the bacterial membrane involved in the crosstalk with the support (Betancor and López-Gallego, 2022).

Finally, 3D printing has emerged as an enabling technology in immobilisation of biocatalysts and has not yet been applied to *Gluconobacter* strains. The technology provides easy control of physical parameters of the support with high precision and is adaptable and

scalable. Moreover, it has the advantage of integrating bacteria with materials that are then printed with *a la carte* sizes and shapes for specific applications (Dimartino et al., 2022). Also, materials have been printed in shapes such as gyroids that ease oxygen transfer within the printed structures. 3D printing therefore could become a new trend in *Gluconobacter* immobilisation with significant advantages.

2.2. Bioreactor selection

As obligate aerobes, bacteria of the genus *Gluconobacter* tend to present limitations when used as biocatalysts in large-scale fermentations. The design of the bioreactor must consider the elevated oxygen demand of the bacteria. Moreover, when working with immobilised bacteria, it is common to encounter mass transfer limitations that hinder productivity. With a proper bioreactor design, these mass transfer limitations could be overcome. In recent years, several reactor configurations have been studied to obtain improved yields in a wide variety of *Gluconobacter*-catalysed biotransformations with both free and immobilised cells (Fig. 3).

2.2.1. Bubble column bioreactors

Bubble column bioreactors have a very simple structure and count with no mechanical agitation. Both aeration and agitation are attained by gas sparging (Stanbury et al., 2017) (Fig. 3a). They are presented as a low-cost and low-energy consuming option for bioconversions with obligate aerobes. Recently, the technology was used by Hu et al. to produce DHA and 6-NSL with immobilised *G. oxydans* ZJB09113 (Hu et al., 2019; Hu et al., 2017). DHA production was carried out in a homemade bubble column bioreactor with a 2 L working volume (Hu et al., 2017). The height-to-diameter ratio of the fermenter was 6.0 and it included a sintered glass gas diffuser with pores ranging from 80 to 120 μm . To maintain a temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$, water was circulated within an outer jacket, while pH was controlled manually, and polyethylene glycol was added as an antifoaming agent. A water cooler condenser was added at the top of the reactor and sterile water was added as needed to avoid volume reduction due to evaporation. With this reactor configuration, several aeration rates were tested using porous ceramic immobilised *G. oxydans* as catalysts. An aeration rate of 1.2 vvm allowed for maximum DHA yield. The authors proposed that the immobilisation carrier could benefit from gas dispersion, allowing for a larger air retention time, further contributing to achieve high productivities with less air expenditure.

For 6-NSL production, a 1 L homemade bubble column reactor with a height-to-diameter ratio of 6.0 was used (Hu et al., 2019). The gas diffuser was made of sintered glass with pores ranging from 80 to 120 μm . The system was completed with a cooling jacket and a pH

controlling system to maintain 15 $^{\circ}\text{C}$ and a pH of 5.5. Polyethylene glycol was added as an antifoaming agent. Aeration proved to be a key element for the production of the target compound and maintenance of bacterial fitness during the reaction. At aeration rates below 1 vvm, 6-NSL production was hindered revealing cell damage, as the immobilised preparations could not be reused more than two times. An increase in aeration rate was accompanied by an increase in 6-NSL production, reaching a maximum at 2.5 vvm where the oxygen supply was sufficient for mixing and the biotransformation. This technology is a simple alternative to more complex reactors, allowing for high fluid circulation, as well as proving good mass and heat transfer with lower shedding stress. This last characteristic makes this kind of reactor especially suitable for use with immobilised bacteria.

2.2.2. Airlift bioreactors

Like bubble column bioreactors, airlift bioreactors are pneumatically agitated, relying only on the aeration rate for providing the oxygen needed for the biotransformation and mixing. The main difference between these types of bioreactors is that liquid circulation is achieved in the airlift bioreactors in addition to that caused by the bubble flow (Stanbury et al., 2017). A schematic representation of a concentric tube airlift bioreactor can be observed in Fig. 3b. As previously discussed in the immobilisation section of this review, Mihal' et al. used immobilised and free biomass of *G. oxydans* NCIMB 8035 for the production of PAA from PEA utilising an internal loop airlift bioreactor (Mihal' et al., 2017). In this case, results showed that the aeration rate only had a minor effect on the PAA production for immobilised cells. However, for free cells, aeration in the reactor had a significant impact on PAA production depending on the biomass concentration. In the conditions of the experiment, the final PAA concentration was approximately 9.3 g/L, 30% higher than the one achieved with the immobilised preparation.

2.2.3. Oxygen-compressed bioreactors

Reactions with obligate aerobes require high oxygen environments that cannot be achieved most of the time simply by supplying air into a reactor. Replacing air with pure oxygen is the simplest way to achieve an oxygen-enriched environment (Hua et al., 2020b). However, due to the elevated cost of oxygen, this strategy becomes non-viable when working with open systems. Alternatively, the use of oxygen-compressed bioreactors for these biotransformations allows for oxygen-enriched environments with high partial pressures that result in a high utilisation rate of oxygen for a fraction of the cost (Hua et al., 2020b) (Fig. 3c). Additionally, oxygen-compressed bioreactors eliminate the requirement for antifoaming agents due to the high pressures achieved inside the vessel, easing the collection of more pure end products (Zhou et al., 2019a). These bioreactors have been recently used for the production of sorbose,

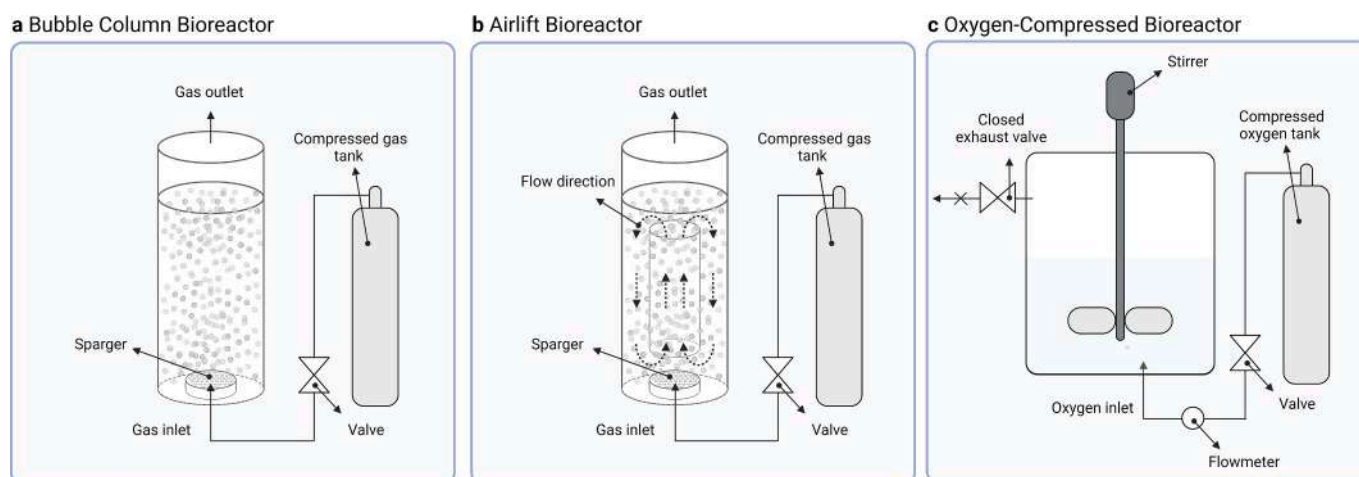


Fig. 3. Schematic representations of different types of bioreactors used for biotransformations catalysed by *Gluconobacter* strains.

acetoin, erythrose and 3-hydroxypropionic acid (3-HPA) with *G. oxydans* NL71 free cells and GlycoA and XA with immobilised preparation of this strain (Table 2).

A clear example of the benefits of this technology with free and immobilised cells has been described by Hua et al. in the production of GlycoA from ethylene glycol. Reactions were carried out using free or PVA-alginate immobilised *G. oxydans* NL71 in three different reactor configurations: air-open stirred bioreactor, oxygen-open stirred bioreactor and oxygen-compressed stirred bioreactor (Hua et al., 2019b). Initial experiments of GlycoA production were carried out in an air-open stirred bioreactor. From the results, it became evident that free cell catalysis was more efficient, as immobilised cells only reached a GlycoA yield of 41.3 g/L, meaning that 54% of the yield was achieved with free cells (76.5 g/L) in the same 48 h time frame. The dissolved oxygen (DO) level in the free cell experiment was lower in comparison with the immobilised cell experiment, indicating that the demand and consumption of immobilised cells were lower than that of free cells due to mass transference problems. To improve the oxygen uptake, the glycolic acid biosynthesis was carried out in an oxygen-open stirred bioreactor with a pure-oxygen feed rate of 0.5 vvm. In these conditions, not only did the glycolic acid production for both free and immobilised cells increase (93.5 g/L and 66.9 g/L, respectively) but oxygen consumption was also increased. In both cases, the DO profile levels remained at nearly 35% during the biotransformation, meaning an improved mass transfer for the immobilised cells. However, since this oxygen supply strategy is unfeasible at a larger scale, the authors evaluated the use of an oxygen-compressed stirred bioreactor. The production of GlycoA with this reactor reached 63.3 g/L in 48 h, virtually the same yield achieved with the immobilised cells in the oxygen-open stirred bioreactor but saving the oxygen consumption by a 40-fold.

Table 2

Production of various compounds using free and immobilised cells of *G. oxydans* NL71 in different types of stirred bioreactors.

Product	Cells	Productivity (g/L.h)			Ref
		Air-aerated open bioreactor	Oxygen-aerated open bioreactor	Oxygen compressed bioreactor	
Sorbitose	Free	4.32 (72 h)	6.12 (72 h)	6.01 (72 h)	(Zhou et al., 2019d)
	Free	10.7 (24 h)	25.4 (24 h)	24.5 (24 h)	(Hua et al., 2020b)
	Immobilised	7.9 (24 h)	11.7 (24 h)	12.2 (24 h)	(Hua et al., 2020b)
XA	Free	1.59 (48 h)	–	1.95 (48 h)	(Zhou et al., 2019a)
	Immobilised	0.86 (48 h)	–	1.39 (48 h)	(Hua et al., 2019a)
3-HPA	Free	–	–	2.82 (24 h)	(Hua et al., 2020b)
Erythrose	Free	–	–	14.78 (24 h)	(Hua et al., 2020b)
GlycoA	Free	1.59 (48 h)	1.95 (48 h)	–	(Hua et al., 2019b)
	Immobilised	0.86 (48 h)	1.39 (48 h)	1.32 (48 h)	(Hua et al., 2019b)
Acetoin	Free	3.25 (30h)	–	4.61 (36 h)	(Zhou et al., 2018b)

2.3. Biotransformation optimisation using design of experiments (DOE)

Design of Experiments (DOE) is a valuable mathematical tool for process optimisation, as it allows for the identification of key variables in a certain process, their importance, and how to control them to achieve the best possible outcome (Lee, 2019). This approach differs from the classic one-variable-at-a-time approach (also known as OVAT) as its main idea is to design a series of experiments varying more than one factor at the time, executing the lesser number of experiments as possible (Veljković et al., 2019). DOE has been successfully applied for the optimisation of chemical processes, as well as for the optimisation of varied productive processes from diverse industries such as the automotive, aerospace and electronics industries (Sethuramiah and Kumar, 2016). Bioprocesses involving bio-based catalysts, be them whole cells, bacterial extracts, or purified enzymes, can also be the subject of optimisation by means of DOE. In these processes it is frequent to encounter a series of variables or factors that may be key to achieve greater results and some that are not that significant, in some cases interactions between factors can be observed, all of this affecting the final reaction yield. Examples of these factors are the different components of a reaction media, the concentration of a certain cofactor or operational parameters like temperature, pH, agitation speed and aeration, among many others.

The correct selection of the experimental design is a fundamental aspect in DOE as there are many to choose from, each of them with distinctive characteristics that adjust to different scenarios, and that produce information of different qualities. Among those experimental designs there are the more classical approaches, namely full factorial design, fractional factorial design or screening designs (Antony, 2014), or Response Surface Methodology (RSM) designs (Lee, 2019). A correct experimental design leads to a series of “runs” that have to be performed, with the subsequent registration of their response, to then execute a statistical analysis that will render an optimal combination of factors. A typical set-up for a DOE experiment can be obtained with various statistical computer programs such as Design Expert, Minitab, JMP, Statgraphic Plus, SPSS, The R Project, Six Sigma, Unscrambler, NCSS, Cornerstone, SAS or S-Matrix (Azcarate et al., 2020; Wagner et al., 2014).

In particular, RSM is a collection of statistical techniques that can be used to model processes and determine the best combination of factors to achieve the highest response, generally providing more information than two-level factorial or fractional-factorial design, and employing lesser experiments than a three-level factorial design (Azcarate et al., 2020; Wagner et al., 2014) (Fig. 4). Generally, these design methods are less laborious and time-consuming, translating into shorter analysis times and reduced experimental costs. Due to them being multilevel designs, responses can be fitted to quadratic or cubic equations, providing better models (Wagner et al., 2014). The most common RSM designs are Central Composite design (CCD) and Box-Behnken design (BBD), which mainly differ in the localization of the experimental points (Rakić et al., 2014), as CCD contains extreme factor combinations while BBD does not (Fig. 4).

In this section of the review, we aim to highlight the vast potential of DOE as a tool for optimisation of *Gluconobacter* based biotransformations with a special focus on RSM, as this methodology is far from being well-known and applied as it should be (Azcarate et al., 2020), despite its great potential. In the next sub-sections, different recent examples of RSM optimisation regarding *Gluconobacter*-catalysed biotransformations are summarised.

2.3.1. Reaction media components optimisation

RSM can be used for diverse purposes, for example, the optimisation of the reaction media composition of a certain biotransformation. Moghadami et al. have recently reported the use of RSM for the improvement of coenzyme Q10 (CoQ10) production by *G. japonicus* FM10 (Moghadami et al., 2021). For this, a five factor, five level CCD

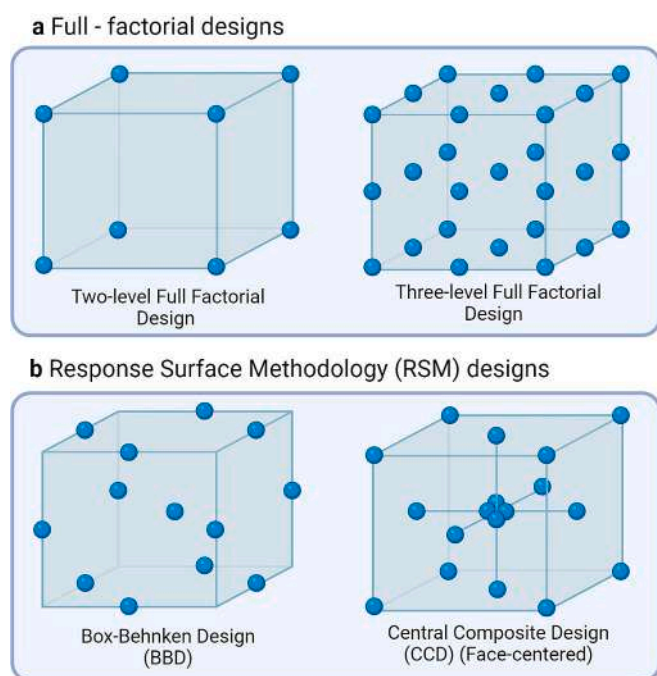


Fig. 4. Graphical representations of different experimental designs considering three factors.

design was utilized to optimise the reaction medium composition. Sorbitol, yeast extract, peptone, KH_2PO_4 , and MgSO_4 were the selected factors, while dry cell weight (DCW) and CoQ10 concentration were chosen as responses. Using the Minitab 18.1 software, 30 experiments were designed, and their responses analysed. The highest CoQ10 concentration (3 mg/L) was obtained using the optimised media composition, which was 110 g/L of sorbitol, 25 g/L of yeast extract, 35 g/L of peptone, 0.5 g/L of KH_2PO_4 and 0.55 g/L of MgSO_4 . Interestingly, the authors found that the optimised medium to obtain the highest DCW was different, consisting of 90 g/L of sorbitol, 17.5 g/L of yeast extract, 35 g/L of peptone, 0 g/L of KH_2PO_4 , and 1.7 g/L of MgSO_4 , achieving a value of 6 g/L. Peptone was identified as the most important factor for CoQ10 production, while sorbitol was found to be the most important factor to obtain high DCW.

Another example of the application of RSM for reaction media optimisation was described by Noman et al. for the optimisation of riboflavin production by newly isolated *G. oxydans* FBFS97 (Noman et al., 2020). In this work the authors first used an eleven factor, two-level Plackett-Burman design (PBD) to evaluate the impact of eleven salts (FeSO_4 , FeCl_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , NaCl , CaCl_2 , KCl , ZnCl_2 and $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) on the bioprocess. This experimental design is a standard screening design, able to detect large main effects that can be then used as factors in RSM. The PBD was obtained using the Minitab 18 software. The measured response was riboflavin production (mg/L). The resulting model showed that K_2HPO_4 and CaCl_2 had a significant positive impact in product formation, whereas the other salts had a negligible or negative impact. Considering these results, the authors utilized the Design Expert 12 software to obtain a four factor, five level Central Composite Design (CCD) for RSM. In this case the factors were K_2HPO_4 and CaCl_2 , along with fructose and tryptone, which were selected as the carbon and nitrogen sources for the reaction media based on previous experiments. 30 runs were performed, and riboflavin production was evaluated. The optimised media composition was fructose 25 g/L, tryptone 12.5 g/L, K_2HPO_4 9 g/L, and CaCl_2 0.06 g/L, with a predicted riboflavin productivity of 23.2 mg/L. The model was then experimentally validated, showing a 97.7% accuracy. The authors state that the results obtained through this optimization protocol surmount those

obtained with other riboflavin producing strains.

2.3.2. Operational parameters optimisation

RSM can also be employed to optimise operational parameters to obtain high product yields in *Gluconobacter*-catalysed processes. In a recent work, He et al. used this approach to improve XA yields (He et al., 2021). The bioconversion of xylose by *G. oxydans* NL71 in batch fermentation was analysed. Agitation, aeration and biomass concentration were selected as the studied factors. The authors used the Design Expert 12 software to develop a three factor, three level Box-Behnken design. 15 experiments were carried out and the response, specific XA productivity ($\text{g}_{\text{XA}}/\text{g}_{\text{biomass}}\text{h}$), was registered and evaluated. The optimised values obtained by the model were: agitation speed 728 rpm, aeration rate 7 L/min, and biomass concentration 1.11 g/L. Using these optimised conditions, an experiment was carried out in the fermenter, reaching a specific XA productivity of $6.64 \pm 0.20 \text{ g}_{\text{XA}}/\text{g}_{\text{biomass}}\text{h}$, which is highly similar to that predicted by the model ($6.74 \text{ g}_{\text{XA}}/\text{g}_{\text{biomass}}\text{h}$). This specific XA productivity value is presented by the authors as one of the highest in comparison to other reports dealing with the same biotransformation. Additionally, crude glycerol bioconversion to DHA was optimised by Dikshit et al. using immobilised *G. oxydans* MTCC 904 as a biocatalyst (Dikshit et al., 2017). A three factor, five level CCD was designed using the Minitab 15.1 software, comprising a total of 20 runs. The selected factors for optimisation were pH, temperature, and glycerol concentration, while the studied response was glycerol conversion (%). The optimised reaction parameters were pH 4.7, temperature 31°C and crude glycerol concentration 20 g/L. Validation experiments were carried out using the optimised conditions, obtaining a conversion of 89.16%, a value that is close to the predicted value of 91.32%.

Alternatively, RSM approaches can be used to optimise downstream processing. As an example, the purification and concentration of GlucA produced by *G. oxydans* NCIM-2095 was optimised by Pal et al. using this strategy (Pal et al., 2019). The biotransformation of glucose from sugarcane juice into GlucA was performed obtaining a high conversion yield (0.9 g/g). The product was then purified from the broth using an integrated membrane system. A four-factor, five-level CCD design was obtained using the Design-Expert 8.06 software. The selected factors were applied pressure, crossflow rate (CFR), pH, and initial GlucA concentration. The registered responses were GlucA permeation and glucose rejection. 30 experiments were designed and executed, and their responses analysed. The optimal parameters were determined to be applied pressure 12 bar, CFR 400 L/h, pH 4 and GlucA concentration 40 g/L. In these conditions, the model predicted 86% GlucA permeation and 84% glucose rejection. Validation experiments were performed reaching values of 88% GlucA permeation and 85% glucose rejection, which are close to the predicted values obtained from the statistical model. The optimisation protocol of the downstream process allowed for the development of an efficient system that can effectively retain glucose to be recycled while yielding highly pure GlucA.

3. Improvements through genetic modification

Gluconobacter strains have many qualities that turn it into a potential synthetic biology relevant chassis. This microorganism can oxidise a great number of carbohydrates, alcohols and other relational compounds, which can be further taken advantage of for potential metabolic engineering purposes (Voitechović et al., 2020). Therefore, this section focuses on reviewing the different strategies used to perform genetic modification in *Gluconobacter* to generate strains with increased bioprocess efficiency. Schematic descriptions of the strategies that have been used for genetic modification of *Gluconobacter* strains in the last five years can be observed in Fig. 5.

3.1. Random mutagenesis

Random mutagenesis techniques are advantageous when working

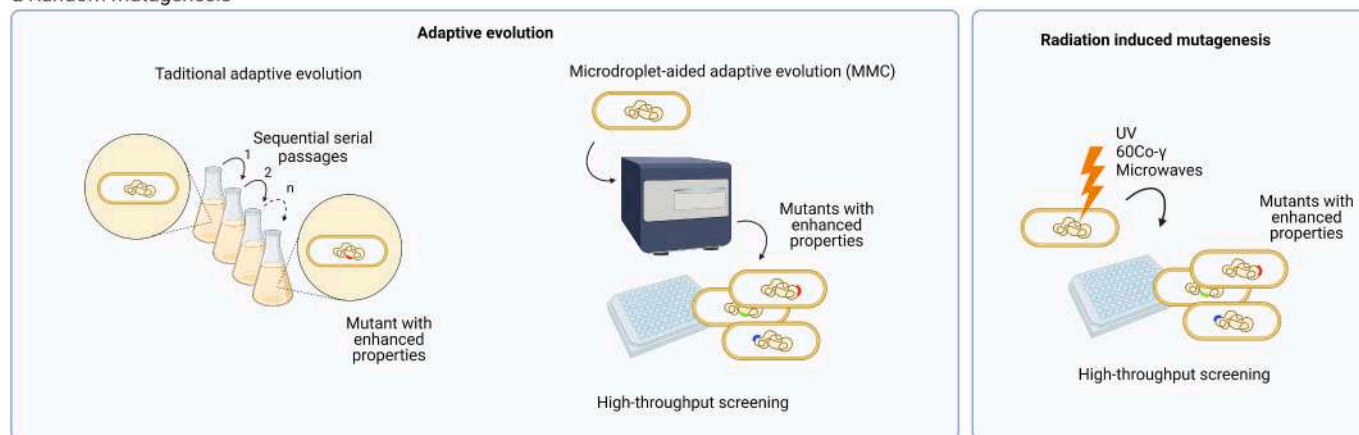
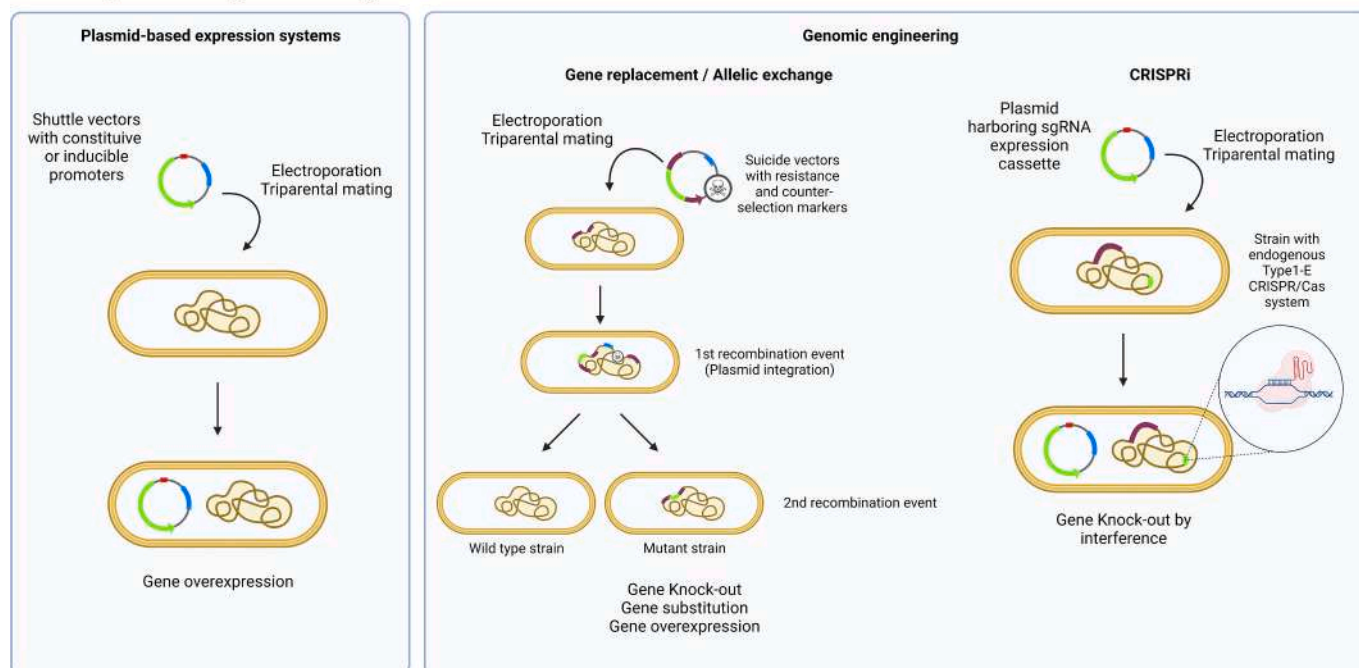
a Random mutagenesis**b Rational plasmid and genome editing**

Fig. 5. Genetic engineering strategies for *Gluconobacter* used in the last five years.

with non-model organisms such as *Gluconobacter* strains, as there is no need to know their genomic backgrounds in depth to obtain mutants with enhanced phenotypes (Yu et al., 2020). Moreover, through these fairly simple techniques, large libraries of mutants can be constructed.

3.1.1. Adaptive evolution

A great tool to generate strains with a high production yield is adaptive evolution. This process submits the microorganism to an unfavourable environment forcing it to generate mutations to better adapt to the conditions in which its being cultured. Adaptive evolution has been successfully applied in *Gluconobacter* strains for the selection of mutants with better characteristics. Jin et al. intensified sugar utilisation from lignocellulose oxidation using an adaptive evolution approach (Jin et al., 2019a). They continuously alternated the medium with different hydrolysate inhibitors to develop more robust *G. oxydans* fermentation. After 420 days, a mutant that presented a 40-fold increase in the membrane-bound PQQ-dependent glucose dehydrogenase enzyme (mGlucDH) expression was obtained, in comparison to the parental strain. This enzyme is responsible for the conversion of lignocellulose-derived sugars to the corresponding sugar acids.

More recently, a microbial microdroplet culture system (MMC) was used to achieve the adaptive evolution of *Gluconobacter* strains for the production of Vitamin C precursors L-Sorbose and 2-KLG. This system is an adaptive evolution platform based on microfluidics that can perform high throughput screening of mutants and automatically subculture those with a certain desired phenotype. Using this technology, Liu et al. reported the obtention of a *G. oxydans* WSH-004 mutant with increased D-sorbitol and high temperature tolerance, after 90 days (Liu et al., 2021d). The *G. oxydans* MMC10 strain was able to grow at a 300 g/L D-sorbitol concentration and can perform its oxidation at 37 °C. A genomic analysis of the adapted strain showed that it presented mutations related to translation, amino acid and nucleotide metabolism, carbohydrate metabolism, and energy metabolism. Based on these findings, Li et al. used the MMC technology to improve 2-KLG tolerance during this compound's production using *G. oxydans* MMC3 (Li et al., 2022). Before the adaptive evolution process *G. oxydans* MMC3's growth was severely impaired in the presence of concentrations above 60 g/L of 2-KLG, reaching maximum OD_{600nm} values of 2. After 45 days of adaptive evolution, the strain *G. oxydans* 2-KLG5 was obtained. This 2-KLG tolerant strain presented OD_{600nm} values above 4 and an increased 2-

KLG titre of 7.68 g/L, which was higher than the 5.60 g/L obtained previously with the *G. oxydans* MMC 3 in the same conditions.

Adaptive evolution has proven to be successful method to generate strains that can achieve high product yields and are adapted to unfavourable environments. However, despite of the fact that new technologies are allowing for more efficient and time saving evolution processes, these protocols might still take a considerable amount of time. An alternative to this approach is the implementation of radiation induced mutagenesis.

3.1.2. Radiation induced mutagenesis

Radiation induced mutagenesis is an effective genetic modification technique to generate mutants with biotechnological applications. This method involves induced mutation by irradiation, followed by the selection of mutants with the desired characteristics. Ke et al. exposed *G. oxydans* ZJB-605 to UV radiation with the aim of generating a strain with improved membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase (mSIDH) catalytic activity for 6-NSL production (Ke et al., 2018). A mutant strain (*G. oxydans* ZJB16009) was obtained, presenting a 1.5-fold catalytic activity improvement and an increase of 33.6% in the production of 6-NSL in a 5 L stirred bioreactor using resting cells. Furthermore, Zhu et al. used the UV-mutagenesis technique to obtain *G. oxydans* DSM 2003 mutants with different 3-HPA production abilities (Zhu et al., 2018). Through advanced transcriptional analysis of the mutants the authors were able to determine that the mADH and mADH enzymes are responsible for 3-HPA production in *G. oxydans* DSM 2003. These findings allowed the authors to successfully generate two mutant strains. One strain overexpressing the genes *adhAB* that codes for two subunits of mADH (*G. oxydans* DSM 2003/*adhAB*) and other strain overexpressing *aldh* that codes for mADH (*G. oxydans* DSM 2003/*aldh*). The mutants were generated using a plasmid-based expression system (the utilisation of these systems is reviewed in a later section). 3-HPA production reached 45.8 g/L when the mutant strains were mixed at a 1:2 cell density ratio (*G. oxydans* DSM 2003/*adhAB*:*G. oxydans* DSM 2003/*aldh*).

In a recent work, Liu et al. described a protocol for sequential mutagenesis, combining ^{60}Co - γ irradiation and microwave treatment (Liu et al., 2020a). This irradiation protocol, combined with a high-throughput screening method based on Fehling's reagent was successfully used for the obtention of a *G. oxydans* ZJB-605 mutant with a high mSIDH activity. The mutant strain *G. oxydans* H-8 was then successfully used for the production of miglitol precursor 6-NSL. The newly developed strain could produce 64.3 ± 2.2 g/L of 6-NSL from 70 g/L of the substrate (N-2-hydroxyethyl glucamine), while the parental strain only produced 48.1 ± 1.3 g/L of 6-NSL. A study of gene expression by qPCR revealed that the genes *sldBA*, encoding mSLDH, were upregulated in the mutant strain. Additionally, two genes of the *pqqABCDE-ldd* gene cluster, *pqqB* and *pqqC* were also significantly upregulated in *G. oxydans* H-8. These genes are related to mSLDH's co-factor pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthesis.

Irrespective of the approach used, randomly induced mutagenesis is a fast and efficient way to generate strains with particular characteristics. However, these methodologies necessitate high-throughput screening methodologies to be successful (Watanabe et al., 2018). On the contrary, rational approaches, although more conservative, can take advantage of the latest developments in rational plasmid and genome engineering techniques described in the next sections.

3.2. Rational plasmid and genome editing

Genetic engineering tools allow for the rational design of new bacterial strains to use as microbial cell factories in green and sustainable processes. In contrast with random mutagenesis, rational genetic engineering facilitates the obtention of mutant strains in a less time-consuming way, while eliminating, as mentioned before, the need for high-throughput screening methods. Due to the industrial importance of

Gluconobacter strains, the study of their genome and metabolism has increased significantly in the last years, elucidating new metabolic pathways and determining the role of key enzymes that constitute possible targets for genetic engineering purposes (Chen et al., 2022; Kataoka et al., 2022; Kataoka et al., 2021; Liu et al., 2019; Miao et al., 2017; Noman et al., 2020; Wan et al., 2017; Zhao et al., 2022; Zhu et al., 2018). Nonetheless, genetic engineering tools for *Gluconobacter* strains are still scarce in comparison to the ones available for other organisms. In this section of the review, a compendium of this tools is presented, accompanied by examples of their application in biotransformations.

3.2.1. Toolkit for rational genetic modification in *Gluconobacter* strains

Several plasmidic vectors have been successfully used in *Gluconobacter* strains to confer new phenotypes or alter gene expression (Table 3). For protein expression, the most widely used family of backbone vectors is the pBBR1 family and its derivatives, which have been known for years as broad-host-range shuttle vectors that can replicate in both *Gluconobacter* and *E. coli* (Kovach et al., 1995). However reliable, this family of vectors was not conceived for application on *Gluconobacter* strains, and it may result in low to medium copy numbers. Recently, a new set of shuttle vectors for *Gluconobacter* strains have been developed by Liu et al. by incorporating sequences of replication proteins obtained from endogenous *G. oxydans* plasmids (Liu et al., 2021c). In the work, different new backbone plasmids are described, with different resistance genes and different copy numbers ranging from low to high, constituting a very valuable contribution to the field of rational genetic modification in *Gluconobacter* strains.

Concerning suicide plasmids for genomic integration, the most used vectors are derivative of *pk18mob* and *pk19mob* (Battling et al., 2020; Kataoka et al., 2022; Qin et al., 2021b; Yan et al., 2018). Within these plasmids, the most frequently used counter-selection markers are the *upp*, *codA* and *sacB* genes, which confer susceptibility to 5-fluorouracil, 5-fluorocytosine and sucrose, respectively (Battling et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Qin et al., 2021b).

Whether using plasmid vectors for gene overexpression or for genomic operations that require integration, the selection of the antibiotic resistance marker is of paramount importance when working with *Gluconobacter* strains. The vast number of strains that comprise this bacterial genus tend to present natural resistance for a series of commonly used antibiotics, hindering selection processes. As an example, Liu et al. assessed the growth of five different strains of the species *G. oxydans* on agar plates containing different concentrations of gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline and kanamycin (Liu et al., 2021c). The results showed that while all strains were susceptible to streptomycin, kanamycin and tetracycline, none of them were susceptible to chloramphenicol and only some of them were susceptible to ampicillin and gentamicin. Therefore, it is recommended to assess the antibiotic susceptibility of the selected working strain before designing genetic constructions.

Promoter selection is another key aspect to consider when designing genetic constructions. In Table 4 we summarised promoters of different origins and strengths that have been recently used in various *Gluconobacter* strains for different genetic operations. While some strong *E. coli* promoters like *P_{tufB}* have successfully been employed in *Gluconobacter* strains in the past (Saito et al., 1997), it is not uncommon to find those who do not perform as well outside their natural host. To avoid sub-optimal promoter performances, it is important to identify natural promoters of *Gluconobacter* strains, further expanding the genetic tools available for this bacterial genus. Consequently, we would like to highlight the work of Chen et al., who in a recent work described a large amount of natural promoters of *G. oxydans* WSH-003 obtained by RNA-seq (Chen et al., 2021). In the work, the authors describe a new strong promoter (*P₂₇₀₃*) that presents a three-fold of the activity of *P₂₆₄*, a well-known promoter of *Gluconobacter* strains. Additionally, two shuttle promoters were described (*P₀₉₄₃* and *P₃₀₂₂*), suitable for expression in strains of both *E. coli* and *Gluconobacter*.

Table 3Backbone plasmids used in *Gluconobacter* strains for genetic modification.

Backbone plasmid*	Derived from	Selection marker	Copy number	Counter selection marker	Functionality	Strains in which it was used
pBBR1MCS-2	pBBR1MCS	Kanamycin	Low - medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR (Herweg et al., 2018; Hoffmann et al., 2020; Siemen et al., 2018), <i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR Δ tolB (Siemen et al., 2018), <i>G. oxydans</i> KCTC 1091 (Kim et al., 2019), <i>G. albidus</i> LMG 1768 (Hoffmann et al., 2020), <i>G. japonicus</i> LMG 26773 (Hoffmann et al., 2020), <i>G. oxydans</i> Δ mgdh::fdh (Hoffmann et al., 2020), <i>G. japonicus</i> LMG 1417 (Hövels et al., 2020), <i>Gluconobacter</i> sp. CHM43 (Habe et al., 2021), <i>Gluconobacter</i> sp. TOR14 (Habe et al., 2021)
pBBR1MCS-4	pBBR1MCS	Ampicillin	Low - medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. frateurii</i> TOR14 (Yakushi et al., 2018), <i>G. oxydans</i> NBRC3244(Nakamura et al., 2021)
pBBR1MCS-5	pBBR1MCS	Gentamicin	Low - medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019), <i>G. oxydans</i> ZJB-605 (Ke et al., 2019b), <i>G. oxydans</i> NL71(Shen et al., 2020), <i>G. oxydans</i> H-8 (Liu et al., 2021a), <i>G. oxydans</i> H24 (Wang et al., 2019), <i>G. oxydans</i> DSM 2003 (Zhu et al., 2018), <i>G. oxydans</i> DSM 2003 Δ adhA (Zhu et al., 2018), <i>G. oxydans</i> DSM 2003 Δ aldh (Zhu et al., 2018)
pK18mobSacB	Pk18mob	Kanamycin	Does not replicate in <i>Gluconobacter</i>	sacB gene	Suicide vector (integration)	<i>G. oxydans</i> 621H(Qin et al., 2021b; Yan et al., 2018), <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> ATCC 9937 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0110 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0049 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> WSH-005 (Qin et al., 2021b)
p2–5		Kanamycin		–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003(Qin et al., 2021a), (Chen et al., 2021)
pAJ63a	pk18mobGII	Kanamycin	Does not replicate in <i>Gluconobacter</i>	upp gene	Suicide vector (integration)	<i>G. oxydans</i> IK003.1(Battling et al., 2020)
pKOS6b	pAJ63a	Kanamycin	Does not replicate in <i>Gluconobacter</i>	codA gene	Suicide vector (integration)	<i>G. frateurii</i> CHM43 (Yakushi et al., 2018), <i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR (Hoffmann et al., 2020)
pGUC	pUC18	Ampicillin		–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Gao et al., 2020)
P13-Tet	pMD19-T, pBBR1MCS-3	Tetracycline	Medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c; Liu et al., 2022)
pk19A	pk19mobsacB	Ampicillin	Does not replicate in <i>Gluconobacter</i>	sacB gene	Suicide vector (integration)	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271 (Kataoka et al., 2022)
pSHO8	pBBR1MCS-4	Ampicillin		–	Expression (shuttle vector)	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271 (Kataoka et al., 2022)
pBBR-35	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
pBBR-10	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
pBBR-R35	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
pBBR-R10	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
pBBR-3510	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
pBBR-R3510	pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
P1-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P2-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Low	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
p3-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P4-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Low	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P5-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Low	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P11-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P12-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Backbone plasmid*	Derived from	Selection marker	Copy number	Counter selection marker	Functionality	Strains in which it was used
P13-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	Medium	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c), <i>G. oxydans</i> 621H (Liu et al., 2021c)
P14-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.04,9 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c)
P15-kana	pMD19-T, pBBR1MCS-2	Kanamycin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c), <i>G. japonicas</i> 1.49 (Liu et al., 2021c), <i>G. cerinus</i> 1.110 (Liu et al., 2021c)
P5-amp	pMD19-T, pBBR1MCS-4	Ampicillin	Low	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c)
P3-gm	pMD19-T, pBBR1MCS-5	Gentamicin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c)
P14-sm	pMD19-T, pBBR1MCS-6	Streptomycin	High	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c)
pBBR1MCS-5-TgdhM-tetR-Ptet-RBS-gene-TBBa_B1002-T0028	pBBR1MCS-5	Gentamicin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b)
pBBR1MCS-5-araC-PBAD-MCS	pBBR1MCS-5	Gentamicin	–	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b)
pMM4a	pEXGOX-K	Kanamycin	–	–	Expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> BP.9 (Mientus et al., 2017)
pLUX0169-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pLUX452-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pLUX264-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pTET0169-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pTET452-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pTET264-gene	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
pBICISTRON	pBBR1MCS-2	Kanamycin	–	–	Inducible expression (shuttle vector)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)

* The word “gene” was added to the name of some plasmids that are intended for expression of different genes but are presented in literature with a name that includes the gene that was being expressed in that particular work.

Until recently, only promoters suitable for constitutive gene expression were available for this bacterial genus. Fortunately, some recent works describe inducible expression systems that can be successfully implemented in *Gluconobacter* strains, based on the AraC-P_{araBAD}, TetR-P_{tet} and LuxR-P_{lux} systems (Bertucci et al., 2022; Fricke et al., 2021b; Fricke et al., 2020). Fricke et al. reported a tunable expression system for *G. oxydans* 621H based in AraC-P_{araBAD}, with an extremely low expression in the absence of the inductor arabinose. With this system, up to a 480-fold induction could be achieved, which could also be tuned down varying the concentration of arabinose (Fricke et al., 2020). In another work, the same group described another tuneable system based on the TetR-P_{tet} system (Fricke et al., 2021b). In this opportunity an induction of up to a 3500-fold was described, which could be tuned down with varying concentration of anhydrotetracycline. Additionally, in a very recent work, Bertucci et al. described two different inducible expression systems for *G. oxydans* 621H, based on TetR-P_{tet} and LuxR-P_{lux} (Bertucci et al., 2022). While the system based in LuxR-P_{lux} could not be tuned by varying the concentration of AHS, the authors suggest that it can be used successfully as an on/off system, presenting relatively low induction ratios of about a 4-fold. In the same work, the authors also present two alternative tunable systems based on TetR-P_{tet}. While one of the genetic arrangements of TetR-P_{tet} system presented only up to a 19-fold induction, a bicistronic arrangement in which the induced gene and

the TetR repressor gene were controlled by the P_{tet} promoter showed better results. With this configuration, the induction ratio was up to more than a 3000-fold and the leakiness was significantly reduced.

To ensure optimum protein translation, a careful selection of the ribosome binding site (RBS) and its location in relation to the position of the start codon must be conducted. In Table 5 a compilation of recently reported RBS for *Gluconobacter* strains is presented. A fairly current RNA-seq study of *G. oxydans* 621H genome revealed a consensus motif (AGGAG) that was present in 94% of the analysed sequences (Kranz et al., 2018), this data was also further corroborated by Chen et al. in a more recent work (Chen et al., 2021). Moreover, Kranz et al. determined that the RBS sequences were mainly located 3–14 nt away from the start codon, suggesting an optimum spacer length of 7–8 nucleotides. Additionally, the authors single out ATG as the preferred initiation codon (84%). In a work by Mientus et al., the promoter regions of different membrane-bound dehydrogenases were studied and five more different RBS sequences were found (Mientus et al., 2017).

To complete this toolkit, transcriptional terminators need to be addressed. Frequently, the design of genomic constructs requires more than one terminator. It is important to rely on a set of different termination sequences to prevent homologous recombination events that might take place if the same terminator is used more than once (Teh et al., 2019). The sequences of some transcription terminators that have

Table 4
Promoters used in *Gluconobacter* strains.

Promoter	Type	Strength	Sequence	Source	Strains in which it was used (ref)
P _{tufB}	Constitutive	Strong		Genomic DNA of <i>G. oxydans</i> 621H, elongation factor TU	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019)
P _{tufB}	Constitutive	Strong		Promoter of elongation factor TU from <i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)	<i>G. oxydans</i> DSM2003 (Mao et al., 2022)
P _{tufB}	Constitutive	Strong	(Qin et al., 2021b)	Promoter of elongation factor TU from <i>G. oxydans</i> WSH-003	<i>G. oxydans</i> H24 (Wang et al., 2019), <i>G. oxydans</i> WSH-003(Chen et al., 2021; Gao et al., 2020; Qin et al., 2021b)
P _{lac}	Constitutive (en los pbbr porque no hay represor)		Caacatacagagccgg aagcataaagtgtaaa	Promoter from <i>E. coli</i> lac operon	<i>G. frateurii</i> TOR14 (Yakushi et al., 2018), <i>G. oxydans</i> NL71 (Shen et al., 2020), <i>Gluconobacter</i> sp. CHM43 (Habe et al., 2021), <i>Gluconobacter</i> sp. TOR14 (Habe et al., 2021), <i>G. oxydans</i> NBRC3244(Nakamura et al., 2021)
P ₂₆₄	Constitutive	Strong		Putative constitutive promoter for the gene <i>gox0264</i> from <i>G. oxydans</i> 621H (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> 621H(Bertucci et al., 2022; Fricke et al., 2020), <i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR(Herweg et al., 2018; Hoffmann et al., 2020; Siemen et al., 2018), <i>G. oxydans</i> 621H Δ hsdR Δ tolB (Siemen et al., 2018), <i>G. oxydans</i> IK003.1 (Battling et al., 2020), <i>G. albidus</i> LMG 1768(Hoffmann et al., 2020) <i>G. japonicus</i> LMG 26773 (Hoffmann et al., 2020) <i>G. oxydans</i> Δ mgdh::fdh (Hoffmann et al., 2020), <i>G. japonicus</i> LMG 1417 (Hövels et al., 2020), <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P _{gmr}	Constitutive			pBBR1MCS-5 (promoter for Gentamicin resistance)	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019)
P _{glp1}	Constitutive			Native GlpF aquaporin promoter in <i>G. oxydans</i> 621H	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019)
P _{glp2}	Constitutive			Native GlpF aquaporin promoter in <i>G. oxydans</i> 621H	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019)
P _{gdh}	Constitutive			genomic DNA of <i>G. oxydans</i> 621H (native promoter of glycerol dehydrogenase)	<i>G. oxydans</i> 621H(Tan et al., 2019)
P _{lux}	Inducible by AHL			Promoter from the Lux cassette from <i>Vibrio fischeri</i>	<i>G. oxydans</i> H24 (Wang et al., 2019), <i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
P ₁₁₆	Constitutive		(Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a)	Obtained from <i>G. oxydans</i> WSH-003 genome	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a), <i>G. oxydans</i> ATCC 9937 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0110 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0049 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> WSH-005 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> 621H (Qin et al., 2021b)
P ₁₁₂	Constitutive		(Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a)	Obtained from <i>G. oxydans</i> WSH-003 genome	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a), <i>G. oxydans</i> ATCC 9937 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0110 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> CGMCC 1.0049 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> WSH-005 (Qin et al., 2021b), <i>G. oxydans</i> 621H (Qin et al., 2021b)
P ₁₁₄	Constitutive		(Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a)	Obtained from <i>G. oxydans</i> WSH-003 genome	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021b, Qin et al., 2021a)
P _{amp+tufB}	Constitutive		(Qin et al., 2021b)	AmpR promoter + pTufB from <i>G. oxydans</i> WSH-003	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021b)
P _{ghp0169}	Constitutive	Strong		Promoter of hypothetical protein from <i>G. oxydans</i> DSM 2003 (Ke et al., 2019b) and <i>G. oxydans</i> 621H (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> ZJB-605 (Ke et al., 2019b), <i>G. oxydans</i> H-8 (Liu et al., 2021a), <i>G. oxydans</i> WSH-003(Chen et al., 2021), <i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
P _{atse}	Constitutive				<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Qin et al., 2021a)
P ₃₀₂₂	Constitutive, shuttle promoter	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of L-sorbose reductase from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P _{dnak}	Constitutive	Strong			<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₁₆₅₃	Constitutive	Medium	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932.1653 from <i>G. oxydans</i> WSH-003(Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₈₀₄	Constitutive	Medium	(Chen et al., 2021)	Promoter of protein translocase subunit SecE from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₆₄₇	Constitutive	Medium	(Chen et al., 2021)	Promoter of D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₂₀₅	Constitutive	Medium	(Chen et al., 2021)	Promoter of outer membrane protein from <i>G. oxydans</i> WSH-003(Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₁₂₉₅	Constitutive	Weak	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932.1295 From <i>G. oxydans</i> WSH-003(Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₃₂₇	Constitutive	Weak	(Chen et al., 2021)	Promoter of transketolase from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Promoter	Type	Strength	Sequence	Source	Strains in which it was used (ref)
P ₁₁₄₂	Constitutive	Weak	(Chen et al., 2021)	Promoter of flagellar hook protein FlgE from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₉₉₁	Constitutive	Weak	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932_0991 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₉₄₃	Constitutive, shuttle	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of bacterioferritin from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₂₀₃₈	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932_2038 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₂₀₅₇	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of stress response protein CsbD from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₂₅₆₄	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24) protein 2 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₀₃₆₅	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932_0365 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)
P ₂₇₀₃	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021)	Promoter of hypothetical protein B932_2703 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021; Liu et al., 2022), <i>G. oxydans</i> MD-16 (Liu et al., 2022)
P ₀₂₉₅	Constitutive	Strong	(Chen et al., 2021), (Liu et al., 2021c)	Promoter of 30S ribosomal protein S4 from <i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Chen et al., 2021; Liu et al., 2021c)
P _{vhb}	Constitutive			Promoter of <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin gene (VHb) (Liu et al., 2022)	<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2022), <i>G. oxydans</i> MD-16 (Liu et al., 2022)
P _{adhAB}	Constitutive	Strong		Promoter for the <i>adhAB</i> gene of <i>G. oxydans</i> ATCC 621H (Kataoka et al., 2022; Kim et al., 2019; Mientus et al., 2017)	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271 (Kataoka et al., 2022), <i>G. oxydans</i> 621H Δ supp Δ 2567–9 (Mientus et al., 2017), <i>G. oxydans</i> BP.9 (Mientus et al., 2017), <i>G. oxydans</i> KCTC 1091 (Kim et al., 2019)
P ₁	Constitutive		(Liu et al., 2021c)		<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c)
P ₂	Constitutive		(Liu et al., 2021c)		<i>G. oxydans</i> WSH-003 (Liu et al., 2021c)
P _{tet}	Inducible by anhydrotetracycline		(Fricke et al., 2021b)	Native promoter of <i>tetR</i> gene (Fricke et al., 2021b)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022; Fricke et al., 2021b)
P _{BAD}	Inducible by arabinose			Promoter from the AraC-P _{araBAD} system from the <i>E. coli</i> K12 derivative MC4100	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b; Fricke et al., 2020), <i>G. oxydans</i> BP.6 (Fricke et al., 2020)
P _{idh}	Constitutive	Strong		Promoter of inositol dehydrogenase (GOX1857) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	<i>G. oxydans</i> 621H Δ supp Δ 2567–9 (Mientus et al., 2017)
P _{sldAB}	Constitutive			Promoter of polyol dehydrogenase (GOX0854–5) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
P _{gldh}	Constitutive			Promoter of gluconate-2 dehydrogenase (GOX1230–2) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
P _{sdh}	Constitutive			Promoter of sorbitol dehydrogenase (GOX2094–7) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
P ₄₅₂	Constitutive	Medium			<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)

recently been used in *Gluconobacter* strains are presented (Table 6).

In the next sections of this review, several examples of genetic modifications of *Gluconobacter* strains are discussed, focusing on the improvement of biotransformations.

3.2.2. Genetic engineering using plasmid-based expression systems

Plasmid-based expression systems are the most popular form of genetic modification for prokaryotic hosts, due to their easy genetic manipulation. Genetic constructs based on shuttle vectors are usually ensembled and enriched using an *E. coli* strain as a host and then delivered to a *Gluconobacter* strain, either by electroporation or conjugation by triparental mating, which are the most widely used plasmid delivery technologies for this genus (Hövels et al., 2020; Schweikert et al., 2021; Shen et al., 2020; Zou et al., 2017). By incorporating expression plasmids, several strains of *Gluconobacter* have been enhanced, improving the production yields in a wide variety of biotransformations. To that aim, the overexpression of both homologous and heterologous genes has been carried out.

Several examples can be found in the literature concerning the

overexpression of key endogenous enzymes, which are directly responsible for the biotransformation of certain substrates into value-added compounds in *Gluconobacter* strains. Mainly, they cover the overexpression of the characteristic membrane-bound dehydrogenases that oxidise sugars, polyols and alcohols into ketones, aldehydes, and organic acids. For example, Mao et al. overexpressed the membrane-bound glucose dehydrogenase in *G. oxydans* DSM2003, responsible for the oxidation of xylose into XA (Mao et al., 2022). The mutant strain not only presented a high XA production from xylose (588.7 g/L) and from corn stover hydrolysate (CSH) without biotransformation (246.4 g/L), but also showed an increased tolerance to common inhibitors present in CSH like 5-hydroxymethyl furfural, furfural and formic acid. In another work, Ke et al. overexpressed the endogenous *sldBA* gene cluster, which codes for two subunits that comprise the mSLDH enzyme in *G. oxydans* ZJB-605, to enhance 6-NSL production (Ke et al., 2019b). By overexpressing this enzyme and adding certain amino acids that improve PQQ biosynthesis during growth, a cumulative 6-NSL titre of 184.28 g/L was achieved after three repeated batches of the biotransformation process, using mutant resting cells as a catalyst. Analogously, Tan et al.

Table 5
RBS used in *Gluconobacter* strains.

RBS sequence	Source	Strains in which it was used
AGGAG	Consensus motif of ribosome binding sites in <i>G. oxydans</i> 621H (Chen et al., 2021; Kranz et al., 2018)	<i>G. japonicus</i> LMG 1417 (Hövels et al., 2020), <i>G. oxydans</i> IK003.1 (Battling et al., 2020)
AGGAGA	Artificial Shine-Dalgarno sequence (Fricke et al., 2020)	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2020)
AAAGG	Downstream from promoter region of alcohol dehydrogenase (GOX1067–8) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
GGAGG	Downstream from promoter region of inositol dehydrogenase (GOX1857) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017) and Downstream from promoter region of polyol dehydrogenase (GOX0854–5) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
GGAGA	Downstream from promoter region of gluconate-2 dehydrogenase (GOX1230–2) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
GAAAG	Downstream from promoter region of D-lactate dehydrogenase from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
GAAGA	Downstream from promoter region of sorbitol dehydrogenase (GOX2094–7) from <i>G. oxydans</i> 621H (Mientus et al., 2017)	
AAAGAGGAGAAA	RBS BBa_B0034 from iGEM parts library	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)
AAAGCCGAGAAAGGTACCGC	Moderate strength RBS (Hensel, 2017)	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)

studied if the combined overexpression of the *sldBA* gene cluster and the glycerol transporter GlpFp could increase DHA production from glycerol using *G. oxydans* 621H (Tan et al., 2019). The authors observed an improved growth and glycerol tolerance when GlpFp was overexpressed alone, but a decrease in DHA production. Alternatively, the overexpression of GlycDH (also known as mSldH) resulted in a 13% increase in DHA production. However, when both genes were overexpressed at the same time, the DHA titre was lower than that achieved with the wild-type strain. It was understood by the authors that GlpFp overexpression improved glycerol uptake, which concomitantly increased bacterial growth as more glycerol could be metabolised in the cytoplasm. Inevitably, less glycerol could be converted to DHA, regardless of a proven augmented GDH activity. However, these findings could be further applied to the design of high-growth strains using glycerol as a carbon source for application in other biotransformations.

In some cases, the overexpression of endogenous genes different from the characteristic *Gluconobacter* membrane-bound dehydrogenases can aid in bettering biotransformations yields.

For instance, the overexpression of levansucrase LevS1417 can improve levan formation in *G. japonicus* LMG 1417 (Hövels et al., 2020).

Table 6
Terminators used in plasmid systems in *Gluconobacter* strains.

Terminator	Sequence	Source	Strains in which it was used
BBa_B1002	CGCAAAAAACCCCGCTTCGGCGGGGTTTTTTCGC	Artificial terminator from iGEM parts library	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b, Fricke et al., 2020), <i>G. oxydans</i> BP.6 (Fricke et al., 2020)
TgdHm	GCCGGAAACGAAAAAGGGGAGATGCCTGATGGCACTCCGCCCTTTTCATGCGCCCG	Terminator sequence of GOX0265 (Fricke et al., 2021b)	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b)
T0028	AGACTGAAGTCTCGGTTTCAGACAGATAAAAAAGCGGTCCGCAAGGGCGGGCTTTTTTGTCTCTCAGACCGCCCTACGAACCGCTCGGGAACGGCGC	Terminator sequence of GOX0028 (Fricke et al., 2021b)	<i>G. oxydans</i> 621H (Fricke et al., 2021b)
BBa_B0010	CCAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTTTGGTTTATCTGTTTTTGTGGGTGAACGCTCTC	Terminator T1 from <i>E. coli</i> rrmB	<i>G. oxydans</i> 621H (Bertucci et al., 2022)

This enzyme is extracellular and prefers sucrose as a substrate. The mutant strain presented a 2.5-fold increase in levansucrase activity in the supernatant, in comparison to the supernatant corresponding to the wild-type strain, improving the space-time yield of the conversion. Also, production yields could be enhanced by overexpressing endogenous accessory proteins that are not directly involved in converting a substrate into the product of interest. As an example, Shen et al. overexpressed the *trx* gene in *G. oxydans* NL71 to improve XA production from xylose (Shen et al., 2020). This gene codes for thioredoxin, a protein responsible for maintaining the redox equilibrium in cells. The authors argue that during XA production from treated lignocellulosic biomass, the presence of inhibitors such as formic acid, furfural or p-hydroxybenzaldehyde (PHBA) impairs *G. oxydans* activity. By overexpressing thioredoxin, the oxidative activity of the bacteria could be improved, enabling higher XA yields. While the overexpression of thioredoxin had a detrimental effect in XA production in the presence of furfural, an increase of productivity was observed for the mutant strains in the synthetic xylose media containing formic acid and PHBA. Increases of 17% and 7% in XA production were observed in the presence of the former and the latter, respectively.

Oftentimes the localisation of key enzymes, either by changing their cellular compartment location or their proximity to other enzymes within the same cellular compartment, could be improved by means of genetic modification facilitating the occurrence of certain reactions. There are a few recent examples of this technique in *Gluconobacter*-catalysed biotransformations. Zou et al. improved L-erythrose production from erythritol in *G. oxydans* DSM2003 by improving the location of cytoplasmic L-ribose isomerase (L-RI) in relation to mSIDH, the two enzymes involved in this synthesis (Zou et al., 2017). By linking these two enzymes capitalizing on the protein–peptide interactions of the PDZ domain and PDZ ligand, which were fused to each enzymatic structure, its spatial proximity was reduced and the L-erythrose yield was improved. This strategy presented a 1.4-fold increase in productivity. Bacterial cells that overexpressed the enzymes with the self-assembly system produced 23.5 g/L of L-erythrose, compared to the control cells that only overexpressed L-RI, which yielded just 17.2 g/L of the product in the same lapse.

The combination of these co-localisation strategies with the expression of exogenous genes can establish new artificial cascades. For example, Gao et al. designed a *G. oxydans* WSH-003 mutant with an improved ability to produce 2-KLG from D-sorbitol (Gao et al., 2020). The authors overexpressed L-sorbose dehydrogenase (SDH) linked to L-sorbose dehydrogenase (SNDH), both originally from *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001, in conjunction with the trimeric protein CutA from *Pyrococcus horikoshii*. This trimeric protein can act as a crosslinker protein that might form a longer protein chain of the linked SDH-SNDH, improving its stability and catalytic efficiency. For this construction, the SH3 adaptor protein and its ligand (SH3lig) were used as the docking protein and docking station peptide, being fused to the linked enzymes and the CutA protein, respectively. By implementing this system and overexpressing the *pqqABCDE* gene cluster, which is involved in cofactor PQQ biosynthesis, a 42.6 g/L titre of 2-KLG was achieved.

Also, the relocation of an enzyme within different compartments of a cell could aid in improving yields. Nakamura et al. proved this as they relocated a cytoplasmic exogenous DHQase to the periplasmic space of *G. oxydans* NBRC3244, which is involved in 3-dehydroshikimate (3-DHS) production from quinate (Nakamura et al., 2021). In some *G. oxydans* strains, quinate is firstly oxidised to 3-dehydroquininate (3-DHQ) by membrane-bound quinate dehydrogenase (QDH), which is then converted to 3-DHS by action of a DHQase. The authors argue that if cytoplasmic DHQase could be exported to the periplasm, 3-DHQ dehydration to obtain 3-DHS could occur more easily. *G. oxydans* NBRC3244 possesses an endogenous type II-DHQase (AroQ), but the authors' efforts to relocate it did not improve 3-DHS production. However, by overexpressing type-I DHQase AroD from *Ga. diazotrophicus* fused with a signal peptide for secretion to the periplasm at its N

terminus, an increase in 3-DHS was observed. The mutants harbouring the fusion protein presented a 3-DHS production rate of 1.9 mM/h whereas the control mutants that expressed AroD without the secretion peptide presented a production rate of 0.17 mM/h.

The expression of exogenous accessory enzymes can also help improve product yields. Kim et al. improved *G. oxydans* KCTC 1091 L-sorbose productivity by overexpressing a special NADP⁺ dependent sorbitol dehydrogenase (GoSIDH) from *G. oxydans* G624 in combination with LreNOX from *Lactobacillus reuteri* (Kim et al., 2019). The authors observed that GoSIDH can be inhibited by the NADPH that is formed during D-sorbitol oxidation. LreNOX is a NAD(P)H oxidase that is able to regenerate NADP⁺ during the biotransformation, thus minimizing NADPH inhibition and further improving L-sorbose production. A 2.9-fold increase in L-sorbose production was observed with this strategy. Additionally, Liu et al. overexpressed Vhb, a kind of bacterial hemo-globin from the genus *Vitreoscilla* to better improve the oxygen utilisation of a mutant of *G. oxydans* H-8 during 6-NSL production (Liu et al., 2021a). This strategy was combined with *sldBA*, *pqqABCDE* and *tlbD* overexpression, which are previously mentioned genes related to the membrane-bound mSIDH and cofactor PQQ biosynthesis. The overexpression of Vhb enhanced bacterial growth and augmented the relative transcription levels of respiratory chain-related enzyme genes. Furthermore, a slight improvement in 6-NSL production from 78.2 ± 1.8 g/L to 87.5 ± 5.9 g/L was obtained with the mutants overexpressing Vhb along with the other previously mentioned genes, in comparison with the mutants overexpressing only *sldBA*, *pqqABCDE* and *tlbD*.

On occasion, bacterial consortia can be useful to produce a certain compound, mainly when its synthesis require cascade reactions. For example, production of the natural sweetener 5-ketofructose (5-KF) from sucrose can be achieved using an artificial bacterial consortium. Herweg et al. overexpressed a fructose dehydrogenase in *G. oxydans* 621H Δ hdsR, which was originally from another *Gluconobacter* strain, *G. japonicus* (Herweg et al., 2018). This modification allowed the mutant strain to produce the natural sweetener 5-KF from fructose. Concentrations up to 489 g/L of 5-KF were obtained in a fed-batch process. In another work by the same group, a two-strain system for 5-KF production from sucrose was developed, based on these previous findings (Siemen et al., 2018). The hitherto mentioned *G. oxydans* 621H Δ hdsR mutant overexpressing a fructose dehydrogenase from *G. japonicus* NBRC3260 was combined with a new *G. oxydans* Δ hdsR Δ tolB mutant, overexpressing SacC from *Zymomonas mobilis* ZM4. SacC is an extracellular sucrose that can catalyse sucrose hydrolysis into fructose and glucose. By co-culturing these two strains at a 1:1 ratio the system yielded a 92.5% conversion to 5-KF starting from a sucrose-containing medium, and an 82% conversion from a sugar beet extract. Another example of the application of artificial bacterial consortium is the production of 2-KLG, which can be obtained from D-sorbitol in a two-step synthesis involving *G. oxydans* and *K. vulgare*. Capitalizing from a plasmid-based expression system, Wang et al. designed a one-pot process for 2-KLG synthesis using a bacterial consortium comprised of *G. oxydans*, *K. vulgare* and *Bacillus megaterium* (Wang et al., 2019). *G. oxydans* H24 first catalyses the oxidation of D-sorbitol into L-sorbose, which is then oxidised by *K. vulgare* to obtain 2-KLG. *B. megaterium* is known to improve the growth and productivity of *K. vulgare*. As L-sorbose can be further metabolised by *G. oxydans* H24 when D-sorbitol is depleted from the medium, it becomes necessary to control this bacterium's population. To that aim, the authors established a quorum sensing system by overexpressing lethal gene *ccdB* (from *E. coli*) under the control of the inducible P_{lux} promoter. In addition, proteins LuxI and LuxR from *Vibrio fischeri* were also overexpressed using P_{tufB} constitutive promoter. LuxI is an autoinducer synthetase that produces the inductor acylated homoserine lactone (AHL), while LuxR is a protein that binds to AHL. If the AHL-LuxR complex reaches a certain threshold, given by a high *G. oxydans* concentration, the P_{lux} promoter is induced and the *ccdB* gene is expressed, causing bacterial death. With this programmed death

system 68.80 ± 4.18 g/L of 2-KLG were obtained, a 19.5% increase in comparison with the control consortium.

Plasmid-based expression systems can also help unravel the functions of certain enzymes. For instance, Habe et al. investigated the heterologous expression of mADH (*adhABS* gene cluster) from *A. tropicalis* NBRC 16470 in *Gluconobacter* sp. CHM43 and its derivatives (Habe et al., 2021). In its original host, this enzyme is able to produce D-glyceric acid (D-GA) with an enantiomeric excess (ee) of 99%. Interestingly, the D-GA ee obtained in biotransformations with the double deletion strain TORI4 (*Gluconobacter* sp. CHM43 Δ sldBA Δ adhAB) expressing *adhAB* was of 49%, while the ee obtained with TORI4 expressing *adhABS* was 27.6%. Additionally, the TORI4 strain without any plasmid produced L-glyceric acid (L-GA) with an ee of 42.5%. These results indicate that glycerol can be converted to L-glyceraldehyde by a putative intracellular NADP-dependent alcohol dehydrogenase, and then converted to L-GA by a putative intracellular NAD-dependent aldehyde dehydrogenase.

Although important success has been achieved using plasmids for the heterologous expression of genes in *Gluconobacter* strains, using plasmids has several disadvantages, including a high metabolic burden, the need to use antibiotics as resistance markers and the high heterogeneity in copy number among others, which is pushing the preference of the biotechnology industry for plasmid-free strains (Battling et al., 2020). A solution to this is applying the novel genome engineering tools developed for *Gluconobacter* strains, which are discussed in the next section.

3.2.3. Genome engineering

3.2.3.1. Suicide vectors. The industrial impact and further potential of *Gluconobacter* strains generated the need for developing and adapting efficient genome engineering technologies for their rational engineering. The most relevant strategy for genome modification of this bacterial genus is gene replacement, also known as allelic exchange, using suicide vectors (Fig. 5b). This well-established technique can be used for gene knockouts (Nguyen et al., 2021a) or point mutations (Qin et al., 2021b), as well as for the overexpression of certain genes through the integration of full expression cassettes (Battling et al., 2020), or by modifying promoter regions (Qin et al., 2021b). Apart from a pair of homologous arms that flank the new DNA sequence that will be incorporated into the genome, suicide vectors usually contain an antibiotic selection marker and a counter-selection gene to aid in the selection of the desired transformants. As these plasmids cannot replicate within the host, after delivery, they either disappear or are integrated into the bacterial chromosome by homologous recombination. The transformants that integrated the plasmid after this first recombination event are then selected by plating in the presence of the selected antibiotic. This transformants are now resistant to said antibiotic, but present susceptibility towards a certain compound, which will vary depending on the selected counter-selection gene. After a second recombination event, the desired transformants would have the new DNA sequence within their bacterial chromosome, and the integrative plasmid would be lost, along with the counter-selection gene. This renders this new transformants resistant to the previously mentioned compound used for counter-selection. To differentiate them from the ones in which a second recombination event did not occur, the transformants are then plated in the presence of the counter-selection compound. Subsequently, the positive transformants are usually corroborated by PCR. This strategy presents the advantage of being markerless, as no selection marker remains in the bacterial chromosome after the second recombination event.

In these last years, three different systems based on this principle have been used successfully in *Gluconobacter* strains. The selected counter-selection markers were the *upp*, *sacB* and *codAB* genes. The *upp* gene codes for a phosphoribosyl transferase that converts 5-fluorouracil (5-FU) into 5-fluorouridinemonophosphate (F-UMP). 5-UMP is then

converted into 5-fluorodesoxyuridinemonophosphate, an inhibitor of thymidylate synthase. The presence of this inhibitor impairs DNA repair and replication, so a selective pressure against the possession of the *upp* gene is established in the presence of 5-FU (Peters et al., 2013). It is noteworthy that for the correct implementation of this system the parental strain must have its endogenous *upp* gene deleted. An example of the application of this technology is described by Battling et al., in a work dealing with the improvement of 5-KF production using plasmid-free *G. oxydans* IK003.1 mutants (Battling et al., 2020). In the work the authors inserted the *fdhSCL* genes, coding for the FDH from *G. japonicus* NBRC3260, at different loci within the bacterial chromosome of the host strain. Four integration strains were assessed for fructose conversion into 5-KF. Their results highlight the importance of careful selection of integration sites, as the authors observed slight changes in 5-KF titres, growth rates and maximum OD_{600nm} values achieved with the mutant strains, as well as different relative *fdhSCL* transcript levels within them. By constructing a double integration strain, containing two copies of *fdhSCL*, the reaction rate of 5-KF formation significantly increased, being much closer to that obtained with a control strain overexpressing FDH using a plasmid-based system. The bioprocess was then successfully scaled-up, carrying out the reaction in a 2 L batch fermenter with one of the mutant integration strains containing only one copy of the gene cluster (*G. oxydans* IK003.1-igr3::*fdhSCL*). Starting from 150 g/L of fructose, a 5-KF yield of 0.84 g/g was achieved, which the authors state is similar to that obtained in the same conditions with a plasmid-based strain from a previous work. This technology is also useful to study the function of key enzymes involved in biotransformations.

Alternatively, a combination of the *codA* and *codB* genes can be employed as counter-selection marker. CodA is a cytosine deaminase from *E. coli* that catalyses the conversion of 5-fluorocytosine (5-FC) into toxic 5-FU that, as previously mentioned, is subsequently metabolised by the phosphoribosyl transferase encoded in the chromosomal *upp* gene, affecting DNA repair and replication. On the other hand, CodB is a cytosine permease that was proven necessary to achieve high efficiency with this system (Kostner et al., 2013). A significant advantage of this method is that it is applicable to wild type strains of most acetic acid bacteria, since the *upp* gene is naturally present in the bacterial chromosome and the *codA* gene is not. This is much more practical in comparison with the previously discussed strategy that used the *upp* gene as the counter-selection marker, as the *upp* gene must be deleted from the parental strain before genetic modification. This strategy was used by Hoffman et al. to generate a one-strain method for 5-KF production from sucrose (Hoffmann et al., 2020). To that aim, a strain that expressed a FDH enzyme and a sucrase hydrolysing enzyme needed to be constructed. Based on a previous work from the group, the *fdhSCL* gene cluster from *G. japonicus* NBRC 3260 and the *sacC* gene from *Zymomonas mobilis* gene were selected (Siemen et al., 2018). The authors evaluated several plasmid-based systems, but none of them produced significant quantities of 5-KF. Oftentimes transformations with more than one plasmid produce a high metabolic burden on the host, hindering its productivity. Analogously, the inclusion of several genes in a plasmid at once, in this case four (*fdhSCL* and *sacC*), sometimes results in suboptimal expression. Alternatively, the authors replaced the mGlucDH gene with a *fdhSCL* expression cassette by integration using a suicide vector with CodA/B as a counter selection-marker. Combining this strategy with a plasmid-based expression system for the overexpression of an invertase from *G. japonicus* (inv1417) the authors obtained a mutant that could produce 5-KF from sucrose, presenting conversion yields of $84 \pm 2\%$. Furthermore, by knocking out membrane-bound glucose dehydrogenase the contamination with ketogluconates was considerably reduced. In another work, Yakushi et al. used the CodA/B system to generate *G. frateurii* CHM43 deletion mutants to further study the substrate scope of the major polyol dehydrogenase, encoded by the *sldBA* gene cluster (Yakushi et al., 2018). By comparison of the oxidative activities of membrane fractions of the wild type and its mutant strain

TOR13 (Δ sldBA), the authors were able to identify new potential substrates for the major polyol dehydrogenase. Oxidation of L-lyxose, L-ribose, and L-tagatose diminished significantly in TOR13 membranes, thus indicating that this enzyme is responsible for their oxidation in the wild type strain. Particularly, the L-ribose oxidation product was identified as L-ribonate. This product could also be obtained in a whole-cell biotransformation with an 82% conversion yield.

Conversely, the *sacB* gene can also be used as a counter-selection marker. This gene codes for a levansucrase, originally from *Bacillus subtilis*. This enzyme can catalyse the formation of levan from sucrose, which interferes with the physiological function of the cells, promoting bacterial lysis (Qin et al., 2021b). Bacterial selection of transformants with the desired characteristics is carried out by plating them in the presence of sucrose. Much like systems based in the *codAB* genes, *sacB* based systems do not require previous manipulation of wild type strains, which makes them more practical. This approach has been successfully applied for gene knockout in several bacterial strains. An example of its application is detailed in a work by Yan et al., in which several enzymes related to glycerol utilisation in *G. oxydans* 621H were knocked out (Yan et al., 2018). The functions of all of them were corroborated by studying the mutant strains' growth and product formation. The mutants lacking the genes encoding the major polyol dehydrogenase were unable to produce DHA, while those lacking the genes encoding mADH were unable to produce GlyceA. Furthermore, the mutants that had *glpD* knocked down could not grow. This gene codes for a glycerol-3-phosphate dehydrogenase that converts glycerol-3-phosphate into DHA phosphate in the cytoplasm, which is then channelled by the metabolism of the bacteria to produce biomass. These results indicate that the previously described glycerol utilisation operon is indispensable for biomass production from glycerol. The authors note that by knocking out the major polyol dehydrogenase and mADH genes, glycerol molecules can be redirected towards the enzymes of previously mentioned glycerol utilisation operon (*glpRDFK*), located in the cytoplasm. In this way, *G. oxydans* 621H mutant whole cells can be produced using lower glycerol concentrations and achieving higher biomass yields, which was then confirmed experimentally. These mutant bacteria become suitable for use in biotransformations involving other membrane-bound dehydrogenases, for example the transformation of xylose into XA, catalysed by the membrane-bound glucose dehydrogenase. This biotransformation was carried out with the double deletion *G. oxydans* 621H mutants and with the wild type strains, obtaining highly comparable product yields of 61.6 g/L and 57.4 g/L of XA, respectively. In a recent work by Qin et al., this counter-selection marker is used to develop a system for multiple genome editing in various *G. oxydans* strains (Qin et al., 2021b). The authors convey that even though the conventional gene knockout function based on *SacB* has already been described in many strains, this strategy had not yet been extensively studied for large-scale gene deletion, gene insertion, gene replacement, and point mutations. In the work, all these genomic operations were successfully carried out using their proposed system with varying efficiencies. A practical approach is also described for the enhancement of L-sorbose production using *G. oxydans* WSH-003 mutants. Previous reports on the overexpression of the *sldBA*, *pqqABCDE* and *cyoBACD* gene clusters that code for the major polyol dehydrogenase, PQQ biosynthesis enzymes and terminal oxidase cytochrome *bo₃* indicate that it can aid in L-sorbose production. Additionally, the knockout of the *edd* gene was proven to be beneficial for *G. oxydans* growth and product formation. By inserting the strong promoter P114 at the 5' end of the previously mentioned gene clusters using the proposed system, relative transcription levels were significantly enhanced. Moreover, *edd* gene knockout was carried out successfully in the same strain. By combining the previously mentioned genomic operations, both the growth and L-sorbose yield of the *G. oxydans* WSH-003 mutant was improved.

3.2.3.2. CRISPR-Cas based systems. As mentioned before, the formerly

reviewed methods for genomic modification are markerless and could help diminish the metabolic burden that can be generated by multiple modifications in a mutant strain. They prove to be suitable not only for gene deletion, but also for gene insertion, gene replacement and for the implementation of point mutations. However, aside from these desirable characteristics, their editing efficiency is still somewhat low, generally reaching maximums of 50%. This is caused by the two possible outcomes of the second homologous recombination event, that can either yield the desired mutant or recover the wild type genotype (Qin et al., 2021b). CRISPR-Cas based systems are known to improve genome editing efficiency in other microorganisms (Lee and Lee, 2021), but at the time none has been reported for application in *Gluconobacter* strains regarding genome modification. However, it is our appreciation that given the industrial importance of these bacterial species and their significant interest among the scientific community, it is likely that a CRISPR-based genome editing system for *Gluconobacter* strains will become available in the near future.

Nonetheless, there have been important advances regarding other CRISPR-based technology, CRISPR interference (CRISPRi). This technology typically relies on a catalytically dead Cas nuclease or multi-subunit Cas-targeting complex, depending on the type of CRISPR/Cas system used as a base (Hochstrasser et al., 2014). This nuclease or targeting complex does not generate cuts, but blocks transcription by binding to genomic DNA (Teh et al., 2019). In a recent work, Qin et al. repurposed an endogenous type I-E CRISPR/Cas system to achieve gene repression in *G. oxydans* WSH-003 (Qin et al., 2021a). Type I-E CRISPR/Cas systems rely on multi-subunit Cas-targeting complexes that bind to crRNA, forming a structure known as Cascade. Cascade then binds to DNA and recruits Cas3 nuclease, which is in charge of target degradation (Hochstrasser et al., 2014). Qin et al. firstly identified this CRISPR/Cas system by analysing *G. oxydans* WSH-003's genome using CRISPRCas-Finder (Qin et al., 2021a). A typical type I-E system was found, presenting a *cas* gene cluster, that codes for Cas3 nuclease and seven other Cas proteins, along with two CRISPR arrays. Usually, to develop a CRISPRi system based on a type I-E CRISPR/Cas system, the *cas3* gene has to be knocked out to avoid nuclease activity. Interestingly, the authors found that in *G. oxydans* WSH-003 the Cas3 nuclease was already inactive, which was an advantage as only crRNA expression was needed to implement the CRISPRi system. The heterologous expression of mCherry, eGFP and CFP fluorescent proteins using a plasmid-based expression system was successfully repressed simultaneously by the endogenous CRISPR/Cas system. In addition, the authors proved the system's applicability in metabolic engineering by repressing the expression of the *gnd* and *edd* genes, which control the channels into the pentose phosphate pathway (PPP) and the Entner-Doudoroff pathway (EDP). These two metabolic pathways are involved in carbohydrate catabolism in the cytoplasm and determine the carbon flux that goes into the incomplete tricarboxylic acid cycle (TCA), so by targeting the aforementioned genes both growth and product formation in *G. oxydans* WSH-003 could be affected. A 90% repression of the *edd* gene was observed, while *gnd* repression was about 60%. Using L-sorbose production as a case study, D-sorbitol conversion by the metabolically engineered strains was carried out. The results showed that repression of the *edd* gene resulted in enhanced growth and product formation, while *gnd* repression had the opposite effect. Considering these results, a mutant strain was constructed in which *edd* was repressed by the CRISPRi system and *gnd* was overexpressed using a plasmid-based expression system. Both L-sorbose production from D-sorbitol and GlucA from D-glucose was improved, along with biomass yields in both biotransformations. All things considered, this newly reported CRISPRi system shows great promise as it could not only be used alone for gene repression but also in conjunction with other genetic engineering techniques.

4. Conclusions and future perspectives

Microbial biotransformations, though having matured after years of investigation, still offer no universal solutions for an increasingly greener synthetic industry. However, advancements in bioprocess and microbial engineering and the use of non-model organisms have started to establish a toolbox for the development of new and improved biotransformations. *Gluconobacter* strains present remarkable advantages as biocatalysts and recently, studies have established their potential as microbial chassis for numerous biotransformations. These advances have proven the value of its genetic modification, its immobilisation and the adequate design of its catalysed transformations for improved productivities, stabilities or new bioconversions. We anticipate that subsequent contributions in the kinetic modelling of *Gluconobacter*-catalysed reactions will help to better identify critical parameters in solving poor or non-industrially feasible transformations. As for stability, a much-desired quality in biocatalysts is a primary challenge involving the development of immobilisation strategies that avoid the impact on the conversion rates of the biocatalyst. Promising new 3D printed immobilisation matrixes with improved geometries that enable better mass transfer could be compatible with *Gluconobacter* strains (Dimartino et al., 2022). Moreover, a deeper understanding of the genetics of *Gluconobacter* strains will open possibilities to modify its genome and gene expression via more efficient and advanced tools including CRISPRi, as it was recently proven with *G. oxydans* WSH-003 (Qin et al., 2021a). Through the combination of *Gluconobacter* strains with other biocatalysts and organocatalysts, the wide variety of valuable products obtained from these biocatalytic processes will be further expanded (Ripoll et al., 2021b; Stewart et al., 2020). The build-up knowledge in all these fields will undoubtedly enhance the biotechnological application of *Gluconobacter* strains.

Funding

This work was supported by Agencia de Investigación e Innovación (ANI) under Grants POS_NAC_2019_1_158182 and FMV_1_2021_1_167184; Engineering and Physical Sciences Research Council under Grant EP/R513209/1; The British Council under Grant 527429894; Universidad Autónoma de Nuevo León under Grant (PAICYT 2020-2021, 2021-2022); CONACyT under Grants 221332 (Basic Science Grant), 1502 (Fronteras de la ciencia Grant), 279957 (Infraestructura Grant).

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

MR and LB would like to acknowledge Universidad ORT Uruguay, Agencia Nacional de Investigación e Innovación and PEDECIBA Química. JA Lerma-Escalera would like to acknowledge for the support from a Beca Nacional de Posgrado from CONACyT. JR M would like to acknowledge Universidad Autónoma de Nuevo León for the PAICYT Grants 2020-2021, 2021-2022 ETOC and Figures were all created using BioRender.

References

- Adachi, O., Nguyen, T.M., Hours, R.A., Kataoka, N., Matsushita, K., Akakabe, Y., Yakushi, T., 2020. 5-keto-D-fructose production from sugar alcohol by isolated wild strain *Gluconobacter frateurii* CHM 43. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 84, 1745–1747. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1767500>.

- Antony, J., 2014. Design of experiments for engineers and scientists. In: Design of Experiments for Engineers and Scientists: Second Edition. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-03558-2>.
- Azar, S.A.D., Alemzadeh, I., 2020. L-sorbose production by *Gluconobacter oxydans* using submerged fermentation in a bench scale fermenter. *Appl. Food Biotechnol.* 7, 41–48. <https://doi.org/10.22037/af.v7i1.26582>.
- Azcarate, S.M., Pinto, L., Goicoechea, H.C., 2020. Applications of mixture experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *J. Chemom.* 34, 1–19. <https://doi.org/10.1002/cem.3246>.
- Bandyopadhyay, S., Saha, N., Saha, P., 2018. Characterization of bacterial cellulose produced using media containing waste apple juice. *Appl. Biochem. Microbiol.* 54, 649–657. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060042>.
- Banerjee, S., Kumar, R., Pal, P., 2018. Fermentative production of gluconic acid: a membrane-integrated green process. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 84, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.01.030>.
- Battling, S., Wohlers, K., Igwe, C., Kranz, A., Pesch, M., Wirtz, A., Baumgart, M., Büchs, J., Bott, M., 2020. Novel plasmid-free *Gluconobacter oxydans* strains for production of the natural sweetener 5-ketofructose. *Microb. Cell Factories* 19, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01310-7>.
- Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Hamdi, M., Li, H.Z., 2020. Mineral pollutants removal through immobilized microalgae-bacterial flocs in a multitrophic microreactor. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 41, 1912–1922. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1551939>.
- Berillo, D., Al-Jwaid, A., Caplin, J., 2021. Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water. *Polymers (Basel)*. 13. <https://doi.org/10.3390/polym13071073>.
- Bertucci, M., Ariano, K., Zumsteg, M., Schweiger, P., 2022. Engineering a tunable bicistronic TetR autoregulation expression system in *Gluconobacter oxydans*. *PeerJ* 10, e13639. <https://doi.org/10.7717/peerj.13639>.
- Betancor, L., López-Gallego, F., 2022. Editorial overview: heterogeneous biocatalysis for sustainable chemistry 2021. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 35, 100615. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100615>.
- Burger, C., Kessler, C., Gruber, S., Ehrenreich, A., Liebl, W., Weuster-Botz, D., 2019. L-Erythrulose production with a multideletion strain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 4393–4404. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09824-w>.
- Cao, R., Xu, Y., 2019. Efficient preparation of Xylonic acid from Xylonate fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187, 396–406. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2827-y>.
- Chandrasekaran, P.T., Bari, N.K., Sinha, S., 2017. Enhanced bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super optimal broth. *Cellulose* 24, 4367–4381. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1419-2>.
- Chen, Y., Liu, L., Shan, X., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2019. High-throughput screening of a 2-keto-L-Gulonic acid-producing *Gluconobacter oxydans* strain based on related dehydrogenases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00385>.
- Chen, Y., Liu, L., Yu, S., Li, J., Zhou, J., Chen, J., 2021. Identification of gradient promoters of *Gluconobacter oxydans* and their applications in the biosynthesis of 2-keto-L-Gulonic acid. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.673844>.
- Chen, Y., Li, D., Shan, X., Zhou, J., Chen, J., 2022. Characterization of a sorbose oxidase involved in the biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid from *Gluconobacter oxydans* WSH-004. *Process Biochem.* 116, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.02.019>.
- da Silva, G.A.R., de Oliveira, S.S.S., Lima, S.F., do Nascimento, R.P., de Baptista, A.R.S., Fiaux, S.B., 2022. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03310-8>.
- Dai, L., Jiang, W., Zhou, X., Xu, Y., 2020. Enhancement in xylonate production from hemicellulose pre-hydrolysate by powdered activated carbon treatment. *Bioresour. Technol.* 316, 123944. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123944>.
- Dai, L., Jiang, W., Jia, R., Zhou, X., Xu, Y., 2022. Directional enhancement of 2-keto-gulonic acid production from enzymatic hydrolysate by acetic acid-mediated bio-oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 348, 126811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126811>.
- de la Morena, S., Acedos, M.G., Santos, V.E., García-Ochoa, F., 2019a. Dihydroxyacetone production from glycerol using *Gluconobacter oxydans*: study of medium composition and operational conditions in shaken flasks. *Biotechnol. Prog.* 35, 1–9. <https://doi.org/10.1002/btpr.2803>.
- de la Morena, S., Santos, V.E., García-Ochoa, F., 2019b. Influence of oxygen transfer and uptake rates on dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in resting cells operation. *Biochem. Eng. J.* 147, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.021>.
- de la Morena, S., Wojtusik, M., Santos, V.E., García-Ochoa, F., 2020. Kinetic modeling of dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 resting cells: effect of fluid dynamics conditions. *Catalysts* 10. <https://doi.org/10.3390/catal10010101>.
- De Muyck, C., Pereira, C.S.S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E. J., 2007. The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 147–171. <https://doi.org/10.1080/07388550701503584>.
- Deppenmeier, U., Ehrenreich, A., 2008. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, 69–80. <https://doi.org/10.1159/000142895>.
- Dikshit, P.K., Kim, B.S., 2020. Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase

- immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 153, 902–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.047>.
- Dikshit, P.K., Moholkar, V.S., 2016. Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. *Bioresour. Technol.* 216, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.100>.
- Dikshit, P.K., Moholkar, V.S., 2019. Batch and repeated-batch fermentation for 1,3-dihydroxyacetone production from waste glycerol using free, immobilized and resting *Gluconobacter oxydans* cells. *Waste Biomass Valoriz.* 10, 2455–2465. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0307-9>.
- Dikshit, P.K., Padhi, S.K., Moholkar, V.S., Kumar, P., Kumar, S., Moholkar, V.S., 2017. Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-dihydroxyacetone production. *Bioresour. Technol.* 244, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.136>.
- 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*. *Bioresour. Technol.* 256, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.024>.
- Dimartino, S., Galindo-Rodriguez, G.R., Simon, U., Conti, M., Sarwar, M.S., Athi Narayanan, S.M., Jiang, Q., Christofi, N., 2022. Flexible material formulations for 3D printing of ordered porous beds with applications in bioprocess engineering. *Bioresour. Bioprocess.* 9 <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00511-9>.
- Dolejš, I., Lišková, M., Krasňan, V., Markošová, K., Rosenberg, M., Lorenzini, F., Marr, A. C., Rebroš, M., 2019. Production of 1,3-Propanediol from pure and crude glycerol using immobilized *Clostridium butyricum*. *Catalysts* 9, 317. <https://doi.org/10.3390/catal9040317>.
- Du, G., Hua, X., Xu, B., Wang, H., Zhou, X., Xu, Y., 2021a. Environmental bio-oxidation of toxic furan by the co-recycling of waste fermented broth and rest cells. *Biochem. Eng. J.* 176, 108193. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108193>.
- Du, R., Ping, W., Song, G., Ge, J., 2021b. Ecofriendly green biosynthesis and characterization of novel bacteriocin-loaded bacterial cellulose nanofiber from *Gluconobacter cerinus* HDX-1. *Int. J. Biol. Macromol.* 193, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.176>.
- Es-Sbata, I., Castro, R., Carmona-Jiménez, Y., Zouhair, R., Durán-Guerrero, E., 2022. Influence of different bacteria inocula and temperature levels on the chemical composition and antioxidant activity of prickly pear vinegar produced by surface culture. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11030303>.
- Fricke, P.M., Link, T., Gätgens, J., Sonntag, C., Otto, M., Bott, M., Polen, T., 2020. A tunable L-arabinose-inducible expression plasmid for the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 9267–9282. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10905-4>.
- Fricke, P.M., Klemm, A., Bott, M., Polen, T., 2021a. On the way toward regulatable expression systems in acetic acid bacteria: target gene expression and use cases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 3423–3456. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11269-z>.
- Fricke, P.M., Lürkens, M., Hünnefeld, M., Sonntag, C.K., Bott, M., Davari, M.D., Polen, T., 2021b. Highly tunable TetR-dependent target gene expression in the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 6835–6852. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11473-x>.
- Fricke, P.M., Hartmann, R., Wirtz, A., Bott, M., Polen, T., 2022. Production of L-arabinonic acid from L-arabinose by the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol. Rep.* 17, 100965. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100965>.
- Gao, L., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, H., 2020. Efficient optimization of *Gluconobacter oxydans* based on protein scaffold-trimeric CutA to enhance the chemical structure stability of enzymes for the direct production of 2-keto-L-gulonidic acid. *J. Chemother.* 2020 <https://doi.org/10.1155/2020/5429409>.
- Gordégir, M., Oz, S., Yezer, I., Buhur, M., Unal, B., Demirkol, D.O., 2019. Cells-on-nanofibers: effect of polyethyleneimine on hydrophobicity of poly-ε-caprolactone electrospun nanofibers and immobilization of bacteria. *Enzym. Microb. Technol.* 126, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.002>.
- Guisan, J.M., López-Gallego, F., Bolívar, J.M., Rocha-Martín, J., Fernandez-Lorente, G., 2020. The science of enzyme immobilization. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_1.
- Gungormusler-Yilmaz, M., Cicek, N., Levin, D.B., Azbar, N., 2016. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 482–494. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.992386>.
- Habe, H., Sato, Y., Tani, H., Matsutani, M., Tanioka, K., Theeragool, G., Matsushita, K., Yakushi, T., 2021. Heterologous expression of membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding genes for glyceric acid production using *Gluconobacter* sp. CHM43 and its derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 6749–6758. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11535-0>.
- Hahn, T., Torkler, S., van der Bolt, R., Gammel, N., Hesse, M., Möller, A., Preylowski, B., Hubrath, V., Patzsch, K., Zibek, S., 2020. Determining different impact factors on the xylonic acid production using *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Process Biochem.* 94, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.011>.
- Han, J., Hua, X., Zhou, X., Xu, B., Wang, H., Huang, G., Xu, Y., 2021. A cost-practical cell-recycling process for xylonic acid bioproduction from acidic lignocellulosic hydrolysate with whole-cell catalysis of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 333, 125157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125157>.
- He, T., Xu, C., Ding, C., Liu, X., Gu, X., 2021. Optimization of specific productivity for Xylonic acid production by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.729988>.
- Hekmat, D., Bauer, R., Neff, V., 2007. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* 42, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.026>.
- Hensel, Z., 2017. A plasmid-based *Escherichia coli* gene expression system with cell-to-cell variation below the extrinsic noise limit. *PLoS One* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187259>.
- Herweg, E., Schöpping, M., Rohr, K., Siemen, A., Frank, O., Hofmann, T., Deppenmeier, U., Büchs, J., 2018. Production of the potential sweetener 5-keto-fructose from fructose in fed-batch cultivation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 259, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.038>.
- Hochstrasser, M.L., Taylor, D.W., Bhat, P., Guegler, C.K., Sternberg, S.H., Nogales, E., Doudna, J.A., 2014. CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6618–6623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405079111>.
- Hoffmann, J.J., Hövels, M., Kosciow, K., Deppenmeier, U., 2020. Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *J. Biotechnol.* 307, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.11.001>.
- Hou, W., Zhang, M., Bao, J., 2018. Cascade hydrolysis and fermentation of corn Stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresour. Technol.* 264, 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.025>.
- Hou, Z., Sun, L., Wang, D., Sun, W., Cui, F., Yu, S., 2020. Production of 2-keto-gluconic acid from glucose by immobilized *Pseudomonas plecoglossicida* resting cells. *3 Biotech.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02243-z>.
- Hövels, M., Kosciow, K., Kniewel, J., Jakob, F., Deppenmeier, U., 2020. High yield production of Levan-type fructans by *Gluconobacter japonicus* LMG 1417. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.105>.
- Hu, Z.C., Tian, S.Y., Ruan, L.J., Zheng, Y.G., 2017. Repeated biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* with glycerol- and urea-feeding strategy in a bubble column bioreactor. *Bioresour. Technol.* 233, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.096>.
- Hu, Z.C., Bu, J.L., Wang, R.Y., Ke, X., Zheng, Y.G., 2019. 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.* 188, 297–309. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2924-y>.
- Hu, Z.C., Zhao, Z.Y., Ke, X., Zheng, Y.G., 2020. Repeated production of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy-α-L-sorbofuranose by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with a strategy of in situ exhaustive cell regeneration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 1781–1789. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02368-8>.
- Hua, X., Zhou, X., Xu, Y., 2018. Improving techno-economics of bioproduct glycolic acid by successive recycled-cell catalysis of ethylene glycol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41, 1555–1559. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1968-2>.
- Hua, X., Cao, R., Zhou, X., Xu, Y., 2019a. One-step continuous/semi-continuous whole-cell catalysis production of glycolic acid by a combining bioprocess with in-situ cell recycling and electrodialysis. *Bioresour. Technol.* 273, 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.061>.
- Hua, X., Du, G.L., Xu, Y., 2019b. Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer. *Bioresour. Technol.* 283, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.094>.
- Hua, X., Du, G.L., Zhou, X., Nawaz, A., Ul Haq, I., Xu, Y., 2020a. A techno-practical method for overcoming the biotoxicity and volatility obstacles of butanol and butyric acid during whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01741-9>.
- Hua, X., Zhou, X., Du, G., Xu, Y., 2020b. Resolving the formidable barrier of oxygen transferring rate (OTR) in ultrahigh-titer bioconversion/biocatalysis by a sealed-oxygen supply biotechnology (SOS). *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1642-1>.
- Hua, X., Zhou, X., Xu, Y., 2021. Directed regulation of whole-cell catalysis for high-quality galactonic acid bio-preparation and characterization by Ca²⁺. *Fuel* 285, 119134. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119134>.
- Hua, X., Liu, X.L., Han, J., Xu, Y., 2022. Reinforcing sorbitol bio-oxidative conversion with *Gluconobacter oxydans* whole-cell catalysis by acetate-assistance. *Biochem. Eng. J.* 179, 108328. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108328>.
- Hundscheil, Christoph S., Braun, A., Wefers, D., Vogel, R.F., Jakob, F., 2020. Size-dependent variability in flow and viscoelastic behavior of Levan produced by *Gluconobacter albidus* TMW 2.1191. *Foods* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3390/foods9020192>.
- Hundscheil, C.S., Bäther, S., Drusch, S., Wagemans, A.M., 2020a. Osmometric and viscometric study of Levan, β-lactoglobulin and their mixtures. *Food Hydrocoll.* 101, 105580. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105580>.
- Hundscheil, C.S., Jakob, F., Wagemans, A.M., 2020b. Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide Levan. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.019>.
- Jackson, E., Ripoll, M., Betancor, L., 2019. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. *Microbiologyopen* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.926>.
- Jakob, F., Gebrande, C., Bichler, R.M., Vogel, R.F., 2020. Insights into the pH-dependent, extracellular sucrose utilization and concomitant Levan formation by *Gluconobacter albidus* TMW 2.1191. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 3, 863–873. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01397-3>.
- Jiang, Y., Liu, K., Zhang, H., Wang, Y., Yuan, Q., Su, N., Bao, J., Fang, X., 2017. Gluconic acid production from potato waste by *Gluconobacter oxydans* using sequential hydrolysis and fermentation. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 6116–6123. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00992>.

- Jin, C., Hou, W., Yao, R., Zhou, P., Zhang, H., Bao, J., 2019a. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. *Bioresour. Technol.* 289, 121623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121623>.
- Jin, H., Reed, D.W., Thompson, V.S., Fujita, Y., Jiao, Y., Crain-Zamora, M., Fisher, J., Scalzone, K., Griffel, M., Hartley, D., Sutherland, J.W., 2019b. Sustainable bioleaching of rare earth elements from industrial waste materials using agricultural wastes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 15311–15319. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02584>.
- Jittijang, S., Jirathitichet, I., Kajonpradabkul, P., Tiatongjitman, T., Siriawatwechakul, W., Boonyarattanakalin, S., 2020. Effect of NaCl removal from biodiesel-derived crude glycerol by ion exchange to enhance dihydroxyacetone production by *Gluconobacter thailandicus* in minimal medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 281–288. <https://doi.org/10.1002/jctb.6234>.
- Karagoz, P., Bill, R.M., Ozkan, M., 2019. Lignocellulosic ethanol production: evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. *Renew. Energy* 143, 741–752. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.045>.
- Kataoka, N., Hirata, K., Matsutani, M., Ano, Y., Nguyen, T.M., Adachi, O., Matsushita, K., Yakushi, T., 2021. Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 1227–1236. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11092-6>.
- Kataoka, N., Saichana, N., Matsutani, M., Toyama, H., Matsushita, K., Yakushi, T., 2022. Characterization of 3 phylogenetically distinct membrane-bound d-gluconate dehydrogenases of *Gluconobacter* spp. and their biotechnological application for efficient 2-keto-d-gluconate production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 86, 681–690. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac024>.
- Ke, X., Wang, N.N., Yu, P.H., Lu, Y.H., Hu, Z.C., Zheng, Y.G., 2018. Biosynthesis of miglitol intermediate 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -l-sorbofuranose by an improved d-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*. *3 Biotech.* 8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1251-x>.
- Ke, X., Lu, Y.H., Yu, P.H., Hu, Z.C., Chen, L., Sun, X.Q., Zheng, Y.G., 2019a. Glutamate addition improves the activity of membrane-bound sorbitol dehydrogenase in a pyrroloquinoline quinone-dependent manner: a feasible strategy for the cost-effective fermentation of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* 84, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.009>.
- Ke, X., Pan-Hong, Y., Hu, Z.C., Chen, L., Sun, X.Q., Zheng, Y.G., 2019b. Synergistic improvement of PQQ-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* for the biosynthesis of miglitol precursor 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose. *J. Biotechnol.* 300, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.007>.
- Kim, T.S., Hui, G., Li, J., Kalia, V.C., Muthusamy, K., Sohng, J.K., Kim, I.W., Lee, J.K., 2019. Overcoming NADPH product inhibition improves D-sorbitol conversion to L-sorbose. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37401-0>.
- Kostner, D., Peters, B., Mientus, M., Liebl, W., Ehrenreich, A., 2013. Importance of codB for new codA-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8341–8349. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5164-7>.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1).
- Kranz, A., Busche, T., Vogel, A., Usadel, B., Kalinowski, J., Bott, M., Polen, T., 2018. RNAseq analysis of a proteobacterium *Gluconobacter oxydans* 621H. *BMC Genomics* 19, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4415-x>.
- Lang, W., Kumagai, Y., Sadahiro, J., Saburi, W., Sarnthima, R., Tagami, T., Okuyama, M., Mori, H., Sakairi, N., Kim, D., Kimura, A., 2022. A practical approach to producing isomaltomaltosaccharide using dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 689–698. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11753-6>.
- Lee, R., 2019. Statistical design of Experiments for screening and optimization. *Chemie-Ingenieur-Technik* 91, 191–200. <https://doi.org/10.1002/cite.201800100>.
- Lee, H.J., Lee, S.J., 2021. Advances in accurate microbial genome-editing CRISPR technologies. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 903–911. <https://doi.org/10.4014/jmb.2106.06056>.
- Li, L., Cai, D., Wang, C., Han, J., Ren, W., Zheng, J., Wang, Z., Tan, T., 2015. Continuous L-lactic acid production from defatted rice bran hydrolysate using corn Stover bagasse immobilized carrier. *RSC Adv.* 5, 18511–18517. <https://doi.org/10.1039/c4ra04641b>.
- Li, D., Liu, L., Qin, Z., Yu, S., Zhou, J., 2022. Combined evolutionary and metabolic engineering improve 2-keto-L-gulonic acid production in *Gluconobacter oxydans* WSH-004. *Bioresour. Technol.* 354, 127107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127107>.
- Liu, L., Zeng, W., Du, G., Chen, J., Zhou, J., 2019. Identification of NAD-dependent xylitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *ACS Omega* 4, 15074–15080. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01867>.
- Liu, D., Hu, Z.C., Ke, X., Zheng, Y.G., 2020a. Breeding of *Gluconobacter oxydans* with high PQQ-dependent D-sorbitol dehydrogenase for improvement of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose production. *Biochem. Eng. J.* 161, 107642. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107642>.
- Liu, D., Ke, X., Hu, Z.C., Zheng, Y.G., 2020b. Combinational expression of D-sorbitol dehydrogenase and pyrroloquinoline quinone increases 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose production by *Gluconobacter oxydans* through cofactor manipulation. *Enzym. Microb. Technol.* 141, 109670. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109670>.
- Liu, D., Ke, X., Hu, Z.C., Zheng, Y.G., 2021a. Improvement of pyrroloquinoline quinone-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* via expression of Vitreoscilla hemoglobin and regulation of dissolved oxygen tension for the biosynthesis of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α . *J. Biosci. Bioeng.* 131, 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.12.013>.
- Liu, X., Cao, R., Nawaz, A., Ul Haq, I., Zhou, X., Xu, Y., 2021b. Smart removal of monosaccharide contaminants in xylo-oligosaccharide slurry using sandwich-integration bioprocess of whole-cell catalysis combined with electrodialysis separation. *Renew. Energy* 168, 1149–1156. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.01.007>.
- Liu, L., Chen, Y., Yu, S., Chen, J., Zhou, J., 2021c. Simultaneous transformation of five vectors in *Gluconobacter oxydans*. *Plasmid* 117, 102588. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2021.102588>.
- Liu, L., Zeng, W., Yu, S., Li, J., Zhou, J., 2021d. Rapid enabling of *Gluconobacter oxydans* resistance to high D-sorbitol concentration and high temperature by microdroplet-aided adaptive evolution. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.731247>.
- Liu, L., Chen, Y., Yu, S., Chen, J., Zhou, J., 2022. Enhanced production of l-sorbose by systematic engineering of dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Synth. Syst. Biotechnol.* 7, 730–737. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.02.008>.
- Lustri, W.R., de Barud, H.G.O., da Barud, H.S., Peres, M.F.S., Gutierrez, J., Tercjak, A., de Oliveira, O.B., Ribeiro, S.J.L., 2015. Microbial cellulose — biosynthesis mechanisms and medical applications. *Cellul. Fundam. Asp. Curr. Trends*. <https://doi.org/10.5772/61797>.
- Ma, K., Cui, J.-Z., Ye, J.-B., Hu, X.-M., Ma, G.-L., Yang, X.-P., 2017. Pyrroloquinoline quinone from *Gluconobacter oxydans* fermentation broth enhances superoxide anion-scavenging capacity of Cu/Zn-SOD. *Food Chem.* 230, 291–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.057>.
- Ma, Q., Bi, Y.H., Wang, E.X., Zhai, B.B., Dong, X.T., Qiao, B., Ding, M.Z., Yuan, Y.J., 2019. Integrated proteomic and metabolomic analysis of a reconstructed three-species microbial consortium for one-step fermentation of 2-keto-L-gulonic acid, the precursor of vitamin C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 46, 21–31. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2096-3>.
- Ma, K., Wu, Z.Z., Wang, G.L., Yang, X.P., 2021. Separation and purification of pyrroloquinoline quinone from *Gluconobacter oxydans* fermentation broth using supramolecular solvent complex extraction. *Food Chem.* 361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130067>.
- Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L.M., 2001. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21, 1–25. <https://doi.org/10.1080/20013891081665>.
- Mao, X., Zhang, B., Zhao, C., Lin, J., Wei, D., 2022. Overexpression of mGDH in *Gluconobacter oxydans* to improve D-xyloic acid production from corn Stover hydrolysate. *Microb. Cell Factories* 21, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01763-y>.
- Martin, C.K.A., Perlman, D., 1976a. 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.* 3, 91–95. <https://doi.org/10.1007/BF00928427>.
- Martin, C.K.A., Perlman, D., 1976b. Conversion of L-sorbose to L-sorbose by immobilized cells of *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 217–237. <https://doi.org/10.1002/bit.260180208>.
- Miao, Y., Shen, Y., Xu, Y., 2017. Effects of inhibitors on the transcriptional profiling of *Gluconobacter oxydans* NL71 genes after biooxidation of xylose into xylonate. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00716>.
- Mientus, M., Kostner, D., Peters, B., Liebl, W., Ehrenreich, A., 2017. Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 3189–3200. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8069-4>.
- Mihaf, M., Cerveňanský, I., Markoš, J., Rebroš, M., 2017. Bioproduction of phenylacetic acid in airlift reactor by immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Chem. Pap.* 71, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11696-016-0062-y>.
- Mihaf, M., Cerveňanský, I., Markoš, J., 2021. Application of immersed silicone rubber membrane module for biocatalytic production of 2-phenylethanol and phenylacetic acid. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 166. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108474>.
- Moghadami, F., Fooladi, J., Hosseini, R., 2019. Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q10 production. *Folia Microbiol. (Praha)*. 64, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0666-4>.
- Moghadami, F., Hosseini, R., Fooladi, J., Kalantari, M., 2021. Optimization of coenzyme q10 production by *Gluconobacter japonicus* fm10 using response surface methodology. *J. Appl. Biotechnol. Rep.* 8, 172–179. <https://doi.org/10.30491/jabr.2021.130940>.
- Nakamura, K., Nagaki, K., Matsutani, M., Adachi, O., Kataoka, N., Ano, Y., Theeragool, G., Matsushita, K., Yakushi, T., 2021. Relocation of dehydroquinone dehydratase to the periplasmic space improves dehydroshikimate production with *Gluconobacter oxydans* strain NBRC3244. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 5883–5894. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11476-8>.
- Nguyen, T.M., Goto, M., Noda, S., Matsutani, M., Hodoja, Y., Kataoka, N., Adachi, O., Matsushita, K., Yakushi, T., 2021a. The 5-Ketofructose reductase of *Gluconobacter* sp. Strain CHM43 is a novel class in the shikimate dehydrogenase family. *J. Bacteriol.* 203. <https://doi.org/10.1128/JB.00558-20>.
- Nguyen, T.M., Naoki, K., Kataoka, N., Matsutani, M., Ano, Y., Adachi, O., Matsushita, K., Yakushi, T., 2021b. Characterization of a cryptic, pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. strain CHM43. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 998–1004. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab005>.

- Noman, A.E., Al-Barha, N.S., Sharaf, A.A.M., Al-Maqtari, Q.A., Mohedein, A., Mohammed, H.H.H., Chen, F., 2020. A novel strain of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* FBFS97 involved in riboflavin production. *Sci. Rep.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70404-4>.
- Ordóñez, J.L., Cañete-Rodríguez, A.M., Callejón, R.M., Santos-Dueñas, M.I., Troncoso, A. M., García-García, I., García-Parrilla, M.C., 2017. Effect of Gluconic acid submerged fermentation of strawberry Purée on amino acids and biogenic amines profile. *J. Food Process. Preserv.* 41, e12787 <https://doi.org/10.1111/jfpp.12787>.
- Pal, P., Kumar, R., Nayak, J., Banerjee, S., 2017. Fermentative production of gluconic acid in membrane-integrated hybrid reactor system: analysis of process intensification. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 122, 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.10.016>.
- Pal, P., Kumar, R., Banerjee, S., 2019. Purification and concentration of gluconic acid from an integrated fermentation and membrane process using response surface optimized conditions. *Front. Chem. Sci. Eng.* 13, 152–163. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1721-z>.
- Park, Y.M., Choi, E.S., Rhee, S.-K.K., 1994. Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Lett.* 16, 345–348. <https://doi.org/10.1007/BF00245048>.
- Peters, B., Junker, A., Brauer, K., Mühlthaler, B., Kostner, D., Mientus, M., Liebl, W., Ehrenreich, A., 2013. Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2521–2530. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4354-z>.
- Plekhanova, Y., Tarasov, S., Kolesov, V., Kuznetsova, I., Signore, M., Quaranta, F., Reshetilov, A., 2018. Effects of polymer matrices and carbon nanotubes on the generation of electric energy in a microbial fuel cell. *Membranes (Basel)*. 8 <https://doi.org/10.3390/membranes8040099>.
- Plekhanova, Y., Tarasov, S., Reshetilov, A., 2021. Use of PEDOT:PSS/graphene/Nafion composite in biosensors based on acetic acid Bacteria. *Biosensors* 11, 332. <https://doi.org/10.3390/bios11090332>.
- Poljungreed, I., Boonyarattanakalin, S., 2017. Dihydroxyacetone production by *Gluconobacter frateurii* in a minimum medium using fed-batch fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 2635–2641. <https://doi.org/10.1111/jctb.5281>.
- Poljungreed, I., Boonyarattanakalin, S., 2018. Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 39–46. <https://doi.org/10.1111/lam.12881>.
- Pyo, S.H., Park, J.H., Srebný, V., Hatti-Kaul, R., 2020. A sustainable synthetic route for biobased 6-hydroxyhexanoic acid, adipic acid and ε-caprolactone by integrating bio- and chemical catalysis. *Green Chem.* 22, 4450–4455. <https://doi.org/10.1039/d0gc01454k>.
- Qin, Z., Yang, Y., Yu, S., Liu, L., Chen, Y., Chen, J., Zhou, J., 2021a. Repurposing the endogenous type I-E CRISPR/Cas system for gene repression in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *ACS Synth. Biol.* 10, 84–93. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00456>.
- Qin, Z., Yu, S., Liu, L., Wang, L., Chen, J., Zhou, J., 2021b. A SacB-based system for diverse and multiple genome editing in *Gluconobacter oxydans*. *J. Biotechnol.* 338, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.004>.
- Qin, Z., Yu, S., Chen, J., Zhou, J., 2022. Dehydrogenases of acetic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 54, 107863. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107863>.
- Rakić, T., Kasagić-Vujanović, I., Jovanović, M., Jancić-Stojanović, B., Ivanović, D., 2014. Comparison of full factorial design, central composite design, and Box-Behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impurities. *Anal. Lett.* 47, 1334–1347. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.867503>.
- Raška, J., Škopál, F., Komers, K., Machek, J., 2007. Kinetics of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconobacter oxydans* and effect of reaction conditions. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 72, 1269–1283. <https://doi.org/10.1135/cccc20071269>.
- Raspor, P., Goranović, D., 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>.
- Ripoll, M., Jackson, E., Trelles, J.A., Betancor, L., 2021a. Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol. *J. Biotechnol.* 340, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.08.011>.
- Ripoll, M., Velasco-Lozano, S., Jackson, E., Diamanti, E., Betancor, L., López-Gallego, F., 2021b. One-pot biotransformation of glycerol into serinol catalysed by biocatalytic composites made of whole cells and immobilised enzymes. *Green Chem.* 23, 1140–1146. <https://doi.org/10.1039/D0GC03918G>.
- Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J., Shimomura, K., 1997. Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 454–460. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.454-460.1997>.
- Satirapipatkul, C., Punggrasmi, W., Nootong, K., Wannachod, T., Satirapipatkul, C., Punggrasmi, W., Nootong, K., 2017. Production of 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter naphelii* in Upflow aerated bioreactors with agro-industrial wastes as external nitrogen source. *Engl. J.* 21, 81–92. <https://doi.org/10.4186/ej.2017.21.5.81>.
- Sayed, M., Pyo, S.H., Rehnberg, N., Hatti-Kaul, R., 2019. Selective oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid using *Gluconobacter oxydans*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/acsschemeng.8b06327>.
- Schlieker, M., Vorlop, K.-D., 2006. A novel immobilization method for entrapment: LentiKats®. In: Guisán, J.M. (Ed.), *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 333–343. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_29.
- Schmitz, A.M., Pian, B., Medin, S., Reid, M.C., Wu, M., Gazel, E., Barstow, B., 2021. Generation of a *Gluconobacter oxydans* knockout collection for improved extraction of rare earth elements. *Nat. Commun.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27047-4>.
- Schweikert, S., Kranz, A., Yakushi, T., Filipchik, A., Polen, T., Etterich, H., Bringer, S., Bott, M., 2021. FNR-type regulator GoxR of the obligatorily aerobic acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans* affects expression of genes involved in respiration and redox metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, 1–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00195-21>.
- Sethuramiah, A., Kumar, R., 2016. Statistics and experimental design in perspective. In: *Modeling of Chemical Wear*. Elsevier, pp. 129–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804533-6.00006-8>.
- Shen, Y., Zhou, X., Xu, Y., 2020. Enhancement of *Gluconobacter oxydans* resistance to lignocellulosic-derived inhibitors in Xylonic acid production by overexpressing Thioredoxin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 191, 1072–1083. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03253-6>.
- Shiraishi, F., Kawakami, K., Kono, S., Tamura, A., Tsuruta, S., Kusunoki, K., 1989. Characterization of production of free gluconic acid by *Gluconobacter suboxydans* adsorbed on ceramic honeycomb monolith. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1413–1418. <https://doi.org/10.1002/bit.260331108>.
- Siemen, A., Kosciow, K., Schweiger, P., Deppenmeier, U., 2018. Production of 5-keto-fructose from fructose or sucrose using genetically modified *Gluconobacter oxydans* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8699-1>.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 2017. Design of a fermenter. In: *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier, pp. 401–485.
- Stasiak-Różańska, L., Błażej, S., 2012. 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.* 235, 1125–1132. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1846-0>.
- Stasiak-Różańska, L., Błażej, S., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Lipińska, E., 2017. Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract. *Electron. J. Biotechnol.* 27, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.003>.
- Stasiak-Różańska, L., Berthold-Pluta, A., Dikshit, P.K., 2018. Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Sci.* 8 <https://doi.org/10.3390/app8122517>.
- Štefca, V., Vidová, M., Slezáková, I., Rosenberg, M., Rebroš, M., 2019. 2-Phenylethanol biooxidation by *Gluconobacter oxydans*: influence of cultivation conditions on biomass production and biocatalytic activity of cells. *Chem. Pap.* 73, 1813–1821. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00758-1>.
- Stewart, K.N., Hicks, E.G., Domaille, D.W., 2020. Merger of whole cell biocatalysis with Organocatalysis upgrades alcohol feedstocks in a mild, aqueous, one-pot process. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 4114–4119. <https://doi.org/10.1021/acsschemeng.9b06663>.
- Stojković, G., Žnidarič-Plazl, P., 2020. Covalent immobilization of microbial cells on microchannel surfaces. In: Guisán, J.M., Bolívar, J.M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J. (Eds.), *Immobilization of Enzymes and Cells*. New York, NY, pp. 417–426. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_28.
- Tamahkar, E., Bakhshpour, M., Denizli, A., 2019. Molecularly imprinted composite bacterial cellulose nanofibers for antibiotic release. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 30, 450–461. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1580665>.
- Tan, J., Yang, X., Lu, W., 2019. Research of 1,3-dihydroxyacetone production by overexpressing glycerol transporter and glycerol dehydrogenase. *Trans. Tianjin Univ.* 25, 549–558. <https://doi.org/10.1007/s12209-019-00207-w>.
- Tanamov, 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>.
- Teh, M.Y., Ooi, K.H., Danny Teo, S.X., Bin Mansoor, M.E., Shaun Lim, W.Z., Tan, M.H., 2019. An expanded synthetic biology toolkit for gene expression control in acetobacteraceae. *ACS Synth. Biol.* 8, 708–723. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00168>.
- Trelles, J.A., Rivero, C.W., 2020. Whole cell entrapment techniques. In: Guisán, J.M., Bolívar, J.M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J. (Eds.), *Immobilization of Enzymes and Cells*. Springer US, New York, NY, pp. 385–394. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_25.
- Truong, V.K., Bhadra, C.M., Christofferson, A.J., Yarovsky, I., Al Kobaisi, M., Garvey, C. J., Panamorea, O.N., Alferov, S.V., Alferov, V.A., Tharushi Perera, P.G., Nguyen, D. H.K.K., Buividas, R., Juodkazis, S., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2017. Three-dimensional organization of self-encapsulating gluconobacter oxydans bacterial cells. *ACS Omega* 2, 8099–8107. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01282>.
- Tuyen, N.V., Ryu, J.H., Kim, H.G., Ahn, D.H., 2020. Anammox bacteria immobilization using polyvinyl alcohol/sodium alginate crosslinked with sodium sulfate. *J. Environ. Eng. (United States)* 146, 1–8. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001658](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001658).
- Ua-Arak, T., Jakob, F., Vogel, R.F., 2017a. Influence of Levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiol.* 65, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.002>.
- Ua-Arak, T., Jakob, F., Vogel, R.F., 2017b. Fermentation pH modulates the size distributions and functional properties of *Gluconobacter albidus* TMW 2.1191 Levan. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00807>.
- Veljković, V.B., Veljković, A.V., Avramović, J.M., Stamenković, O.S., 2019. Modeling of biodiesel production: performance comparison of box–Behnken, face central composite and full factorial design. *Chin. J. Chem. Eng.* 27, 1690–1698. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.08.002>.

- Voitechovič, E., Vektariene, A., Vektaris, G., Jančienė, R., Razumienė, J., Gurevičienė, V., 2020. 1,4-benzoquinone derivatives for enhanced Bioelectrocatalysis by fructose dehydrogenase from *Gluconobacter Japonicus*: towards promising D-fructose biosensor development. *Electroanalysis* 32, 1005–1016. <https://doi.org/10.1002/elan.201900612>.
- Wagner, J.R., Mount, E.M., Giles, H.F., 2014. Design of experiments. In: *Extrusion*. Elsevier, pp. 291–308. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3481-2.00025-9>.
- Wan, H., Xia, Y., Li, J., Kang, Z., Zhou, J., 2017. Identification of transporter proteins for PQQ-secretion pathways by transcriptomics and proteomics analysis in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Front. Chem. Sci. Eng.* 11, 72–88. <https://doi.org/10.1007/s11705-016-1580-4>.
- Wang, E.-X.X., Liu, Y., Ma, Q., Dong, X.-T.T., Ding, M.-Z.Z., Yuan, Y.-J.J., 2019. Synthetic cell-cell communication in a three-species consortium for one-step vitamin C fermentation. *Biotechnol. Lett.* 41, 951–961. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02705-2>.
- Wang, J., Huang, J., Guo, H., Jiang, S., Zhang, J., Ning, Y., Fang, M., Liu, S., 2020. Optimization of immobilization conditions for *Lactobacillus pentosus* cells. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 1071–1079. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02305-9>.
- Wang, G., Zhou, Y., Ma, K., Zhang, F., Ye, J., Zhong, G., Yang, X., 2021. Bioconversion of recombinantly produced precursor peptide pqqA into pyrroloquinoline quinone (PQQ) using a cell-free in vitro system. *Protein Expr. Purif.* 178, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105777>.
- Wang, J., Liang, J., Ning, D., Zhang, T., Wang, M., 2022. A review of biomass immobilization in anammox and partial nitrification/anammox systems: advances, issues, and future perspectives. *Sci. Total Environ.* 821, 152792. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152792>.
- Watanabe, M., Matsuzawa, T., Yaoi, K., 2018. Rational protein design for thermostabilization of glycoside hydrolases based on structural analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8677–8684. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9288-7>.
- Wu, J., Le Wang, J., Li, M.H., Lin, J.P., Wei, D.Z., 2010. Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 101, 8936–8941. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.019>.
- Xu, C., He, T., Zhou, X., Xu, Y., Gu, X., 2021a. Influence of oxygen transfer and uptake rates on xylonic acid production from xylose by *Gluconobacter oxydans*. *Biochem. Eng. J.* 176, 108192. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108192>.
- Xu, Y., Chi, P., Lv, J., Bilal, M., Cheng, H., 2021b. L-Xylo-3-hexulose, a new rare sugar produced by the action of acetic acid bacteria on galactitol, an exception to Bertrand Hudson's rule. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1865, 129740. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129740>.
- Yakushi, T., Terada, Y., Ozaki, S., Kataoka, N., Akakabe, Y., Adachi, O., Matsutani, M., Matsushita, K., 2018. Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3159–3171. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8848-1>.
- Yan, J., Xu, J., Cao, M., Li, Z., Xu, C., Wang, X., Yang, C., Xu, P., Gao, C., Ma, C., 2018. Engineering of glycerol utilization in *Gluconobacter oxydans* 621H for biocatalyst preparation in a low-cost way. *Microb. Cell Factories* 17, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1001-0>.
- Yang, S.Y., Choi, T.R., Jung, H.R., Park, Y.L., Han, Y.H., Song, H.S., Bhatia, S.K., Park, K., Ahn, J.O., Jeon, W.Y., Kim, J.S., Yang, Y.H., 2019. Production of glutaric acid from 5-aminovaleric acid by robust whole-cell immobilized with polyvinyl alcohol and polyethylene glycol. *Enzym. Microb. Technol.* 128, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.003>.
- Yao, R., Hou, W., Bao, J., 2017. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 244, 1188–1192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.078>.
- Yu, Q., Li, Y., Wu, B., Hu, W., He, M., Hu, G., 2020. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1517–1531. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10341-z>.
- Zeng, W., Cai, W., Liu, L., Du, G., Chen, J., Zhou, J., 2019. Efficient biosynthesis of 2-keto-D-gluconic acid by fed-batch culture of metabolically engineered *Gluconobacter japonicus*. *Synth. Syst. Biotechnol.* 4, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.07.001>.
- Zhang, H., Yun, J., Zayed, H., Yang, M., Zhang, G., Qi, Y., Guo, Q., Qi, X., 2018. Production of xylitol by expressing xylitol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter thailandicus* and co-biotransformation of whole cells. *Bioresour. Technol.* 257, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.095>.
- Zhang, B., Ni, Y., Liu, J., Yan, T., Zhu, X., Li, Q.X., Hua, R., Pan, D., Wu, X., 2020. Bead-immobilized *Pseudomonas stutzeri* Y2 prolongs functions to degrade s-triazine herbicides in industrial wastewater and maize fields. *Sci. Total Environ.* 731, 139183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139183>.
- Zhang, Y., Liu, Y., Zhu, J., Xiao, D., Xu, P., Ma, C., Gao, C., Lü, C., 2021. Coculture of *Gluconobacter oxydans* and *Escherichia coli* for 3,4-dihydroxybutyric acid production from xylose. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9, 10809–10817. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02511>.
- Zhang, J., Wei, J., Massey, I.Y., Peng, T., Yang, F., 2022. Immobilization of microbes for biodegradation of microcystins: a mini review. *Toxins (Basel)* 14, 573. <https://doi.org/10.3390/toxins14080573>.
- Zhao, J., Zhang, X., Lei, W., Ji, X., Zhou, X., Xu, Y., 2020. Mannonic acid and bio-ethanol production from konjac using a two-step bioprocess with *Candida shehatae* and *Gluconobacter oxydans*. *J. Renew. Mater.* 8, 79–88. <https://doi.org/10.32604/jrm.2020.08761>.
- Zhao, L., Zhu, J., Ro, K.S., Xie, J., Wei, D., 2022. Discovery of a novel acrylic acid formation pathway in *Gluconobacter oxydans* and its application in biosynthesis of acrylic acid from glycerol. *Process Biochem.* 118, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.027>.
- Zhou, X., Xu, Y., 2019a. Integrative process for sugarcane bagasse biorefinery to co-produce xylooligosaccharides and gluconic acid. *Bioresour. Technol.* 282, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.129>.
- Zhou, X., Xu, Y., 2019b. Eco-friendly consolidated process for co-production of xylooligosaccharides and fermentable sugars using self-providing xylonic acid as key pretreatment catalyst. *Biotechnol. Biofuels* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1614-5>.
- Zhou, X., Huang, L., Xu, Y., Yu, S., 2017a. A two-step bioprocessing strategy in pentonic acids production from lignocellulosic pre-hydrolysate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40, 1581–1587. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1814-y>.
- Zhou, Xuelian, Zhou, X., Huang, L., Cao, R., Xu, Y., 2017b. Efficient coproduction of gluconic acid and xylonic acid from lignocellulosic hydrolysate by Zn(II)-selective inhibition on whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 243, 855–859. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.023>.
- Zhou, X., Zhou, Xuelian, Xu, Y., 2017c. Improvement of fermentation performance of *Gluconobacter oxydans* by combination of enhanced oxygen mass transfer in compressed-oxygen-supplied sealed system and cell-recycle technique. *Bioresour. Technol.* 244, 1137–1141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.107>.
- Zhou, Xuelian, Zhou, X., Xu, Y., Chen, R.R., 2017d. *Gluconobacter oxydans* (ATCC 621H) catalyzed oxidation of furfural for detoxification of furfural and bioproduction of furoic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 1285–1289. <https://doi.org/10.1002/jctb.5122>.
- Zhou, X., Hua, X., Zhou, Xuelian, Xu, Y., 2018a. Process for the successive production of calcium galactonate crystals by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 261, 458–460. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.043>.
- Zhou, Xuelian, Zhou, X., Liu, G., Xu, Y., Balan, V., 2018b. Integrated production of gluconic acid and xylonic acid using dilute acid pretreated corn Stover by two-stage fermentation. *Biochem. Eng. J.* 137, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.005>.
- Zhou, X., Zhou, Xuelian, Tang, X., Xu, Y., 2018c. Process for calcium xylonate production as a concrete admixture derived from in-situ fermentation of wheat straw pre-hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 261, 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.040>.
- Zhou, Xuelian, Zhou, X., Zhang, H., Cao, R., Xu, Y., 2018d. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of acetoin from 2,3-butanediol using a compressed oxygen supply. *Process Biochem.* 64, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.027>.
- Zhou, P., Yao, R., Zhang, H., Bao, J., 2019. Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 2191–2199. <https://doi.org/10.1002/bit.27020>.
- Zhou, X., Han, J., Xu, Y., 2019a. Electrodialytic bioproduction of xylonic acid in a bioreactor of supplied-oxygen intensification by using immobilized whole-cell *Gluconobacter oxydans* as biocatalyst. *Bioresour. Technol.* 282, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.042>.
- Zhou, X., Hua, X., Huang, L., Xu, Y., 2019b. Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess. *Bioresour. Technol.* 272, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.001>.
- Zhou, X., Zhao, J., Zhang, X., Xu, Y., 2019c. An eco-friendly biorefinery strategy for xylooligosaccharides production from sugarcane bagasse using cellulosic derived gluconic acid as efficient catalyst. *Bioresour. Technol.* 289, 121755. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121755>.
- Zhou, X., Hua, X., Zhou, Xuelian, Xu, Y., Zhang, W., 2019d. Continuous co-production of biomass and bio-oxidized metabolite (sorboside) using *Gluconobacter oxydans* in a high-oxygen tension bioreactor. *Bioresour. Technol.* 277, 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.046>.
- Zhou, X., Shen, Y., Xu, Y., Balan, V., 2020. Directing cell catalysis of glucose to 2-keto-D-gluconic acid using *Gluconobacter oxydans* NL71. *Process Biochem.* 94, 365–369. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.038>.
- Zhu, J., Xie, J., Wei, L., Lin, J., Zhao, L., Wei, D., 2018. Identification of the enzymes responsible for 3-hydroxypropionic acid formation and their use in improving 3-hydroxypropionic acid production in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Bioresour. Technol.* 265, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.001>.
- Zou, X., Lin, J., Mao, X., Zhao, S., Ren, Y., 2017. Biosynthesis of L-Erythrose by assembly of two key enzymes in *Gluconobacter oxydans*. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7721–7725. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02201>.

CRISPR Tools in Bacterial Whole-Cell Biocatalysis

Ana Paula Mulet,* Magdalena Ripoll, and Lorena Betancor*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c05735>

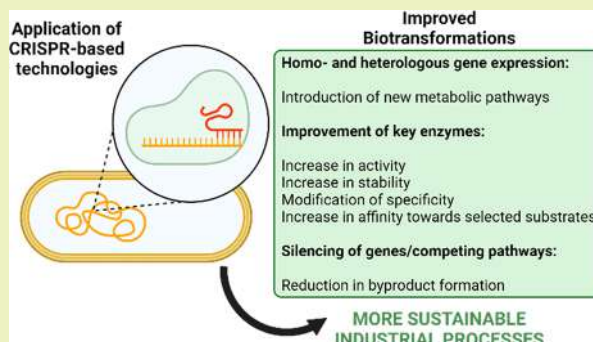
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Biocatalysis has emerged as a promising alternative to conventional chemical processes for the production of a wide range of chemicals, providing a sustainable solution to the problem of limited resources due to an ever-increasing global population. This approach involves the use of biobased catalysts, such as whole microorganisms or enzymes, to perform chemical conversions. While whole-cell biocatalysts offer advantages over the use of free enzymes, limitations related to productivity and undesired compound production have been observed when using microorganisms. Offering high specificity, broad applicability, and increased efficiency over traditional genetic engineering methods, CRISPR-based technologies may be the quintessential tool for the fit-for-purpose design of efficient bacterial biocatalysts. In this work, we aim to demonstrate the potential of CRISPR-based technologies to enhance whole-cell bacterial biotransformations for a more sustainable obtention of industrially important products. We have included a comprehensive and in-depth analysis of the current state of the art, emphasizing challenges and opportunities for future research. Through a critical analysis of reported examples, we intend to highlight the opportunities and advantages offered by CRISPR-based technologies in the field of biocatalysis for more efficient, sustainable, and translational processes.



KEYWORDS: Biotransformations, CRISPR, Biocatalyst engineering, Metabolic engineering, Genome editing, Transcription regulation

INTRODUCTION

Biocatalysis enables the production of a wealth of chemicals, with new processes and biocatalysts being developed every year.¹ Defined as the use of biobased catalysts, either whole-cells or isolated enzymes, to perform chemical conversions,^{2–4} this alternative to conventional chemical processes holds the key to a more green and sustainable chemistry. The global increase in population that occurred in recent years has directly impacted the economy, increasing the demand for food, fuels, and chemicals. To cope with this ever-growing demand, higher exploitation of natural resources has to be carried out. Indeed, given the limited availability of certain resources and the imperative to ensure their environmentally responsible utilization, the chemical industry has been compelled to address these concerns.⁵

Chemical processes oftentimes present poor selectivity, are carried out at high temperatures and pressures making them energy demanding, and use heavy metal catalysts that may be both expensive and highly contaminant.⁶ In contrast, biocatalytic processes are inherently green as they are carried out under mild conditions with lower energy requirements, and generate less toxic waste than conventional chemical processes.⁷ In these reactions, free enzymes or whole cells are used as catalysts, with the advantage of achieving selective modifications of polyfunctional substrates thanks to their high selectivity and efficiency.³

When it comes to industrial bioprocesses, ensuring sustainability in biocatalysis involves taking into account multiple factors, such as the productivity (g/L h), the cost of the catalyst, and its potential for being reused, among others.² While enzymes are highly selective and efficient, their utilization might be expensive due to high preparation costs or even low specific activities.⁸ Furthermore, the addition of expensive exogenous cofactors is sometimes needed. Additionally, an enzyme's tridimensional structure is frequently labile, which causes a loss of activity, preventing its repeated use. Whole microorganisms are efficient, ecological, and generally low-cost catalysts that have been used satisfactorily in various industries, such as pharmaceutical, chemical, food, agrochemical, and cosmetic, among others.^{9,10} In addition to a variety of shared advantages with free enzymes, whole cells present an interesting array of additional advantages. For instance, a microbial cell is generally more resistant to changes in its environment than an enzyme in solution, diminishing the risk of inactivation and easing its reuse.¹¹ Microorganisms can

Received: September 7, 2023

Revised: September 26, 2023

Table 1. Examples of CRISPR-Based Technologies Used to Improve Biotransformations

Product	Organism	Technique	Ref
(–)- α -bisabolol	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	18
(2R,3S)-butanediol	<i>Bacillus licheniformis</i> 4071-15	CRISPR-mediated HDR	19
(2S)-naringenin	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	20
1,4-butanediol	<i>Escherichia coli</i> W (ATCC 9637)	CRISPR-assisted recombination + CRISPRi	21
2,3-butanediol	<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM1183	CRISPR-assisted recombination	22
	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955	CRISPR-mediated HDR	23
2'-fucosyllactose	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	24
2-hydroxy phenazine	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> GP72	Base editing	25
3-hydroxybutyrate	<i>Clostridium ljungdahlii</i> PETC	CRISPRi	26
3-hydroxy propionic acid	<i>Escherichia coli</i> BW25113	CRISPRi	27
4-hydroxycoumarin	<i>Escherichia coli</i> BW25113	CRISPRa + CRISPRi	28
4-hydroxy isoleucine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ssp. <i>lactofermentum</i> SN01	CRISPR-mediated HDR	29
5-aminolevulinic acid	<i>Escherichia coli</i> MG1655	CRISPRi	30
5-methyl pyrazine-2-carboxylic acid	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	31
Acetoin	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955	CRISPR-mediated HDR	23
	<i>Eubacterium limosum</i> (ATCC 8486)	CRISPRi	32
Aconitic acid	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	CRISPRi	33
Acrylamide	<i>Rhodococcus ruber</i> TH	CRISPR-assisted recombination	34
Actinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	CRISPR-mediated HDR + NHEJ	35
Adipic acid	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	36
Bisabolene	<i>Escherichia coli</i> DH1	CRISPR-assisted recombination	37
Butanol	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755 (KCTC 5387)	CRISPR-mediated HDR	38
	<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	Nickase-assisted modification	39
Butenoic acid	<i>Escherichia coli</i> XP-4	CRISPRi	40
Butyrate	<i>Escherichia coli</i> BW25113(F')	CRISPRi	41
Cadaverine	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) and W3110::L5	CRISPRi + CRISPR-assisted recombination	42
Carotenoid	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	CRISPRi	43
	<i>Bacillus subtilis</i> KO7-S	CRISPR-mediated HDR	44
Cis-3-hydroxy pipelicolic acid	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	45
Coniferyl alcohol	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	46
Cysteine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> B253	CRISPRa	47
D-alanine	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	48
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	49
Dihydrobiopterin (BH ₂)	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 PPC01	CRISPRa	50
D-lactic acid	<i>Bacillus</i> sp. N16–5	CRISPRi + CRISPRa + CRISPR-mediated HDR	51
D-pantothenic acid	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPR-assisted recombination	52
Erythromycin	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> HL3168	CRISPRi	53
Ethanol	<i>Clostridium cellulovorans</i> DSM 743B	CRISPRi	54
	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10 ATCC 35319	Nickase-assisted modification	55
Exopolysaccharide (EPS)	<i>Streptococcus thermophilus</i> S-3	CRISPRi	56
EPS variants	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	CRISPR-mediated HDR	57
Genistin	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	58
Glucaric acid	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	59
Gluconic acid	<i>Gluconobacter oxydans</i> WSH-003	CRISPRi	60
Glutamate	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Base editing	61
Glycogen	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Base editing	62
Hexanol	<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	Nickase-assisted modification	39
Homobutyrate	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPRi	63
Hyaluronic acid	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NB	CRISPR-mediated HDR	64
	<i>Bacillus subtilis</i> 1A751	CRISPRi	65
Isobutanol	<i>Bacillus subtilis</i> 168	CRISPR-mediated HDR	66
Isopentenol	<i>Escherichia coli</i> BEI-14034	CRISPRi	67
Isopropanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	CRISPR-mediated HDR	68
	<i>Escherichia coli</i> BW25113	CRISPR-assisted recombination	69
Lactic acid	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	CRISPRi	70
	<i>Pediococcus acidilactici</i> LA412	CRISPR-mediated HDR	71
	<i>Lactobacillus paracasei</i> NCBI001-M2	CRISPR-assisted recombination	72
Lacto-N-neotetraose	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	73
L-glutamate	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPRi	74
L-homoserine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPR-assisted recombination	75
L-lysine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPRi	74

Table 1. continued

Product	Organism	Technique	Ref
L-phenylalanine L-proline	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPRi	76
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM 1919	CRISPRi	77
	<i>Escherichia coli</i> PHE01	CRISPR-assisted recombination	78
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	CRISPR-assisted recombination	79
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> 13032	CRISPRa + CRISPRi	80
L-valine Lycopene	<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA-EH3	CRISPR-directed evolution	81
	<i>Bacillus licheniformis</i> DW2 (CCTCC M2011344)	CRISPRi	82
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	18
Lysine Malate Medium chain length polyhydroxyalkanoate Mevalonate (MVA)	<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold (DE3)	CRISPR-assisted recombination	83
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Base editing	84
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	85
	<i>Escherichia coli</i> B0013	CRISPRi	86
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	CRISPR-assisted recombination	87
Muconate Myo-inositol N-acetyl glucosamine	<i>Escherichia coli</i> BW25113	CRISPRi	88
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 PPC01	CRISPRa	50
	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	CRISPRi	89
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	59
	<i>Escherichia coli</i> W3110	CRISPRi	90
N-acetylneuraminic acid N-butanol	<i>Bacillus subtilis</i> BNY	CRISPRi	91
	<i>Bacillus subtilis</i> BNYP	CRISPRi	92
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	93
	<i>Escherichia coli</i> DSM01	CRISPR-assisted recombination	94
	<i>Escherichia coli</i> MG1655	CRISPR-assisted recombination	95
Nicotinamide mononucleotide Octadecanol O-methylated anthocyanin P(3HB-co-3HV) Phenazine-1-carboxylic acid Pinosylvin Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	96
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	CRISPRi	97
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	CRISPRi	98
	<i>Halomonas bluephagenesis</i> TD01	CRISPR-mediated HDR	99
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> GP72	Base editing	25
Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Poly-hydroxybutyrate	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	100
	<i>Halomonas species</i> TD01	CRISPRi	101
	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	CRISPRi	102
	<i>Halomonas bluephagenesis</i> TD1.0	CRISPR-mediated HDR	103
	<i>Escherichia coli</i> MG1655	CRISPRi	104
Pyruvate	<i>Halomonas bluephagenesis</i> TD01	CRISPR-mediated HDR	105
	<i>Escherichia coli</i> Top10Dcas3	CRISPRi	106
	<i>Escherichia coli</i> MG1655	CRISPRi	107
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	48
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPR-assisted recombination	49
R-,R-2,3-butanediol Resveratrol Serine Sorbitose Squalene	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	CRISPR-mediated HDR	108
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	109
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> B253	CRISPRa	47
	<i>Gluconobacter oxydans</i> WSH-003	CRISPRi	60
	<i>Synechococcus elongatus</i> UTEX 2973	CRISPRi	110
Succinate	<i>Corynebacterium glutamicum</i> DM 1919	CRISPRi	77
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CRISPRi	111
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CRISPR-mediated HDR	112
	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655	CRISPR-assisted recombination + CRISPRi	113
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	CRISPRi	114
Sulfated naringenin Surfactin Thaxtomin A Uridine Wax ester α -Pinene β -carotene γ -aminobutyric acid	<i>Bacillus subtilis</i> DSM7	CRISPRi	115
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154	CRISPR-assisted recombination	116
	<i>Escherichia coli</i> W3110	CRISPR-assisted recombination	117
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	CRISPRi	118
	<i>Escherichia coli</i> YZFP	CRISPRa + CRISPRi	119
	<i>Escherichia coli</i> MG1655	CRISPR-assisted recombination	120
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	CRISPR-assisted recombination	121

easily catalyze multiple-step reactions, as several enzymes of the same metabolic pathway can coexist within the cell.¹² In addition, exogenous cofactor supplementation is not necessary as the cell itself produces and recycles them.¹³ These

advantages, paired with low catalyst production costs, contribute to more economical bioprocesses.¹¹

However, at times, productivities achieved with whole-cell biocatalysts, the most adequate parameter for benchmarking

Cas protein variants

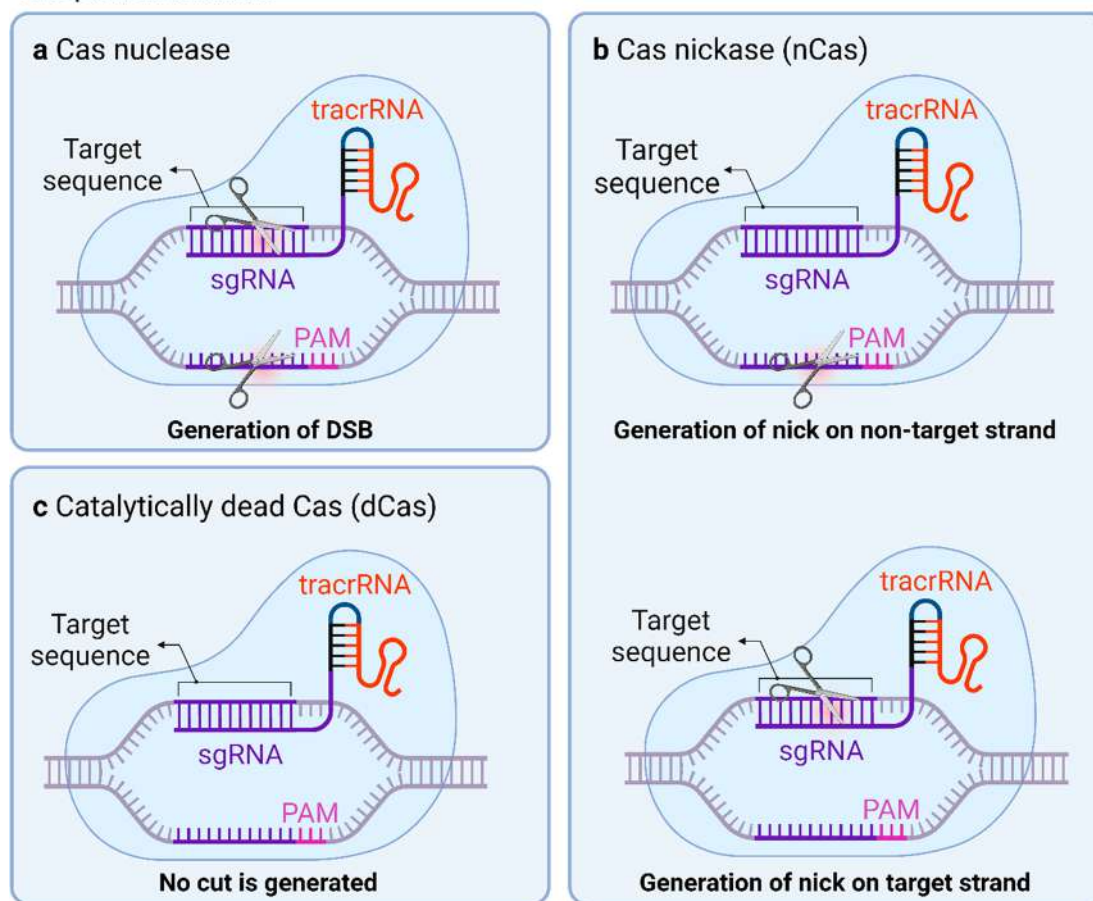


Figure 1. Different variants of Cas proteins are employed in CRISPR-based technologies. Cas nucleases (a) are able to generate double-strand breaks (DSBs) in the host's genome, while Cas nickases (nCas) (b) are mutated and are only able to generate nicks in the target sequence. Catalytically dead Cas proteins (dCas) (c) are mutant variants that are unable to cut DNA but are useful for applications related to site-directed gene repression or activation.

the process in economic terms,¹⁴ still fall behind those obtained with chemical catalysts.¹⁰ In addition, the fact that most microorganisms that produce compounds of industrial interest are not model organisms brings limitations related to their culture and the amount of product that can be obtained. Furthermore, in some cases, microorganisms produce undesired compounds along with the compound of interest, adding to the complexity of the subsequent downstream processing.

Genetic engineering of microbial strains stands as a key technological resource to challenge these issues.¹⁵ Productivities can be enhanced by increasing the expression of certain enzymes using plasmids or switching naturally occurring promoters present in the bacterial chromosome with stronger ones. If the natural host of a certain enzyme or metabolic pathway cannot be used at an industrial scale, that enzyme, or a set of enzymes, can be expressed in another bacterial chassis. Additionally, it is possible to knock out genes encoding enzymes responsible for undesired reactions, provided they are nonessential for bacterial metabolism, thereby helping to reduce the occurrence of unwanted products.

Among the available techniques for genetic modification in bacteria, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-based technologies stand out due to their broad applicability, high specificity, and increased effi-

ciency.^{16,17} Inspired by its biological role and mode of action, which uses RNA probes and CRISPR-associated proteins (Cas), scientists have adapted and used CRISPR for genome engineering and gene regulation applications.

CRISPR-based technologies have been successfully applied to enhance whole-cell biotransformations for the acquisition of industrially relevant products (Table 1). Notably, the strategy has been used not only on extensively studied model microorganisms but also on nonmodel bacteria such as *Pergeobacillus*, *Clostridium*, or *Gluconobacter* species. These types of microorganisms harness tremendous potential for biotransformations, as they accept varied carbon sources and are able to function under harsh conditions. However, they often present challenges for their genetic modification due to a dearth of insights into their cellular metabolism and regulatory mechanisms. Therefore, successful gene editing tools on this type of bacteria could enlarge the toolkit of biocatalysts with microorganisms that would be otherwise disregarded.

The information compiled in Table 1 also evidences the wealth of target biocatalytic compounds whose production has been addressed by CRISPR technologies. These targets span from sustainable energy sources like butanol to sweeteners for the food industry like sorbose, acrylamide for enhanced petroleum recovery and agricultural soil conditioning, and even

antibiotics like erythromycin. The influence of CRISPR as an enabling technology in biocatalysis is clearly substantial.

The pertinence and relevance of biocatalyst modification using CRISPR-based technologies are evidenced by the growing body of research papers published over the past decade. These findings have been thoroughly examined and discussed in various publications^{15,122–124} emphasizing the application of CRISPR-based technologies in both prokaryotes and eukaryotes. Complementarily, herein, we focus on the importance of CRISPR-based technologies for improving bacterial biocatalysts, showcasing a variety of current approaches as well as their advantages over other, more traditional genetic engineering methods. Microbial whole-cells stand as the quintessential example of industrial biotechnology and lead the way in emerging technologies. As the implementation of CRISPR-based technologies greatly varies among the different organisms, our work provides methodological details that must be considered for CRISPR application in bacteria, which may aid in the obtention of new or more efficient biocatalysts.

General Aspects of CRISPR-Based Technologies. In 2005, Mojica et al. described the CRISPR function in nature as a type of adaptative immune system in prokaryotes.¹²⁵ Later, Doudna and Charpentier repurposed it for genetic engineering in *E. coli*.¹²⁶ Since then, the technology has expanded to be used in many prokaryotes, archaea, and eukaryotes for genomic editing and gene regulation purposes.¹²⁷

In general, these technologies rely on the introduction of a Cas nuclease that can exhibit catalytic activity or be mutated to remain inactive, and a guide RNA (gRNA) that will bind to the nuclease and lead to the target site in the host's genome (Figure 1). In the CRISPR-Cas9 system, Cas9 depends on two RNA molecules: a crRNA (crRNA) which contains a 20-nt sequence that confers specificity to the Cas9 and a transactivating RNA (tracrRNA) that hybridizes partially with the crRNA and stabilizes the structure, activating Cas9. crRNA and tracrRNA can be fused, forming a single guide RNA (sgRNA). Additionally, for the correct positioning of the CRISPR-Cas complex on the target DNA, a protospacer adjacent motif (known as a PAM sequence) must be located near the target DNA sequence, which is complementary to the crRNA.¹²⁸

In the past decade, different technologies based on the CRISPR-Cas system have been successfully applied to modify industrially relevant bacteria. An example of such is CRISPR interference (CRISPRi), which is a gene regulation tool. This approach is based on a “dead” or catalytically inactive Cas protein (dCas) and an RNA molecule that bind to DNA in order to silence a targeted gene by blocking RNA polymerase.¹²⁹ This methodology is oftentimes used for the screening of potential targets for either future gene knockouts (KO) or gene overexpression. Additionally, it can prove useful when the expression of certain essential genes cannot be completely eliminated, permitting the continuance of vital cellular processes.¹³⁰

Conversely, CRISPR-based technologies may facilitate a plethora of genomic modifications. By introduction of CRISPR-induced double-strand breaks (DSBs) for homologous directed repair (HDR) or a combination of CRISPR-based technologies with targeted modifications induced by recombinases, biocatalytic processes can be further improved. Regulatory elements replacement, gene editing, and expression cassette integration are all examples of these modifications. For instance, enzymatic activities can be improved through

structural modification or the overexpression of a key gene, while competing pathways can be downregulated, diminishing byproduct formation.^{51,64,81} Furthermore, the integration of CRISPR-Cas technology with other genomic modification technologies offers an enhanced means of achieving the previously mentioned targeted modifications, greatly boosting the efficiency of the process. Using this approach, a genomic modification is incorporated via another editing technique (i.e., recombinases), and the positive clones are selected by means of CRISPR.

In the ever-evolving landscape of genetic CRISPR-based technologies, emerging techniques have ushered. These cutting-edge methods, such as CRISPR activation (CRISPRa), Base Editing, and CRISPR-assisted evolution, offer new tools to complement those previously mentioned and broaden the genetic manipulation possibilities. Also, there are some approaches that apply only to restricted groups of bacterial species in which specific molecular pathways are present, including nonhomologous end joining (NHEJ), microhomology-mediated end joining (MMEJ), and the use of Cas nickases (nCAs).

It is noteworthy that the potential use of all these CRISPR-based technologies can be constrained at times due to the toxicity associated with the Cas proteins and their modified forms, including their noncatalytic variations (Figure 1). This phenomenon has been extensively documented in the literature^{38,121,131,132} and is mostly related to the toxicity of DSBs in some bacteria, and the impact of off-target effects on the expression of essential genes. In consequence, a careful design of the genetic resources to implement these technologies is of key importance to help mitigate these issues. A correct regulation of Cas expression, as well as that of the gRNA, can be instrumental in obtaining the desired results. While discrete levels of Cas protein expression are oftentimes optimum for implementation, high levels of gRNA are generally associated with successful CRISPR modification attempts. Several strategies to achieve the regulation of these key components are discussed extensively in the next section of the review regarding CRISPRi for gene repression but can be analogously translated to the vast majority of CRISPR-based technologies.

In the following sections, we delve into a curated selection of CRISPR-based technologies of particular relevance. Our focus is on their implementation within industrially relevant bacteria to enhance their capacity as biocatalysts, with a thorough analysis of their respective advantages and disadvantages. Additionally, selected examples are also presented in order to elucidate their practical applications.

CRISPRi for Gene Repression: Rewiring Biocatalysts for More and Cleaner Product Generation.

In bacteria, CRISPRi arises as the preferred method for regulating gene expression in a sequence-specific manner, as other technologies, such as RNAi, cannot be implemented due to a lack of the required molecular machinery. CRISPRi technology involves a dCas that is coupled with an RNA molecule (gRNA) that is in charge of guiding the complex to the promoter or coding sequence of the target gene, resulting in gene repression. The ribonucleoprotein complex acts sterically, inhibiting the transcription of the target gene either by blocking elongation or transcription initiation.¹³³

Transcription regulation by CRISPRi emerges as a valuable tool in biocatalysis, as it may allow for fine-tuning metabolic or physiological traits encoded by essential genes. Sometimes,

CRISPRi implementation strategies

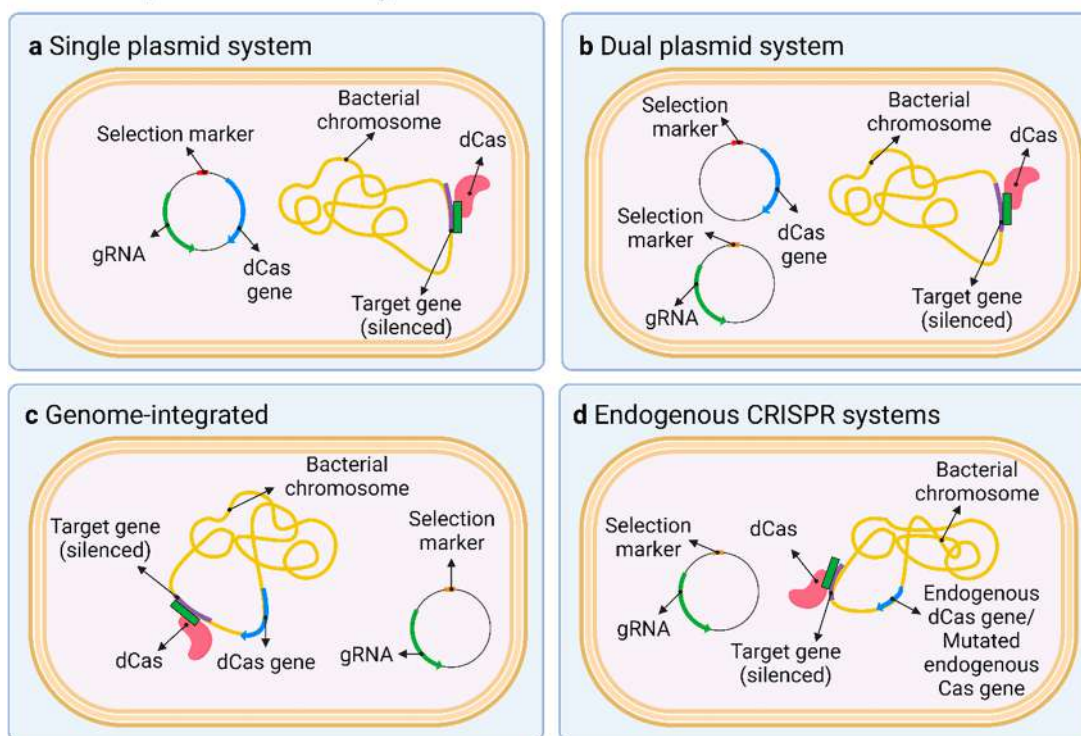


Figure 2. CRISPRi implementation strategies in bacteria. CRISPRi components (dCas and gRNA) can be introduced to bacteria in the same plasmid (a) or in different plasmids (b) or dCas can be integrated into the bacterial genome (c). Alternatively, endogenous CRISPR systems can be reprogrammed for gene repression. To achieve this, a mutation must take place in a naturally occurring Cas protein to obtain dCas (dead Cas) (d). This mutation can either happen naturally (endogenous dCas gene) or be induced using genetic modification technologies (mutated endogenous Cas gene). In all cases, after transcription, the gRNA will guide the dCas protein to the target sequence. Once in place, the complex will act, sterically inhibiting gene transcription. dCas: catalytically dead Cas protein; gRNA: guide RNA.

these genes or metabolic pathways cannot be altered by traditional gene-suppressing methods, as they may result in bacterial death. Repression by CRISPRi can allow for a basal expression that does not interfere with vital cellular processes but, for example, does not generate large amounts of an undesired byproduct. In addition, CRISPRi can be used as an exploratory technique preceding a KO attempt. Its simplicity, compared with KO techniques, can be exploited to evaluate multiple gene targets to determine which one is best. Moreover, this approach can be beneficial for gene repression in genetically recalcitrant nonmodel organisms when the knowledge of the acting DNA repair mechanisms is scarce. CRISPRi also allows the simultaneous repression of various genes by the introduction of more than one gRNA; this multiplexing capacity may be exploited in metabolic engineering. Enhancing metabolic flux through optimization in whole-cell biocatalysis is a challenging and time-intensive endeavor. In fact, it frequently necessitates simultaneous adjustments to the expression levels of multiple genes. While certain pathways possess identified rate-limiting steps, intricate metabolic networks often demand a methodical, trial-and-error approach to fine-tune the expression of multiple genes in order to attain efficient biotransformation. In this regard, CRISPRi has emerged to alleviate the workload associated with metabolic pathway engineering.

While this tool has many advantages, certain limitations need to be considered. One of the major challenges is achieving the optimal level of repression, which may require optimization. In cases where a high level of repression is

needed, this may not be attainable, requiring a KO. On the other hand, poor specificity of the gRNA may result in off-target effects. Although this is a common issue for all CRISPR tools, in the case of CRISPRi, measuring this effect can be more challenging. Additionally, the size of the dCas-gRNA complex can lead to the repression of nearby genes.

CRISPRi in bacteria can be achieved through different strategies (Figure 2). A common approach involves the transformation of the bacterial strain with single plasmid systems or dual plasmid systems. In single plasmid systems, the dCas and gRNA (or gRNAs) expression cassettes are harbored in the same plasmid whereas in dual plasmid systems, the dCas protein and the gRNA (or gRNAs) are codified in different plasmids. Alternatively, it is frequent to see examples of the dCas expression cassette integrated into the bacterial chromosome, alleviating the metabolic burden and diminishing the use of antibiotics. Moreover, in some cases, pre-existing endogenous Cas systems can be harnessed, only requiring the incorporation of a gRNA expression cassette.

Given the multiple applications and implementations of CRISPRi, we present and discuss them separately as follows.

Single Plasmid Systems. The simplicity of this approach becomes evident as a sole plasmid transformation is sufficient for the expression of the CRISPRi complex and the subsequent transcriptional repression of the target gene (Figure 2a). An example of the expression of a dCas9, which features two inactive mutations of D10A and H840A at its RuvC1 and HNH nuclease domains, was reported by Kozhva et al. in a recent work.¹⁰² The nuclease was introduced in model strain

Pseudomonas putida KT2440 using inducible plasmids to enhance PHB production. This common polyhydroxyalkanoate is frequently used in the medical, agriculture, and food industries. The authors improved PHB production by knocking down two genes involved in competing pathways. Through the double knockdown, the acetyl-CoA content in the rewired strain remained constant at levels 8-fold higher than that in the control strain. In an automated fermentation platform, this rewired strain was able to produce 0.94 g/L of PHB, which represents a 3.4-fold increase compared to the control strain. In another attempt to enhance PHB productivity, the authors used the CRISPRi approach to knock down the bacterial fission ring protein FtsZ. The downregulation of the expression of this protein results in the formation of filamentous cells, benefiting the accumulation of PHB within the cell. The resulting bacteria presented a filamentous shape 10-fold longer than its wild-type (WT) counterpart, allowing for a PHB production of 1.12 g/L.

CRISPRi relying on single plasmid transformation is also applicable to nonmodel organisms. For instance, Mo et al. modified the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* AM1 to produce carotenoids.⁴³ These natural pigments are used as colorants, feed supplements, and nutraceuticals, among their many applications in the medical, cosmetic, and biotechnology industries.¹³⁴ By knocking down an enzyme involved in a competing pathway, the authors reported a 1.9-fold increase in the level of carotenoid formation.

Dual Plasmid Systems. It is not uncommon to find difficulties in the implementation of CRISPRi single plasmid systems. Due to the relatively large plasmid size that is required, plasmid construction, as well as its transformation, are often times challenging.¹²⁹ Therefore, the use of dual plasmid systems, where the dCas and the gRNA are harbored by different plasmids, may arise as a more practical approach (Figure 2b). However, one of its limitations is the requirement of two different selection markers.

Wu et al. successfully applied a dual plasmid system for the efficient obtention of resveratrol in *E. coli* BL21.¹⁰⁹ Resveratrol is a well-known antioxidant with proven anti-inflammatory, anticancer, and chemopreventive activities. The authors enhanced this compound's production by constructing a synthetic pathway from precursors glucose and malonate in *E. coli*. In addition, the mutant strain was further engineered by using CRISPRi to improve malonyl-CoA availability, which is a part of the synthetic pathway of resveratrol. To implement the system, a plasmid-based on pACYCDuet-1 and harboring a chloramphenicol expression cassette was used to express the dCas9 protein, while the different sgRNA cassettes were cloned in the pCOLADuet-1, which confers kanamycin resistance. It was observed that the simultaneous downregulation of four genes encoding competing fatty acid assimilation pathways resulted in a resveratrol titer of 187.1 mg/L, which represents an almost 6-fold increase in comparison to the parental strain.

Genome-Integrated CRISPRi. Another approach for CRISPRi implementation involves the incorporation of the dCas expression cassette into the bacterial chromosome (Figure 2c). This technique diminishes the need for antibiotic selection and, at the same time, alleviates the metabolic burden associated with multiple plasmid replication and maintenance as only one plasmid harboring the gRNA is needed.

This approach may be particularly useful for bacteria that exhibit low transformation efficiency such as *Bacillus licheniformis*. This microorganism has significant industrial importance as it is considered "Generally Recognized as Safe" (GRAS). However, the difficulties associated with its transformation make its genetic manipulation challenging. Aiming to facilitate its metabolic engineering, Zhan et al. generated a mutant strain in which a dCas9 expression cassette was inserted as a single copy within the bacterial chromosome.⁸² The construction was inserted in gene *yjqB*'s locus, which corresponds to a phage genome present in the bacterial chromosome. Once the expression of dCas9 was established, this allowed the modification of the expression of several genes individually and as a multiplex. The sgRNAs were introduced as plasmids, which represent a minor challenge due to the smaller size of the constructions. These changes permitted improvement in the production of L-valine, an amino acid that has pharmaceutical applications as well as is widely used in the areas of animal feed and dietary supplements. The authors employed the CRISPRi system to suppress various genes involved in both byproduct formation and L-valine degradation pathways, intending to identify which genes have a more significant impact on L-valine production. By reducing the expression of a gene involved in byproduct formation and an enzyme that uses L-valine as a substrate, production of L-valine was increased by 1.27 and 2.89-fold in experiments carried out in shake-flasks and a bioreactor, respectively.

Capitalizing on Endogenous CRISPR Systems. In some cases, endogenous CRISPR systems can be successfully repurposed for gene repression (Figure 2d). For this, a mutation in a naturally occurring Cas must take place for it to be rendered catalytically "dead". Additionally, an expression cassette for the gRNA has to be delivered to the bacterial cell, for example, integrated within a plasmid. The expressed gRNA would then encounter the endogenous dCas and, subsequently, repress the expression of the selected gene.

This approach proved helpful in the metabolic engineering of the nonmodel organism *Gluconobacter oxydans* WSH-003.⁶⁰ Qin et al. reported and repurposed an endogenous type I-E CRISPR/Cas system to enhance sorbose and gluconic acid production.⁶⁰ These systems comprise multisubunit Cas-targeting complexes that form a structure known as Cascade, which interacts with gRNA. In nature, this structure subsequently binds to DNA, recruits Cas3 nuclease, and degrades the target sequence.¹³⁵ In *G. oxydans*, WSH-003 Cas3 is inactive, probably due to the effect of spontaneous mutations. Repression of two genes permitted the determination of the catabolism pathway most relevant for growth. The experiments revealed that downregulating the Entner–Doudoroff pathway (EDP) was favorable for growth and product formation. In contrast, the downregulation of the pentose phosphate pathway (PPP) had the opposite effect. Those findings were used to increase the sorbitol to L-sorbose and D-glucose to D-gluconic acid conversions by repressing and overexpressing essential genes of EDP and PPP pathways, respectively. Overall, the reported CRISPRi system demonstrated great potential not only for gene repression alone but also for use in combination with other genetic engineering techniques.

Establishing CRISPRi Repression Levels. One of the most remarkable advantages of the CRISPRi application is its tunability. As previously mentioned, achieving the desired repression level may require some optimization, which can be a

Establishing CRISPRi repression level

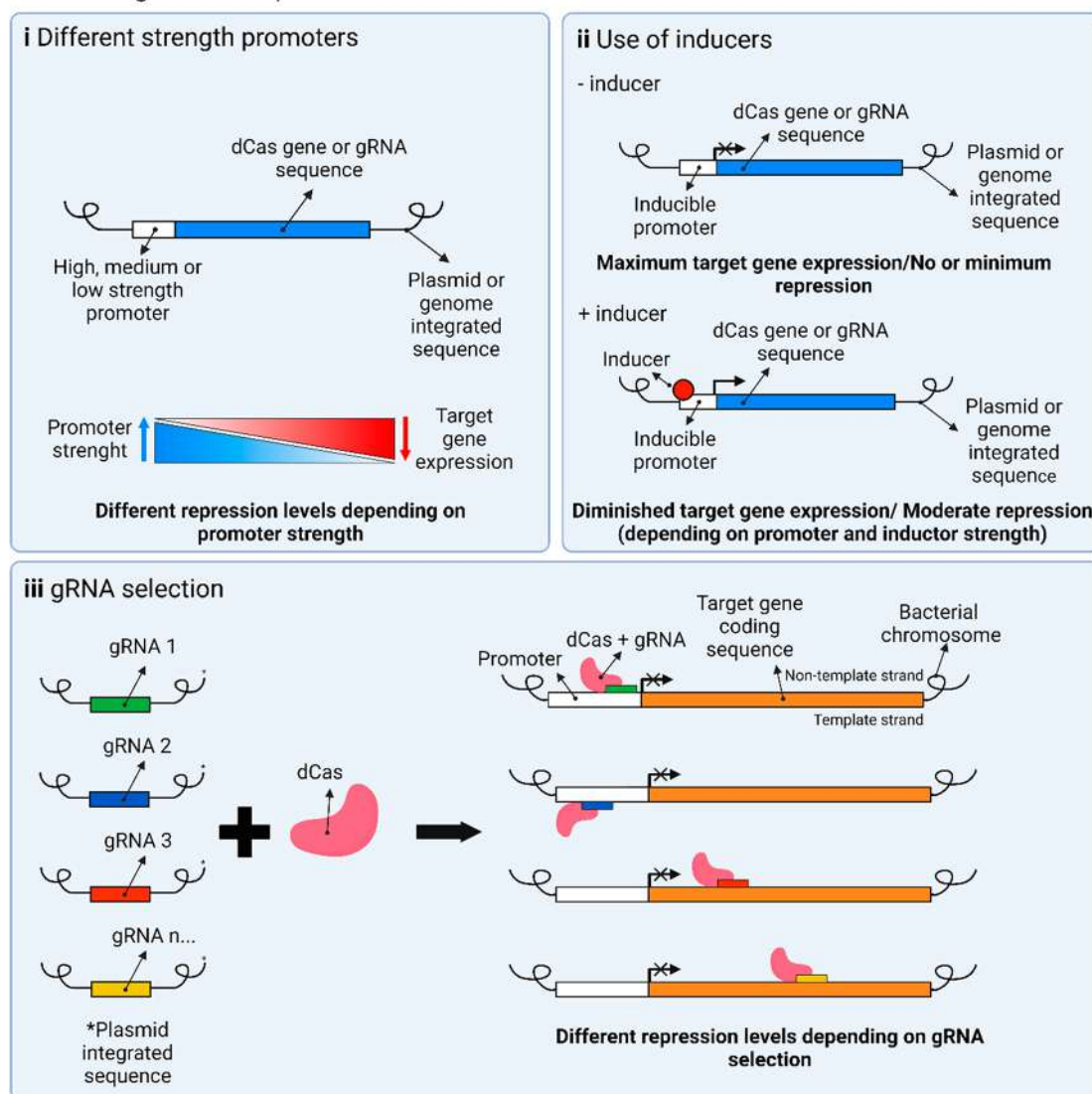


Figure 3. Different strategies for tuning repression levels using CRISPRi. The expression level of the CRISPRi components can aid in tuning the repression level of the target gene. There are several strategies to adjust these expression levels, including choosing a suitable promoter strength for dCas and sgRNA expression cassettes (i) or employing inducible promoters for the CRISPRi components (ii). Repression level can also be regulated by using different gRNAs that target different parts of the target gene or its promoter region (iii). gRNA: guide RNA; dCas: catalytically dead Cas protein.

potential drawback. Gene repression levels can be fine-tuned in all implementation systems by a variety of strategies (Figure 3). It has been observed that the expression levels of CRISPRi components directly impact the repression of a target gene. Studies involving catalytically active Cas9 demonstrated optimum Cas9:sgRNA molar ratios of 1:2.5 to 1:4.6,^{136,137} which indicates that, generally, a decimal ratio equivalent below 1 is necessary for a successful CRISPRi attempt. It is reasonable to assume that this is also the case for CRISPRi implementation systems. In that sense, selecting promoters with different strengths to control the expression cassettes for dCas and gRNA may aid in achieving the necessary dCas:gRNA ratio for a successful CRISPRi attempt. In these cases, promoter strength may allow for a higher or lower level of expression of the CRISPRi machinery, resulting in different levels of repression of the target gene.

In addition, the use of inducible promoters to control dCas and gRNA expression cassettes is an interesting approach that

also allows for fine-tuning the expression of target genes in a flexible manner. In particular, this is a valuable tool for biocatalysis as it not only allows for a certain repression level depending on promoter strength but also enables the induction of gene repression at a certain time point during biotransformation.^{21,97} As an example, gene repression can be induced at a particular bacterial growth phase or with the buildup of precursor metabolites.⁸⁸ Additionally, when the knockdown of a certain gene interferes with the growing capacity of the bacteria by redirecting the carbon flux, the regulation of the expression of the CRISPRi machinery allows the accumulation of biomass before product formation.¹⁸ This can aid in the achievement of higher biomass concentrations and the improvement of product yields.

Conversely, different levels of gene repression can also be accomplished by a thorough selection of the gRNA sequence. It has been observed that the hybridization site of the gRNA within the target gene can affect gene repression levels.

Differences in several orders of magnitude can be observed in gene repression level depending on the distance of the binding site to the transcription start, the selection of the target strand, and the occurrence of mismatches between the gRNA and the binding site.¹⁰⁷

In this section of the review, a selection of examples of gene repression tunability tools is presented, highlighting their applicability in biotransformations as well as the advantages and disadvantages that arise from their implementation.

Different Promoter Strength. The selection of the promoters that control the expression of dCas and the gRNA is a key aspect in the design of a CRISPRi system. Promoter strength will translate into different levels of expression of the CRISPRi machinery, which directly affect gene repression levels (Figure 3i). Concomitantly, a good combination of promoters will contribute to the establishment of a proper dCas:gRNA molar ratio.

This strategy was employed by Kong et al. to explore and enhance the biosynthetic pathway of a new EPS in *Streptococcus thermophilus* S-3.⁵⁶ EPSs are common additives utilized in the food and medical industries due to their applicability as thickening agents. First, with the aim of determining which promoters to use in the proposed CRISPRi system, the authors screened six high-strength promoters for the sgRNA expression cassette design. For this, the *upp* gene was selected as a model to establish the repression levels associated with each promoter, as this gene encodes a uracil phosphoribosyltransferase that converts 5-fluorouracil into uridine monophosphate, causing cell death. The transcription repression levels obtained ranged from 24% to 85%, demonstrating that the promoter that drives the expression of the CRISPRi system is critical for its efficiency. The authors chose promoter P₁₁, which provided the highest repression level to clarify the EPS biosynthetic pathway through repression experiments. The downregulation of all genes in the EPS biosynthetic pathway was performed using the designed CRISPRi system, individually and in pairs, to identify its limiting steps. In addition, CRISPRi was also used to determine whether the expression level of genes involved in the nucleotide sugar metabolism affects EPS yields. Based on the obtained results, the authors combined the repression of a nucleotide sugar metabolism gene with the overexpression of two EPS biosynthetic pathway proteins. The engineered strain accumulated 221 mg/L/OD₆₀₀ of EPS, which meant a 63% increase in production compared to that of the control strain.

Use of Inducers. Promoter selection is not limited to constitutive promoters as the CRISPRi machinery can be controlled by inducible promoters, further multiplying the opportunities for gene repression tunability (Figure 3ii). The usage of inducible promoters to control the expression of dCas and the gRNA is an invaluable resource for the development and intensification of biocatalytic processes. The possibility to “switch” the expression of the CRISPRi machinery “on” facilitates biomass accumulation, which can be directly translated to higher production yields.^{18,97} Also, the expression levels of each part of the machinery could theoretically be managed in a concentration-dependent manner. This means that the expression level of the machinery would vary with the amount of inducer added, facilitating the study and implementation of different levels of repression using the same system.

Kim et al. reported a regulatable CRISPRi system using a rhamnose-inducible promoter to drive the expression of dCas

in *E. coli*.¹⁸ To develop the system, the authors designed a plasmid harboring a fluorescent protein (GFP) under the control of the T7 promoter. Targeting the T7RNAP gene, responsible for the transcription of T7-regulated genes, presented a restricted dynamic range. The expression of GFP decreased by only 1.7 to 3.9 times when rhamnose concentrations ranging from 16 to 1000 μ M were used. However, in a second attempt targeting both the T7RNA and GFP genes, the gene repression ranged from 7- to 27-fold. Building on these findings, the authors employed the established CRISPRi system to regulate the heterologous pathways leading to the production of (–)- α -bisabolol and lycopene. These compounds are well-known terpenoids, frequently used in diverse industries, such as the fragrance, pharmaceutical, and chemical industries. A common limitation in terpenoid production in mutant *E. coli* strains is the buildup of toxic metabolites from the heterologous MVA pathway, which is also responsible for generating the desired compound. Utilizing the rhamnose-inducible CRISPRi system, the authors successfully uncoupled bacterial growth with the production of the target compounds by repressing the expression of all the genes in the MVA gene cluster and the expression of the *mvaE* gene, which codes for an acetyl-CoA acetyltransferase. This strategy successfully reduced the production of toxic intermediates, allowing for the achievement of higher biomass yields in the first step of the fermentation. The subsequent removal of rhamnose permitted product formation. With this strategy, using 1 mM of rhamnose during growth, lycopene production was increased by 8-fold, while (–)- α -bisabolol production was increased by 10.8-fold.

However, one drawback of this strategy is the leakage of some inducible promoters. Oftentimes, even a small amount of dCas9 is capable of a significant reduction in the expression of the target gene. For instance, dCas9 regulated by promoter PLTetO-1 without induction reduced to 0.05% the expression of a fluorescent protein in cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002.⁷⁰ The larger dynamic range obtained for system induction was obtained when using an inducible promoter for both dCas and gRNA.

gRNA Selection. A diligent design of the gRNA can lead to different levels of repression of the target gene (Figure 3iii). The position of the binding site with the coding sequence might range from the promoter location to different sites throughout the coding sequence of the gene. Additionally, the selection of the target DNA strand must be accounted for. While there seems to be no difference in targeting the template or nontemplate strand when the promoter region is considered,¹³⁸ generally, aiming for the nontemplate strand of the coding sequence is the more effective alternative.¹⁰⁷

For instance, Li et al. studied different locations for gRNA binding in the strain EP-bifido *E. coli* to enhance MVA production.⁸⁸ This previously engineered strain contained a carbon-saving artificial pathway (EP-bifido pathway) that generates high acetyl-CoA from glucose, with the former being a precursor for MVA. MVA is involved in terpenoid production and is also used as a moisturizer in cosmetics, and as a monomer for polyester production.¹³⁹ In this work, the target gene was *pfkA*, which encodes the enzyme phosphofructose kinase A. By repressing its expression, the authors hypothesized that a change would occur in the metabolic flux, redirecting it from the Embden–Meyerhof pathway (EMP) to the pentose phosphate (PP) pathway, promoting a higher production of NADPH. In turn, the higher availability of

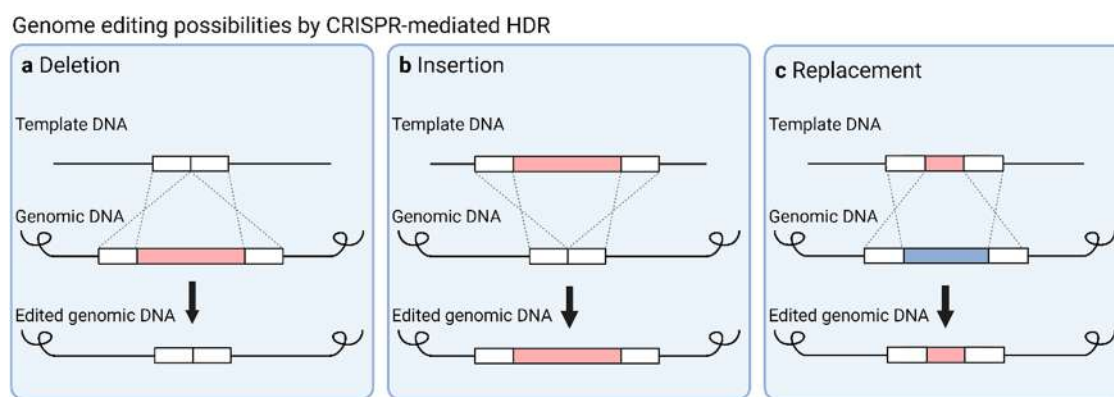


Figure 4. Genome editing possibilities by CRISPR-mediated HDR. The introduction of a template for homologous recombination permits the deletion of a genomic region (a), the insertion of a DNA sequence within the chromosome without genomic DNA loss (b), or the replacement of a genomic region with another DNA sequence (c). Red box: gene of interest. White box: homologous sequence; Blue box: replaced sequence.

NADPH would facilitate MVA production. In this example, the greatest inhibition of *pfkA* expression was achieved by a gRNA located in the promoter sequence, allowing the obtention of 8.53 g/L of MVA, when CRISPRi was combined with the overexpression of the *zwf* gene (which codes for the first enzyme of the PP pathway).

CRISPR-Mediated HDR: Improving Biocatalysts through Genomic Modifications. In biotransformations, genomic modifications are often preferred over their plasmid-based counterparts as bacteria with stable genotypes are more suitable for industrial application. To induce these modifications in a sequence-specific manner, biotechnologists harnessed the HDR system, which is the dominant DNA repair mechanism in most prokaryotes.¹⁴⁰ By generating DSBs and introducing a donor DNA template with the desired mutation, bacteria can incorporate that mutation into its chromosome by means of HDR. However, apart from being a sophisticated technology, HDR rates are often low, reducing the technique's efficiency.

The possibility of using CRISPR-based systems to induce DSBs emerged as a game changer as it significantly improves HDR rates. This directly translates into an increase in efficiency, further facilitating genomic modification in bacteria. The donor DNA fragment can be introduced in the cell together with the CRISPR system and used as a repair template for HDR after the occurrence of the nuclease-generated DSB.

This technology allows for a wide variety of targeted genomic modifications from point mutations and small indels to KO and knock-ins (KI). All these modifications can be achieved by three basic genomic operations: deletion, insertion, and replacement of DNA fragments (Figure 4).

The potential of introducing virtually any mutation into the bacterial chromosome opens the door to a plethora of possibilities for the improvement of whole-cell biocatalytic processes (Figure 5).

It is worth noting that although promising, the applicability of this technology is limited as many bacterial species are susceptible to DSB due to the lack of HDR machinery. In consequence, it is recommended to evaluate the presence of the HDR pathway and its activity prior to an attempt at CRISPR-mediated HDR genomic modification in a new bacterial species.

However, this methodology has been successfully applied to several industrially relevant bacteria, with the aim of improving

their biotransformation efficiency. In this segment of the review, we present examples of those CRISPR-mediated HDR genomic modifications, highlighting their applicability in selected examples of biotransformations.

Deletion of DNA Fragments. Deletions in the DNA sequence of a bacterial chromosome often result in the KO of a gene, achieved through the removal of either the entire gene sequence or a specific fragment. To generate these KOs using CRISPR-mediated HDR, a template DNA must be designed with homology arms directed toward the flanking regions of the target sequence (Figure 4a). Once the Cas nuclease generates the DSB, the HDR process results in the targeted removal of the sequence from the bacterial chromosome.

Deletions resulting in gene KOs can be successfully implemented to enhance biotransformation processes, for example, by eliminating competing pathways or increasing target product formation, while diminishing the production of undesired compounds. Schilling et al. resorted to this technology to improve 2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.¹⁰⁸ This compound is a valuable platform chemical commonly used as a precursor for the obtention of more complex chemicals. Common unwanted byproducts associated with 2,3 butanediol production by *P. polymyxa* are EPS and spores. By creating two KO mutants of the bacterium, the occurrence of these undesired byproducts was effectively reduced. The outcome confirms that this approach holds promise for producing mutants that streamline downstream processing. In addition, the 2,3-butanediol production was improved to 43.8 g/L by coupling a KO on lactate dehydrogenase with the heterologous expression of butanediol dehydrogenase. In all cases, KO mutants were obtained by the design of 1 kb homology arms constituting the HDR template, achieving the deletion of up to 18 kb.

Additionally, knocking out specific genes can enhance the performance of a bacterial chassis for biotransformation purposes. For instance, one common drawback in biotransformations is the appearance of mass transfer limitations faced by substrates and products to and from the cells. Modifying the outer membrane can alleviate these limitations, concomitantly increasing the level of product formation. In a recent example, Wang et al. studied *Halomonas bluephagenesis* mutants presenting a defective outer membrane in the bioproduction of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB).¹⁰³ To generate this mutant, a CRISPR-based system was developed to successfully

Possible applications of CRISPR-mediated HDR genomic modifications

Genomic modification	Effect	Possible implications for the biocatalytic process
Addition of an expression cassette for a heterologous protein/enzyme	Generation of a mutant strain that expresses a new protein/enzyme	Generation of mutants to obtain new industrially relevant products Improvement of a biotransformation by adding an accessory protein/enzyme that augments target compound formation
Change naturally occurring promoter with a stronger one	Augmented expression of a protein/enzyme	Augmented production of target compounds
Change naturally occurring promoter for a weaker one	Decreased expression of a protein/enzyme	In cases where essential genes cannot be KO, decrease in competing products formation
Change naturally occurring promoter for an inducible one	Inducible expression of a protein/enzyme	In cases where the product is toxic, allows for the generation of biomass prior to product formation induction
Modification of the sequence of a protein/enzyme to replace aminoacids	Modification in the tridimensional structure of a protein/enzyme	Increase in enzyme activity leading to an augment in target compound formation Modification of substrate scope of an enzyme, increasing the number of products that can be obtained or increasing enzyme specificity to avoid undesired products Increase of enzyme stability, facilitating reuse and enabling longer operation times
Addition of linkers and expression cassettes for a protein/enzyme	Generation of fusion proteins	Obtention of a chimeric protein that improves spatial proximity within two enzymes, facilitating product formation In cases where the fusion protein is fluorescent, easier localization for characterization
Adding a tag to a protein	Generation of a marked protein	Easier localization and purification for characterization
Generating a KO of a gene	Generation of a mutant strain that does not express a certain protein/enzyme	Decrease in by-product formation

Figure 5. Possible applications of CRISPR-mediated HDR genomic modifications for the improvement of biocatalytic processes.

delete the *lpxL* gene, which codes for an enzyme involved in LPS biosynthesis. The process involved generating a template DNA with homology arms to remove 450 base pairs (bp) corresponding to the target gene. The KO strain, namely, *H. bluephagenesis* WZY09, showed enhanced properties. Among those were increased growth and membrane permeability, a 21-fold reduction in endotoxin content (a common problem related to the outer membrane of this bacterium), and a 30% increase in PHB production.

Insertion of DNA Fragments. The insertion of a DNA fragment can take place outside or within the coding region of a gene. If the insertion takes place on the outside, then a fragment can be added to the bacterial chromosome, generally without any disruption in the expression of neighboring genes.

On the contrary, if the insertion takes place within the coding region of a gene, it may result in a KO of the gene. The insertion of a gene or a fragment in a particular location within the genome, regardless of whether it is a coding sequence or not, is referred to as a KI (Figure 4b). Similarly, KOs can be accomplished by disrupting the target coding sequences with the insertion of exogenous DNA.

The endogenous Type II-A CRISPR system present in *Pediococcus acidilactici* was exploited by Liu et al. to introduce another copy of an endogenous NADH-dependent L-lactate dehydrogenase gene (*L-ldh*) into a noncoding region of the genome.⁷¹ *P. acidilactici* is a lactic acid bacterium suitable for probiotic use and for the industrial production of lactic acid as it exhibits excellent properties such as thermotolerance and

CRISPR-assisted recombination

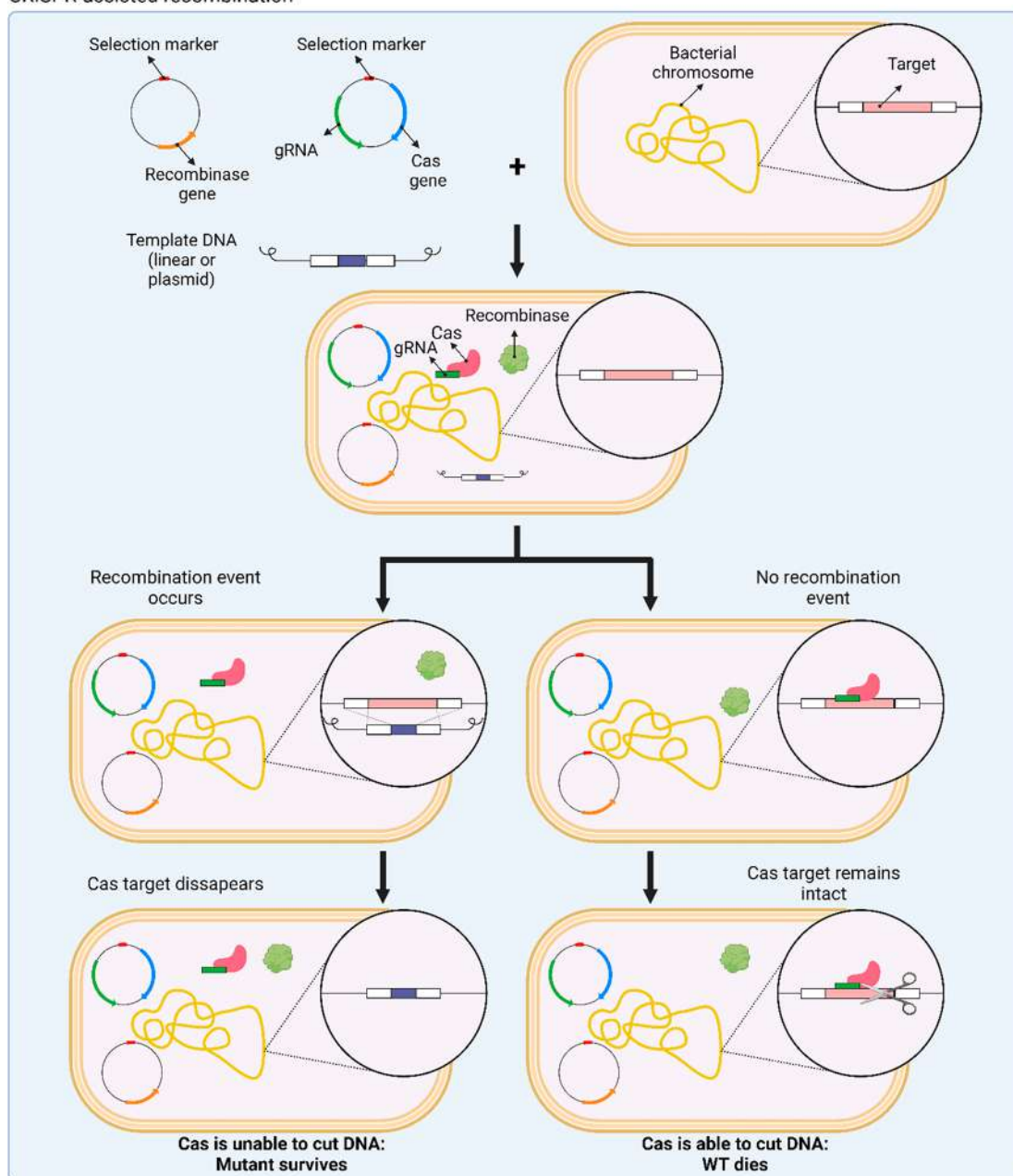


Figure 6. CRISPR-assisted recombination for mutant selection. Recombination is carried out by heterologous recombinases, and the CRISPR system is designed to aid in positive mutant selection by cutting the genome in the WT sequence. The bacteria that did not successfully incorporate the intended change die due to the incapacity of repairing the CRISPR-induced DSB. In consequence, only mutant bacteria survive and can grow in a Petri dish. Recombinase: protein that catalyzes site-specific recombination events; gRNA: guide RNA; Cas: Cas protein.

stress resistance. Lactic acid is widely used to produce poly(lactic acid), a biodegradable polyester. Repurposing an endogenous CRISPR system is often less laborious, as Cas9 and tracrRNA are already encoded in the bacterial chromosome. In that sense, the sole introduction of the crRNA coding sequence and the repair template is enough to obtain the desired modifications. Using 700 bp homology arms flanking the *L-ldh* expression cassette, the authors successfully introduced the construction in *P. acidilactici*'s genome. The modified strain showed improved growth and produced 24.5 g/L lactic acid, surpassing the WT strain.

Replacement of DNA Fragments. Another possible genomic operation that can be performed by CRISPR-

mediated HDR is the replacement of a DNA fragment (Figure 4c). This implies the substitution of a region of genomic DNA with an exogenous sequence. When this substitution occurs within the coding sequence of a gene, it can lead to a variety of possible outcomes. For instance, this methodology can be employed to generate point mutations in the sequence or to add a tag to a certain protein. This is also frequently used to switch promoters to others with different strengths. Conversely, the replacement of a sequence within a gene can also end in KO.

In another recent example of lactic acid production improvement, Huang et al. reported the modification of *Bacillus* sp. N16-5 employing CRISPR-mediated HDR.⁵¹ The

authors replaced the endogenous L-lactic acid dehydrogenase gene (*L-ldhA*) with a D-lactic acid dehydrogenase gene (*D-ldhA*) from *Lactobacillus delbrueckii*. By eliminating the expression of the *L-ldhA* gene, the researchers aimed to obtain optically pure lactic acid from xylose. Different homology arm lengths were assessed to determine the insertion efficiency. By presenting an 88% efficiency, it was determined that 1 kb sequences were optimal for performing the replacement. In addition to the successful gene replacement, the authors performed other genetic operations to enhance xylose utilization, including deleting a xylose utilization pathway repressor and integrating a native xylose transporter. These joint modifications increased the xylose utilization, leading to an increase in the D-lactic acid productivity of 27.7%. This example depicts the applicability of CRISPR editing for the obtention of enantiomerically pure compounds from biotransformations, significantly highlighting the superiority of engineered biocatalysts compared to the less stereoselective chemical catalysts.

CRISPR-Assisted Recombination: Easing Mutant Selection for Better Biocatalysts. The occurrence of DSBs in the DNA of several bacterial species often leads to high toxicity and cell death, even when a template for HDR is provided. This feature makes it unsuitable to employ CRISPR for genome editing. However, this characteristic can be employed for positive clone selection. In this scenario, a precise modification is induced by another system (i.e., λ -Red recombination), while a CRISPR-generated DSB is utilized to kill the clones that did not acquire the selected mutation. As a consequence, only mutated clones survive, thereby streamlining the process of clone selection while increasing the recombination efficiency. While most examples of using CRISPR as counterselection are based on the use of recombinases (Figure 6), this system has also been employed to enhance the screening of second-crossover strains in suicidal plasmid systems.²⁹ The use of recombinases with a template can allow for the same wide variety of modifications detailed in the previous section (Figure 5), with the added advantage of this increase in efficiency. For instance, for *E. coli* strains, Cas9 selection can increase the recombination efficiency to 39%–98% depending on the genomic modification.¹⁴¹

One of the most popular systems for CRISPR-assisted recombination was developed by Jiang et al. and reached efficiencies of up to 100%.¹⁴² This system consists of two plasmids, one harboring the Cas9 nuclease and the λ -Red recombinases and a second plasmid carrying the gRNA expression cassette and the recombination template.

A modification in this system allowed efficient gene deletions in *Escherichia coli* BL21.⁸³ This technique involves the use of linear double-stranded DNA as a repair template. The production of the template by a single PCR step was facilitated by the use of asymmetrical homology arms of 50 and 500 pb. This design was named CRASH (CRISPR-Cas9 and asymmetric homology arm-directed genomic engineering) by the authors. The inclusion of a sucrose-inducible cassette for the expression of the toxic *sacB* gene from *Bacillus subtilis* permitted the easy curing of the gRNA-carrying plasmid. CRASH was used to obtain an *E. coli* strain that produced 3-fold more lycopene than its parental (~15,000 ppm to >40,000 ppm). Lycopene is an important antioxidant used as a dietary supplement and constitutes the carotenoid most widely used in the healthcare market.¹⁴³ By deleting a gene required for Z ring formation and proper division, cell size was increased. As

lycopene is an intracellular product, the elongated cell shape obtained serves a greater compound accumulation. Additionally, two genes were deleted to increase the precursor availability, resulting in 135 mg/L of lycopene.

In an alternate approach, Li et al. developed a CRISPR-assisted recombination method for *Corynebacterium glutamicum* based on the chromosomal insertion of recombinase *recET* and Cas9 coding genes.⁷⁵ The genomic, rather than plasmid-based, expression helped to maintain low levels of expression of Cas9 that proved to be enough to cleave the DNA target with the added advantage of a reduction in toxicity. The sgRNA was provided in a plasmid containing a fluorescent protein expression cassette, facilitating subsequent curing. The method was used to modify an L-homoserine-producing strain. This chiral amino acid is an L-threonine and L-methionine precursor and holds considerable potential to be used in the pharmaceutical, agricultural, cosmetic, and fragrance industries.¹⁴⁴ To enhance L-homoserine production, the authors reduced the consumption of this product by deleting two genes. Moreover, an *Escherichia coli* gene, coding for a homoserine dehydrogenase variant (*thrA*^{S345F}), was expressed to direct the carbon flux to L-homoserine. When this gene was inserted into the genome, 6.3 g/L of L-homoserine was produced, while the expression in a plasmid boosted the production to 9.6 g/L. For industrial applications, the Cas9-*recET* expression cassette was deleted, and the obtained variant yielded 21.2 g/L of L-homoserine in a 5 L bioreactor at a rotary speed at 400 rpm and pH 6.0 after 96 h.

Designing a CRISPR-Cas9-based genome editing system combining different recombinases has allowed the modification of species for which genome editing remains challenging. Indeed, Liang et al. achieved an increase in the editing efficiency of *Rhodococcus ruber* from 1% to 75% by introducing the recombinases Che9c60 and Che9c6. Using a three-plasmid transformation system containing Cas9, recombinases, and sgRNA, the authors were able to obtain gene KOs, insertions, and mutations.³⁴ By knocking out one amidase gene (*amiE*) that generated an undesired byproduct and replacing the WT gene in charge of the bioproduction of acrylamide from acrylonitrile with a stable mutant, a strain with a 23.5% improvement in acrylamide production was obtained. Remarkably, the production of the byproduct acrylic acid was reduced by 80%, easing downstream processing, and the operational stability was increased from 1 to 4 reuses in the conversion.

Judging by the abundance of examples found in the literature, CRISPR-assisted recombination is, without a doubt, one of the most commonly used CRISPR-based technologies in bacteria. Its broad applicability throughout various bacterial species renders this methodology ideal for biocatalyst development. Capitalizing on the fact that DSBs are frequently lethal for bacteria, the design of the system must mainly focus on selecting a suitable recombinase. As DNA reparation by homologous recombination requires additional proteins that interact with recombinases, the success of the approach will strongly depend on identifying recombinases that perform well in the selected bacterium.¹⁴⁵

Other CRISPR-Based Technologies with Potential in Biocatalysis. The scientific community's ever-growing enthusiasm for CRISPR-based technologies has given rise to a diverse array of novel and promising applications, which hold tremendous potential for utilization in biocatalysis. These applications encompass the utilization of CRISPRa for transcription activation, base editors for point mutations, and

Emergent CRISPR-based technologies

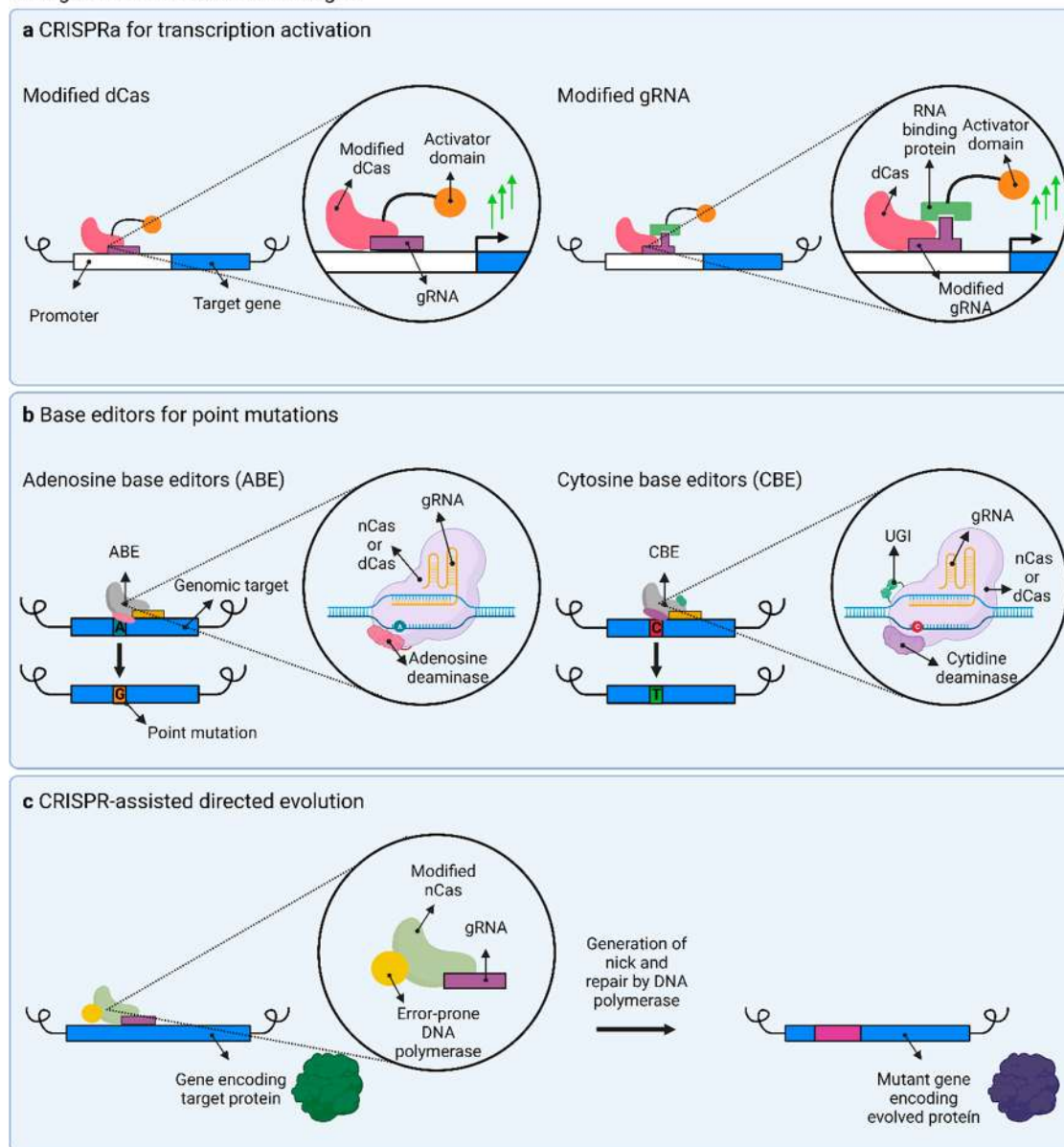


Figure 7. Emergent CRISPR-based technologies. CRISPRa allows for an increase in gene transcription by coupling an activator domain to either the dCas or the gRNA (a). Base editors permit the modification of single nucleotides, generating point mutations in a small nucleotide window defined by the gRNA. ABE editors catalyze A to G conversions, while CBE induces C to A substitutions (b). For CRISPR-assisted directed evolution, different CRISPR-based technologies can be applied. In this work, we chose to highlight the EvolvR technology. For this application, an nCas protein is fused with an error-prone DNA polymerase that introduces random modifications in the site near the single strand cut (c). dCas: catalytically dead Cas protein; gRNA: guide RNA; ABE: adenosine base editors; CBE: cytosine base editors; UGI: uracil DNA glycosylase inhibitor; nCas: mutant Cas protein with nickase activity.

CRISPR-assisted directed evolution, particularly EvolvR technology (Figure 7). These remarkable techniques have broad applicability among different bacterial species and are likely to succeed given a correct design of the experimental attempt.

Moreover, some techniques are worth mentioning, as they may be applied to a certain group of bacteria based on the DNA repair pathways harbored in their genomes. Those approaches rely either on the use of Cas nickases for genome editing or the occurrence of CRISPR-mediated MMEJ and NHEJ (Figure 8).

This section of the review aims to showcase these emergent and more widely applicable technologies along with some

species-specific technologies with examples of their possible applications in biocatalysis.

CRISPRa for Transcription Activation. The use of dCas enzymes is not limited to gene repression, as they can also be employed for transcription activation. This technology, known as CRISPRa, can be implemented in bacteria following two distinct approaches¹⁴⁶ (Figure 7a). The first one relies on a modified dCas protein with an added transcriptional activation domain. The dCas portion of the protein, along with the gRNA, is responsible for targeting a specific part of the genome (upstream of a promoter). Analogously, CRISPRa implementation can be carried out by a dCas enzyme accompanied by a modified gRNA with a hairpin domain that interacts with an

Other CRISPR-based technologies

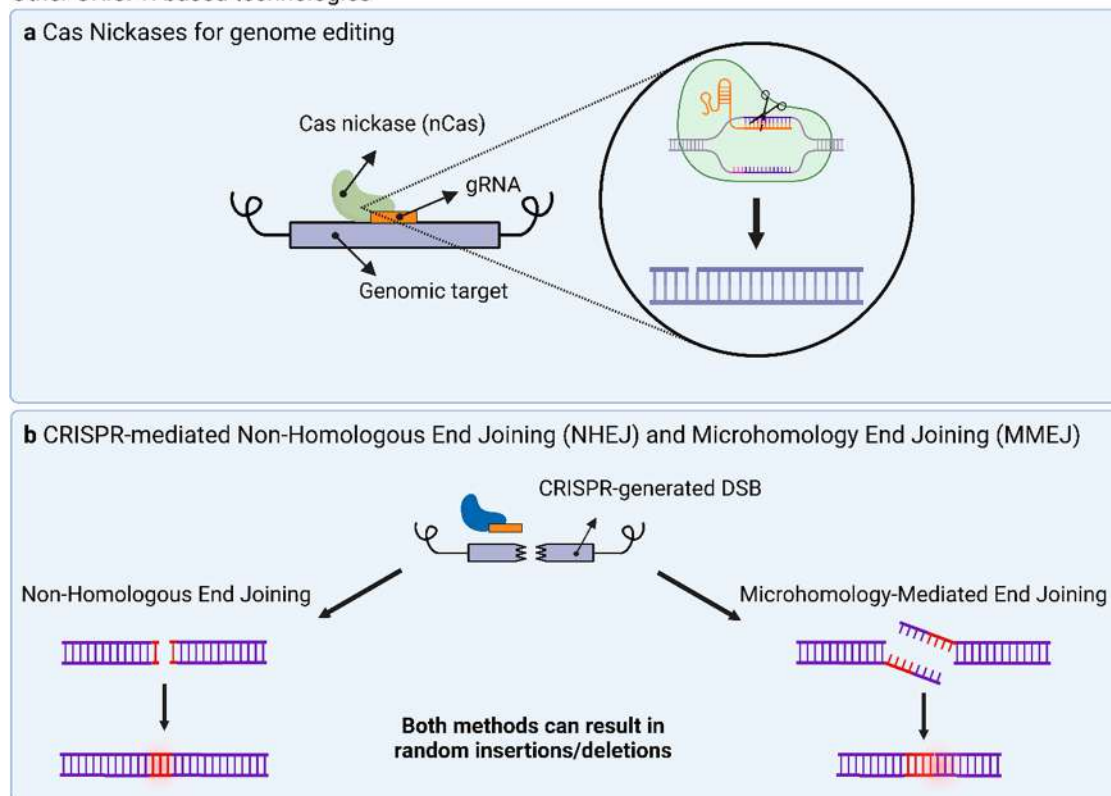


Figure 8. Other CRISPR-based technologies. A nCas-induced single-strand break can be exploited to obtain target modifications in organisms harboring the appropriate repair pathway (a); it presents as an alternative for bacteria that are susceptible to DSB. In bacteria that present the NHEJ or MMEJ repair pathways, DSB could be used to generate random modifications without the need for a template (b). nCas: mutant Cas protein with nickase activity; gRNA: guide RNA.

RNA binding protein (RBP) with a fused activator domain. In any case, the activator domain is in charge of recruiting activator proteins and enhancing gene expression. Similar to CRISPRi implementation, as nonpermanent changes occur in the genome, this strategy is reversible. Additionally, inducible promoters may be used to turn the system "on" and "off" as needed.

CRISPRa was used by Kiattisewee et al. for the modification of *Pseudomonas putida*. For this purpose, the authors used a combination of dCas9 and sgRNA containing an RNA hairpin designated as MS2.⁵⁰ MS2 recruits a protein fused to an activator domain (soxS) that interacts with the alpha subunit of the RNA polymerase. Within the cell, the dCas9-sgRNA complex interacts with the target sequence, approximating soxS upstream of the transcription initiation site. Using this approach, two heterologous pathways were activated, obtaining 5- and 40-fold increases in BH2 and MVA production, respectively.

The optimal distance with the transcription start site (TSS), the spacer sequence, the target gene promoter strength, and the 5' proximal sequences to the TSS were found to play a role in the effectiveness of the technology. As these features may be species-specific, further experimental evidence is necessary to define general rules that help predict the effectiveness and efficiency of this strategy in other bacteria.

Base Editors for Point Mutations. The precise targeting ability of the CRISPR complex can be harnessed for the generation of site-directed point mutations. Base editors based on a nCas or dCas enzyme fused with a DNA modifying

enzyme can accurately substitute DNA bases without the need for a DSB. CRISPR base editors (CRISPR-BEs) usually employ either a cytidine deaminase or an adenine deaminase as a fusion protein, which can respectively substitute cytosine for thymine or adenine for guanine during base editing (Figure 7b).¹⁴⁷

This approach was used by Wang et al. to improve the bioproduction and accumulation of glycogen in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.⁶² Glycogen is a promising feedstock that can be converted to ethanol through saccharification and fermentation processes and is therefore used in biofuel production.¹⁴⁸ In a pioneering application of CRISPR technology in cyanobacterium, they introduced premature stop codons in two genes responsible for glycogen degradation (*glgP* and *glgX*). Using a dCas9 fused to a cytidine deaminase, they achieved precise and efficient genome editing at a single-nucleotide resolution to convert cytosine to thymine. Upon inactivation of both *glgP* and *glgX*, mutants showed a higher glycogen content of 94.28 ± 11.32 mg/gDCW compared with that of the WT strain (67.86 ± 11.29 mg/gDCW).

Although CRISPR-BEs are increasingly being used in bacteria and other organisms, concerns remain regarding their bystander and off-target editing effects. Bystander modifications refer to nucleotide modifications that occur near the target nucleotide, as each CRISPR-BE has an editing window in which unintended modifications are more likely to occur. Off-target modifications, on the other hand, are modifications that occur in sequences similar to the target

sequence and may be recognized by the gRNA. The likelihood of off-target modifications, like in the case of bystander mutations, depends on the specific CRISPR-BEs used.¹⁴⁹ There is active research aimed at achieving more precise modifications. Still, it is important to address the likelihood and potential interference of these changes with the expected results in each specific case.

CRISPR-Assisted Directed Evolution. Directed evolution is a well-established and potent tool used for the generation of mutant proteins and enzymes with new or improved tailored functions. This technology can greatly benefit from the accurate ability of the CRISPR machinery to target specific portions of the DNA, increasing the efficiency of the directed evolution process. While several aforementioned CRISPR-based technologies can be applied for directed evolution, this section of the review is dedicated to EvolvR (Figure 7c). This elegant technology is based on a fusion protein comprised of an error-prone, nick-translating DNA polymerase and a nCas protein, which is capable of introducing random mutations in a site-specific manner.¹⁵⁰ The localization of the polymerase initiation site is determined by the gRNA, while the mutagenesis window length, mutation rate, and substitution bias will depend on the selected DNA polymerase.

The EvolvR technology was utilized by Long et al. to increase the activity of *Pseudomonas putida*'s ornithine cyclo deaminase (OCD), encoded by the *Ppocd* gene.⁸¹ This enzyme is responsible for L-proline production (L-Pro), an amino acid frequently used in the pharmaceutical, chemical, and animal feed industries. Directed evolution using EvolvR was initially carried out in *E. coli*, and subsequently, the evolved enzyme was introduced in *Corynebacterium crenatum* to enhance L-Pro production. The design of the sgRNAs used for EvolvR was aimed at three loops near the pocket of OCD's active center. Implementing a high throughput strategy for mutant selection is a common bottleneck in directed evolution. In this work, the authors developed an elegant strategy based on a plasmid harboring the *Ppocd* gene along with an antibiotic resistance cassette in which the L-Pro codons were substituted by rare codons. Consequently, after the directed evolution process, only the mutants containing improved versions of *Ppocd* could express antibiotic resistance and, in turn, grow in its presence. After the selection process, the plasmids containing the improved OCDs were recovered, and the activity of the evolved enzymes was measured. The results showed an increase in performance in 92% of the mutants. The three most favorable mutations were incorporated in the *Ppocd* gene, presenting a 2.41-fold increase in activity in comparison to that of the WT enzyme.

Cas Nickases for Genome Editing. One of the limitations of the utilization of Cas nucleases for genome editing is the toxicity associated with the generation of DSBs, as is the case for many industrially relevant bacterial species.¹⁵¹ For that reason, it is not uncommon to experience the appearance of very few or no colonies on the Petri dish after a CRISPR-Cas editing attempt. The development of mutant Cas nucleases with the ability to cleave only one DNA strand (nickases, nCas) has emerged as an alternative to increase mutation efficiency in CRISPR-based genome editing of these particularly susceptible bacteria (Figure 8a). The application of this technique will depend on the presence and expression level of the specific repair pathway. If the selected bacterium possesses the repair pathway, the versatility of this technology is comparable to that of HDR-mediated genomic modification

or CRISPR-assisted recombination, in terms of possible genomic operations to be performed on the chromosomal DNA.

Genomic modification attempts on *Clostridium cellulolyticum* using a CRISPR-Cas9 system are ineffective, probably due to the toxicity of the generated DSBs.¹⁵² Nonetheless, Tao et al. successfully achieved precise modifications on this model organism, utilizing a nCas9 coupled with a homologous repair template.⁵⁵ This bacterial species is of particular industrial importance as it can degrade the cellulose in lignocellulosic biomass, which constitutes one of the most abundant renewable feedstocks and generates products of industrial relevance, such as lactate, acetate, ethanol, and hydrogen. In the aforementioned work, the authors used a nCas9-based genome editing system to improve cellulose degradation in different mutant strains of *C. cellulolyticum*. The insertion of constitutive promoters to drive the expression of a gene cluster, which encodes various carbohydrate-active enzymes, resulted in an augmented growth capacity in mutants based on *C. cellulolyticum* $\Delta 2866$ (previously modified to improve transformation efficiency). The two resulting mutants presented a more efficient cellulose bioconversion. Furthermore, inserting the promoters in *C. cellulolyticum* LM ($\Delta dh/mdh$), a strain that does not produce lactate, resulted in mutants with increased ethanol production.

CRISPR-Mediated Nonhomologous End Joining (NHEJ) and Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ). In bacteria, the repair of DSBs in the absence of a template can proceed via two different pathways, namely, the NHEJ pathway and the MMEJ pathway (also referred as Alternative End Joining (AEJ)) (Figure 8b). The NHEJ repair pathway is active in many prokaryotic species like *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces ambofaciens*, and *Sinorhizobium meliloti* and involves key enzymes Ku and DNA ligaseD. This repair system consists of processing the DNA ends by exonucleases and endonucleases and their subsequent ligation.¹⁵³ This often results in an imprecise repair that involves the loss or addition of nucleotides, affecting the original DNA sequence. In contrast, the MMEJ repair pathway has been described as an alternative for repairing DSBs that does not require Ku or ligaseD.¹⁵⁴ Alternatively, this method relies on aligning microhomologous sequences near the DSB, generating insertions and deletions in the DNA sequence.^{155,156} Both the NHEJ and MMEJ pathways may be exploited by CRISPR systems to produce KO strains without the necessity of introducing a repair template, which constitutes an advantage (Figure 8b). After modification, a desired genotype must be selected from the obtained genotypes, since the modification is random. This approach provides more stable phenotypes than other strategies to reduce expression such as CRISPRi and requires minimal plasmid construction. However, it is noteworthy that the applicability of both of these strategies is limited to the presence of the complete pathways and their activity in the target bacterial strain.

Examples of the use of these particular CRISPR-mediated techniques in biotransformations are scarce. For instance, the NHEJ pathway was identified in *Rhodococcus opacus* PD630 but presented a very low repair efficiency (0% to 25% depending on the sgRNA) and did not permit further applications.¹⁵⁷ This repair system was also identified in *Clostridium cellulolyticum*. However, a CRISPR-mediated editing attempt by Xu et al. did not lead to colony formation,

Table 2. Overview of Advantages and Disadvantages of CRISPR-Based Technologies

Technology	Advantages	Disadvantages
CRISPRi	• Allows manipulation of essential genes • Offers titratability for fine-tuning expression levels • Features a simple design • Enables multiplexing • Is inducible, allowing for reversibility • Proves helpful in nonmodel organisms	• Requires optimization to achieve desired expression levels • Makes it more challenging to evaluate potential off-targets • Poses a risk of persistency in basal expression • Has a limited phenotype capacity (restricted to gene repression) • When using inducible promoters, leakiness may become problematic
CRISPR-mediated HDR genomic modifications	• Facilitates a wide range of targeted genomic modifications • Exhibits a broader phenotypic range compared to CRISPRi	• Applicable to a reduced group of bacteria • DSBs can be lethal in many species
CRISPR-assisted recombination	• Facilitates a wide range of targeted genomic modifications • Demonstrates broad applicability among relevant bacteria	• For recombinase based systems, depends on the availability of suitable recombinases
CRISPRa for transcription activation Base editors for point mutations	• Is inducible, allowing for reversibility • Presents reduced toxicity compared with other edition techniques	• Presents challenges in predicting effectiveness and efficiency • Can lead to bystander and off-target editing effects
CRISPR-assisted directed evolution	• Represents a potent tool for new catalyst discovery	• Requires the design of a case-specific selection system
Cas nickases for genome editing	• Avoids DSB toxicity • Facilitates a wide range of targeted genomic modifications	• Depends on the presence and expression level of single-strand break repair pathways
CRISPR-mediated MMEJ and NHEJ	• Eliminates the need for a repair template • Requires less plasmid construction and design than other KO techniques • Generates mutants with more stable phenotypes	• Produces random mutations • Is under study (mainly MMEJ) • Applicability is limited to the presence of the complete pathways and their activity in the target bacterial strain

indicating the lethality of the generated DSB, probably related to a low expression of key enzymes in the system.¹⁵² Alternatively, the enzymes of the NHEJ pathway can be introduced into the cell together with the CRISPR system.¹⁵⁸ This approach was followed by Tian et al. to test the feasibility of editing the genome of *Bacillus subtilis*.⁶⁶ In the work, the authors reported the inactivation of two extracellular proteases, successfully generating deletions of 496 bp and 490 bp in each sequence, respectively. However, the NHEJ-based editing system was not suitable to perform deletions of long DNA fragments.

Conversely, the presence and relevance of the MMEJ pathway in bacteria remain under study, with its potential as an editing tool being hindered due to the lack of knowledge and successful examples to capitalize on. Even though the MMEJ pathway was first described in the archetypal bacterial chassis *E. coli*, the lethality of DSBs in this species indicates that, in this case, the mechanism efficiency is not enough, limiting its applicability.¹⁵⁹ However, a report by Sui et al. describes an efficient CRISPR-mediated MMEJ system in *Zymomonas mobilis*.¹⁶⁰ In the work, the authors repurposed an endogenous subtype I–F CRISPR–Cas system coupled with the MMEJ pathway to generate targeted deletions within the bacterial chromosome. Different efficiencies were observed depending on the localization of the targeted DSBs. When the DSB was located adjacent to essential genes, the repair efficiency was significantly lower. The authors highlighted the application of this technology for the study of the function of essential genes, while proposing an alternative to CRISPRi based on the generations of small deletions in the promoter region of a target gene. This proposed application could be an easier

alternative to CRISPRi, as it would require less plasmid construction and generate mutants with a stable genotype.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

The steady development of new CRISPR-based technologies has made it possible to modify bacterial genomes accurately and efficiently, allowing for fine-tuning of gene expression and consequent generation of truly state-of-the-art whole-cell biocatalysts.

Each CRISPR-based technology offers unique advantages and poses distinct challenges (Table 2). Through this Perspective, we made an effort to highlight their strengths and limitations. By understanding the intricacies of each tool, researchers can make informed choices about selecting the most suitable method for their specific bacterial species and biocatalytic tasks.

Upon analysis of relevant examples of CRISPR tools applied to improve bacterial biocatalysis, these authors believe that CRISPRi and CRISPR-assisted recombination stand out over the rest of the technologies. The distinctive molecular properties of bacteria render these technologies particularly efficient and well-suited for application in these organisms compared to others.

We believe CRISPRi arises as one of the most promising and applied technologies, as it can virtually be used in all bacterial species provided there is an effective preparation and delivery of the constructs harboring the expression cassettes for the dCas protein and the gRNA. This technique is key for downregulating genes from competing pathways or silencing enzymes that generate unwanted products. Consequently, the

engineered bacterial strains can improve their productivity, contributing to the sustainability of the biocatalytic processes.

The most widely used technology for genomic modification is CRISPR-assisted recombination due to its versatile utility and notable enhancement of recombination efficiency. As this technique has broad applicability within industrially relevant bacteria and allows for a plethora of stable genomic modifications, we believe it has made a breakthrough contribution to biocatalysis and promises a future generation of new and improved biocatalysts.

Nowadays, the need for new and improved sustainable biocatalysts for industrial applications often requires the execution of more than one genetic modification at once. In that sense, we envision that a variety of available CRISPR-based technologies should be combined to develop these highly modified tailor-made catalysts and exploit the full potential of CRISPR tools.

This idea was tested by Wu et al.²¹ and followed a holistic approach in a pioneering work, combining multiple applications of CRISPR-based technologies in *E. coli*. In this metabolic engineering study, a series of modifications were carried out to improve the production of 1,4-butanediol (1,4 BDO), a compound used in the manufacturing of fibers, plastics, and solvents. Using CRISPR-assisted recombinases, the authors introduced point mutations, KOs, and KIs to improve the function of the biocatalyst under anaerobic conditions and to add additional genes to regenerate intermediates. Additionally, CRISPRi was applied to reduce the expression of an enzyme catalyzing a byproduct formation. These changes improved the production by 100%, reaching 1.8 g/L of 1,4-BDO in 48 h. To the best of our knowledge, there are no recent reports that use the same methodological approach, which may be associated with the level of expertise needed and the difficulty of reproducing the approach in other systems.

We also anticipate that high throughput approaches may spur the development of CRISPR-based technologies and expand their utilization in biocatalysis. Access to large data sets has the potential to create more comprehensive insights into the genome editions needed to obtain improved biocatalysts, provided that a rigorous and meticulous methodological approach is established for data analysis and evaluation. Wang et al. developed a method called BETTER (Base Editor-Targeted and Template-free Expression Regulation) that uses CRISPR-BEs to generate different regulatory sequences, namely, ribosome binding sites (RBS), 5' untranslated regions (UTRs), and promoters.⁸⁴ The experimental design uses nCas9-cytidine deaminase fusion to introduce random mutations in regulatory sequences, obtaining hundreds to thousands of variants. BETTER was applied to improve xylose utilization in *Corynebacterium glutamicum*, lycopene production, and glycerol utilization by the same group.

In conclusion, the examples discussed and included in this work demonstrate the potential of CRISPR tools to modify bacteria to better perform or resist industrial bioconversions. Certainly, there is still room for proposing new, more sophisticated systems that will enrich the number of molecules industrially prepared through green and potentially more sustainable processes. Indeed, some of the works in the field are undoubtedly primal, if judged from an industrial point of view. However, each piece of overwhelming evidence of the benefits of CRISPR for biotransformations paves the way for more translational studies.

Biocatalysis presents itself as a green chemistry and sustainability enabler. It clearly aligns with many of the 12 principles of green chemistry described back in the late 1990s by Anastas and Warner¹⁶¹ as it addresses safety, health, economic, and environmental boundary conditions when applied to industrial production. Nevertheless, the field is currently not sufficiently mature to address sustainability parameters. While the works discussed in this review were selected based on their capacity to enhance productivity and generate novel biocatalysts, researchers should invest greater effort in developing comprehensive metrics that encompass their contributions to biocatalysis.

Finally, new genome editing technologies for fitted microorganisms that could support the production of high yields of target products in simple media, avoiding the formation of byproducts and resisting multiple reuses, could speed up their utilization in biocatalysis. It is clear that CRISPR-based technologies have the potential to circumvent the current limitations of microbial bioconversions that hinder their application over less green chemical processes.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Ana Paula Mulet – Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, 11100 Montevideo, Uruguay; orcid.org/0000-0001-8628-3424; Phone: +5982902 1505; Email: mulet@ort.edu.uy

Lorena Betancor – Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, 11100 Montevideo, Uruguay; Department of Bioengineering, McGill University, Montreal, Quebec H3A 0E9, Canada; orcid.org/0000-0002-0569-0499; Phone: +5982902 1505; Email: betancor@ort.edu.uy

Author

Magdalena Ripoll – Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, 11100 Montevideo, Uruguay; Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acssuschemeng.3c05735>

Author Contributions

The manuscript was written through the contributions of all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies



Dr. Ana Paula Mulet holds a Bachelor's degree in biological sciences, a Master's degree in biology with a focus on cellular and molecular biology, and a Doctorate in medical sciences, all obtained from Universidad de la República (Uruguay). She is a Lecturer at Universidad ORT Uruguay, teaching courses related to genetic engineering and cellular biology. Dr. Mulet's main area of expertise is molecular and cellular biology, with a special focus on gene editing using CRISPR-based technologies.



Magdalena Ripoll is a Ph.D. candidate at Universidad ORT Uruguay. Magdalena holds a biotechnology engineering degree from Universidad ORT Uruguay (Uruguay) and a Master's degree in chemistry from Universidad de la República (Uruguay). Magdalena currently works as a research assistant and pre-doctoral lecturer at Universidad ORT Uruguay. Her main research area is biocatalysis, particularly, biotransformations using immobilized enzymes and cells, focusing on the valorization of industrial residues.



Prof. Lorena Betancor holds a biochemistry degree from Universidad de la República (Uruguay) and a Ph.D. in biochemistry and molecular biology from Universidad Autónoma de Madrid (Spain). Her research experience includes two postdoctoral positions, initially at Georgia Tech in Atlanta (USA) and subsequently at Cambridge University (UK). She was a Ramon y Cajal researcher at Food-IMDEA Institute (Spain). Presently, Prof. Betancor serves as a principal investigator at the CBI+I Biotechnology Center for Investigation and Innovation in Montevideo (Uruguay) and as head of the Protein Technology Lab at the Faculty of Engineering at Universidad ORT Uruguay. Additionally, she is an associate professor at the Department of Bioengineering at McGill University (Canada). Prof. Betancor's research endeavors are sharply focused on the immobilization of biocatalysts for both the development of greener and more sustainable industrial processes and biomedical applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Agencia Nacional de Investigación e Innovación (POS_NAC_2019_1_158182, FMV_1_2021_1_167184), Universidad ORT Uruguay and PEDECIBA Química. ETOC and figures were created with Biorender.com.

ABBREVIATIONS

AEJ - alternative end joining
BETTER - Base Editor-Targeted and Template-free Expression Regulation
BH2 - dihydrobiopterin
bp - base pair
Cas - CRISPR-associated proteins
CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPR-BEs - CRISPR base editors
CRISPRa - CRISPR activation
CRISPRi - CRISPR interference
crRNA - CRISPR RNA
dCas - catalytically dead Cas
DSB - double-strand break
EDP - Entner–Doudoroff pathway
EPS - exopolysaccharide
GRAS - generally recognized as safe
gRNA - guide RNA
HDR - homology directed repair
KI - knock-in
KO - knockout
L-DOPA - L-3,4-dihydroxyphenylalanine
L-Pro - L-proline
MMEJ - microhomology-mediated end joining
MVA - mevalonate
nCas - Cas nickase
NHEJ - nonhomologous end joining
OCD - ornithine cyclo deaminase
PAM - protospacer adjacent motif
PHB - poly(3-hydroxybutyrate)
PPP - pentose phosphate pathway
RBS - ribosome binding sites
RNAi - RNA interference
tracrRNA - tracer RNA
TSS - transcription start site
UTRs - untranslated regions
WT - wild-type

REFERENCES

- (1) Bell, E. L.; Finnigan, W.; France, S. P.; Green, A. P.; Hayes, M. A.; Hepworth, L. J.; Lovelock, S. L.; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; Ryan, K. S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, 1 (1), 46.
- (2) Alcántara, A. R.; Domínguez de María, P.; Littlechild, J. A.; Schürmann, M.; Sheldon, R. A.; Wohlgenuth, R. Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. *ChemSusChem* **2022**, 15 (9), No. e202102709.
- (3) Xue, F.; Li, C.; Xu, Q. Biocatalytic Approaches for the Synthesis of Optically Pure Vic-Halohydrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105 (9), 3411–3421.
- (4) Wohlgenuth, R. Horizons of Systems Biocatalysis and Renaissance of Metabolite Synthesis. *Biotechnol. J.* **2018**, 13 (6), 1700620.
- (5) Faber, K. Introduction and Background Information. In *Biotransformations in Organic Chemistry*; Faber, K., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 1–30.

- (6) Woodley, J. M. New Frontiers in Biocatalysis for Sustainable Synthesis. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2020**, *21*, 22–26.
- (7) Betancor, L.; López-Gallego, F. Cell–Enzyme Tandem Systems for Sustainable Chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *34*, No. 100600.
- (8) Soti, V.; Lenaerts, S.; Cornet, I. Of Enzyme Use in Cost-Effective High Solid Simultaneous Saccharification and Fermentation Processes. *J. Biotechnol.* **2018**, *270*, 70–76.
- (9) Trelles, J. A.; Rivero, C. W. Whole Cell Entrapment Techniques. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan, J. M., Bolivar, J. M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J., Eds.; Springer US: New York, 2020; pp 385–394. DOI: 10.1007/978-1-0716-0215-7_25.
- (10) Qin, D.; Dong, J. Multi-Level Optimization and Strategies in Microbial Biotransformation of Nature Products. *Molecules* **2023**, *28* (6), 2619.
- (11) Pinto, A.; Contente, M. L.; Tamborini, L. Advances on Whole-Cell Biocatalysis in Flow. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2020**, *25*, 100343.
- (12) Song, J. W.; Seo, J. H.; Oh, D. K.; Bornscheuer, U. T.; Park, J. B. Design and Engineering of Whole-Cell Biocatalytic Cascades for the Valorization of Fatty Acids. *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10* (1), 46–64.
- (13) Otles, S.; Özyurt, V. H. Biotransformation in the Production of Secondary Metabolites. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier B.V., 2021; Vol. 68, pp 435–457. DOI: 10.1016/B978-0-12-819485-0.00007-4.
- (14) Dias Gomes, M.; Woodley, J. M. Considerations When Measuring Biocatalyst Performance. *Molecules* **2019**, *24* (19), 3573.
- (15) Zhao, D.; Zhu, X.; Zhou, H.; Sun, N.; Wang, T.; Bi, C.; Zhang, X. CRISPR-Based Metabolic Pathway Engineering. *Metab. Eng.* **2021**, *63*, 148–159.
- (16) Knott, G. J.; Doudna, J. A. CRISPR-Cas Guides the Future of Genetic Engineering. *Science* (80-) **2018**, *361* (6405), 866–869.
- (17) Biswas, P.; Anand, U.; Ghorai, M.; Pandey, D. K.; Jha, N. K.; Behl, T.; Kumar, M.; Chauhan, R.; Shekhawat, M. S.; Dey, A. Unraveling the Promise and Limitations of CRISPR/Cas System in Natural Product Research: Approaches and Challenges. *Biotechnol. J.* **2022**, *17*, e2100507.
- (18) Kim, S. K.; Han, G. H.; Seong, W.; Kim, H.; Kim, S. W.; Lee, D. H.; Lee, S. G. CRISPR Interference-Guided Balancing of a Biosynthetic Mevalonate Pathway Increases Terpenoid Production. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 228–240.
- (19) Song, C. W.; Rathnasingh, C.; Park, J. M.; Kwon, M.; Song, H. CRISPR-Cas9 Mediated Engineering of *Bacillus Licheniformis* for Industrial Production of (2R,3S)-Butanediol. *Biotechnol. Prog.* **2021**, *37* (1), e3072.
- (20) Wu, J.; Du, G.; Chen, J.; Zhou, J. Enhancing Flavonoid Production by Systematically Tuning the Central Metabolic Pathways Based on a CRISPR Interference System in *Escherichia Coli*. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 13477.
- (21) Wu, M. Y.; Sung, L. Y.; Li, H.; Huang, C. H.; Hu, Y. C. Combining CRISPR and CRISPRi Systems for Metabolic Engineering of *E. Coli* and 1,4-BDO Biosynthesis. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (12), 2350–2361.
- (22) Lu, P.; Gao, T.; Bai, R.; Yang, J.; Xu, Y.; Chu, W.; Jiang, K.; Zhang, J.; Xu, F.; Zhao, H. Regulation of Carbon Flux and NADH/NAD⁺ Supply to Enhance 2,3-Butanediol Production in *Enterobacter Aerogenes*. *J. Biotechnol.* **2022**, *358*, 67–75.
- (23) Sheng, L.; Madika, A.; Lau, M. S. H.; Zhang, Y.; Minton, N. P. Metabolic Engineering for the Production of Acetoin and 2,3-Butanediol at Elevated Temperature in *Parageobacillus Thermoglucosidicus* NCIMB 11955. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11* (May), 1–18.
- (24) Li, M.; Li, C.; Hu, M.; Zhang, T. Metabolic Engineering Strategies of de Novo Pathway for Enhancing 2'-Fucosyllactose Synthesis in *Escherichia Coli*. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (5), 1561–1573.
- (25) Yue, S. J.; Huang, P.; Li, S.; Cai, Y. Y.; Wang, W.; Zhang, X. H.; Nikel, P. I.; Hu, H. B. Developing a CRISPR-Assisted Base-Editing System for Genome Engineering of *Pseudomonas Chlororaphis*. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (9), 2324–2336.
- (26) Woolston, B. M.; Emerson, D. F.; Currie, D. H.; Stephanopoulos, G. Rediverting Carbon Flux in *Clostridium Ljungdahl* Using CRISPR Interference (CRISPRi). *Metab. Eng.* **2018**, *48*, 243–253.
- (27) Tarasava, K.; Liu, R.; Garst, A.; Gill, R. T. Combinatorial Pathway Engineering Using Type I-E CRISPR Interference. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (7), 1878–1883.
- (28) Wang, J.; Teng, Y.; Gong, X.; Zhang, J.; Wu, Y.; Lou, L.; Li, M.; Xie, Z. R.; Yan, Y. Exploring and Engineering PAM-Diverse Streptococci Cas9 for PAM-Directed Bifunctional and Titratable Gene Control in Bacteria. *Metab. Eng.* **2023**, *75*, 68–77.
- (29) Chen, R.; Shi, F.; Xiang, Y.; Lai, W.; Ji, G. Establishment of CRISPR-Cpf1-Assisted Gene Editing Tool and Engineering of 4-Hydroxyisoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium Glutamicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *39* (10), 266.
- (30) Su, T.; Guo, Q.; Zheng, Y.; Liang, Q.; Wang, Q.; Qi, Q. Fine-Tuning of HemB Using CRISPRi for Increasing 5-Aminolevulinic Acid Production in *Escherichia Coli*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, na DOI: 10.3389/fmicb.2019.01731.
- (31) Gu, L.; Yuan, H.; Lv, X.; Li, G.; Cong, R.; Li, J.; Du, G.; Liu, L. High-Yield and Plasmid-Free Biocatalytic Production of 5-Methylpyrazine-2-Carboxylic Acid by Combinatorial Genetic Elements Engineering and Genome Engineering of *Escherichia Coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *134*, No. 109488.
- (32) Shin, J.; Bae, J.; Lee, H.; Kang, S.; Jin, S.; Song, Y.; Cho, S.; Cho, B.-K. Genome-Wide CRISPRi Screen Identifies Enhanced Autolithotrophic Phenotypes in Acetogenic Bacterium *Eubacterium Limosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2023**, *120* (6), e2216244120.
- (33) Li, Q.; Zhao, P.; Yin, H.; Liu, Z.; Zhao, H.; Tian, P. CRISPR Interference-Guided Modulation of Glucose Pathways to Boost Aconitic Acid Production in *Escherichia Coli*. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19* (1), 174.
- (34) Liang, Y.; Jiao, S.; Wang, M.; Yu, H.; Shen, Z. A CRISPR/Cas9-Based Genome Editing System for *Rhodococcus Ruber* TH. *Metab. Eng.* **2020**, *57*, 13–22.
- (35) Tong, Y.; Charusanti, P.; Zhang, L.; Weber, T.; Lee, S. Y. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4* (9), 1020–1029.
- (36) Zhao, M.; Huang, D.; Zhang, X.; Koffas, M. A. G.; Zhou, J.; Deng, Y. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for Producing Adipic Acid through the Reverse Adipate-Degradation Pathway. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 254–262.
- (37) Alonso-Gutierrez, J.; Koma, D.; Hu, Q.; Yang, Y.; Chan, L. J. G.; Petzold, C. J.; Adams, P. D.; Vickers, C. E.; Nielsen, L. K.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Toward Industrial Production of Isoprenoids in *Escherichia Coli*: Lessons Learned from CRISPR-Cas9 Based Optimization of a Chromosomally Integrated Mevalonate Pathway. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (4), 1000–1013.
- (38) Zhang, J.; Zong, W.; Hong, W.; Zhang, Z. T.; Wang, Y. Exploiting Endogenous CRISPR-Cas System for Multiplex Genome Editing in *Clostridium Tyrobutyricum* and Engineer the Strain for High-Level Butanol Production. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 49–59.
- (39) Lauer, I.; Philipps, G.; Jennewein, S. Metabolic Engineering of *Clostridium Ljungdahl* for the Production of Hexanol and Butanol from CO₂ and H₂. *Microb. Cell Fact.* **2022**, *21* (1), 85.
- (40) Ji, X.; Zhao, H.; Zhu, H.; Zhu, K.; Tang, S.-Y.; Lou, C. CRISPRi/DCpf1-Mediated Dynamic Metabolic Switch to Enhance Butenoic Acid Production in *Escherichia Coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (12), 5385–5393.
- (41) Wang, J.; Li, C.; Jiang, T.; Yan, Y. Biosensor-Assisted Titratable CRISPRi High-Throughput (BATCH) Screening for over-Production Phenotypes. *Metab. Eng.* **2023**, *75*, 58–67.
- (42) Ting, W.-W.; Ng, I.-S. Metabolic Manipulation through CRISPRi and Gene Deletion to Enhance Cadaverine Production in *Escherichia Coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **2020**, *130* (6), 553–562.
- (43) Mo, X.-H.; Zhang, H.; Wang, T.-M.; Zhang, C.; Zhang, C.; Xing, X.-H.; Yang, S. Establishment of CRISPR Interference in

Methylorubrum Exorquens and Application of Rapidly Mining a New Phytoene Desaturase Involved in Carotenoid Biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (10), 4515–4532.

(44) Filluelo, O.; Ferrando, J.; Picart, P. Metabolic Engineering of *Bacillus Subtilis* toward the Efficient and Stable Production of C30-Carotenoids. *AMB Express* **2023**, *13* (1), 38.

(45) Hu, S.; Li, Y.; Zhang, A.; Li, H.; Chen, K.; Ouyang, P. Designing of an Efficient Whole-Cell Biocatalyst System for Converting L-Lysine Into Cis-3-Hydroxyisopicolinic Acid. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 945184.

(46) Zhou, H.; Gao, S.; Zeng, W.; Zhou, J. Improving Bioconversion of Eugenol to Coniferyl Alcohol by Constitutive Promoters in *Escherichia Coli*. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *168*, No. 107953.

(47) Liu, W.; Tang, D.; Wang, H.; Lian, J.; Huang, L.; Xu, Z. Combined Genome Editing and Transcriptional Repression for Metabolic Pathway Engineering in *Corynebacterium Glutamicum* Using a Catalytically Active Cas12a. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (21–22), 8911–8922.

(48) Liu, K.; Gong, M.; Lv, X.; Li, J.; Du, G.; Liu, L. Biotransformation and Chiral Resolution of d, l-alanine into Pyruvate and d-alanine with a Whole-cell Biocatalyst Expressing l-amino Acid Deaminase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2020**, *67* (4), 668–676.

(49) Liu, K.; Yu, H.; Sun, G.; Liu, Y.; Li, J.; Du, G.; Lv, X.; Liu, L. Semi-Rational Design of L-Amino Acid Deaminase for Production of Pyruvate and d-Alanine by *Escherichia Coli* Whole-Cell Biocatalyst. *Amino Acids* **2021**, *53* (9), 1361–1371.

(50) Kiattisewee, C.; Dong, C.; Fontana, J.; Sugianto, W.; Peralta-Yahya, P.; Carothers, J. M.; Zalatan, J. G. Portable Bacterial CRISPR Transcriptional Activation Enables Metabolic Engineering in *Pseudomonas Putida*. *Metab. Eng.* **2021**, *66*, 283–295.

(51) Huang, S.; Xue, Y.; Zhou, C.; Ma, Y. An Efficient CRISPR/Cas9-based Genome Editing System for Alkaliphilic *Bacillus* Sp. N16–5 and Application in Engineering Xylose Utilization for D-lactic Acid Production. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (11), 2730–2743.

(52) Su, R.; Wang, T.; Bo, T.; Cai, N.; Yuan, M.; Wu, C.; Jiang, H.; Peng, H.; Chen, N.; Li, Y. Enhanced Production of D-Pantothenic Acid in *Corynebacterium Glutamicum* Using an Efficient CRISPR–Cpf1 Genome Editing Method. *Microb. Cell Fact.* **2023**, *22* (1), 3.

(53) Ke, X.; Jiang, X.; Huang, M.; Tian, X.; Chu, J. Engineering of Succinyl-CoA Metabolism in View of Succinylation Regulation to Improve the Erythromycin Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106* (13–16), S153–S165.

(54) Wen, Z.; Minton, N. P.; Zhang, Y.; Li, Q.; Liu, J.; Jiang, Y.; Yang, S. Enhanced Solvent Production by Metabolic Engineering of a Twin-Clostridial Consortium. *Metab. Eng.* **2017**, *39*, 38–48.

(55) Tao, X.; Xu, T.; Kempfer, M. L.; Liu, J.; Zhou, J. Precise Promoter Integration Improves Cellulose Bioconversion and Thermotolerance in *Clostridium Cellulolyticum*. *Metab. Eng.* **2020**, *60*, 110–118.

(56) Kong, L.; Xiong, Z.; Song, X.; Xia, Y.; Ai, L. CRISPR/DCas9-Based Metabolic Pathway Engineering for the Systematic Optimization of Exopolysaccharide Biosynthesis in *Streptococcus Thermophilus*. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105* (8), 6499–6512.

(57) Rüter, M.; Cress, B. F.; Schilling, M.; Rühmann, B.; Koffas, M. A. G.; Sieber, V.; Schmid, J. Tailor-Made Exopolysaccharides—CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Paenibacillus Polymyxa*. *Synth. Biol.* **2017**, *2* (1), 1–12.

(58) Wang, Z.; Li, X.; Dai, Y.; Yin, L.; Azi, F.; Zhou, J.; Dong, M.; Xia, X. Sustainable Production of Genistin from Glycerol by Constructing and Optimizing *Escherichia Coli*. *Metab. Eng.* **2022**, *74*, 206–219.

(59) Gupta, A.; Reizman, I. M. B.; Reisch, C. R.; Prather, K. L. J. Dynamic Regulation of Metabolic Flux in Engineered Bacteria Using a Pathway-Independent Quorum-Sensing Circuit. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 273–279.

(60) Qin, Z.; Yang, Y.; Yu, S.; Liu, L.; Chen, Y.; Chen, J.; Zhou, J. Repurposing the Endogenous Type I-E CRISPR/Cas System for Gene Repression in *Gluconobacter Oxydans* WSH-003. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (1), 84–93.

(61) Wang, Y.; Liu, Y.; Liu, J.; Guo, Y.; Fan, L.; Ni, X.; Zheng, X.; Wang, M.; Zheng, P.; Sun, J.; Ma, Y. MACBETH: Multiplex Automated *Corynebacterium Glutamicum* Base Editing Method. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 200–210.

(62) Wang, S.-Y.; Li, X.; Wang, S.-G.; Xia, P.-F. Base Editing for Reprogramming *Cyanobacterium Synechococcus Elongatus*. *Metab. Eng.* **2023**, *75*, 91–99.

(63) Yoon, J.; Woo, H. M. CRISPR Interference–Mediated Metabolic Engineering of *Corynebacterium Glutamicum* for Homobutyrate Production. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (8), 2067–2074.

(64) Ma, Y.; Qiu, Y.; Yu, C.; Li, S.; Xu, H. Design and Construction of a *Bacillus Amyloliquefaciens* Cell Factory for Hyaluronic Acid Synthesis from Jerusalem Artichoke Inulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *205*, 410–418.

(65) Westbrook, A. W.; Ren, X.; Oh, J.; Moo-Young, M.; Chou, C. P. Metabolic Engineering to Enhance Heterologous Production of Hyaluronic Acid in *Bacillus Subtilis*. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 401–413.

(66) Tian, J.; Xing, B.; Li, M.; Xu, C.; Huo, Y.-X.; Guo, S. Efficient Large-Scale and Scarless Genome Engineering Enables the Construction and Screening of *Bacillus Subtilis* Biofuel Overproducers. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (9), 4853.

(67) Tian, T.; Kang, J. W.; Kang, A.; Lee, T. S. Redirecting Metabolic Flux via Combinatorial Multiplex CRISPRi-Mediated Repression for Isopentenol Production in *Escherichia Coli*. *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8* (2), 391–402.

(68) Wasels, F.; Jean-Marie, J.; Collas, F.; López-Contreras, A. M.; Lopes Ferreira, N. A Two-Plasmid Inducible CRISPR/Cas9 Genome Editing Tool for *Clostridium Acetobutylicum*. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *140*, 5–11.

(69) Liang, L.; Liu, R.; Garst, A. D.; Lee, T.; Nogué, V. S. i.; Beckham, G. T.; Gill, R. T. CRISPR Enabled Trackable Genome Engineering for Isopropanol Production in *Escherichia Coli*. *Metab. Eng.* **2017**, *41*, 1–10.

(70) Gordon, G. C.; Korosh, T. C.; Cameron, J. C.; Markley, A. L.; Begemann, M. B.; Pfeiffer, B. F. CRISPR Interference as a Titratable, Trans-Acting Regulatory Tool for Metabolic Engineering in the *Cyanobacterium Synechococcus* Sp. Strain PCC 7002. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 170–179.

(71) Liu, L.; Yang, D.; Zhang, Z.; Liu, T.; Hu, G.; He, M.; Zhao, S.; Peng, N. High-Efficiency Genome Editing Based on Endogenous CRISPR-Cas System Enhances Cell Growth and Lactic Acid Production in *Pediococcus Acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87* (20), 1–13.

(72) Tian, X.; Liu, X.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Hang, H.; Chu, J.; Zhuang, Y. Metabolic Engineering Coupled with Adaptive Evolution Strategies for the Efficient Production of High-Quality L-Lactic Acid by *Lactobacillus Paracasei*. *Bioresour. Technol.* **2021**, *323*, No. 124549.

(73) Hu, M.; Li, M.; Li, C.; Luo, Y.; Zhang, T. High-Level Productivity of Lacto- N -Neotetraose in *Escherichia Coli* by Systematic Metabolic Engineering. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71* (9), 4051–4058.

(74) Cleto, S.; Jensen, J. V. K.; Wendisch, V. F.; Lu, T. K. *Corynebacterium Glutamicum* Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5* (5), 375–385.

(75) Li, N.; Wang, M.; Yu, S.; Zhou, J. Optimization of CRISPR-Cas9 through Promoter Replacement and Efficient Production of L-homoserine in *Corynebacterium Glutamicum*. *Biotechnol. J.* **2021**, *16* (8), 2100093.

(76) Park, J.; Shin, H.; Lee, S.-M.; Um, Y.; Woo, H. M. RNA-Guided Single/Double Gene Repressions in *Corynebacterium Glutamicum* Using an Efficient CRISPR Interference and Its Application to Industrial Strain. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17* (1), 4.

(77) Park, J.; Woo, H. M. Co-Production of l-Lysine and Heterologous Squalene in CRISPR/DCas9-Assisted *Corynebacterium Glutamicum*. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (46), 14755–14760.

(78) Chen, M.; Liang, H.; Han, C.; Zhou, P.; Xing, Z.; Chen, Q.; Liu, Y.; Xie, G.; Xie, R. Engineering of Global Transcription Factor FruR to Redirect the Carbon Flow in *Escherichia Coli* for Enhancing L-Phenylalanine Biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* **2022**, *21* (1), 222.

- (79) Jiang, Y.; Qian, F.; Yang, J.; Liu, Y.; Dong, F.; Xu, C.; Sun, B.; Chen, B.; Xu, X.; Li, Y.; Wang, R.; Yang, S. CRISPR-Cpf1 Assisted Genome Editing of *Corynebacterium Glutamicum*. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), No. 15179.
- (80) Zhang, J.; Qian, F.; Dong, F.; Wang, Q.; Yang, J.; Jiang, Y.; Yang, S. De Novo Engineering of *Corynebacterium Glutamicum* for L-Proline Production. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (7), 1897–1906.
- (81) Long, M.; Xu, M.; Qiao, Z.; Ma, Z.; Osire, T.; Yang, T.; Zhang, X.; Shao, M.; Rao, Z. Directed Evolution of Ornithine Cyclodeaminase Using an EvolvR-Based Growth-Coupling Strategy for Efficient Biosynthesis of L-Proline. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (7), 1855–1863.
- (82) Zhan, Y.; Xu, Y.; Zheng, P.; He, M.; Sun, S.; Wang, D.; Cai, D.; Ma, X.; Chen, S. Establishment and Application of Multiplexed CRISPR Interference System in *Bacillus Licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (1), 391–403.
- (83) Shukal, S.; Lim, X. H.; Zhang, C.; Chen, X. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* BL21 Strain Using Simplified CRISPR-Cas9 and Asymmetric Homology Arms Recombineering. *Microb. Cell Fact.* **2022**, *21* (1), 19.
- (84) Wang, Y.; Cheng, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wen, X.; Zhang, K.; Ni, X.; Gao, N.; Fan, L.; Zhang, Z.; Liu, J.; Chen, J.; Wang, L.; Guo, Y.; Zheng, P.; Wang, M.; Sun, J.; Ma, Y. In-Situ Generation of Large Numbers of Genetic Combinations for Metabolic Reprogramming via CRISPR-Guided Base Editing. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 678.
- (85) Wang, X.; Wang, X.; Lu, X.; Ma, C.; Chen, K.; Ouyang, P. Methanol Fermentation Increases the Production of NAD(P)H-Dependent Chemicals in Synthetic Methylophilic *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12* (1), 17.
- (86) Gao, C.; Wang, S.; Hu, G.; Guo, L.; Chen, X.; Xu, P.; Liu, L. Engineering *Escherichia Coli* for Malate Production by Integrating Modular Pathway Characterization with CRISPRi-Guided Multiplexed Metabolic Tuning. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (3), 661–672.
- (87) Zhou, Y.; Lin, L.; Wang, H.; Zhang, Z.; Zhou, J.; Jiao, N. Development of a CRISPR/Cas9n-Based Tool for Metabolic Engineering of *Pseudomonas Putida* for Ferulic Acid-to-Polyhydroxyalkanoate Bioconversion. *Commun. Biol.* **2020**, *3* (1), 98.
- (88) Li, Y.; Xian, H.; Xu, Y.; Zhu, Y.; Sun, Z.; Wang, Q.; Qi, Q. Fine Tuning the Glycolytic Flux Ratio of EP-Bifido Pathway for Mevalonate Production by Enhancing Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Zwf) and CRISPRi Suppressing 6-Phosphofructose Kinase (PfkA) in *Escherichia Coli*. *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20* (1), 32.
- (89) DeLorenzo, D. M.; Diaio, J.; Carr, R.; Hu, Y.; Moon, T. S. An Improved CRISPR Interference Tool to Engineer *Rhodococcus Opacus*. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (4), 786–798.
- (90) Zhang, Q.; Hou, Z.; Ma, Q.; Mo, X.; Sun, Q.; Tan, M.; Xia, L.; Lin, G.; Yang, M.; Zhang, Y.; Xu, Q.; Li, Y.; Chen, N.; Xie, X. CRISPRi-Based Dynamic Control of Carbon Flow for Efficient N-Acetyl Glucosamine Production and Its Metabolomic Effects in *Escherichia Coli*. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (10), 3203–3213.
- (91) Wu, Y.; Chen, T.; Liu, Y.; Lv, X.; Li, J.; Du, G.; Ledesma-Amaro, R.; Liu, L. CRISPRi Allows Optimal Temporal Control of N-Acetylglucosamine Bioproduction by a Dynamic Coordination of Glucose and Xylose Metabolism in *Bacillus Subtilis*. *Metab. Eng.* **2018**, *49*, 232–241.
- (92) Wu, Y.; Li, Y.; Jin, K.; Zhang, L.; Li, J.; Liu, Y.; Du, G.; Lv, X.; Chen, J.; Ledesma-Amaro, R.; Liu, L. CRISPR–DCas12a-Mediated Genetic Circuit Cascades for Multiplexed Pathway Optimization. *Nat. Chem. Biol.* **2023**, *19* (3), 367–377.
- (93) Liu, C.; Lv, X.; Li, J.; Liu, L.; Du, G.; Liu, Y. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for Increased Bioproduction of N-Acetylneuraminic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (50), 15859–15868.
- (94) Heo, M.-J.; Jung, H.-M.; Um, J.; Lee, S.-W.; Oh, M.-K. Controlling Citrate Synthase Expression by CRISPR/Cas9 Genome Editing for n-Butanol Production in *Escherichia Coli*. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (2), 182–189.
- (95) Abdelaal, A. S.; Jawed, K.; Yazdani, S. S. CRISPR/Cas9-Mediated Engineering of *Escherichia Coli* for n-Butanol Production from Xylose in Defined Medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *46* (7), 965–975.
- (96) Huang, Z.; Li, N.; Yu, S.; Zhang, W.; Zhang, T.; Zhou, J. Systematic Engineering of *Escherichia Coli* for Efficient Production of Nicotinamide Mononucleotide From Nicotinamide. *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11* (9), 2979–2988.
- (97) Kaczmarzyk, D.; Cengic, I.; Yao, L.; Hudson, E. P. Diversion of the Long-Chain Acyl-ACP Pool in *Synechocystis* to Fatty Alcohols through CRISPRi Repression of the Essential Phosphate Acyltransferase PlsX. *Metab. Eng.* **2018**, *45*, 59–66.
- (98) Cress, B. F.; Leitz, Q. D.; Kim, D. C.; Amore, T. D.; Suzuki, J. Y.; Linhardt, R. J.; Koffas, M. A. G. CRISPRi-Mediated Metabolic Engineering of *E. Coli* for O-Methylated Anthocyanin Production. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16* (1), 10.
- (99) Qin, Q.; Ling, C.; Zhao, Y.; Yang, T.; Yin, J.; Guo, Y.; Chen, G. Q. CRISPR/Cas9 Editing Genome of Extremophile *Halomonas* Spp. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 219–229.
- (100) Wu, J.; Zhang, X.; Zhu, Y.; Tan, Q.; He, J.; Dong, M. Rational Modular Design of Metabolic Network for Efficient Production of Plant Polyphenol Pinosylvin. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1459.
- (101) Tao, W.; Lv, L.; Chen, G.-Q. Engineering *Halomonas* Species TD01 for Enhanced Polyhydroxyalkanoates Synthesis via CRISPRi. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16* (1), 48.
- (102) Kozaeva, E.; Volkova, S.; Matos, M. R. A.; Mezzina, M. P.; Wulff, T.; Volke, D. C.; Nielsen, L. K.; Nikel, P. I. Model-Guided Dynamic Control of Essential Metabolic Nodes Boosts Acetyl-Coenzyme A–Dependent Bioproduction in Rewired *Pseudomonas Putida*. *Metab. Eng.* **2021**, *67*, 373–386.
- (103) Wang, Z.; Qin, Q.; Zheng, Y.; Li, F.; Zhao, Y.; Chen, G.-Q. Engineering the Permeability of *Halomonas Bluephagenesis* Enhanced Its Chassis Properties. *Metab. Eng.* **2021**, *67*, 53–66.
- (104) Lv, L.; Ren, Y.-L.; Chen, J.-C.; Wu, Q.; Chen, G.-Q. Application of CRISPRi for Prokaryotic Metabolic Engineering Involving Multiple Genes, a Case Study: Controllable P(3HB-Co-4HB) Biosynthesis. *Metab. Eng.* **2015**, *29*, 160–168.
- (105) Shen, R.; Ning, Z.-Y.; Lan, Y.-X.; Chen, J.-C.; Chen, G.-Q. Manipulation of Polyhydroxyalkanoate Granular Sizes in *Halomonas Bluephagenesis*. *Metab. Eng.* **2019**, *54*, 117–126.
- (106) Li, X.; Jiang, W.; Qi, Q.; Liang, Q. A Gene Circuit Combining the Endogenous I-E Type CRISPR-Cas System and a Light Sensor to Produce Poly-β-Hydroxybutyric Acid Efficiently. *Biosensors* **2022**, *12* (8), 642.
- (107) Ziegler, M.; Hägele, L.; Gäbele, T.; Takors, R. CRISPRi Enables Fast Growth Followed by Stable Aerobic Pyruvate Formation in *Escherichia Coli* without Auxotrophy. *Eng. Life Sci.* **2022**, *22* (2), 70–84.
- (108) Schilling, C.; Ciccone, R.; Sieber, V.; Schmid, J. Engineering of the 2,3-Butanediol Pathway of *Paenibacillus Polymyxa* DSM 365. *Metab. Eng.* **2020**, *61*, 381–388.
- (109) Wu, J.; Zhou, P.; Zhang, X.; Dong, M. Efficient de Novo Synthesis of Resveratrol by Metabolically Engineered *Escherichia Coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44* (7), 1083–1095.
- (110) Choi, S. Y.; Woo, H. M. CRISPRi-DCas12a: A DCas12a-Mediated CRISPR Interference for Repression of Multiple Genes and Metabolic Engineering in *Cyanobacteria*. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (9), 2351–2361.
- (111) Huang, C.-H.; Shen, C. R.; Li, H.; Sung, L.-Y.; Wu, M.-Y.; Hu, Y.-C. CRISPR Interference (CRISPRi) for Gene Regulation and Succinate Production in *Cyanobacterium S. Elongatus* PCC 7942. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15* (1), 196.
- (112) Li, H.; Shen, C. R.; Huang, C.-H.; Sung, L.-Y.; Wu, M.-Y.; Hu, Y.-C. CRISPR-Cas9 for the Genome Engineering of *Cyanobacteria* and Succinate Production. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 293–302.
- (113) Sung, L.; Wu, M.; Lin, M.; Hsu, M.; Truong, V. A.; Shen, C.; Tu, Y.; Hwang, K.; Tu, A.; Chang, Y.; Hu, Y. Combining Orthogonal CRISPR and CRISPRi Systems for Genome Engineering and Metabolic Pathway Modulation in *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116* (5), 1066–1079.

- (114) Chu, L. L.; Dhakal, D.; Shin, H. J.; Jung, H. J.; Yamaguchi, T.; Sohng, J. K. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for Enhanced Production of Naringenin 7-Sulfate and Its Biological Activities. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1671.
- (115) Wang, C.; Cao, Y.; Wang, Y.; Sun, L.; Song, H. Enhancing Surfactin Production by Using Systematic CRISPRi Repression to Screen Amino Acid Biosynthesis Genes in *Bacillus Subtilis*. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18* (1), 90.
- (116) Zhao, X.; Zong, Y.; Wei, W.; Lou, C. Multiplexed Promoter Engineering for Improving Thaxtomin A Production in Heterologous *Streptomyces* Hosts. *Life* **2022**, *12* (5), 689.
- (117) Wu, H.; Li, Y.; Ma, Q.; Li, Q.; Jia, Z.; Yang, B.; Xu, Q.; Fan, X.; Zhang, C.; Chen, N.; Xie, X. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for High-Yield Uridine Production. *Metab. Eng.* **2018**, *49*, 248–256.
- (118) Luo, J.; Efimova, E.; Volke, D. C.; Santala, V.; Santala, S. Engineering Cell Morphology by CRISPR Interference in *Acinetobacter Baylyi* ADP1. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (11), 2800–2818.
- (119) Niu, F.-X.; Huang, Y.-B.; Ji, L.-N.; Liu, J.-Z. Genomic and Transcriptional Changes in Response to Pinene Tolerance and Overproduction in Evolved *Escherichia Coli*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2019**, *4* (3), 113–119.
- (120) Li, Y.; Lin, Z.; Huang, C.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Tang, Y.; Chen, T.; Zhao, X. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* Using CRISPR–Cas9 Mediated Genome Editing. *Metab. Eng.* **2015**, *31*, 13–21.
- (121) Cho, J. S.; Choi, K. R.; Prabowo, C. P. S.; Shin, J. H.; Yang, D.; Jang, J.; Lee, S. Y. CRISPR/Cas9-Coupled Recombineering for Metabolic Engineering of *Corynebacterium Glutamicum*. *Metab. Eng.* **2017**, *42*, 157–167.
- (122) Shi, S.; Qi, N.; Nielsen, J. Microbial Production of Chemicals Driven by CRISPR-Cas Systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2022**, *73*, 34–42.
- (123) Nishida, K.; Kondo, A. CRISPR-Derived Genome Editing Technologies for Metabolic Engineering. *Metab. Eng.* **2021**, *63*, 141–147.
- (124) Kolasinliler, G.; Aagre, M. M.; Akkale, C.; Kaya, H. B. The Use of CRISPR-Cas-Based Systems in Bacterial Cell Factories. *Biochem. Eng. J.* **2023**, *194*, No. 108880.
- (125) Mojica, F. J. M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Soria, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* **2005**, *60* (2), 174–182.
- (126) Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science* (80-) **2012**, *337*, 816–822.
- (127) Liu, G.; Lin, Q.; Jin, S.; Gao, C. The CRISPR-Cas Toolbox and Gene Editing Technologies. *Mol. Cell* **2022**, *82* (2), 333–347.
- (128) Lunge, A.; Choudhary, E.; Sharma, R.; Gupta, R.; Agarwal, N. Functional Understanding of CRISPR Interference: Its Advantages and Limitations for Gene Silencing in Bacteria. In *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*; Elsevier, 2020; pp 199–218. DOI: 10.1016/B978-0-12-818140-9.00017-9.
- (129) Zhang, R.; Xu, W.; Shao, S.; Wang, Q. Gene Silencing Through CRISPR Interference in Bacteria: Current Advances and Future Prospects. *Front. Microbiol.* **2021**, *12* (March), 1–8.
- (130) Silvis, M. R.; Rajendram, M.; Shi, H.; Osadnik, H.; Gray, A. N.; Cesar, S.; Peters, J. M.; Hearne, C. C.; Kumar, P.; Todor, H.; Huang, K. C.; Gross, C. A. Morphological and Transcriptional Responses to CRISPRi Knockdown of Essential Genes in *Escherichia Coli*. *MBio* **2021**, *12* (5), e0256121.
- (131) Rostain, W.; Grebert, T.; Vyhovskiy, D.; Pizarro, P. T.; Tshinsele-Van Bellinghen, G.; Cui, L.; Bikard, D. Cas9 Off-Target Binding to the Promoter of Bacterial Genes Leads to Silencing and Toxicity. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (7), 3485–3496.
- (132) Sun, B.; Yang, J.; Yang, S.; Ye, R. D.; Chen, D.; Jiang, Y. A CRISPR-Cpf1-Assisted Non-Homologous End Joining Genome Editing System of *Mycobacterium Smegmatis*. *Biotechnol. J.* **2018**, *13* (9), e1700588.
- (133) Schultenkämper, K.; Brito, L. F.; Wendisch, V. F. Impact of CRISPR Interference on Strain Development in Biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2020**, *67* (1), 7–21.
- (134) Barreiro, C.; Barredo, J.-L. Carotenoids Production: A Healthy and Profitable Industry. In *Microbial Carotenoids*; Barreiro, C., Barredo, J.-L., Eds.; Humana New York, NY, 2018; pp 45–55. DOI: 10.1007/978-1-4939-8742-9_2.
- (135) Hochstrasser, M. L.; Taylor, D. W.; Bhat, P.; Guegler, C. K.; Sternberg, S. H.; Nogales, E.; Doudna, J. A. CasA Mediates Cas3-Catalyzed Target Degradation during CRISPR RNA-Guided Interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (18), 6618–6623.
- (136) Shapiro, J.; Iancu, O.; Jacobi, A. M.; McNeill, M. S.; Turk, R.; Rettig, G. R.; Amit, I.; Tovbin-Recht, A.; Yakhini, Z.; Behlke, M. A.; Hendel, A. Increasing CRISPR Efficiency and Measuring Its Specificity in HSPCs Using a Clinically Relevant System. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2020**, *17*, 1097–1107.
- (137) Kouranova, E.; Forbes, K.; Zhao, G.; Warren, J.; Bartels, A.; Wu, Y.; Cui, X. CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Hum. Gene Ther.* **2016**, *27* (6), 464–475.
- (138) Qi, L. S.; Larson, M. H.; Gilbert, L. A.; Doudna, J. A.; Weissman, J. S.; Arkin, A. P.; Lim, W. A. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **2013**, *152* (5), 1173–1183.
- (139) Yang, J.; Son, J. H.; Kim, H.; Cho, S.; Na, J.; Yeon, Y. J.; Lee, J. Mevalonate Production from Ethanol by Direct Conversion through Acetyl-CoA Using Recombinant *Pseudomonas Putida*, a Novel Biocatalyst for Terpenoid Production. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18* (1), 168.
- (140) Hashemi, A. CRISPR–Cas9/CRISPRi Tools for Cell Factory Construction in *E. Coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *36* (7), 96.
- (141) Csörgő, B.; Nyerges, Á.; Pósfai, G.; Fehér, T. System-Level Genome Editing in Microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 113–122.
- (142) Jiang, Y.; Chen, B.; Duan, C.; Sun, B.; Yang, J.; Yang, S. Multigene Editing in the *Escherichia Coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (7), 2506–2514.
- (143) Li, L.; Liu, Z.; Jiang, H.; Mao, X. Biotechnological Production of Lycopene by Microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (24), 10307–10324.
- (144) Mu, Q.; Zhang, S.; Mao, X.; Tao, Y.; Yu, B. Highly Efficient Production of L-Homoserine in *Escherichia Coli* by Engineering a Redox Balance Route. *Metab. Eng.* **2021**, *67*, 321–329.
- (145) Vento, J. M.; Crook, N.; Beisel, C. L. Barriers to Genome Editing with CRISPR in Bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *46* (9–10), 1327–1341.
- (146) Fontana, J.; Sparkman-Yager, D.; Zalatan, J. G.; Carothers, J. M. Challenges and Opportunities with CRISPR Activation in Bacteria for Data-Driven Metabolic Engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *64*, 190–198.
- (147) Shelake, R. M.; Pramanik, D.; Kim, J.-Y. In Vivo Rapid Investigation of CRISPR-Based Base Editing Components in *Escherichia Coli* (IRI-CCE): A Platform for Evaluating Base Editing Tools and Their Components. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (3), 1145.
- (148) Sproles, A. E.; Fields, F. J.; Smalley, T. N.; Le, C. H.; Badary, A.; Mayfield, S. P. Recent Advancements in the Genetic Engineering of Microalgae. *Algal Res.* **2021**, *53*, No. 102158.
- (149) Chen, L.; Zhang, S.; Xue, N.; Hong, M.; Zhang, X.; Zhang, D.; Yang, J.; Bai, S.; Huang, Y.; Meng, H.; Wu, H.; Luan, C.; Zhu, B.; Ru, G.; Gao, H.; Zhong, L.; Liu, M.; Liu, M.; Cheng, Y.; Yi, C.; Wang, L.; Zhao, Y.; Song, G.; Li, D. Engineering a Precise Adenine Base Editor with Minimal Bystander Editing. *Nat. Chem. Biol.* **2023**, *19* (1), 101–110.
- (150) Halperin, S. O.; Tou, C. J.; Wong, E. B.; Modavi, C.; Schaffer, D. V.; Dueber, J. E. CRISPR-Guided DNA Polymerases Enable Diversification of All Nucleotides in a Tunable Window. *Nature* **2018**, *560* (7717), 248–252.

- (151) Arroyo-Olarte, R. D.; Bravo Rodríguez, R.; Morales-Ríos, E. Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond. *Microorganisms* **2021**, *9* (4), 844.
- (152) Xu, T.; Li, Y.; Shi, Z.; Hemme, C. L.; Li, Y.; Zhu, Y.; Van Nostrand, J. D.; He, Z.; Zhou, J. Efficient Genome Editing in *Clostridium Cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (13), 4423–4431.
- (153) Bertrand, C.; Thibessard, A.; Bruand, C.; Lecointe, F.; Leblond, P. Bacterial NHEJ: A Never Ending Story. *Mol. Microbiol.* **2019**, *111* (5), 1139–1151.
- (154) Chayot, R.; Montagne, B.; Mazel, D.; Ricchetti, M. An End-Joining Repair Mechanism in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (5), 2141–2146.
- (155) Wang, X.; Wu, B.; Sui, X.; Zhang, Z.; Liu, T.; Li, Y.; Hu, G.; He, M.; Peng, N. CRISPR-Mediated Host Genomic DNA Damage Is Efficiently Repaired through Microhomology-Mediated End Joining in *Zymomonas Mobilis*. *J. Genet. Genomics* **2021**, *48* (2), 115–122.
- (156) Xue, C.; Greene, E. C. DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends Genet.* **2021**, *37* (7), 639–656.
- (157) Liang, Y.; Wei, Y.; Jiao, S.; Yu, H. A CRISPR/Cas9-Based Single-Stranded DNA Recombineering System for Genome Editing of *Rhodococcus Opacus* PD630. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2021**, *6* (3), 200–208.
- (158) Su, T.; Liu, F.; Gu, P.; Jin, H.; Chang, Y.; Wang, Q.; Liang, Q.; Qi, Q. A CRISPR-Cas9 Assisted Non-Homologous End-Joining Strategy for One-Step Engineering of Bacterial Genome. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 37895.
- (159) Cui, L.; Bikard, D. Consequences of Cas9 Cleavage in the Chromosome of *Escherichia Coli*. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (9), 4243–4251.
- (160) Sui, X.; Wang, X.; Liu, T.; Ye, Q.; Wu, B.; Hu, G.; Yang, S.; He, M.; Peng, N. Endogenous CRISPR-Assisted Microhomology-Mediated End Joining Enables Rapid Genome Editing in *Zymomonas Mobilis*. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14* (1), 208.
- (161) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Anastas, P. T., Ed.; Oxford University Press, 1998.

Artificial Spores as Multi-Functional Biocatalysts to Perform Biosynthetic Cascades

Maialen Iturralde, Magdalena Ripoll, Desiré di Silvio, Marta Gallego, Daniel A. Grajales-Hernández, Xabier López, Lorena Betancor, and Fernando López-Gallego*

Cells exhibit diverse structural formations such as biofilms and spores, enabling them to acquire novel functionalities. Many of these structures display biomacromolecules, including enzymes, tethered to cell walls to support various extracellular processes. Alternatively, encapsulating single cells with polymer coatings offers a strategy that circumvents the need for genetic engineering while imparting artificial functionalities to cells. Here, a universal method is presented for encapsulating single gram-negative microbes with polymeric coatings based on the ancestral gall ink formed by tannic acid-iron complexes. As a result, synthetic spores are achieved that selectively bind His-tagged enzymes through the formation of unprecedented galloyl/imidazole-Fe²⁺ complexes via ligand substitution demonstrated by density functional theory. These synthetic spores with a thickness of 41.5 ± 4.2 nm and a stiffness of 6.0 ± 3.5 GPa serve as biocatalytic materials for the one-pot oxidative amination of diols into amino alcohols, facilitated by the cooperative catalysis between intracellular endogenous or recombinant oxidoreductases, and an extracellular transaminase from *Pseudomonas fluorescens* displayed at the spore surface. These spores maintain their performance in three consecutive batch cycles. Integrating isolated enzymes onto the surface of engineered microbes coated with polymers offers novel opportunities for synthetic biology, advancing the efficiency of biosynthetic cascades in solid-state environments.

cofactors and include endogenous cofactor regeneration systems, they face selectivity and reproducibility issues due to their metabolic background and genomic adaptations. In contrast, isolated enzymes often achieve higher yields, titers, and productivity than whole cells due to a lack of complex metabolic background that may either derail intermediates or drive products to dead ends.^[5] For certain biotransformations that combine challenging-to-express^[6] or labile enzymes with enzymes whose substrates are insoluble or face mass transport limitations to cross the cell membranes, integrating whole cells with isolated enzymes emerges as an elegant solution for constructing biosynthetic pathways. These hybrid systems facilitate the valorization of poorly soluble or metabolically inactive feedstocks by employing a sequence of extracellular enzymes to break down the starting materials into metabolically active intermediates.^[7] Cell metabolism then utilizes these intermediates to generate a valorized end product. Conversely, in an alternative approach, microorganisms can convert low-value materials, such as

glycerol, into intermediates that are secreted into the media and subsequently transformed by extracellular enzymes under non-physiological conditions.^[8]

In nature, a wide array of enzymes is tethered to cell walls to facilitate various extracellular processes. Cellulosome is the

1. Introduction

Inside the biocatalysis toolbox, we can find two main formats of biocatalysts: whole cells^[1,2] and isolated enzymes.^[3,4] While whole cells afford low production costs for enzymes and

M. Iturralde, D. di Silvio, M. Gallego, D. A. Grajales-Hernández, F. López-Gallego
Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE) – Basque Research and Technology Alliance (BRTA)
Paseo de Miramón 182, Donostia-San Sebastián 20014, Spain
E-mail: flopez@cicbiomagune.es
M. Ripoll, L. Betancor
Laboratorio de Biotecnología
Universidad ORT Uruguay
Mercedes 1237, Montevideo 11100, Uruguay

X. López
Polimero eta Material Aurreratuak: Fisika
Kimika eta Teknologia
Kimika Fakultatea
UPV/EHU & Donostia International Physics Center (DIPC)
PK 1072, Donostia-San Sebastian 20018, Spain
F. López-Gallego
Ikerbasque
Basque Foundation for Science
Plaza Euskadi 5, Bilbao 48009, Spain

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/adfm.202406097>

DOI: 10.1002/adfm.202406097

paradigmatic example to illustrate how cells assemble extracellular systems at their surfaces. Inspired by nature's approach, the surface of a myriad of microorganisms has been engineered to display a wide variety of enzymes. Frequently, the displayed enzymes are based on the genetic fusion of the enzyme sequence with that of a membrane anchor (i.e., Lpp–OmpA,^[9] PgsA,^[10] ice nucleation protein^[11]), resulting in a chimera integrated into the cell membrane, spore surface or S-layer.^[12] Nonetheless, the fusion of membrane anchors and passenger proteins (i.e., enzymes) may result in unfavorable domain interactions, protein degradation, or even complete loss of functionality.^[13] Consequently, this significantly impacts surface display efficiency and the biocatalyst activity. These difficulties can be alleviated by displaying membrane proteins tagged with extracellular peptides capable of interacting with enzymes through post-translational bioconjugation.^[14]

Alternatively, bacterial spores can serve as chassis for post-translational immobilization (display) of enzymes on cell surfaces, with the genus *Bacillus* being the most commonly used microbe for this purpose.^[15–17] Beyond using wild spores, microbes can also be coated with synthetic polymers resulting in artificial spores that preserve cell viability under drastic conditions. This approach has been successful in a wide cell scope since prokaryotic (i.e., *Escherichia coli*) and eukaryotic (i.e., *Saccharomyces cerevisiae*) cells have been artificially sporulated, increasing their tolerance to drastic conditions. Inspired by bio-adhesives found in mussels, single-cell organic coatings have been achieved through self-polymerization of dopamine under aerobic conditions.^[18,19] In contrast, the bio-silicification of diatoms^[20] has been taken as inspiration to create inorganic single-cell spores. For example, yeast has been coated with metal-organic frameworks (i.e., ZIF-8).^[21] In a hybrid approach, tannic acid in combination with iron (III) polymerizes at the surface of both prokaryotes and eukaryotes, protecting them.^[22] In this reaction, the iron crosslinks the tannic acid molecules that spontaneously polymerize on the cell surface.^[23] Tannic acid is a natural polyphenol that includes several galloyl groups linked to the glucose molecule with high adherence to biological surfaces.^[24] While tannic is absorbed by the lipopolysaccharides of cell outer membranes,^[25] the galloyl groups can form coordination bonds with Fe^{III} triggering the polyphenol crosslinking at the cell surface. Thus, the complexation between iron (III) and tannic acid forms multivalent coordination interactions that create a supramolecular iron-organic complex (TAFE) at the cell surface.

These artificial coatings protect cells under drastic conditions, cryopreserving them for applications like delivering probiotics with enhanced survival and mucosal adhesion for gastrointestinal treatments.^[26] Besides, these artificial spores can also provide microbes with new functionalities, as the cell surface can be decorated with biogenic but also abiogenic elements for artificial functions in microbial fuel cells^[27,28] and interfacial catalysis.^[29] Despite the demonstrated potential of artificial coatings to augment the capability of resting bacteria in biotechnology, this approach has been rarely exploited to display enzymes that cooperatively work with either the endogenous or engineered metabolism of coated cells. One of the few examples^[30] where enzymes attached to the artificial coatings interplay with the cell metabolism is the MOF-based artificial spores of yeast functionalized with β -galactosidase.^[31] In this proof-of-concept, coated yeast can sur-

vive longer times than uncoated ones in oligotrophic cell media containing lactose. The displayed enzymes break down lactose into galactose and glucose that can be metabolized by yeast to survive. Beyond this example, biotransformations of high-value-added products using hybrid biocatalytic cascades, which combine endogenous metabolic enzymes and extracellular enzymes anchored to natural or artificial spore coatings, have scarcely been explored.

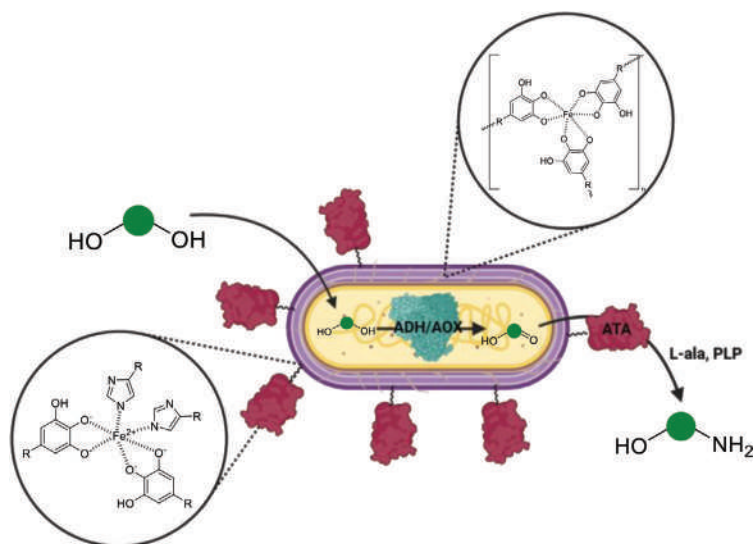
In this work, we have developed a single-cell encapsulation protocol driven by tannic acid-iron polymerization to display enzymes at the coated surface of both wild-type or engineered whole-cells with resting metabolism. Iron-galloyl complexes exposed on the surface of coated bacteria serve as anchor points to selectively bind His-tagged proteins without engineering the cells (**Scheme 1**). Following the optimization of the protocol for generating single-cell spores utilizing *E. coli* as a model chassis and the characterization of their surface, we proceeded to immobilize a His-tagged tetrameric amine transaminase from *Pseudomonas fluorescens* (PfATA) onto the surface of coated *E. coli* cells overexpressing various oxidoreductases. This enabled the execution of a two-step transformation of polyols into aminoalcohols in a one-pot reaction (**Scheme 1**). With this method, we connect resting whole-cell biocatalysts with His-tagged isolated enzymes using an adhesive biomaterial made of tannic acid-iron complexes. This underexplored setup enables cooperative biocatalysis for an industrially significant biotransformation. This approach was finally expanded to other Gram-negative bacteria from the genus *Gluconobacter* that endogenously express a membrane-bound dehydrogenase at their inner membrane, to couple its alcohol oxidation activity with the transamination reaction catalyzed by the displayed PfATA.

2. Results and Discussion

2.1. Assembly of Artificial Spores Based on Tannic Acid-Iron Complexes

As a model system to demonstrate the single-cell encapsulation to fabricate artificial microbial spores, we used *E. coli* as a biological chassis and tannic acid complexed with iron(III) as an artificial coating. As observed in other microbes,^[28] tannic acid in the presence of iron(III) polymerizes at the microbial outer membrane giving rise to a polymeric coating. Besides the cell encapsulation, this methodology functionalizes the cell surface with iron complexes ready to form coordination bonds with the imidazole ring of His-tagged proteins (**Figure 1a**). To this aim, we established a workflow where pellets of *E. coli* were suspended in a solution of tannic acid and FeCl₃ and vigorously shaken for 10 s to achieve single-cell coatings. After the artificial spore formation, the cells were washed and incubated with a His-tag protein for their surface decoration. The UV-vis spectrum of coated cells shows a broad absorbance band in the 450–600 nm range, indicating the formation of tris-galloyl/iron complexes (**Figure S1**, Supporting Information).^[25,32]

To assess the efficiency of the single-cell encapsulation, we incubated the coated cells after each synthetic protocol with His-tagged mCherry and analyzed the resulting spores by confocal laser scanning microscopy (CLSM). We studied the effect of the number of sequential coating steps ([TAFE]_x), the cell



Scheme 1. Representation of single-cell encapsulation based on tannic-iron complexes that result in a biocatalytic artificial spore where one enzyme is overexpressed in the cell cytosol (alcohol dehydrogenase/oxidase; ADH/AOX) and another enzyme is displayed at the spore's surface (amine transaminase; ATA) to perform the stepwise transformation of polyols into aminoalcohols. The superior circular loop represents the structure of the bacterial coating. The inferior circular loop represents the interaction between the His-tag of the displayed enzyme and the iron(II)-tannic acid complexes.

concentration, and the blocking step (Figures S2–S7, Supporting Information) on the encapsulation efficiency. These parameters were reported as important for the cytoprotection of the fabricated spores.^[22,33] As the artificial spores aggregated upon their storage at 4°C (Figures S2 and S3, Supporting Information), we decided to add a blocking step to avoid such an aggregation process. Different concentrations of either bovine serum albumin (BSA) (1–5%) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (1–5%) were assessed as blocking agents. While polymeric coatings may unspecifically bind BSA^[34,35] as observed by other polymer-coated materials, EDTA coordinates the displayed remaining iron complexes upon immobilization of the His-tagged protein.^[36] These two blocking agents avoided the interaction between single spores hampering their aggregation (Figures S4 and S5, Supporting Information). As BSA makes [TAFE]₂ layers more inert as no additional metal complexes are formed (i.e., EDTA-Fe), we suggest that this blocking step precludes bacteria aggregation and unspecific absorption of untagged proteins. Hence, the general protocol to achieve stable single-cell artificial spores consisted of two consecutive coating steps using 0.40 dried cell weight (DCW) mL^{−1}, followed by a blocking step with 1% BSA. The resulting sporulated *E. coli* cells are dubbed as [TAFE]₂@*E. coli*. The polymeric shells surrounding the cells were stable for 21 days at 4°C as the sample OD_{600nm} and green fluorescence (underlying the overexpressed GFP λ_{ex} = 488 nm and λ_{em} = 508 nm) remained unaltered (Figure S6, Supporting Information). Once a synthetic protocol was defined, we scaled it up either by parallelizing the synthetic protocol without altering the reaction volume or by increasing the reaction volume while keeping the reactant concentrations constant. Both protocol approaches allowed the scale-up of the synthetic protocol without observing significant aggregation and jeopardizing the single-encapsulation efficiency (Figure S7, Supporting Information).

Once the protocol was fully optimized, uncoated, and coated cells were characterized by different methods. Figure 1b, b' and Figure S8 (Supporting Information) show transversal TEM images of uncoated and coated *E. coli* cells. The uncoated cell displays the typical lipid bacteria bilayer whereas the coated cell displays a brushy hair-like structure on the outer membrane surrounding single cells, confirming the presence of single-cell coatings on the cell surface. This morphology is similar to that already reported for other artificial *E. coli* spores following a similar single-encapsulation protocol.^[28,33] Through the analysis of ten TEM images, we found out that the thickness of the TAFE layer was 41.5 ± 4.2 nm, which matches the thickness found in other cells encapsulated with similar coatings.^[28,33] In addition, this hair-like structure seems to be heterogeneously distributed exhibiting some large brushes anchored to the cell surface.

Furthermore, confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed using fluorescent proteins at different cell localizations (Figure 1c, c'). On one hand, the green fluorescence of the overexpressed GFP is observed inside bacteria transformed with a plasmid encoding GFP. On the other hand, the red fluorescence of His-tagged mCherry is localized at the outer surface of the bacteria where the polymeric shell is, according to TEM images. CLSM studies demonstrate that proteins are compartmentalized inside (*E. coli*(GFP) in green) and outside (His-mCherry in red) of artificial spores. Hence, the presence of immobilized protein proves the protein display at the surface of encapsulated single cells thanks to the functionalization of the cell coating with iron chelates reactive with the His-tags through histidine-metal coordination. Furthermore, we performed atomic force microscopy (AFM) analysis to assess the topography of the outer shell of the cells (Figure 1d, d'). While uncoated *E. coli* cells show a smooth surface, the coated ones show a rugged and uneven surface, matching what we observed in the TEM analysis. Note, that atomic force spectroscopy revealed that the stiffness of the

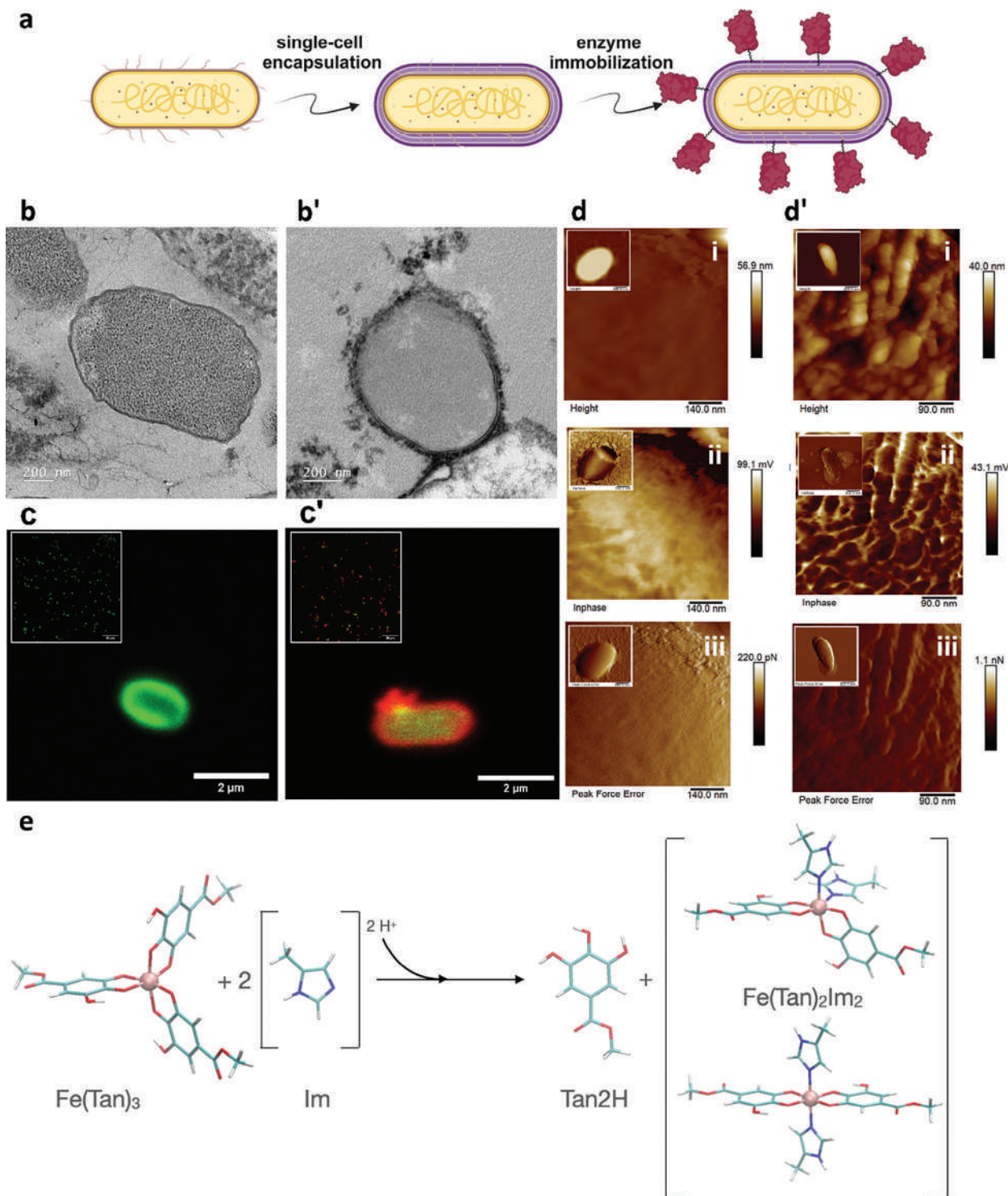


Figure 1. Characterization of single-cell encapsulation: a) scheme of the assembly protocol to achieve artificial spores displaying a His-tagged protein. b) Transmission electron microscopy (TEM) images of a representative uncoated (b) and coated (b') *E. coli* cell. c) CLSM images of *E. coli* cells expressing GFP (green channel $\lambda_{\text{ex}} = 488$ and $\lambda_{\text{em}} = 508$ nm) without coating (c) and coated with His-mCherry (red channel $\lambda_{\text{ex}} = 561$ and $\lambda_{\text{em}} = 610$ nm) immobilized on their surface (c'). The insets at the left-top corner show a larger area of the sample. d) Atomic force microscopy (AFM) images of the outer shell of an uncoated (d) and coated (d') *E. coli* cell depicting i) height where lighter colors display higher pixels ii) in phase where a phase shift is shown iii) peak force error. e) Lowest energy structures determined by quantum calculations that correspond to the $[\text{Fe}(\text{Tan})_3]^{q-6} + 2\text{Im} \rightarrow [\text{Fe}(\text{Tan})_2\text{Im}_2]^{q-4} + \text{Tan}^{2-}$ reaction. Fe refers to iron (II) and (Tan) refers to the deprotonated galloyl ligands coordinated with the iron (II). The overall affinity reaction also considers the stabilization energy of free (Tan) by protonation leading to the most stable protonation state (Tan2H) in solution at pH 8.

artificial spores is similar to that of uncoated cells (Figure S9, Supporting Information).

The presence of iron on the polymeric coating was confirmed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Table S1, Supporting Information). Using ICP-MS, we determined 3 times more total iron in coated cells than in uncoated ones. While with XPS analysis, we observed the typical band Fe2p widely reported for [TAFE]₂ assemblies,^[25,28,37] but also the band Fe3p that informs us about the oxidation state of the iron on these assemblies. To note, XPS reveals that the iron in the spores is majorly reduced to Fe²⁺ due to the reducing power of tannic acids,^[38,39] yet Fe³⁺ was also present (Figure S10, Supporting Information). As the typical oxidation state of iron to coordinate imidazole in metal-phenolic complexes is iron(III),^[40,41] we decided to study whether iron(II) in tris-galloyl complexes can coordinate peptides with imidazole rings through ligand displacement. To that aim, we calculated the ligand substitution energies through density functional theory (DFT) calculations (see Supporting Information). Through this, we observe that the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ dramatically changes the capacity of a tris-galloyl complex to chelate the imidazole rings. DFT calculations show that imidazole complexation is energetically more favorable when the tris-galloyl complex is coordinated with Fe²⁺, as its binding energy is 12.5–14.6 kcal mol⁻¹ lower than that estimated with Fe³⁺ complexes depending on the complex conformation (see supporting information, Tables S2 and S3, Supporting Information). Under His-tag binding conditions (pH 8) galloyl ligands (Tan2H) are neutral species, however, upon coordination with iron, galloyl ligands are doubly deprotonated at the coordinating oxygen positions. Thus, the three ligands around the metal center in tris-galloyl complexes present a total charge of -6. The +3 charge of the iron(III) reduces considerably the strong coulombic repulsion between the ligands, stabilizing the tris-galloyl complex, and making the ligand exchange with imidazole endothermic. However, the tannic-driven reduction of iron(III) to iron(II) during the coating formation decreases the charge of the metal center to +2, destabilizing the co-location of three doubly negatively (Tan) ligands and reducing the stability of the tris-galloyl complex. This fact makes the exchange of one of the (Tan) ligands by neutral imidazole thermodynamically competitive (exothermic). Consequently, upon iron reduction, tris-galloyl complexes can interact with two imidazole groups from a His-tag, releasing one galloyl ligand (which in turn transforms to its fully protonated state, TanH2), and forming a [Fe(Tan)₂Im]₂²⁻ complex (Figure 1e; Figure S12, Supporting Information). The selectivity of this interaction is supported by the fact that untagged mCherry is not able to be immobilized on the surface of the artificial spores as red fluorescence was not detected at the surface of [TAFE]₂@*E.coli* overexpressing GFP (Figure S11, Supporting Information). Thus, the presence and the oxidation state of iron together with the genetic fusion of a His-tag to the N-terminus of the protein sequence enable the immobilization and display of His-mCherry on these artificial spores. In this case, the functionalization of [TAFE]₂ layer with other divalent metals (i.e., Co²⁺) was unnecessary as reported elsewhere,^[42] and demonstrates that galloyl-Fe²⁺ complexes are mandatory to immobilize His-tagged proteins.

2.2. Artificial Spores Provide Cytoprotection to *E.coli* Cells

Once the artificial spores were assembled, we next studied their reversibility and cytoprotective role under relevant conditions for industrial bioprocesses. To that aim, we first assayed the desporulation of [TAFE]₂@*E.coli* cells overexpressing GFP where the polymer coating is broken due to cell division forces. Uncoated and coated cells were grown and induced with isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) in either buffer or Lysogeny Broth (LB) media to monitor cell density (OD_{600nm}) and GFP overexpression (Figure S13, Supporting Information). Figure 2a shows that bacteria cannot be grown in phosphate buffer as would be expected due to the absence of a carbon source. However, when a rich media (LB) is used, [TAFE]₂@*E.coli* cells reach higher cell density but at a slower growth rate than uncoated ones (Figure 2a; Figure S13, Supporting Information). Furthermore, [TAFE]₂@*E.coli* harboring an IPTG-inducible plasmid encoding GFP overexpresses this fluorescence protein intracellularly when cultured in LB media doped with IPTG (Figure S13, Supporting Information). According to the growth curves shown in Figure 2a, flow cytometry analysis supports the cytoprotective properties of [TAFE]₂ as we found a larger population of green fluorescent bacteria when we inoculated coated bacteria than when we inoculated uncoated ones (Figure S13, Supporting Information). To assess the presence of the coating after de-sporulation, [TAFE]₂@*E.coli* cells were incubated with His-tagged mCherry and then cultured in either phosphate buffer or LB media. After 72 h of growth, samples were collected and analyzed by CLSM (Figure S13, Supporting Information). During bacterial growth, the polymeric coating was lost as no red fluorescence was detected at the surface of bacteria that were able to express GFP (Figure S13, Supporting Information). By tracking the red fluorescence underlying the His-tagged mCherry displayed at the bacteria surface, we prove the reversibility of the artificial sporulation process. Hence, the polymeric coating allows bacteria replication, suggesting a spontaneous dismantling of [TAFE]₂ layers likely caused by the physical forces exerted by this cell division. This result is supported by the similar stiffness of [TAFE]₂@*E.coli* and uncoated *E.coli* (Figure S9, Supporting Information). This de-sporulation process of artificially coated cells has also been achieved with other polymeric shells (i.e., dopamine).^[29] The organic polymeric shell is spontaneously broken unlike artificial spores based on inorganic shells where an external stimulus (i.e., EDTA) must be applied to dissolve the artificial coating.^[21]

Encouraged by the superior survival of *E.coli* cells when coated with [TAFE]₂, we submitted these artificial spores to a thermal shock (70 °C for 1 h), organic solvent incubation (20% DMSO for 16 h at 25 °C) and acidic (pH 4 for 3 h at 25 °C) and alkaline (pH 10 for 3 h at 25 °C) conditions. After these incubations, we assessed the live cell fraction by fluorescence spectroscopy (see materials and methods). After the thermal shock, artificial spores lost 27% of their initial viability, in comparison to uncoated cells, which lost 50% of their initial viability (Figure 2b). In contrast, the [TAFE]₂-based artificial spores resisted DMSO similarly to the uncoated cells (Figure 2c) maintaining more than half of the cells alive after the incubation period. Unlike, polydopamine coatings that stabilize cells against organic-aqueous interfaces,^[29] [TAFE]₂ coating negligibly increases the cell stability against organic solvents such as DMSO. Remarkably, the

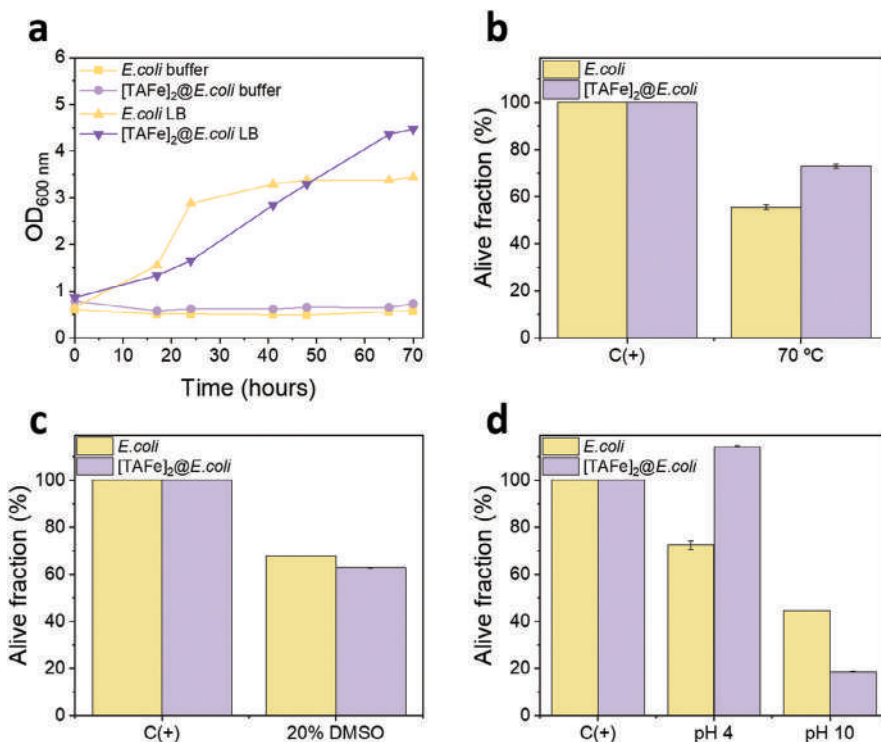


Figure 2. Cytoprotective assays of [TAFE]₂@*E. coli* (purple) and uncoated *E. coli* (yellow) cells. a) De-sporulation assay in different culture media, nutrient-rich LB media, and 50 mM Tris-HCl buffer. Alive fraction after b) incubation at 70 °C for 1 h, c) incubation with 20% DMSO for 16 h at 25 °C, and d) incubation at pH 4 and pH 10 for 3 h at 25 °C. Positive controls (C(+)) represent [TAFE]₂@*E. coli* and uncoated *E. coli* cells without any incubation. Alive fraction is the ratio between alive cells after incubation and alive cells in the corresponding positive controls. In panels (b–d), all data are presented as the mean value and the standard deviation (error bars) of two independent experiments.

artificial spores exhibited an outstanding tolerance to acidic pH, retaining their initial viability after incubation at pH 4. Unlike the artificial spores, only 75% of the initial uncoated cells survive the acidic conditions (Figure 2d). These results match previous work where similar *E. coli* cells were encapsulated into [TAFE]₂-based coatings.^[33] In contrast, alkaline pH (pH 10 for 3 h at 25 °C) was more deleterious for cell viability with both uncoated (45%) and coated cells (19%). Viability results were confirmed by CSLM (Figure S14, Supporting Information). The increased tolerance of [TAFE]₂@*E. coli* cells to acidic pH may be attributed to a shift in the composition of the TAFE layer from tris- to mono-complexes under these conditions.^[43] This transition results in the display of free galloyl ligands (with a pK_{a1} = 3.3 and pK_{a2} = 8.5),^[39] which are readily protonated, capturing protons from the media. Hence, we suggest that the TAFE layer exhibits a heightened buffer capacity under acidic conditions, thereby reducing the proton diffusion into the bacteria, which minimizes cytosol acidification, ultimately increasing cell survival. This buffer effect is less plausible at alkaline pH, where most galloyl ligands are coordinated with iron-forming tris-complexes.

2.3. Artificial Spores Offer a Larger Surface Area to Display His-Tagged Proteins

Determining the capacity of artificial spores to display high surface protein load is key to manufacturing highly competent co-

operative biocatalysts. To do so, we first quantitatively evaluated two different approaches for the post-translational display of proteins on the surface of artificial spores using two linkers of different lengths. On one hand, we investigated the direct immobilization of His-tagged proteins on the polymeric layer functionalized with galloyl-iron(II) complexes. On the other hand, we immobilized a His-tagged type II cohesin (His-Coh) from *Clostridium thermocellum* as an anchor domain to ultimately immobilize a protein fused with its cognate dockerin (Dock) domain (Figure 3a). While the first approach only relies on the iron-histidine coordination bonds through a short linker (His-tag), the second one relies on a dual interaction; the iron-histidine coordination for displaying a His-Coh and the calcium-mediated biomolecular cohesin/dockerin recognition. Herein, the Dock-fused protein is bound to the surface through a larger spacer arm than the His-tagged proteins. This latter interaction has already been applied for the nanometric assembly of enzyme cascades on yeast surfaces^[44,45] as well as on porous agarose beads functionalized with cobalt chelates.^[46]

To assess the maximum protein loading admitted by the surface of [TAFE]₂@*E. coli* cells without overexpressing any recombinant protein, we compared the one-step immobilization of His-GFP on naked spores and the two-step immobilization of Dock-GFP on spores displaying His-Coh. First, we incubated these artificial spores with different concentrations of His-GFP to assess the direct binding between the His-tagged protein and the [TAFE]₂ layer. To this aim, we quantified the unbound protein

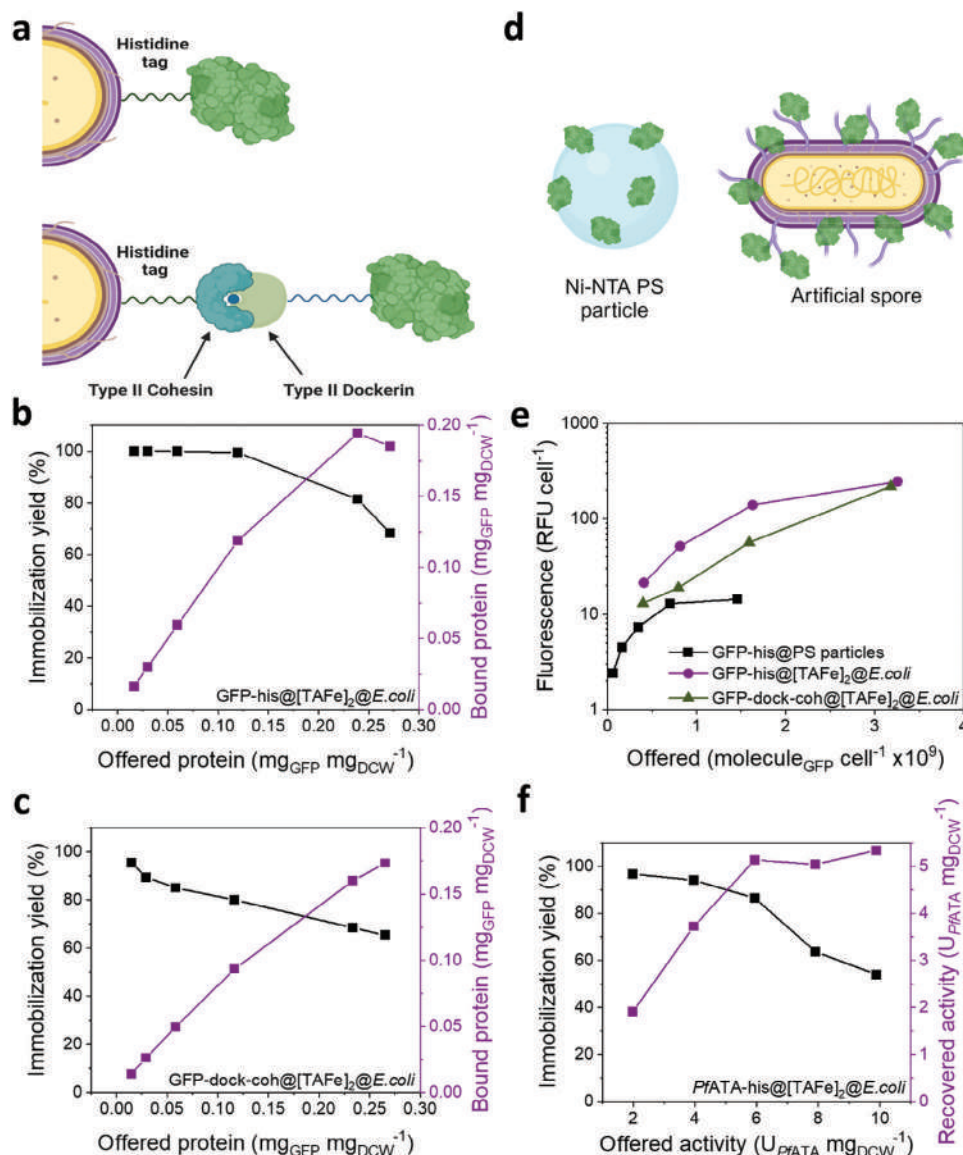


Figure 3. Protein binding capacity of [TAFE]₂@E.coli. Scheme of immobilization via histidine tag and cohesin-dockerin interaction a). Immobilization yield and mass bound protein per cell mass as a function of the offered protein per cell mass of His-GFP b) and Dock-GFP c) to [TAFE]₂@E.coli and [TAFE]₂@E.coli functionalized with His-Coh, respectively. Scheme of His-tagged proteins immobilized on polystyrene microparticles (PS) functionalized with nitrotriacetic acid-Ni²⁺ chelates (NTA-Ni²⁺) and on the surface of the artificial spores d). Average fluorescence intensity per cell (determined by flow cytometry) as a function of the offered His-GFP (from panel b) and Dock-GFP (from panel c) per [TAFE]₂@E.coli and [TAFE]₂@E.coli functionalized with His-Coh, respectively e). Raw data from panel e is provided in Table S4 (Supporting Information). Immobilization yield and recovered activity of His-PfATA per cell mass as a function of the enzyme activity per cell mass of His-PfATA f). Panel a and d were created with Biorender.com. His-driven immobilization is carried out in 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl while Dock/Coh driven immobilization is carried out in 25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂.

concentration in the supernatant and calculated the mass balance regarding different offered protein concentrations (0.02–0.27 $\text{mg}_{\text{His-GFP}} \text{mg}_{\text{DCW}}^{-1}$). Figure 3b shows that the surface of [TAFE]₂@E.coli is saturated when offered > 0.20 $\text{mg}_{\text{His-GFP}} \text{mg}_{\text{DCW}}^{-1}$, reaching a maximum GFP mass load of 0.19 $\text{mg}_{\text{His-GFP}} \text{mg}_{\text{DCW}}^{-1}$, which means an immobilization yield of 95%. Next, we studied the binding efficiency of Dock-GFP to [TAFE]₂@E.coli functionalized with His-Coh. To this aim, we first optimized the maximum mass load of His-Coh per DCW on the surface of the artificial spores by offering 0.07–0.21 $\text{mg}_{\text{His-Coh}} \text{mg}_{\text{DCW}}^{-1}$. We

found that a maximum of 0.07 $\text{mg}_{\text{His-Coh}} \text{mg}_{\text{DCW}}^{-1}$ is bound to the artificial spore's surface regardless of the protein concentration offered (Figure S15, Supporting Information). Thus, we selected these Coh-functionalized spores for the surface display of Dock-GFP fusion protein and compared this one with direct immobilization of His-GFP on [TAFE]₂-coated E.coli cells. Figure 3c shows that a saturation binding plateau was not reached under the studied conditions, and higher concentrations of Dock-GFP needed to be offered to reach a similar loading as that achieved with the direct immobilization of His-GFP. Hence, offering

0.23 mg_{GFP} mg_{DCW}⁻¹, we could load 18% more GFP through imidazole-[TAFE]₂ complexes than through the biomolecular interaction between type II cohesin-dockerin domains. The lower protein loading observed with the latter approach may rely on steric hindrances caused by the excessive density or the wrong orientation of the His-Coh domains displayed at the [TAFE]₂ layer. Similar crowding-based limitations were reported in the binding of cellulases fused to dockerin domains in type I/II cohesin/dockerin-mediated display at the surface of an engineered yeast,^[44,45] and in the solid-phase assembly of bi-enzyme systems through type II cohesin/dockerin interactions.^[46]

As TEM images revealed the hair-like extension in the [TAFE]₂ layer coating the *E. coli* surfaces (Figure 1b'), we hypothesize that the surface area of the artificial spores is larger, and thus can load more protein per cell, than uncoated *E. coli*. To demonstrate this hypothesis, we used nonporous 1 μm poly(styrene) (PS) particles functionalized with the nickel(II)-nitrilotriacetic acid complex (Ni-NTA) on their surface to selectively bind His-tagged proteins as mimics of uncoated *E. coli* cells able to display His-proteins (Figure 3d). First, we incubated the PS particles with different His-GFP concentrations to find a saturation plateau where the immobilization yield was lower than 50% (Figure S16, Supporting Information). Based on the offered protein concentration and the particle density, we calculated how many GFP molecules we offer either per particle or artificial spore (see Supporting Information, Figure S18 and Table S4, Supporting Information). For comparison purposes, we also calculated the offered theoretical density of GFP per spore using the data reported in Figure 3b,c. Then, PS particles and artificial spores with different GFP loads were analyzed by flow cytometry (FACS) (Figure S17 and Table S4, Supporting Information). Figure 3e evidences a 20-fold increase in the mean fluorescence intensity per [TAFE]₂@*E. coli* cell compared to that determined per PS particle. The mean fluorescence intensity per count (either PS particle or spore) determined by FACS correlates with GFP density at the surface of the analyzed particles (or cells). This experiment supports that [TAFE]₂@*E. coli* cells displayed a similar molecular density of GFP at the spore surface regardless of the binding mode, however, GFP density is significantly higher than that determined for non-porous PS microparticles. This proves our initial hypothesis meaning that spores offer a higher surface area for the immobilization of proteins than microparticles of the same size. Considering an *E. coli* cell with a rod shape of 1 μm wide, a surface area of 7.85 μm² is estimated.^[47] If the surface area of one molecule of His-GFP is equal to 4 nm², we estimate that the surface of an *E. coli* cell can display a maximum of 1.96 × 10⁶ His-GFP molecules per cell. This density is similar to that estimated for PS microparticles (1.57 × 10⁶ molecules particle⁻¹), validating the latter as a mimic of uncoated *E. coli* cells.

In contrast, the mass balance between the protein concentration before and after incubating 0.2 mg mL⁻¹ His-GFP with the artificial spores indicates that 95% immobilization yield is achieved (Figure 3b), giving rise to a protein density of 2.65 × 10⁹ molecules per spore. These data confirm that the area available for protein immobilization in the *E. coli* surface has been increased by three orders of magnitude upon the coating with [TAFE]₂. All in all, these results point out that [TAFE]₂@*E. coli* cells exhibit a larger surface available to immobilize His-tagged protein than that estimated for 1 μm-size uncoated *E. coli* cells.

The higher surface area of our synthetic spores potentially allows them to display up to four orders of magnitude more enzymes at the cell surface than genetically programmed yeasts that display optimized enzyme anchoring scaffolds (3 × 10⁵ enzymes per cell)^[45]

To expand the applicability of protein display in these artificial spores and create biocatalysts with cooperative biocatalysis (isolated enzymes plus whole cells), we immobilized His-tagged amine transaminase from *Pseudomonas fluorescens* (PfATA)^[48] on the surface of [TAFE]₂@*E. coli* cells overexpressing in their cytosol the alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* (BsADH).^[49,50] After incubating a fixed amount of DCW *E. coli* cells with a range of PfATA activity, we found a plateau in the recovered activity of the displayed enzyme when more than 6 U of PfATA are offered per mg of DCW of [TAFE]₂@*E. coli*, expressing a maximum activity of 5 U mg_{DCW}⁻¹, which means a relative recovered activity^[51] of 92% regarding of the free PfATA and an immobilization efficiency of 83%^[52] (Figure 3f). Moreover, we studied the stability of the immobilized PfATA on the surface of the *E. coli* artificial spores under transamination reaction conditions (Figure S19a, Supporting Information). We found that the immobilized enzyme on [TAFE]₂@*E. coli* cells is more stable than its free counterpart when incubated under the same conditions. The immobilization of PfATA on [TAFE]₂@*E. coli* cells also protected this enzyme against its inactivation in the presence of 10% DMSO, an important solvent for biocatalytic transamination reactions (Figure S19b, Supporting Information). This protective effect was lost at higher solvent concentrations. Besides, CLSM analyses prove that the artificial spores remain stable under reaction media conditions, keeping the displayed protein at the bacteria's surface (Figure S19c,d, Supporting Information), thus supporting their use for cooperative biocatalysis.

2.4. Application of Artificial Spores in a Cascade Biotransformation

As a model cascade reaction toward cooperative biocatalysis where surface enzymes cooperate with cytosolic ones, we studied the immobilization of an amine transaminase bound to the surface of [TAFE]₂-based artificial spores overexpressing an oxidoreductase. For this purpose, we selected the oxidative amination of an aromatic diol (4-(Hydroxymethyl)phenol, 1a) to yield the corresponding amino alcohol (4-(Aminomethyl)phenol, 1c) (Figure 4a). This cascade has been previously investigated in our laboratory using full-cell-free and heterogeneous biocatalysts combining oxidoreductases and transaminases.^[46,53] However, in this work, the first NAD⁺-dependent oxidation of 1a is catalyzed by an oxidoreductase recombinantly overexpressed by [TAFE]₂@*E. coli* cells. Then, the resulting intermediate (4-hydroxybenzaldehyde (1b)) is subsequently aminated by His-PfATA anchored to the [TAFE]₂ layers of the artificial spores to yield 1c, using L-alanine as an amine donor. In this cascade, the starting materials (1a) must be internalized by [TAFE]₂@*E. coli* cells to be oxidized intracellularly, while the intermediate (1b) must diffuse out the cell to be aminated at the cell surface in the presence of an extracellular excess of amine donor (L-alanine).

To optimize this bi-enzyme cascade with this cooperative biocatalyst based on artificial spores, we evaluated two

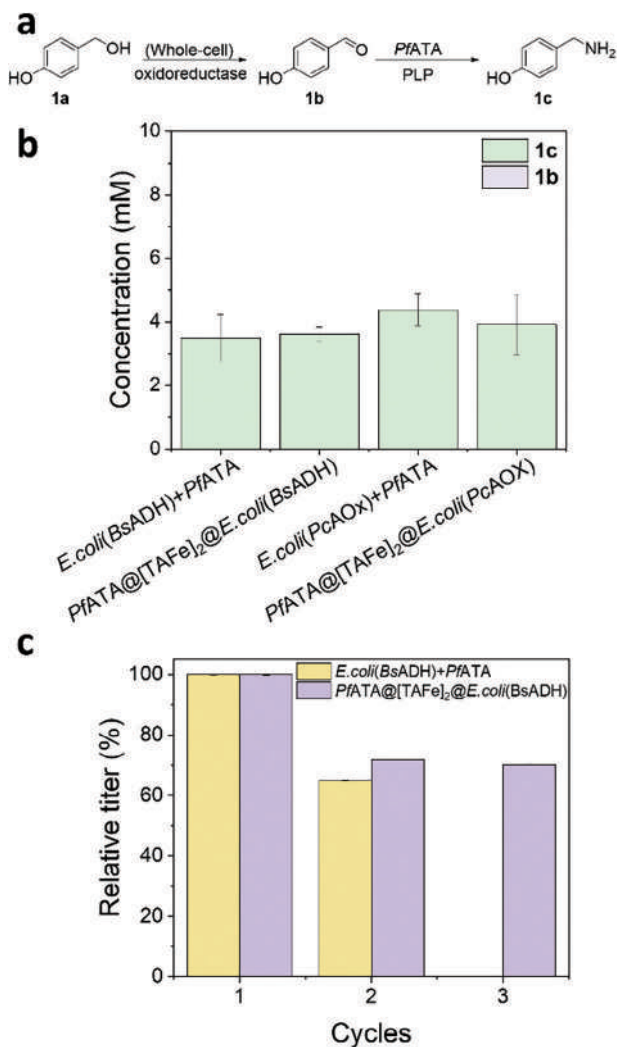


Figure 4. One-pot two-step cascade for the oxidative amination of 4-(Hydroxymethyl)phenol (1a) to 4-(Aminomethyl)phenol (1c). Reaction scheme where two oxidoreductases are employed: alcohol dehydrogenase (BsADH) and oxidase (PcAOX), in combination with one amine transaminase (PfATA). a) Titer of 4-hydroxybenzaldehyde (1b) and product (1c) achieved with different biocatalytic systems b) using 50 mM 1a and 100 mM L-Ala in 100 mM phosphate buffer at pH 7 after 16 h reaction at 25 °C with 0.40 DCW mL⁻¹ cell density. Relative titer determined in consecutive batch reaction cycles catalyzed by artificial spores (purple) and resting cells plus free PfATA (yellow) in the reaction mix described above (d). The relative titer is defined as the percentage of titer achieved in the n cycle regarding the titer in the first cycle (100%). All data are presented as the mean value and the standard deviation (error bars) of two independent experiments.

[TAFE]₂@*E. coli* mutants transformed with two different oxidoreductases; the NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* (BsADH) that requires intracellular NAD⁺ regeneration (PfATA@[TAFE]₂@*E. coli*(BsADH)), and the F101S mutant of alcohol oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* (PcAOX)^[54] that generates hydrogen peroxide intracellularly (PfATA@[TAFE]₂@*E. coli*(PcAOX)). In the case of BsADH, the host strain was *E. coli* (BL21 DE3), while PcAOX was overexpressed in *E. coli* ArcticExpress (DE3). Artificial spores were pre-

pared with these two *E. coli* strains. Using 50 mM 1a and 2 equivalents of L-Ala in 100 mM phosphate buffer at pH 8, we performed the reactions and analyzed the product profile by HPLC after 16 h. As a reference, we performed the oxidative amination cascade with an equivalent mass of resting *E. coli* cells overexpressing the corresponding oxidoreductase and free PfATA under the same reaction conditions (*E. coli*(Oxidoreductase)+PfATA) using the same enzyme loads. Figure 4b shows that all biocatalytic systems yield a similar product titer of roughly 4 mM, accumulating negligible amounts of intermediate (1b). This result suggests that the immobilization of the transaminase at the surface of the whole cell has no effect on the mass transfer of intermediates between the two cooperating biocatalysts. However, the titers obtained with this cooperative biocatalytic system are only 8% of the aromatic diol (1a) that is converted to the desired aminoalcohol (1c) regardless of the microbial formulation. Similar low yields were also reported for the bio-oxidation of *para*-substituted benzyl alcohols using *Janibacter terrae* resting whole cells.^[55] When we increase the loading of the biocatalytic artificial spores in reaction, we negligibly see an increase in the product titer (Figure S20, Supporting Information), suggesting that there are other issues beyond the cooperation between the intracellular and extracellular enzymes. We discard issues related to endogenous NAD⁺ recycling because we observed similar low substrate conversion with the systems using the NAD⁺-independent oxidase PcAOX. Therefore, 1a might face uptake limitations to reach the *E. coli* cytosol. This issue is not a consequence of the artificial coating since similarly low conversions are also found with the uncoated resting cells.

Finally, to assess the superior operational stability of coated cooperative biocatalysts (PfATA@[TAFE]₂@*E. coli*(BsADH)), we carried out consecutive batch cascade reactions to transform 1a into 1c. Figure 4c shows the relative product (1c) titers along consecutive batch reaction cycles. Resting whole cells lost their ability to perform this reaction after the second cycle, whereas the artificial spores kept 70% of their performance at cycle one after three consecutive cycles, proving the enhanced operational stability of the biocatalytic artificial spores. This superior operational stability is supported by the enhanced thermal stability reported above (see Figure 2b).

2.5. Expanding the Manufacturing of Biocatalytic Artificial Spores to Other Bacteria

To expand the artificial sporulation to other Gram-negative bacteria, we investigated if different strains of the *Gluconobacter* genus can tolerate the [TAFE]₂ coatings. We selected *Gluconobacter oxydans* (G.ox) due to their capacity to catalyze the oxidation of sugars and alcohols such as glycerol as resting whole-cell biocatalysts.^[56–58] This bio-oxidation is governed by a membrane-bound PQQ-dehydrogenase whose recombinant expression and isolation are challenging. For this reason, engineering these strains with polymeric coatings to anchor enzymes to their surface opens new avenues for cascade reactions without genetically manipulating them.

Upon encapsulating these bacteria following the same protocol we used for *E. coli*, we characterized the single-cell coating of this microorganism by TEM and CLSM analysis

(Figure 5a,b). Likewise in *E.coli*, *Gluconobacter* strains showed hair-like structures at their surfaces as a result of the $[TAFE]_2$ coatings ($[TAFE]_2 @ G.ox$) (Figure 5a, a'). To further prove the single-cell encapsulation, we used an engineered *G.ox* that over-expresses mCherry^[58] to be coated with $[TAFE]_2$ as a chassis to immobilize and display His-tagged GFP. CLSM analyses reveal how both fluorescent proteins are compartmentalized, being mCherry and His-GFP in the cytosol and surface of $[TAFE]_2 @ G.ox$, respectively (Figure 5b, b').

To demonstrate the performance of this cooperative whole-cell biocatalyst, we chose the oxidative amination of glycerol to serinol (Figure 5c) we previously reported with *G.ox* and immobilized *PfATA* entrapped into macroscopic alginate beads.^[59] To that aim $[TAFE]_2 @ G.ox$ cells were incubated with His-*PfATA*. The resulting artificial spores were mixed with 500 mM glycerol (2a) and 0.5 M L-Ala at pH 8 for 20 h, and the product outcome was analyzed by GC-FID and GC-MS (Figures S21 and S22). In this cascade, glycerol is oxidized by *G.ox* to dihydroxyacetone (DHA, 2b), which is further aminated by the surface displayed *PfATA* to serinol (2c). We found out that artificial spores achieved a serinol titer of 1.4 mM similar to that found with resting *G.ox* cells and free *PfATA* under these reaction conditions. Hence, the $[TAFE]_2$ coating is biocompatible with *G.ox* as well as with *E.coli* and serves as a chassis to display extracellular active enzymes. When $[TAFE]_2 @ G.ox$ cells were recycled in consecutive batch reactions, we observed that $[TAFE]_2$ coatings enhanced the operational stability of these biocatalysts toward the oxidation of glycerol, improving their reusability when compared with uncoated cells (Figure 5e). While uncoated cells were 10 times less efficient in the fourth cycle than in the first cycle, artificial spores kept 75% of the overall catalytic performance compared to the performance in the first cycle.

3. Conclusion

In this study, we have successfully developed and optimized a novel methodology for the fabrication of biocatalytic artificial spores as cooperative biocatalysts combining isolated extracellular enzymes with endogenous or engineered metabolism of resting whole-cells. To that aim, we exploit tannic acid complexed with iron ($[TAFE]_2$) to encapsulate Gram-negative bacteria. This coating not only provides stability to the cells but also allows functionalization of the cell surface with iron(II) complexes for subsequent enzyme immobilization (display). As far as we know this work is the first evidence of using the metal complexes of $[TAFE]_2$ as polymeric layers to site-selectively immobilize His-tagged proteins through iron-imidazol coordination complexes, enabling efficient enzyme display. Moreover, the polymeric coating increases the surface area of bacteria to anchor a higher density of displayed enzyme per cell.

Through enzyme display on the surface of the artificial spores, we fabricated a hybrid biocatalyst where an amine transaminase is immobilized on the surface of cells expressing either recombinant or endogenous dehydrogenase activities. This allowed us to perform model cascade biotransformations, showcasing the potential of these artificial spores in synthetic biology applications. The cooperative biocatalysts displayed superior operational stability compared to uncoated whole-cell biocatalysts in combination with free enzymes. Besides, we envision that the reversibility

of the artificial spores herein proven may facilitate the regeneration of the hybrid biocatalyst once it is exhausted. By their sequential desporulation in rich media, the newly grown cells can be coated again to immobilize a fresh batch of extracellular enzymes displayed at their surface. Hence, we can advance in more circular loops for the fabrication of this new biocatalyst architecture.

In our view, this study presents a robust methodology for the fabrication of artificial spores with tailored properties, paving the way for their widespread application in applied biocatalysis. Remarkably, the single-encapsulation process only relies on the chemistry of spontaneous polymerization rather than on the genetic modification of the host. Hence, we foresee new avenues for the enzyme display in microorganisms for which genetic engineering tools are scarce. Thus, these artificial biocatalytic spores can contribute to developing novel biotechnological processes, offering enhanced stability, productivity, and versatility compared to traditional biocatalytic systems.

4. Experimental Section

Cell Growth: Single colonies of *E.coli* BL21/ ArcticExpress (DE3) harboring different plasmids encoding separate proteins (Table S6) were expressed and purified by metal affinity chromatography (IMAC) as explained in the supporting information. To normalize the cell mass per volume, the cell density was calibrated by plotting the optical density (y_{OD} 600 nm) as a function of the dried cell weight (x , g_{DCW}/L). From this calibration, the following equation was obtained:

$$y_{(OD_{600nm})} = 3.900 \times (g_{DCW}/L) \quad (1)$$

The *G.ox* recombinantly expressing mCherry (*G.ox* mCherry) was generated in a previous work.^[58] The strain was maintained in glucose-agar medium (5 g L⁻¹ peptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, D-glucose g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹, pH 6.5) plates supplemented with 50 µg mL⁻¹ kanamycin.

To generate *G.ox* mCherry biomass for the microscopy experiments 3 mL precultures of glucose liquid medium (5 g L⁻¹ peptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, D-glucose g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹, pH 6.5) supplemented with 50 µg mL⁻¹ kanamycin were prepared from a single colony. The precultures were incubated at 30 °C and 200 rpm for 16 h. Cultures of 250 mL were inoculated with 6 mL of *G.ox* mCherry preculture and incubated at 30 °C and 200 rpm in 1 L flasks containing glycerol growth medium (glycerol 100 g L⁻¹, peptone 9 g L⁻¹, yeast extract 1 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0.9 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0.1 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1 g L⁻¹, pH 6.0). At an OD_{600nm} value of 1, a volume corresponding to 20 mg dry cell weight (DCW) was centrifuged for 15 min at 4800 g and 4 °C. As for *E.coli* cells, the cell density regarding DCW was calibrated and the following equation was obtained:

$$y_{(OD_{600nm})} = 4.375 \times (g_{DCW}/L) \quad (2)$$

The bacterial pellet was washed with distilled water and finally centrifuged at 4800 g at 4 °C for 15 min again, discarding the supernatant.

Single-Cell Encapsulation: This protocol was based on and optimized from Park et al.⁷ Tannic acid (5 µL, 40 mg mL⁻¹) was added to 490 µL of cells at an OD_{600 nm} of 1.8 and vortexed for 10 s. Then, 5 µL of FeCl₃·6H₂O 10 mg mL⁻¹ were added and vortexed for 10 s. 500 µL of the buffer 20 mM MOPS was added (water was used in the case of *G.ox*) the solution was centrifuged (4800 g × 5 min × 4 °C) and the supernatant was removed. The resulting pellet was resuspended in 490 µL of elix H₂O and the previous procedure was performed again up to four consecutive times. The resulting purple powder was washed with 1 mL of water three times

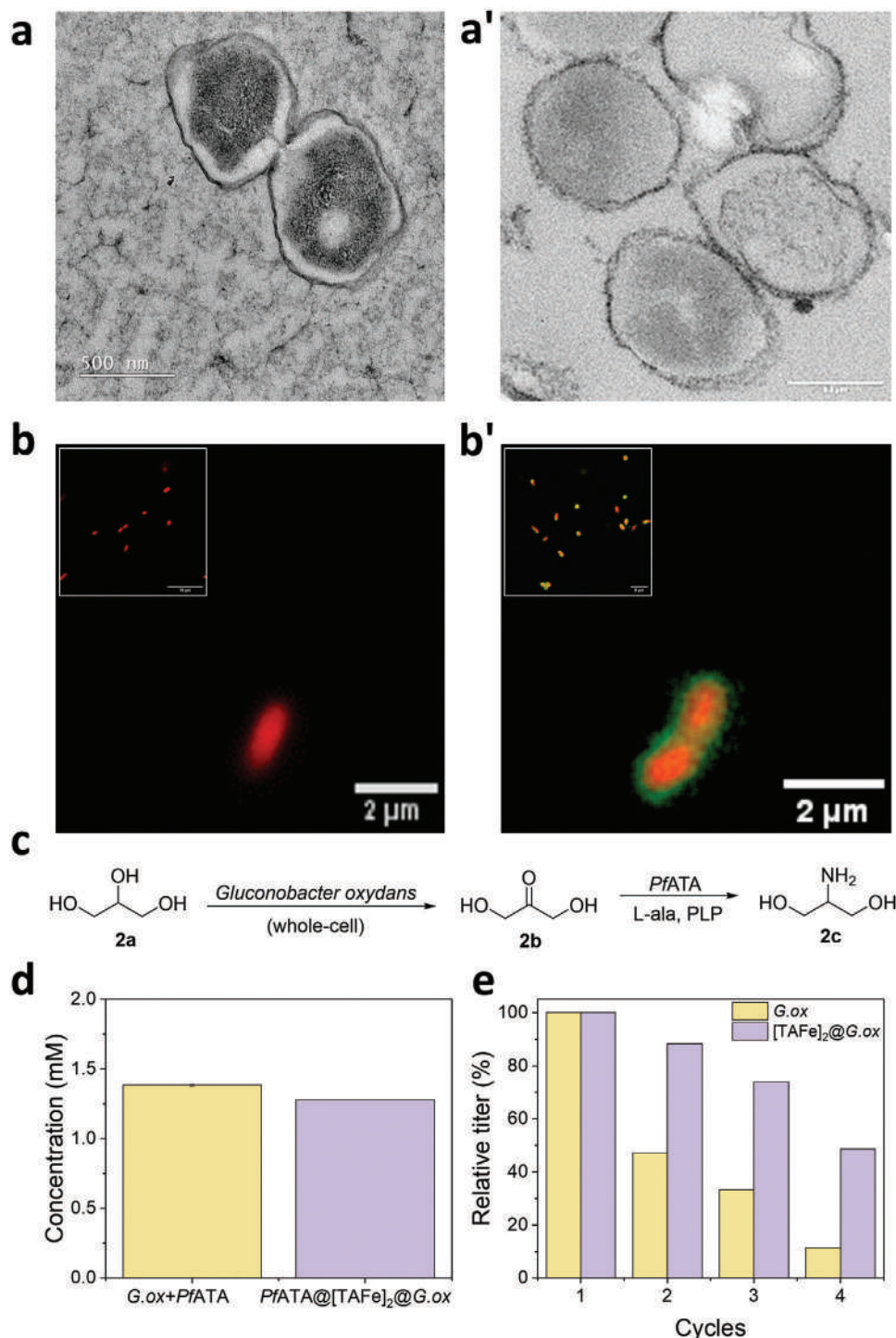


Figure 5. Manufacturing and evaluation of artificial spores composed of *Gluconobacter oxydans* (*G.ox*) coated with $[TAFE]_2$ and displaying *PfATA*. TEM images of representative uncoated a) and $[TAFE]_2$ coated (a') *G.ox* cells. CLSM images of *G.ox* overexpressing mCherry b) and coated *G.ox* overexpressing mCherry and displaying His-GFP at its surface (b'). Scheme of one-pot two-step oxidative amination of glycerol (2a) to serinol (2c) through dihydroxyacetone (2b) as intermediate c). Serinol (2c) titer achieved by the oxidative amination of 500 mM glycerol catalyzed by uncoated *G.ox* plus free *PfATA* (yellow) and *PfATA*@ $[TAFE]_2$ @*G.ox* (purple) in the presence of 500 mM L-alanine, 0.1 mM PLP in 100 mM HEPES at pH 8 d). Relative titer after consecutive batch cycles using uncoated *G.ox* (yellow) and $[TAFE]_2$ @*G.ox* (purple) as biocatalysts toward the oxidation of 500 mM glycerol under the conditions above described. The relative titer is defined as the percentage of titer achieved in the n cycle regarding the titer in the first cycle (100%) e). All data are presented as the mean value and the standard deviation (error bars) of two independent experiments.

discarding the supernatant each time. The final pellet was resuspended in 1 mL of elix H₂O and 1% BSA 1 mg mL⁻¹ was added.

GFP Immobilization on [TAFE]₂@E.coli/Bead—His-GFP: After the pure protein was obtained, the concentration of the protein was measured by Bradford assay. Sequential dilutions were performed and 100 µL of protein dissolved in 25 mM Tris-HCl, and 50 mM NaCl buffer were offered to a pellet (0.40 mg DCW) of [TAFE]₂@E.coli or 20 µL of beads. One micrometer polystyrene (PS) Ni-NTA microparticles (50 mg × mL⁻¹) from CD Bioparticles were used as control. The suspensions were incubated for 1 h at 4 °C on a rotary shaker. After incubation, three washes were carried out with 1 mL of 25 mM Tris-HCl pH 7. Each time the suspension was centrifuged at 4800 g for 2 min and the supernatant was discarded. The immobilization yield was assessed by the concentration difference of offered and recovered protein by Bradford protein assay, fluorescence measurement (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 508 nm), and flow cytometry.

His-Coh: One hundred microliters of three sequential dilutions of a known concentration of pure His-Coh (0.75, 0.50, and 0.25 mg mL⁻¹) dissolved in 25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ pH 7 were offered to a pellet (0.40 mg DCW) of [TAFE]₂@E.coli. The suspensions were incubated for 1 h at 4 °C on a rotary shaker. The immobilization yield was assessed by the concentration difference of offered and recovered protein by Bradford protein assay.

Dock-GFP: One hundred microliters of sequential dilutions of a known concentration of pure Dock-GFP 25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ pH 7 were offered to a pellet (0.40 mg DCW) of Coh-His-[TAFE]₂ displaying 0.07 mg_{His-Coh} mg_{DCW}⁻¹ in the previous buffer with the addition of 1 mM of CaCl₂. The suspensions were incubated for 1 h at 4 °C on a rotary shaker.^[46] After incubation, three washes were carried out with 1 mL of 25 mM Tris-HCl pH 7. Each time the suspension was centrifuged at 4800 g for 2 min and the supernatant was discarded. The immobilization yield was assessed by the concentration difference of offered and recovered protein by Bradford protein assay, fluorescence measurement (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 508 nm), and flow cytometry.

His-mCherry Immobilization: Five hundred microliters of 1 mg mL⁻¹ of pure protein were offered to a pellet (0.40 mg DCW) of [TAFE]₂@E.coli. The suspensions were incubated for 1 h at 4 °C on a rotary shaker. After incubation, three washes were carried out with 1 mL of 25 mM Tris-HCl pH 7. Each time, the suspension was centrifuged at 4800 g for 2 min and the supernatant was discarded. The immobilization yield was assessed by the fluorescence difference of offered and recovered protein (λ_{ex} = 561 nm, λ_{em} = 610 nm).

His-PfATA Immobilization: Four milliliters of His-PfATA crude extract was added to 2 mg of [TAFE]₂@E.coli(BsADH)/G.ox and the suspension was incubated for 1 h at 4 °C on a rotary shaker. After incubation, three washes were carried out with 1 mL of 50 mM HEPES Buffer, pH 8 + 0.1 mM PLP. Each time the suspension was centrifuged at 4800 g for 2 min and the supernatant was discarded. The resulting PfATA@[TAFE]₂@E.coli(BsADH)/G.ox pellet was stored on ice until further use.

PfATA Activity Assay: The activity of the PfATA enzyme was carried out by a colorimetric assay in a 96-well plate. The reaction mixture was 100 mM HEPES pH 8, 0.1 mM PLP, 2 mM Pyruvate, and 2 mM Phenylethylamine (PEA). Measurements were always performed in triplicate, adding 5 µL of sample and 200 µL of reaction mixture to each well. The measurement was carried out for 10 min at 30 °C in an EPOCH plate reader. One unit of enzyme (IU mL⁻¹) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 µmol of FEA to acetophenone per minute, per mL of enzyme suspension.

PfATA Stability Assay: Eighty microliters of the previously expressed and purified PfATA were offered to a pellet of [TAFE]₂@E.coli and immobilized for 1 h, shaking at 4 °C in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM PLP at pH 7. The same amount of soluble enzyme was prepared in duplicate. The samples were left at 4 °C for several days with no agitation, and the activity of the enzyme was measured by a colorimetric assay in a 96-well plate. In parallel, samples were submitted to a solvent resistance assay by incubating them in 10%, 20%, and 50% DMSO in 200 µL of 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 0.1 mM PLP at pH 7 for 16 h.

Viability Assays: Uncoated and coated cells were submitted to a thermal shock of 70 °C for 1 h in duplicate. In parallel, some uncoated and coated cells were left overnight with 20% DMSO in water and others were incubated for 3 h in 100 mM sodium acetate pH 4 buffer and 100 mM sodium bicarbonate pH 10 in duplicate. All the samples were analyzed with the LIVE/DEAD™ viability assay kit and cell viability was assessed with the following formula:

$$\text{Viability} = \frac{\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}}{\lambda_{ex} = 630 \text{ nm}} \quad (3)$$

The relative viability was calculated as the coefficient between the viability of each sample incubated at different conditions and the viability of each sample before the incubation.

4-(Aminomethyl) Phenol Synthesis: PfATA@[TAFE]₂@E.coli(BsADH) were resuspended in 3 mL of the reaction medium (100 mM sodium phosphate buffer pH 8, 0.05 M 4-(Aminomethyl)phenol, 0.1 M L-Alanine, 0.1 mM PLP). The reactions were carried out in 25 mL flasks, with shaking at 200 rpm at 30 °C. Controls were carried out with E.coli(BsADH) in the same conditions. Samples were taken periodically and analyzed by HPLC-UV/VIS.

To perform consecutive batch cycles and assess the operational stability of the biocatalysts, after a 24 h cycle, reaction media was centrifuged (4800 g × 5 min × 4 °C), the supernatant was discarded, and the pellet was recovered. The pellet was resuspended in the new reaction media. In the case of the whole cells, fresh enzyme was added to the media.

Glycerol Conversion by PfATA@[TAFE]₂@G.ox: Two milligrams of PfATA@[TAFE]₂@G.ox were resuspended in 3 mL of the reaction medium (100 mM HEPES pH 8, 0.5 M L-Alanine, 0.1 mM PLP). The reactions were carried out in 25 mL flasks, with shaking at 200 rpm at 30 °C. Controls were carried out with G.ox in the same conditions. Samples were taken periodically and analyzed by GC-FID.

Characterization: Characterization of the artificial spores was performed by the following techniques: CLSM, TEM, AFM, ICP-MS, and XPS. The methodology can be found in the Supporting Information.

Analytical Methods: HPLC-UV/VIS, GC-FID, and GC-MS techniques were used for the follow-up of the reactions. The protocols are described in the Supporting Information.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Agency of Research (AEI) (PID2021-124811OB-I00). M.I. thanks Ministerio de Ciencia e Innovación for the FPI fellowship (PRE2022-101787). DG thanks to Basque Government for the BIKAINTEK funding (019-B1-2023). L.B. and M.R. would like to thank Universidad ORT Uruguay, PEDECIBA Química, and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Grants: POS_NAC_2019_1_158182 and FMV_1_2021_1_167184) from Uruguay. The authors thank A. Orrego for his assistance in the analysis of GC-MS samples.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

F.L.G. designed the study. M.I. and M.R. performed most of the experimental work. D.G., M.I., and M.R. performed the HPLC analysis. D.S. performed the XPS and AFM analysis. M.G. performed the TEM analysis. M.I., M.R., L.B., and F.L.G. analyzed and discussed the results, and contributed to writing the manuscript. All authors edited and revised the manuscript.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords

biocatalysis, enzyme immobilization, oxidoreductases, polymer coating, transaminases

Received: April 10, 2024

Revised: May 8, 2024

Published online:

- [1] J. Toepel, R. Karande, S. Klähn, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2023**, 80, 102892.
- [2] A. P. Mulet, M. Ripoll, L. Betancor, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2023**, 11, 15765.
- [3] M. Teshima, V. P. Willers, V. Sieber, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2023**, 79, 102868.
- [4] B. J. Rasor, B. Vögeli, G. M. Landwehr, J. W. Bogart, A. S. Karim, M. C. Jewett, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, 69, 136.
- [5] N. J. Claassens, S. Burgener, B. Vögeli, T. J. Erb, A. Bar-Even, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, 60, 221.
- [6] R. Bernhardt, V. B. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98, 6185.
- [7] T. Bamba, G. Guirimand, A. Kondo, T. Hasunuma, *Curr. Op. Green. Sustain. Chem.* **2022**, 33, 100584.
- [8] L. Betancor, F. López-Gallego, *Curr. Op. Green. Sustain. Chem.* **2022**, 34, 100600.
- [9] W. Yang, M. Li, M. Wu, S. Yu, J. Zhou, *Biochem. Eng. J.* **2022**, 188, 108686.
- [10] J. Narita, K. Okano, T. Kitao, S. Ishida, T. Sewaki, M. H. Sung, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 269.
- [11] K. Naik, D. Srichandan, P. Singh, S. Mishra, **2019**, 242.
- [12] B. Davenport, S. J. Hallam, *Environ. Microbiol.* **2023**, 25, 241.
- [13] D. T. Monterrey, I. Ayuso-Fernandez, I. Oroz-Guinea, E. Garcia-Junceda, *Biotechnol. Adv.* **2022**, 60, 108016.
- [14] S. Gallus, T. Peschke, M. Paulsen, T. Burgahn, C. M. Niemeyer, K. S. Rabe, *ChemBioChem* **2020**, 21, 2126.
- [15] Z. Guoyan, A. Yingfeng, H. Zabeed, G. Qi, M. Yang, Y. Jiao, W. Li, S. Wenjing, Q. Xianghui, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 29, 179.
- [16] M. Kawada, H. Jo, A. M. Medina, S. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 16210.
- [17] H. Jo, S. Sim, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, 14, 20729.
- [18] G. Buscemi, D. Vona, P. Stufano, R. Labarile, P. Cosma, A. Agostiano, M. Trotta, G. M. Farinola, M. Grattieri, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, 14, 26631.
- [19] H. Hemmatpour, O. De Luca, D. Crestani, M. C. A. Stuart, A. Lasorsa, P. C. A. van der Wel, K. Loos, T. Giousis, V. Haddadi-Asl, P. Rudolf, *Nat. Comm.* **2023**, 14, 664.
- [20] M. A. Brzezinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 1391.
- [21] L. Gan, M. d. J. Velásquez-Hernández, A. Emmerstorfer-Augustin, P. Wied, H. Wolinski, S. D. Zilio, M. Solomon, W. Liang, C. Doonan, P. Falcaro, *Chem. Commun.* **2022**, 58, 10004.
- [22] J. H. Park, K. Kim, J. Lee, J. Y. Choi, D. Hong, S. H. Yang, F. Caruso, Y. Lee, I. S. Choi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 12420.
- [23] J. Guo, Y. Ping, H. Ejima, K. Alt, M. Meissner, J. J. Richardson, Y. Yan, K. Peter, D. von Elverfeldt, C. E. Hagemeyer, F. Caruso, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 5546.
- [24] Y. Han, Z. Lin, J. Zhou, G. Yun, R. Guo, J. J. Richardson, F. Caruso, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, 59, 15618.
- [25] H. Ejima, J. J. Richardson, K. Liang, J. P. Best, M. P. van Koeven, G. K. Such, J. Cui, F. Caruso, *Science* **2013**, 341, 154.
- [26] M. Han, W. Lei, J. Liang, H. Li, M. Hou, Z. Gao, *Carbohydr. Polym.* **2024**, 324, 121472.
- [27] R.-B. Song, Y. Wu, Z.-Q. Lin, J. Xie, C. H. Tan, J. S. C. Loo, B. Cao, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, Q. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 10516.
- [28] Z. Yi, S. Tian, W. Geng, T. Zhang, W. Zhang, Y. Huang, H.-N. Barad, G. Tian, X.-Y. Yang, *Chem.-Eur. J.* **2023**, 29, 202203662.
- [29] Z. Sun, R. Hübner, J. Li, C. Wu, *Nat. Comm.* **2022**, 13, 3142.
- [30] K. Liang, J. J. Richardson, C. J. Doonan, X. Mulet, Y. Ju, J. Cui, F. Caruso, P. Falcaro, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, 56, 8510.
- [31] K. Liang, J. J. Richardson, C. J. Doonan, X. Mulet, Y. Ju, J. Cui, F. Caruso, P. Falcaro, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 8510.
- [32] A. Espina, M. V. Cañamares, Z. Jurašková, S. Sanchez-Cortes, *ACS Omega* **2022**, 7, 27937.
- [33] W. Li, W. Bing, S. Huang, J. Ren, X. Qu, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25, 3775.
- [34] L. F. Leopold, I. S. Tóodor, Z. Diaconeasa, D. Rugină, A. Ștefancu, N. Leopold, C. Coman, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2017**, 532, 70.
- [35] R. Tantra, J. Tompkins, P. Quincey, *Colloids Surf., B* **2010**, 75, 275.
- [36] A. G. Magdalena, I. M. B. Silva, R. F. C. Marques, A. R. F. Pipi, P. N. Lisboa-Filho, M. Jafellicci, *J. Phys. Chem. Solids* **2018**, 113, 5.
- [37] B. L. Tardy, J. J. Richardson, V. Nithipat, K. Kempe, J. Guo, K. L. Cho, M. A. Rahim, H. Ejima, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2019**, 20, 1421.
- [38] J. Bolobajev, M. Trapido, A. Goi, *App. Catal. B* **2016**, 187, 75.
- [39] L. R. L. Santos, D. A. Leal, C. E. B. Marino, I. C. Riegel-Vidotti, *Mater. Today Commun.* **2022**, 31, 103730.
- [40] Y. Li, W. Jiang, R. Gao, Y. Cai, Z. Guan, X. Liao, *3 Biotech* **2018**, 8, 392.
- [41] R. Yamahara, S. Ogo, H. Masuda, Y. Watanabe, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, 284.
- [42] L. Han, Q. Liu, L. Yang, T. Ye, Z. He, L. Jia, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, 3, 3328.
- [43] N. Holten-Andersen, M. J. Harrington, H. Birkedal, B. P. Lee, P. B. Messersmith, K. Y. Lee, J. H. Waite, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, 108, 2651.
- [44] M. R. Smith, H. Gao, P. Prabhu, L. F. Bugada, C. Roth, D. Mutukuri, C. M. Yee, L. Lee, R. M. Ziff, J.-K. Lee, F. Wen, *Nat. Catal.* **2019**, 2, 809.
- [45] X. Y. Ma, B. Coleman, P. Prabhu, M. Yang, F. Wen, *ACS Synth. Biol.* **2024**, 13, 1225.
- [46] N. Zeballos, E. Diamanti, A. I. Benítez-Mateos, C. Schmidt-Dannert, F. López-Gallego, *Bioconj. Chem.* **1966**, 32, 2021.
- [47] L. K. Harris, J. A. Theriot, *Trends Microbiol.* **2018**, 26, 815.
- [48] D. Roura Padrosa, R. Alaux, P. Smith, I. Dreveny, F. López-Gallego, F. Paradisi, *Front. Bioeng. Biotech.* **2019**, 7.
- [49] C. Ceccarelli, Z.-X. Liang, M. Strickler, G. Prehna, B. M. Goldstein, J. P. Klinman, B. J. Bahnson, *Biochemistry* **2004**, 43, 5266.
- [50] F. López-Gallego, L. Yate, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 8753.
- [51] Relative Recovered activity (%) = (Measured Recovered Activity / Immobilized Activity) * 100; where immobilized activity (U) represents the initial amount of activity per mass of spores multiplied by the immobilization yield divided by 100, and measured recovered activity represents the amount of activity that is successfully recovered activity upon the immobilization process.
- [52] Immobilization Efficiency (%) = (Measured Recovered Activity / Offered Activity) * 100; where measured recovered activity and offered activity are defined in reference 45.
- [53] S. Velasco-Lozano, J. Santiago-Arcos, J. A. Mayoral, F. López-Gallego, *ChemCatChem* **2020**, 12, 3030.
- [54] C. Martin, M. Trajkovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, 59, 4869.
- [55] T. Orbeago, J. G. de Vries, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 3445.

- [56] M. Ripoll, E. Jackson, J. A. Trelles, L. Betancor, *J. Biotechnol.* **2021**, 340, 102.
- [57] M. Ripoll, J. A. Lerma-Escalera, J. R. Morones-Ramírez, L. Rios-Solis, L. Betancor, *Biotechnol. Adv.* **2023**, 65, 108127.
- [58] M. Ripoll, N. Soriano, S. Ibarburu, M. Dalies, A. P. Mulet, L. Betancor, *Polymers (Basel)* **2023**, 15, 2514.
- [59] M. Ripoll, S. Velasco-Lozano, E. Jackson, E. Diamanti, L. Betancor, F. López-Gallego, *Green Chem.* **2021**, 23, 1140.

Bibliografía

1. Bell, E. L. et al. *Biocatalysis*. *Nat. Rev. Methods Prim.* **1**, 1–21 (2021).
2. Alcántara, A. R. et al. *Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry*. *ChemSusChem* vol. 15 e202102709 at <https://doi.org/10.1002/cssc.202102709> (2022).
3. Xue, F., Li, C. & Xu, Q. *Biocatalytic approaches for the synthesis of optically pure vic-halohydrins*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 3411–3421 (2021).
4. Wohlgemuth, R. *Horizons of Systems Biocatalysis and Renaissance of Metabolite Synthesis*. *Biotechnol. J.* **13**, 1700620 (2018).
5. Faber, K. *Introduction and background information*. en *Biotransformations in Organic Chemistry* (ed. Faber, K.) 1–30 (Springer International Publishing, Cham, 2018).
6. Sheldon, R. A., Basso, A. & Brady, D. *New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy*. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 5850–5862 (2021).
7. Yi, D. et al. *Recent trends in biocatalysis*. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 8003–8049 (2021).
8. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. *Advanced Synthesis & Catalysis* vol. 343 (Springer International Publishing, Cham, 2018).
9. Cutlan, R., De Rose, S., Isupov, M. N., Littlechild, J. A. & Harmer, N. J. *Using enzyme cascades in biocatalysis: Highlight on transaminases and carboxylic acid reductases*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1868**, 140322 (2020).
10. Woodley, J. M. *New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **21**, 22–26 (2020).
11. Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K. & Bornscheuer, U. T. *Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **60**, 88–119 (2021).
12. Garzón-Posse, F., Becerra-Figueroa, L., Hernández-Arias, J. & Gamba-Sánchez, D. *Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations*. *Molecules* **23**, (2018).
13. Shanu-Wilson, J. et al. *Biotransformation: Impact and Application of Metabolism in Drug Discovery*. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 2087–2107 (2020).

14. Pinto, A., Contente, M. L. & Tamborini, L. *Advances on whole-cell biocatalysis in flow*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **25**, 100343 (2020).
15. Song, J. W., Seo, J. H., Oh, D. K., Bornscheuer, U. T. & Park, J. B. *Design and engineering of whole-cell biocatalytic cascades for the valorization of fatty acids*. *Catal. Sci. Technol.* **10**, 46–64 (2020).
16. Otles, S. & Özyurt, V. H. *Biotransformation in the production of secondary metabolites*. en *Studies in Natural Products Chemistry* vol. 68 435–457 (Elsevier B.V., 2021).
17. Sheldon, R. A. & Brady, D. *The limits to biocatalysis: Pushing the envelope*. *Chem. Commun.* **54**, 6088–6104 (2018).
18. Lin, B. & Tao, Y. *Whole-cell biocatalysts by design*. *Microb. Cell Fact.* **16**, 1–12 (2017).
19. Moens, E., Bolca, S., Possemiers, S. & Verstraete, W. *A Wake-Up Call for the Efficient Use of the Bacterial Resting Cell Process, with Focus on Low Solubility Products*. *Curr. Microbiol.* **77**, 1349–1362 (2020).
20. Žnidaršič-Plazl, P. *Biocatalytic process intensification via efficient biocatalyst immobilization, miniaturization, and process integration*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **32**, 100546 (2021).
21. Domínguez de María, P. *Grand challenges in industrial catalysis: let's put academia and industry on the same page!* *Front. Catal.* **3**, 1–3 (2024).
22. Mulet, A. P., Ripoll, M. & Betancor, L. *CRISPR Tools in Bacterial Whole-Cell Biocatalysis*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **11**, 15765–15788 (2023).
23. Yu, Q. et al. *Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: advances and prospects*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 1517–1531 (2020).
24. Watanabe, M., Matsuzawa, T. & Yaoi, K. *Rational protein design for thermostabilization of glycoside hydrolases based on structural analysis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 8677–8684 (2018).
25. Battling, S. et al. *Novel plasmid-free *Gluconobacter oxydans* strains for production of the natural sweetener 5-ketofructose*. *Microb. Cell Fact.* **19**, 1–15 (2020).
26. Riley, L. A. & Guss, A. M. *Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms*. *Biotechnol. Biofuels* **14**, 1–17 (2021).
27. Wei, J. & Li, Y. *CRISPR-based gene editing technology and its application in microbial engineering*. *Eng.*

Microbiol. **3**, 100101 (2023).

28. Guisan, J. M., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J. & Moreno-Gamero, D. *Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **35**, 100593 (2022).
29. Grunwald, P. *Immobilized biocatalysts*. *Immobil. Biocatal.* **8**, (2018).
30. Guisan, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. *Immobilization of Enzymes and Cells (Third Edition)* vol. 2100 (Springer US, New York, NY, 2020).
31. Jackson, E. et al. *Protein-templated biomimetic silica nanoparticles*. *Langmuir* **31**, 3687–3695 (2015).
32. Mihaľ, M., Červeňanský, I., Markoš, J. & Rebroš, M. *Bioproduction of phenylacetic acid in airlift reactor by immobilized *Gluconobacter oxydans**. *Chem. Pap.* **71**, 103–118 (2017).
33. Hu, Z. C., Tian, S. Y., Ruan, L. J. & Zheng, Y. G. *Repeated biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* with glycerol- and urea-feeding strategy in a bubble column bioreactor*. *Bioresour. Technol.* **233**, 144–149 (2017).
34. Dimartino, S. et al. *Flexible material formulations for 3D printing of ordered porous beds with applications in bioprocess engineering*. *Bioresour. Bioprocess.* **9**, (2022).
35. Wilson, L. et al. *Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media*. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 558–562 (2004).
36. Ripoll, M., Lerma-Escalera, J. A., Morones-Ramírez, J. R., Rios-Solis, L. & Betancor, L. *New perspectives into *Gluconobacter*-catalysed biotransformations*. *Biotechnol. Adv.* **65**, (2023).
37. Ripoll, M. et al. *Bacteria-Polymer Composite Material for Glycerol Valorization*. *Polymers (Basel)*. **15**, 1–14 (2023).
38. Wang, J. et al. *Optimization of immobilization conditions for *Lactobacillus pentosus* cells*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **43**, 1071–1079 (2020).
39. Sun, R. et al. *Preparation and characterization of pectin-alginate-based microbeads reinforced by nano montmorillonite filler for probiotics encapsulation: Improving viability and colonic colonization*. *Int. J. Biol. Macromol.* **264**, 130543 (2024).

40. del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Silica-Calcium-Alginate Hydrogels for the Co-Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase to Reduce the Glucose in Grape Must*. *Gels* **9**, (2023).
41. Li, L. et al. *Continuous L-lactic acid production from defatted rice bran hydrolysate using corn stover bagasse immobilized carrier*. *RSC Adv.* **5**, 18511–18517 (2015).
42. Hu, Z. C., Bu, J. L., Wang, R. Y., Ke, X. & Zheng, Y. G. *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.* **188**, 297–309 (2019).
43. Popkov, A. et al. *Engineering polyelectrolyte multilayer coatings as a strategy to optimize enzyme immobilization on a membrane support*. *Biochem. Eng. J.* **193**, (2023).
44. El-Shishtawy, R. M., Al Angari, Y. M., Alotaibi, M. M. & Almulaiky, Y. Q. *Acrylic fabric and nanomaterials to enhance α -amylase-based biocatalytic immobilized systems for industrial food applications*. *Int. J. Biol. Macromol.* **233**, 123539 (2023).
45. Tang, Y., Wang, P., Zeng, H. & Rui, Z. *Construction of porous chitosan macrospheres via dual pore-forming strategy as host for alkaline protease immobilization with high activity and stability*. *Carbohydr. Polym.* **305**, 120476 (2023).
46. Eş, I., Vieira, J. D. G. & Amaral, A. C. *Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2065–2082 (2015).
47. Laponi, M. J., Méndez, M. B., Trelles, J. A. & Rivero, C. W. *Cell immobilization strategies for biotransformations*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **33**, 100565 (2022).
48. Gungormusler-Yilmaz, M., Cicek, N., Levin, D. B. & Azbar, N. *Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 482–494 (2016).
49. Truong, V. K. et al. *Three-Dimensional Organization of Self-Encapsulating Gluconobacter oxydans Bacterial Cells*. *ACS Omega* **2**, 8099–8107 (2017).
50. Berillo, D., Al-Jwaid, A. & Caplin, J. *Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water*. *Polymers (Basel)*. **13**, (2021).
51. Grandi, E., Feyza Özgen, F., Schmidt, S. & Poelarends, G. J. *Enzymatic Oxy- and Amino-Functionalization in Biocatalytic Cascade Synthesis: Recent Advances and Future Perspectives*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **62**,

(2023).

52. Benítez-Mateos, A. I., Roura Padrosa, D. & Paradisi, F. *Multistep enzyme cascades as a route towards green and sustainable pharmaceutical syntheses*. *Nat. Chem.* **14**, 489–499 (2022).
53. Buller, R. et al. *From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis*. *Science* **382**, eadh8615 (2023).
54. Pfeiffer, M. & Nidetzky, B. *Biocatalytic cascade transformations for the synthesis of C-nucleosides and N-nucleoside analogs*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **79**, 102873 (2023).
55. Kuska, J. & O'Reilly, E. *Engineered biosynthetic pathways and biocatalytic cascades for sustainable synthesis*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **58**, 146–154 (2020).
56. Hooe, S. L. et al. *Multienzymatic Cascades and Nanomaterial Scaffolding—A Potential Way Forward for the Efficient Biosynthesis of Novel Chemical Products*. *Adv. Mater.* **2309963**, 1–35 (2023).
57. Terholsen, H. & Schmidt, S. *Cell-free chemoenzymatic cascades with bio-based molecules*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **85**, 103058 (2024).
58. Ripoll, M. et al. *One-pot biotransformation of glycerol into serinol catalysed by biocatalytic composites made of whole cells and immobilised enzymes*. *Green Chem.* **23**, 1140–1146 (2021).
59. Roberto, I. C., Pessoa Jr, A. & Tonso, A. *Bioreactors: Modes of operation*. en *Pharmaceutical Biotechnology: A Focus on Industrial Application* (eds. Pessoa Jr., A., Vitolo, M. & Long, P. F.) 157–179 (CRC Press, Boca Ratón, 2022).
60. Bolivar, J. M., Woodley, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. *Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization*. *Chem. Soc. Rev.* **51**, 6251–6290 (2022).
61. Stanbury, P. F., Whitaker, A. & Hall, S. J. *Design of a Fermenter*. en *Principles of Fermentation Technology* 401–485 (Elsevier, 2017).
62. Hua, X., Zhou, X., Du, G. & Xu, Y. *Resolving the formidable barrier of oxygen transferring rate (OTR) in ultrahigh-titer bioconversion/biocatalysis by a sealed-oxygen supply biotechnology (SOS)*. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1–12 (2020).
63. Zhou, X., Han, J. & Xu, Y. *Electrodialytic bioproduction of xylonic acid in a bioreactor of supplied-oxygen*

intensification by using immobilized whole-cell *Gluconobacter oxydans* as biocatalyst. *Bioresour. Technol.* **282**, 378–383 (2019).

64. Pithani, S., Karlsson, S., Emtenäs, H. & Öberg, C. T. *Using Spinchem Rotating Bed Reactor Technology for Immobilized Enzymatic Reactions: A Case Study.* *Org. Process Res. Dev.* **23**, 1926–1931 (2019).
65. Holtheuer, J. et al. *Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in a Rotating Bed Reactor.* *Molecules* **28**, 1–12 (2023).
66. Neffe-Skocińska, K., Kruk, M., Ścibisz, I. & Zielińska, D. *The Novel Strain of Gluconobacter oxydans H32 Isolated from Kombucha as a Proposition of a Starter Culture for Sour Ale Craft Beer Production.* *Appl. Sci.* **12**, (2022).
67. Choi, E. J. et al. *Fermentation characteristics and radical scavenging capacities of ginseng berry kombucha fermented by Saccharomyces cerevisiae and Gluconobacter oxydans.* *Appl. Biol. Chem.* **66**, 3–11 (2023).
68. Plekhanova, Y., Tarasov, S. & Reshetilov, A. *Use of PEDOT:PSS/Graphene/Nafion Composite in Biosensors Based on Acetic Acid Bacteria.* *Biosensors* **11**, 332 (2021).
69. Kitova, A., Tarasov, S., Plekhanova, Y., Bykov, A. & Reshetilov, A. *Direct Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by Gluconobacter oxydans Membrane Fractions in PEDOT:PSS/TEG-Modified Biosensors.* *Biosensors* **11**, 144 (2021).
70. Tarasov, S. et al. *Gluconobacter Oxydans-Based MFC with PEDOT:PSS/Graphene/Nafion Bioanode for Wastewater Treatment.* *Biosensors* **12**, 699 (2022).
71. Vishnevskaya, M. V. et al. *On the Stable Operation of a Membraneless Microbial Fuel Cell for More Than One Hundred Days.* *Nanobiotechnology Reports* **18**, 28–32 (2023).
72. Ripoll, M., Lerma-escalera, J. A., Rios-solis, L. & Betancor, L. *New perspectives into Gluconobacter - catalysed biotransformations.* **65**, (2023).
73. Qin, Z., Yu, S., Chen, J. & Zhou, J. *Dehydrogenases of acetic acid bacteria.* *Biotechnol. Adv.* **54**, 107863 (2022).
74. Dwivedi, M. *Gluconobacter.* en *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (eds. Amaran, N., Shentil Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K. & Sankaranarayanan) 521–544 (Academic Press, London, 2020).

75. He, Y. et al. *Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products*. *Front. Microbiol.* **13**, (2022).
76. Es-Sbata, I., Castro, R., Carmona-Jiménez, Y., Zouhair, R. & Durán-Guerrero, E. *Influence of Different Bacteria Inocula and Temperature Levels on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Prickly Pear Vinegar Produced by Surface Culture*. *Foods* **11**, (2022).
77. Gao, L., Liu, Y., Zhang, X. & Zhang, H. *Efficient Optimization of *Gluconobacter oxydans* Based on Protein Scaffold-Trimeric CutA to Enhance the Chemical Structure Stability of Enzymes for the Direct Production of 2-Keto-L-gulonic Acid*. *J. Chem.* **2020**, (2020).
78. Ripoll, M., Jackson, E., Trelles, J. A. & Betancor, L. *Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol*. *J. Biotechnol.* **340**, 102–109 (2021).
79. Liu, D., Ke, X., Hu, Z. C. & Zheng, Y. G. *Improvement of pyrroloquinoline quinone-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and regulation of dissolved oxygen tension for the biosynthesis of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L*. *J. Biosci. Bioeng.* **131**, 518–524 (2021).
80. Sayed, M., Pyo, S. H., Rehnberg, N. & Hatti-Kaul, R. *Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylic Acid Using *Gluconobacter oxydans**. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 4406–4413 (2019).
81. Ke, X. et al. *Synergistic improvement of PQQ-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* for the biosynthesis of miglitol precursor 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose*. *J. Biotechnol.* **300**, 55–62 (2019).
82. Liu, L., Chen, Y., Yu, S., Chen, J. & Zhou, J. *Simultaneous transformation of five vectors in *Gluconobacter oxydans**. *Plasmid* **117**, 102588 (2021).
83. Fricke, P. M. et al. *Highly tunable TetR-dependent target gene expression in the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 6835–6852 (2021).
84. Mao, X., Qian, X., Lin, J. & Wei, D. *Engineering *Gluconobacter oxydans* for Efficient production of 3,4-dihydroxybutunate or 1,2,4-butanetriol from D-xylose*. *Biochem. Eng. J.* **195**, 108936 (2023).
85. Andersen, C. M., Knudson, L. D. & Domaille, D. W. *Interfacing Whole Cell Biocatalysis with a Biocompatible Pictet-Spengler Reaction for One-Pot Syntheses of Tetrahydroisoquinolines and Tryptolines***. *ChemBioChem* **24**, 1–6 (2023).

86. Nakamura, K. et al. *Relocation of dehydroquinase dehydratase to the periplasmic space improves dehydroshikimate production with Gluconobacter oxydans strain NBRC3244*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 5883–5894 (2021).
87. Herweg, E. et al. *Production of the potential sweetener 5-ketofructose from fructose in fed-batch cultivation with Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* **259**, 164–172 (2018).
88. Siemen, A., Kosciow, K., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. *Production of 5-ketofructose from fructose or sucrose using genetically modified Gluconobacter oxydans strains*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 1699–1710 (2018).
89. Hoffmann, J. J., Hövels, M., Kosciow, K. & Deppenmeier, U. *Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing Gluconobacter strains*. *J. Biotechnol.* **307**, 164–174 (2020).
90. Adachi, O. et al. *5-Keto-D-fructose production from sugar alcohol by isolated wild strain Gluconobacter frateurii CHM 43*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1745–1747 (2020).
91. Nguyen, T. M. et al. *The 5-ketofructose reductase of gluconobacter sp. strain chm43 is a novel class in the shikimate dehydrogenase family*. *J. Bacteriol.* **203**, (2021).
92. Battling, S. et al. *Development of a novel defined minimal medium for Gluconobacter oxydans 621H by systematic investigation of metabolic demands*. *J. Biol. Eng.* **16**, 1–18 (2022).
93. Battling, S. et al. *Highly efficient fermentation of 5-keto-d-fructose with Gluconobacter oxydans at different scales*. *Microb. Cell Fact.* **21**, 1–21 (2022).
94. Ke, X. et al. *Biosynthesis of miglitol intermediate 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -l-sorbofuranose by an improved d-sorbitol dehydrogenase from Gluconobacter oxydans*. *3 Biotech* **8**, 0 (2018).
95. Ke, X. et al. *Glutamate addition improves the activity of membrane-bound sorbitol dehydrogenase in a pyrroloquinoline quinone-dependent manner: A feasible strategy for the cost-effective fermentation of Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* **84**, 1–8 (2019).
96. Hu, Z.-C. C., Zhao, Z.-Y. Y., Ke, X. & Zheng, Y.-G. G. *Repeated production of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -l-sorbofuranose by immobilized Gluconobacter oxydans cells with a strategy of in situ exhaustive cell regeneration*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **43**, 1781–1789 (2020).
97. Liu, D., Hu, Z. C., Ke, X. & Zheng, Y. G. *Breeding of Gluconobacter oxydans with high PQQ-dependent D-*

sorbitol dehydrogenase for improvement of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose production. *Biochem. Eng. J.* **161**, 107642 (2020).

98. Liu, D., Ke, X., Hu, Z. C. & Zheng, Y. G. Combinational expression of D-sorbitol dehydrogenase and pyrroloquinoline quinone increases 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose production by *Gluconobacter oxydans* through cofactor manipulation. *Enzyme Microb. Technol.* **141**, 109670 (2020).
99. Zhou, X. X., Zhou, X. X., Zhang, H., Cao, R. & Xu, Y. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of acetoin from 2,3-butanediol using a compressed oxygen supply. *Process Biochem.* **64**, 46–50 (2018).
100. Liu, F. et al. Efficient biosynthesis of (R)-mandelic acid from styrene oxide by an adaptive evolutionary *Gluconobacter oxydans* STA. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **16**, 1–14 (2023).
101. Zeng, W. et al. Efficient biosynthesis of 2-keto-D-gluconic acid by fed-batch culture of metabolically engineered *Gluconobacter japonicus*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **4**, 134–141 (2019).
102. Li, G. et al. Efficient Production of 2,5-Diketo-D-gluconic Acid by Reducing Browning Levels During *Gluconobacter oxydans* ATCC 9937 Fermentation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 1–11 (2022).
103. Son, H., Han, S. U. & Lee, K. 2,5-Diketo-D-Gluconate Hyperproducing *Gluconobacter sphaericus* SJF2-1 with Reporting Multiple Genes Encoding the Membrane-Associated Flavoprotein-Cytochrome c Complexed Dehydrogenases. *Microorganisms* **10**, 1–13 (2022).
104. Zhou, X., Huang, L., Xu, Y. & Yu, S. A two-step bioprocessing strategy in pentonic acids production from lignocellulosic pre-hydrolysate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **40**, 1581–1587 (2017).
105. Zhou, X., Shen, Y., Xu, Y. & Balan, V. Directing cell catalysis of glucose to 2-keto-d-gluconic acid using *Gluconobacter oxydans* NL71. *Process Biochem.* **94**, 365–369 (2020).
106. Kataoka, N. et al. Characterization of 3 phylogenetically distinct membrane-bound d-gluconate dehydrogenases of *Gluconobacter* spp. and their biotechnological application for efficient 2-keto-d-gluconate production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**, 681–690 (2022).
107. Dai, L., Jiang, W., Jia, R., Zhou, X. & Xu, Y. Directional enhancement of 2-keto-gluconic acid production from enzymatic hydrolysate by acetic acid-mediated bio-oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* **348**, 126811 (2022).
108. Liu, X., Wang, Z., Xiao, J., Zhou, X. & Xu, Y. Osmotic stress tolerance and transcriptome analysis of

Gluconobacter oxydans to extra-high titers of glucose. *Front. Microbiol.* **13**, 1–11 (2022).

109. Chen, Y. et al. *High-Throughput Screening of a 2-Keto-L-Gulonic Acid-Producing Gluconobacter oxydans Strain Based on Related Dehydrogenases.* *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 1–9 (2019).
110. Chen, Y. et al. *Identification of Gradient Promoters of Gluconobacter oxydans and Their Applications in the Biosynthesis of 2-Keto-L-Gulonic Acid.* *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–9 (2021).
111. Li, D., Liu, L., Qin, Z., Yu, S. & Zhou, J. *Combined evolutionary and metabolic engineering improve 2-keto-L-gulonic acid production in Gluconobacter oxydans WSH-004.* *Bioresour. Technol.* **354**, 127107 (2022).
112. Qin, Z., Chen, Y., Yu, S., Chen, J. & Zhou, J. *Engineering Gluconobacter cerinus CGMCC 1.110 for direct 2-keto-L-gulonic acid production.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **107**, 153–162 (2023).
113. Li, G. et al. *Efficient production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose in Gluconobacter oxydans ATCC9937 by mining key enzyme and transporter.* *Bioresour. Technol.* **384**, 129316 (2023).
114. Zhang, Y. et al. *Coculture of Gluconobacter oxydans and Escherichia coli for 3,4-Dihydroxybutyric Acid Production from Xylose.* *ACS Sustain. Chem. Eng.* **9**, 10809–10817 (2021).
115. Zhu, J. et al. *Identification of the enzymes responsible for 3-hydroxypropionic acid formation and their use in improving 3-hydroxypropionic acid production in Gluconobacter oxydans DSM 2003.* *Bioresour. Technol.* **265**, 328–333 (2018).
116. Hua, X., Zhang, C. H., Han, J. & Xu, Y. *pH regulatory divergent point for the selective bio-oxidation of primary diols during resting cell catalysis.* *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **15**, 1–10 (2022).
117. Kataoka, N., Naoki, K., Ano, Y., Matsushita, K. & Yakushi, T. *Development of efficient 5-ketogluconate production system by Gluconobacter japonicus.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**, 7751–7761 (2022).
118. Pyo, S. H., Park, J. H., Srebny, V. & Hatti-Kaul, R. *A sustainable synthetic route for biobased 6-hydroxyhexanoic acid, adipic acid and ϵ -caprolactone by integrating bio- And chemical catalysis.* *Green Chem.* **22**, 4450–4455 (2020).
119. Saelee, N., Cheong, L. Z. & Chaijan, M. *Optimized Acetic Acid Production by Mixed Culture of Saccharomyces cerevisiae TISTR 5279 and Gluconobacter oxydans TBRC 4013 for Mangosteen Vinegar Fermentation Using Taguchi Design and Its Physicochemical Properties.* *Foods* **12**, (2023).
120. Zhao, L., Zhu, J., Ro, K. S., Xie, J. & Wei, D. *Discovery of a novel acrylic acid formation pathway in*

Gluconobacter oxydans and its application in biosynthesis of acrylic acid from glycerol. *Process Biochem.* **118**, 182–189 (2022).

121. Pyo, S. H. et al. A facile process for adipic acid production in high yield by oxidation of 1,6-hexanediol using the resting cells of *Gluconobacter oxydans*. *Microb. Cell Fact.* **21**, 1–10 (2022).
122. Yao, R., Hou, W. & Bao, J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* **244**, 1188–1192 (2017).
123. Jin, C. et al. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. *Bioresour. Technol.* **289**, 121623 (2019).
124. Liu, X. et al. Smart removal of monosaccharide contaminants in xylo-oligosaccharide slurry using sandwich-integration bioprocess of whole-cell catalysis combined with electrodialysis separation. *Renew. Energy* **168**, 1149–1156 (2021).
125. Fricke, P. M., Hartmann, R., Wirtz, A., Bott, M. & Polen, T. Production of L-arabinonic acid from L-arabinose by the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol. Reports* **17**, 100965 (2022).
126. Hua, X. et al. A techno-practical method for overcoming the biotoxicity and volatility obstacles of butanol and butyric acid during whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1–11 (2020).
127. Stewart, K. N., Hicks, E. G. & Domaille, D. W. Merger of Whole Cell Biocatalysis with Organocatalysis Upgrades Alcohol Feedstocks in a Mild, Aqueous, One-Pot Process. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8**, 4114–4119 (2020).
128. Mihaľ, M., Červeňanský, I. & Markoš, J. Application of immersed silicone rubber membrane module for biocatalytic production of 2-phenylethanol and phenylacetic acid. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* **166**, (2021).
129. Štefuca, V., Vidová, M., Slezáková, I., Rosenberg, M. & Rebroš, M. 2-Phenylethanol biooxidation by *Gluconobacter oxydans*: influence of cultivation conditions on biomass production and biocatalytic activity of cells. *Chem. Pap.* **73**, 1813–1821 (2019).
130. Zhou, X., Zhou, X., Xu, Y. & Chen, R. R. *Gluconobacter oxydans* (ATCC 621H) catalyzed oxidation of furfural for detoxification of furfural and bioproduction of furoic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92**, 1285–1289 (2017).

131. Du, G. et al. *Environmental bio-oxidation of toxic furan by the co-recycling of waste fermented broth and rest cells*. *Biochem. Eng. J.* **176**, 108193 (2021).
132. Hua, X., Han, J., Zhou, X. & Xu, Y. *Gas pressure intensifying oxygen transfer to significantly improving the bio-oxidation productivity of whole-cell catalysis*. *AIChE J.* **69**, 1–12 (2023).
133. Hua, X., Zhang, C. H., Han, J. & Xu, Y. *A wholly biological method for galactaric acid production from pectin by the combination of enzymatic hydrolysis and resting-cell catalysis*. *Green Chem.* **24**, 5197–5203 (2022).
134. Zhou, X. X., Hua, X., Zhou, X. X. & Xu, Y. *Process for the successive production of calcium galactonate crystals by *Gluconobacter oxydans**. *Bioresour. Technol.* **261**, 458–460 (2018).
135. Zhou, X., Hua, X., Huang, L. & Xu, Y. *Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess*. *Bioresour. Technol.* **272**, 70–76 (2019).
136. Hua, X., Zhou, X. & Xu, Y. *Directed regulation of whole-cell catalysis for high-quality galactonic acid bio-preparation and characterization by Ca^{2+}* . *Fuel* **285**, 119134 (2021).
137. Habe, H. et al. *Heterologous expression of membrane-bound alcohol dehydrogenase–encoding genes for glyceric acid production using *Gluconobacter* sp. CHM43 and its derivatives*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 6749–6758 (2021).
138. Jackson, E., Ripoll, M. & Betancor, L. *Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells*. *Microbiologyopen* **8**, 1–10 (2019).
139. Hua, X., Zhou, X. & Xu, Y. *Improving techno-economics of bioproduct glycolic acid by successive recycled-cell catalysis of ethylene glycol with *Gluconobacter oxydans**. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **41**, 1555–1559 (2018).
140. Hua, X., Du, G. L. & Xu, Y. *Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer*. *Bioresour. Technol.* **283**, 326–331 (2019).
141. Hua, X., Cao, R., Zhou, X. & Xu, Y. *One-step continuous/semi-continuous whole-cell catalysis production of glycolic acid by a combining bioprocess with in-situ cell recycling and electrodialysis*. *Bioresour. Technol.* **273**, 515–520 (2019).
142. Yu, Q. et al. *A roundabout strategy for high-purity glycolic acid biopreparation via a resting cell bio-oxidation*

catalysis of ethylene glycol. Green Chem. **24**, 5142–5150 (2022).

143. Yu, Q. et al. *Tandem production of high-purity sodium glycolate via the dual purification technology of crystallization and active carbon adsorption. Chem. Eng. J.* **452**, 138994 (2023).
144. Zhou, X., Zhao, J., Zhang, X. & Xu, Y. *An eco-friendly biorefinery strategy for xylooligosaccharides production from sugarcane bagasse using cellulosic derived gluconic acid as efficient catalyst. Bioresour. Technol.* **289**, 121755 (2019).
145. Zhou, P., Yao, R., Zhang, H. & Bao, J. *Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. Biotechnol. Bioeng.* **116**, 2191–2199 (2019).
146. Zhou, X. & Xu, Y. *Integrative process for sugarcane bagasse biorefinery to co-produce xylooligosaccharides and gluconic acid. Bioresour. Technol.* **282**, 81–87 (2019).
147. Pal, P., Kumar, R. & Banerjee, S. *Purification and concentration of gluconic acid from an integrated fermentation and membrane process using response surface optimized conditions. Front. Chem. Sci. Eng.* **13**, 152–163 (2019).
148. Qin, Z. et al. *Repurposing the Endogenous Type I-E CRISPR/Cas System for Gene Repression in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. ACS Synth. Biol.* **10**, 84–93 (2021).
149. Abhilash et al. *Extraction of REEs from Blast Furnace Slag by *Gluconobacter oxydans*. Minerals* **12**, 1–9 (2022).
150. Lian, Z. et al. *Efficient aerobic fermentation of gluconic acid by high tension oxygen supply strategy with reusable *Gluconobacter oxydans* HG19 cells. Bioprocess Biosyst. Eng.* **45**, 1849–1855 (2022).
151. Aston, J. E., Thompson, V. S., Fujita, Y. & Reed, D. W. *Metabolic flux modeling of *Gluconobacter oxydans* enables improved production of bioleaching organic acids. Process Biochem.* **122**, 350–356 (2022).
152. Dai, L. et al. *Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. Ind. Crops Prod.* **189**, 115748 (2022).
153. Zhang, R., Li, F., Liu, X., Zhou, X. & Jiang, K. *Valorization of Cheese Whey Powder by Two-Step Fermentation for Gluconic Acid and Ethanol Preparation. Appl. Biochem. Biotechnol.* (2023) doi:10.1007/s12010-023-04834-x.

154. Dai, L. et al. *Low pH Stress Enhances Gluconic Acid Accumulation with Enzymatic Hydrolysate as Feedstock Using Gluconobacter oxydans*. *Fermentation* **9**, (2023).
155. Rasoulnia, P., Hajdu-Rahkama, R. & Puhakka, J. A. *High-rate and -yield continuous fluidized-bed bioconversion of glucose-to-gluconic acid for enhanced metal leaching*. *Chem. Eng. J.* **462**, (2023).
156. Cheng, L. et al. *Sequential Bioprocess with Gluconobacter oxydans and Candida tropicalis for Gluconic Acid and Single-Cell Protein Production from Enzymatic Hydrolysate*. *Fermentation* **9**, (2023).
157. Hua, X., Zhang, C. H., Han, J., Yang, F. & Xu, Y. *Bi-directional switch regulation of three metals for cleaner bio-production of gluconic acid by whole-cell catalysis*. *J. Clean. Prod.* **423**, 138786 (2023).
158. Zhang, B., Yang, H., Wang, Y. & Bao, J. *Improving the dissolved oxygen level in high solids loading cellulosic sugar acids fermentation by restructuring the biorefinery chain*. *Biochem. Eng. J.* **200**, 109111 (2023).
159. Brugnoli, M., Cantadori, E., Arena, M. P. & Gullo, M. *Oxidative fermentation of glucose and ethanol in designed media and cooked grape must by acetic acid bacteria*. *J. Agric. Food Res.* **15**, 101028 (2024).
160. Lee, D. H. et al. *Screening of Acetic Acid Bacteria Isolated from Various Sources for Use in Kombucha Production*. *Fermentation* **10**, 1–18 (2024).
161. Schueler, T. A., Schippers, A. & Goldmann, D. *Bioleaching for metals removal from mine tailings flotation fractions*. *Hydrometallurgy* **225**, 106286 (2024).
162. Han, J. et al. *In-situ sodium percarbonate assisting and intensifying the aerobic whole-cell catalysis and bio-oxidation of lignocellulosic xylose, glucose and glycerol*. *Ind. Crops Prod.* **195**, 116482 (2023).
163. Pal, P., Kumar, R., Nayak, J. & Banerjee, S. *Fermentative production of gluconic acid in membrane-integrated hybrid reactor system: Analysis of process intensification*. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **122**, 258–268 (2017).
164. Jiang, Y. et al. *Gluconic Acid Production from Potato Waste by Gluconobacter oxidans Using Sequential Hydrolysis and Fermentation*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 6116–6123 (2017).
165. Ordóñez, J. L. et al. *Effect of Gluconic Acid Submerged Fermentation of Strawberry Purée on Amino Acids and Biogenic Amines Profile*. *J. Food Process. Preserv.* **41**, e12787 (2017).
166. Zhou, X., Zhou, X., Huang, L., Cao, R. & Xu, Y. *Efficient coproduction of gluconic acid and xylonic acid from lignocellulosic hydrolysate by Zn(II)-selective inhibition on whole-cell catalysis by Gluconobacter oxydans*.

Bioresour. Technol. **243**, 855–859 (2017).

167. Zhou, X. X., Zhou, X. X., Liu, G., Xu, Y. & Balan, V. *Integrated production of gluconic acid and xylonic acid using dilute acid pretreated corn stover by two-stage fermentation*. *Biochem. Eng. J.* **137**, 18–22 (2018).
168. Banerjee, S., Kumar, R. & Pal, P. *Fermentative production of gluconic acid: A membrane-integrated Green process*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **84**, 76–84 (2018).
169. Neffe-Skocińska, K., Długosz, E., Szulc-Dąbrowska, L. & Zielińska, D. *Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **108**, 1–12 (2024).
170. Zhao, J. et al. *Mannonic acid and bio-ethanol production from konjac using a two-step bioprocess with *Candida shehatae* and *Gluconobacter oxydans**. *J. Renew. Mater.* **8**, 79–88 (2020).
171. Miao, Y., Shen, Y. & Xu, Y. *Effects of inhibitors on the transcriptional profiling of *Gluconobacter oxydans* NL71 genes after biooxidation of xylose into xylonate*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017).
172. Zhou, X., Zhou, X. & Xu, Y. *Improvement of fermentation performance of *Gluconobacter oxydans* by combination of enhanced oxygen mass transfer in compressed-oxygen-supplied sealed system and cell-recycle technique*. *Bioresour. Technol.* **244**, 1137–1141 (2017).
173. Hou, W., Zhang, M. & Bao, J. *Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids*. *Bioresour. Technol.* **264**, 395–399 (2018).
174. Zhou, X., Zhou, X., Tang, X. & Xu, Y. *Process for calcium xylonate production as a concrete admixture derived from in-situ fermentation of wheat straw pre-hydrolysate*. *Bioresour. Technol.* **261**, 288–293 (2018).
175. Zhou, X. & Xu, Y. *Eco-friendly consolidated process for co-production of xylooligosaccharides and fermentable sugars using self-providing xylonic acid as key pretreatment catalyst*. *Biotechnol. Biofuels* **12**, 1–10 (2019).
176. Cao, R. & Xu, Y. *Efficient Preparation of Xylonic Acid from Xylonate Fermentation Broth by Bipolar Membrane Electrodialysis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **187**, 396–406 (2019).
177. Hahn, T. et al. *Determining different impact factors on the xylonic acid production using *Gluconobacter oxydans* DSM 2343*. *Process Biochem.* **94**, 172–179 (2020).
178. Shen, Y., Zhou, X. & Xu, Y. *Enhancement of *Gluconobacter oxydans* Resistance to Lignocellulosic-Derived Inhibitors in Xylonic Acid Production by Overexpressing Thioredoxin*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **191**, 1072–

1083 (2020).

179. Dai, L., Jiang, W., Zhou, X. & Xu, Y. *Enhancement in xylonate production from hemicellulose pre-hydrolysate by powdered activated carbon treatment. Bioresour. Technol.* **316**, 123944 (2020).
180. He, T., Xu, C., Ding, C., Liu, X. & Gu, X. *Optimization of Specific Productivity for Xylonic Acid Production by Gluconobacter oxydans Using Response Surface Methodology. Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–9 (2021).
181. Xu, C., He, T., Zhou, X., Xu, Y. & Gu, X. *Influence of oxygen transfer and uptake rates on xylonic acid production from xylose by Gluconobacter oxydans. Biochem. Eng. J.* **176**, 108192 (2021).
182. Han, J. et al. *A cost-practical cell-recycling process for xylonic acid bioproduction from acidic lignocellulosic hydrolysate with whole-cell catalysis of Gluconobacter oxydans. Bioresour. Technol.* **333**, 125157 (2021).
183. Mao, X., Zhang, B., Zhao, C., Lin, J. & Wei, D. *Overexpression of mGDH in Gluconobacter oxydans to improve d-xylonic acid production from corn stover hydrolysate. Microb. Cell Fact.* **21**, 1–9 (2022).
184. Lv, Y., Zhou, S., Zhang, X. & Xu, Y. *A smart self-balancing biosystem with reversible competitive adsorption of in-situ anion exchange resin for whole-cell catalysis preparation of lignocellulosic xylonic acid. Bioresour. Technol.* **363**, 127998 (2022).
185. Ding, C. et al. *Oxygen mass transfer enhancement by activated carbon particles in xylose fermentation media. Bioprocess Biosyst. Eng.* **46**, 15–23 (2023).
186. Zhu, Z. et al. *An integrated process for co-producing fermentable sugars and xylonate from sugarcane bagasse based on xylonic acid assisted pretreatment. Bioresour. Technol.* **369**, 128464 (2023).
187. Jiang, W., Dai, L., Tan, X., Zhou, X. & Xu, Y. *Screening of Gluconobacter oxydans in xylonic acid fermentation for tolerance of the inhibitors formed dilute acid pretreatment. Bioprocess Biosyst. Eng.* **46**, 589–597 (2023).
188. Liu, X. et al. *Kinetic modeling of xylonic acid production by Gluconobacter oxydans: effects of hydrodynamic conditions. Bioprocess Biosyst. Eng.* **46**, 829–837 (2023).
189. Madadi, M. et al. *Holistic lignocellulosic biorefinery approach for dual production of bioethanol and xylonic acid coupled with efficient dye removal. Renew. Sustain. Energy Rev.* **185**, 113605 (2023).
190. Han, F., Huang, K., Wei, Y., Han, J. & Xu, Y. *The Mechanical Properties and Water-Reducing and Retarding Mechanism of a Xylonic Cement Admixture. Materials (Basel).* **16**, (2023).

191. Jin, H. et al. *Sustainable Bioleaching of Rare Earth Elements from Industrial Waste Materials Using Agricultural Wastes*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 15311–15319 (2019).
192. Schmitz, A. M. et al. *Generation of a *Gluconobacter oxydans* knockout collection for improved extraction of rare earth elements*. *Nat. Commun.* **12**, 1–11 (2021).
193. Alipanah, M., Reed, D., Thompson, V., Fujita, Y. & Jin, H. *Sustainable bioleaching of lithium-ion batteries for critical materials recovery*. *J. Clean. Prod.* **382**, 135274 (2023).
194. Lustri, W. R. et al. *Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications*. *Cellul. - Fundam. Asp. Curr. Trends* (2015) doi:10.5772/61797.
195. Chandrasekaran, P. T., Bari, N. K. & Sinha, S. *Enhanced bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super optimal broth*. *Cellulose* **24**, 4367–4381 (2017).
196. Bandyopadhyay, S., Saha, N. & Saha, P. *Characterization of Bacterial Cellulose Produced using Media Containing Waste Apple Juice*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **54**, 649–657 (2018).
197. Tamahkar, E., Bakhshpour, M. & Denizli, A. *Molecularly imprinted composite bacterial cellulose nanofibers for antibiotic release*. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 450–461 (2019).
198. Dikshit, P. K. & Kim, B. S. *Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization*. *Int. J. Biol. Macromol.* **153**, 902–911 (2020).
199. Du, R., Ping, W., Song, G. & Ge, J. *Ecofriendly green biosynthesis and characterization of novel bacteriocin-loaded bacterial cellulose nanofiber from *Gluconobacter cerinus* HDX-1*. *Int. J. Biol. Macromol.* **193**, 693–701 (2021).
200. Ahmed, E. F., Ali, W. S. & Heider, N. H. *Purification and Characterization of Bacterial Nanocellulose Produced by *Gluconobacter* 5AC Isolate from Apple Vinegar*. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* **7**, 2580–2585 (2023).
201. Jie, T. Y. et al. *Isolation and Identification of *Acetobacter tropicalis* From Selected Malaysian Local Fruits for Potential BC Production*. *Malaysian Appl. Biol.* **52**, 133–143 (2023).
202. Moghadami, F., Fooladi, J. & Hosseini, R. *Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q10 production*. *Folia Microbiol. (Praha)*. **64**, 471–479 (2019).
203. Moghadami, F., Hosseini, R., Fooladi, J. & Kalantari, M. *Optimization of coenzyme q10 production by*

- gluconobacter japonicus fm10* using response surface methodology. *J. Appl. Biotechnol. Reports* **8**, 172–179 (2021).
204. Dikshit, P. K. et al. Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone production. *Bioresour. Technol.* **244**, 362–370 (2017).
 205. Dikshit, P. K., Kharmawlong, G. J. & Moholkar, V. S. Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* **256**, 302–311 (2018).
 206. Stasiak-Rózańska, L., Berthold-Pluta, A. & Dikshit, P. K. Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from *gluconobacter oxydans*. *Appl. Sci.* **8**, (2018).
 207. Tanamool, V., Hongsachart, P. & Soemphol, W. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by a potential acetic acid bacteria. *Sains Malaysiana* **47**, 481–488 (2018).
 208. Poljungreed, I. & Boonyarattanakalin, S. Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only. *Lett. Appl. Microbiol.* **67**, 39–46 (2018).
 209. de la Morena, S., Acedos, M. G., Santos, V. E. & García-Ochoa, F. Dihydroxyacetone production from glycerol using *Gluconobacter oxydans*: Study of medium composition and operational conditions in shaken flasks. *Biotechnol. Prog.* **35**, 1–9 (2019).
 210. Dikshit, P. K. & Moholkar, V. S. 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* **10**, 2455–2465 (2019).
 211. Tan, J., Yang, X. & Lu, W. Research of 1,3-Dihydroxyacetone Production by Overexpressing Glycerol Transporter and Glycerol Dehydrogenase. *Trans. Tianjin Univ.* **25**, 549–558 (2019).
 212. de la Morena, S., Santos, V. E. & García-Ochoa, F. Influence of oxygen transfer and uptake rates on dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in resting cells operation. *Biochem. Eng. J.* **147**, 20–28 (2019).
 213. Jittjang, S. et al. Effect of NaCl removal from biodiesel-derived crude glycerol by ion exchange to enhance dihydroxyacetone production by *Gluconobacter thailandicus* in minimal medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **95**, 281–288 (2020).
 214. de la Morena, S., Wojtusik, M., Santos, V. E. & Garcia-Ochoa, F. Kinetic modeling of dihydroxyacetone

production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 resting cells: Effect of fluid dynamics conditions. *Catalysts* **10**, (2020).

215. Kataoka, N. et al. Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Appl. Microb. CELL Physiol. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 1227–1236 (2021).
216. Zeng, W., Shan, X., Liu, L. & Zhou, J. Efficient 1,3-dihydroxyacetone biosynthesis in *Gluconobacter oxydans* using metabolic engineering and a fed-batch strategy. *Bioresour. Bioprocess.* **9**, (2022).
217. Stasiak-Róžańska, L., Błażej, S., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A. & Lipińska, E. Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract. *Electron. J. Biotechnol.* **27**, 44–48 (2017).
218. Poljungreed, I. & Boonyarattanakalin, S. Dihydroxyacetone production by *Gluconobacter frateurii* in a minimum medium using fed-batch fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2017) doi:10.1002/jctb.5281.
219. Satirapipatkul, C., Pungrasmi, W., Nootong, K. & Wannachod, T. Production of 1,3-Dihydroxyacetone by *Gluconobacter naphelii* in Upflow Aerated Bioreactors with Agro-industrial Wastes as External Nitrogen Source. *Eng. J.* **21**, 81–92 (2017).
220. Xu, Y., Chi, P., Lv, J., Bilal, M. & Cheng, H. L-Xylo-3-hexulose, a new rare sugar produced by the action of acetic acid bacteria on galactitol, an exception to Bertrand Hudson's rule. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1865**, 129740 (2021).
221. Xu, Y. et al. Membrane-bound sorbitol dehydrogenase is responsible for the unique oxidation of D-galactitol to L-xylo-3-hexulose and D-tagatose in *Gluconobacter oxydans*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1867**, 130289 (2023).
222. Chan, E. T. S., Zhu, Y., Li, X. Z., Zhou, T. & Seah, S. Y. K. Characterization of Two Dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* Involved in the Transformation of Patulin to Ascladiol. *Toxins (Basel)*. **14**, (2022).
223. Adachi, O. et al. Membrane-bound d-mannose isomerase of acetic acid bacteria: Finding, characterization, and application. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**, 938–948 (2022).
224. Lang, W. et al. A practical approach to producing isomaltomegalosaccharide using dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**, 689–698 (2022).

225. Zou, X., Lin, J., Mao, X., Zhao, S. & Ren, Y. *Biosynthesis of L-Erythrose by Assembly of Two Key Enzymes in Gluconobacter oxydans*. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 7721–7725 (2017).
226. Burger, C. et al. *L-Erythrulose production with a multideletion strain of Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 4393–4404 (2019).
227. Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F. *Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads*. *Food Microbiol.* **65**, 95–104 (2017).
228. Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F. *Fermentation pH modulates the size distributions and functional properties of Gluconobacter albidus TMW 2.1191 levan*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017).
229. Hundschell, C. S., Braun, A., Wefers, D., Vogel, R. F. & Jakob, F. *Size-Dependent Variability in Flow and Viscoelastic Behavior of Levan Produced by Gluconobacter albidus TMW 2.1191*. *Foods* **9**, 1–10 (2020).
230. Jakob, F., Gebrande, C., Bichler, R. M. & Vogel, R. F. *Insights into the pH-dependent, extracellular sucrose utilization and concomitant levan formation by Gluconobacter albidus TMW 2.1191*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **3**, 863–873 (2020).
231. Hövels, M., Kosciow, K., Kniewel, J., Jakob, F. & Deppenmeier, U. *High yield production of levan-type fructans by Gluconobacter japonicus LMG 1417*. *Int. J. Biol. Macromol.* **164**, 295–303 (2020).
232. Hundschell, C. S., Jakob, F. & Wagemans, A. M. *Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide levan*. *Int. J. Biol. Macromol.* **161**, 398–405 (2020).
233. Hundschell, C. S., Bätther, S., Drusch, S. & Wagemans, A. M. *Osmometric and viscometric study of levan, β -lactoglobulin and their mixtures*. *Food Hydrocoll.* **101**, 105580 (2020).
234. Anguluri, K. et al. *Candidate Acetic Acid Bacteria Strains for Levan Production*. *Polymers (Basel)*. **14**, (2022).
235. Bruni, G. O., Qi, Y., Terrell, E., Dupre, R. A. & Mattison, C. P. *Characterization of Levan Fructan Produced by a Gluconobacter japonicus Strain Isolated from a Sugarcane Processing Facility*. *Microorganisms* **12**, (2024).
236. Yakushi, T. et al. *Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of Gluconobacter sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3159–3171 (2018).
237. Wang, E.-X. X. et al. *Synthetic cell–cell communication in a three-species consortium for one-step vitamin*

C fermentation. *Biotechnol. Lett.* **41**, 951–961 (2019).

- 238. Hua, X., Liu, X. L., Han, J. & Xu, Y. Reinforcing sorbitol bio-oxidative conversion with *Gluconobacter oxydans* whole-cell catalysis by acetate-assistance. *Biochem. Eng. J.* **179**, 108328 (2022).
- 239. Kim, T. S. et al. Overcoming NADPH product inhibition improves *D*-sorbitol conversion to *L*-sorbose. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
- 240. Zhou, X., Hua, X., Zhou, X., Xu, Y. & Zhang, W. Continuous co-production of biomass and bio-oxidized metabolite (sorbose) using *Gluconobacter oxydans* in a high-oxygen tension bioreactor. *Bioresour. Technol.* **277**, 221–224 (2019).
- 241. Ma, Q. et al. Integrated proteomic and metabolomic analysis of a reconstructed three-species microbial consortium for one-step fermentation of 2-keto-*L*-gulonic acid, the precursor of vitamin C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 21–31 (2019).
- 242. Azar, S. A. D. & Alemzadeh, I. *L*-sorbose production by *gluconobacter oxydans* using submerged fermentation in a bench scale fermenter. *Appl. Food Biotechnol.* **7**, 41–48 (2020).
- 243. Qin, Z. et al. A *SacB*-based system for diverse and multiple genome editing in *Gluconobacter oxydans*. *J. Biotechnol.* **338**, 31–39 (2021).
- 244. Liu, L., Zeng, W., Yu, S., Li, J. & Zhou, J. Rapid Enabling of *Gluconobacter oxydans* Resistance to High *D*-Sorbitol Concentration and High Temperature by Microdroplet-Aided Adaptive Evolution. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–12 (2021).
- 245. Nguyen, T. M. et al. Characterization of a cryptic, pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. strain CHM43. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **85**, 998–1004 (2021).
- 246. Liu, L., Chen, Y., Yu, S., Chen, J. & Zhou, J. Enhanced production of *L*-sorbose by systematic engineering of dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **7**, 730–737 (2022).
- 247. Wang, P. et al. Recent advances in biotransformation, extraction and green production of *D*-mannose. *Curr. Res. Food Sci.* **5**, 49–56 (2022).
- 248. Noman, A. E., Al-Barha, N. S. & Chen, F. Characterization of Physicochemical Properties of Melanin Produced by *Gluconobacter oxydans* FBFS 97. *Fermentation* **8**, (2022).
- 249. Ma, K. et al. Pyrroloquinoline quinone from *Gluconobacter oxydans* fermentation broth enhances

superoxide anion-scavenging capacity of Cu/Zn-SOD. *Food Chem.* **230**, 291–294 (2017).

250. Wan, H., Xia, Y., Li, J., Kang, Z. & Zhou, J. *Identification of transporter proteins for PQQ-secretion pathways by transcriptomics and proteomics analysis in Gluconobacter oxydans WSH-003.* *Front. Chem. Sci. Eng.* **11**, 72–88 (2017).
251. Ma, K., Wu, Z. Z., Wang, G. L. & Yang, X. P. *Separation and purification of pyrroloquinoline quinone from Gluconobacter oxydans fermentation broth using supramolecular solvent complex extraction.* *Food Chem.* **361**, (2021).
252. Wang, G. et al. *Bioconversion of recombinantly produced precursor peptide pqqA into pyrroloquinoline quinone (PQQ) using a cell-free in vitro system.* *Protein Expr. Purif.* **178**, 1–7 (2021).
253. Nagaki, K. et al. *Periplasmic dehydroshikimate dehydratase combined with quinate oxidation in Gluconobacter oxydans for protocatechuate production.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**, 1151–1159 (2022).
254. Noman, A. E. et al. *A novel strain of acetic acid bacteria Gluconobacter oxydans FBFS97 involved in riboflavin production.* *Sci. Rep.* **10**, 1–17 (2020).
255. Zhang, H. et al. *Production of xylitol by expressing xylitol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase from Gluconobacter thailandicus and co-biotransformation of whole cells.* *Bioresour. Technol.* **257**, 223–228 (2018).
256. Kranz, A. et al. *Global mRNA decay and 23S rRNA fragmentation in Gluconobacter oxydans 621H.* *BMC Genomics* **19**, 1–17 (2018).
257. Liu, X., Ali, A., Liu, C., Liu, Y. & Zhang, P. *The first in-depth exploration of the genome of the engineered bacterium, Gluconobacter thailandicus.* *Biotechnol. Appl. Biochem.* **69**, 1190–1198 (2022).
258. Adachi, T. et al. *Experimental and Theoretical Insights into Biocatalytic Cascade for Mediatorless Bioelectrochemical Ethanol Oxidation with Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases.* *ACS Catal.* **13**, 7955–7965 (2023).
259. Qi, X. H. et al. *Enhanced xylitol production: Expression of xylitol dehydrogenase from Gluconobacter oxydans and mixed culture of resting cell.* *J. Biosci. Bioeng.* **122**, 257–262 (2016).
260. Li, K. et al. *Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-d-gluconic acid by Gluconobacter oxydans.* *Microb. Cell Fact.* **15**, 1–10 (2016).

261. Dishisha, T., Pyo, S.-H. & Hatti-Kaul, R. *Bio-based 3-hydroxypropionic- and acrylic acid production from biodiesel glycerol via integrated microbial and chemical catalysis*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 200 (2015).
262. Kiryu, T., Kiso, T., Nakano, H. & Murakami, H. *Lactobionic and cellobionic acid production profiles of the resting cells of acetic acid bacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1712–1718 (2015).
263. Zhang, H., Shi, L., Mao, X., Lin, J. & Wei, D. *Enhancement of cell growth and glycolic acid production by overexpression of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003*. *J. Biotechnol.* **237**, 18–24 (2016).
264. Guajardo, N. & Schrebler, R. A. *Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology*. *Pharmaceutics* **16**, (2024).
265. Patil, M. D., Grogan, G., Bommarius, A. & Yun, H. *Recent advances in ω -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines*. *Catalysts* **8**, (2018).
266. Khanam, W. & Dubey, N. C. *Recent advances in immobilized ω -transaminase for chiral amine synthesis*. *Mater. Today Chem.* **24**, 100922 (2022).
267. Kelly, S. A., Mix, S., Moody, T. S. & Gilmore, B. F. *Transaminases for industrial biocatalysis: novel enzyme discovery*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 4781–4794 (2020).
268. Sato, S. *Application of glyceric acid to bio-related functional materials and improvement of microbial production*. *J. Oleo Sci.* **70**, 289–295 (2021).
269. Habe, H. et al. *Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7760–7766 (2009).
270. Grajales-Hernández, D. A. et al. *Spatial Organization of Immobilized Multienzyme Systems Improves the Deracemization of Alkyl Glyceryl Ethers*. *ACS Catal.* **13**, 15620–15632 (2023).
271. Haidar Ahmad, I. A. et al. *In Silico Method Development of Achiral and Chiral Tandem Column Reversed-phase Liquid Chromatography for Multicomponent Pharmaceutical Mixtures*. *Anal. Chem.* **94**, 4065–4071 (2022).
272. Habe, H. et al. *Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1799–1805 (2009).
273. Voitechovič, E. et al. *1,4-Benzoquinone Derivatives for Enhanced Bioelectrocatalysis by Fructose*

Dehydrogenase from Gluconobacter Japonicus : Towards Promising D-Fructose Biosensor Development. Electroanalysis **32**, 1005–1016 (2020).

274. Yan, J. et al. Engineering of glycerol utilization in *Gluconobacter oxydans* 621H for biocatalyst preparation in a low-cost way. *Microb. Cell Fact.* **17**, 1–11 (2018).
275. Chen, Y., Li, D., Shan, X., Zhou, J. & Chen, J. Characterization of a sorbose oxidase involved in the biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid from *Gluconobacter oxydans* WSH-004. *Process Biochem.* **116**, 1–7 (2022).
276. Liu, L., Zeng, W., Du, G., Chen, J. & Zhou, J. Identification of NAD-Dependent Xylitol Dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *ACS Omega* **4**, 15074–15080 (2019).
277. Schweikert, S. et al. FNR-Type Regulator GoxR of the Obligatorily Aerobic Acetic Acid Bacterium *Gluconobacter oxydans* Affects Expression of Genes Involved in Respiration and Redox Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, 1–20 (2021).
278. Schlechter, R. O. et al. Chromatic bacteria – A broad host-range plasmid and chromosomal insertion toolbox for fluorescent protein expression in bacteria. *Front. Microbiol.* **9**, 1–14 (2018).
279. Yuan, J., Wu, M., Lin, J. & Yang, L. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnol.* **16**, 42 (2016).
280. Fricke, P. M. et al. The l-rhamnose-dependent regulator RhaS and its target promoters from *Escherichia coli* expand the genetic toolkit for regulatable gene expression in the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Front. Microbiol.* **13**, (2022).
281. Peters, B. et al. Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2521–2530 (2013).
282. Kostner, D., Peters, B., Mientus, M., Liebl, W. & Ehrenreich, A. Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8341–8349 (2013).
283. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–82 (2005).
284. Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.).* **337**, 816–821 (2012).

285. Liu, G., Lin, Q., Jin, S. & Gao, C. *The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies*. *Mol. Cell* **82**, 333–347 (2022).
286. Wang, G. & Li, J. *Review, analysis, and optimization of the CRISPR Streptococcus pyogenes Cas9 system*. *Med. Drug Discov.* **9**, 100080 (2021).
287. Lunge, A., Choudhary, E., Sharma, R., Gupta, R. & Agarwal, N. *Functional understanding of CRISPR interference: its advantages and limitations for gene silencing in bacteria*. en *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* 199–218 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-818140-9.00017-9.
288. Arroyo-Olarte, R. D., Bravo Rodríguez, R. & Morales-Ríos, E. *Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond*. *Microorganisms* **9**, 844 (2021).
289. Schultenkämper, K., Brito, L. F. & Wendisch, V. F. *Impact of CRISPR interference on strain development in biotechnology*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **67**, 7–21 (2020).
290. Hochstrasser, M. L. et al. *CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6618–6623 (2014).
291. Wang, X., Li, D., Qin, Z., Chen, J. & Zhou, J. *CRISPR/Cpf1–FokI-induced gene editing in Gluconobacter oxydans*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **9**, 369–379 (2024).
292. Zhang, F. *Target Sequence Cloning Protocol*.
https://media.addgene.org/cms/filer_public/6d/d8/6dd83407-3b07-47db-8adb-4fada30bde8a/zhang-lab-general-cloning-protocol-target-sequencing_1.pdf.
293. Antoine, R. & Loch, C. *Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from Bordetella bronchiseptica with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1785–1799 (1992).
294. Soemphol, W., Adachi, O., Matsushita, K. & Toyama, H. *Distinct physiological roles of two membrane-bound dehydrogenases responsible for D-sorbitol oxidation in Gluconobacter frateurii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 842–850 (2008).
295. Matsumoto, N. et al. *A Single-Nucleotide Insertion in a Drug Transporter Gene Induces a Thermotolerance Phenotype in Gluconobacter frateurii by Increasing the NADPH/NADP Ratio via Metabolic Change*. (2018) doi:10.1128/AEM.
296. Fricke, P. M. et al. *A tunable l-arabinose-inducible expression plasmid for the acetic acid bacterium*

Gluconobacter oxydans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 9267–9282 (2020).

297. Toyama, H., Soemphol, W., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. *Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant gluconobacter frateurii isolated from Thailand. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1120–1129 (2005).
298. Lammens, E. M., Putzeys, L., Boon, M. & Lavigne, R. *Sourcing Phage-Encoded Terminators Using ONT-cappable-seq for SynBio Applications in Pseudomonas. ACS Synth. Biol.* **12**, 1415–1423 (2023).
299. Sette, M., Johnson, L. A., Jimenez, R. & Mulder, F. A. A. *Backbone ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of the 27kDa fluorescent protein mCherry. Biomol. NMR Assign.* **17**, 243–247 (2023).
300. Chaurasia, R., Liang, C., How, K., Vieira, D. S. & Vinetz, J. M. *Production and Purification of Cysteine-Rich Leptospiral Virulence-Modifying Proteins with or Without mCherry Fusion. Protein J.* **42**, 792–801 (2023).
301. Pena, M. M. et al. *mCherry fusions enable the subcellular localization of periplasmic and cytoplasmic proteins in Xanthomonas sp. PLoS One* **15**, (2020).
302. Teh, M. Y. et al. *An Expanded Synthetic Biology Toolkit for Gene Expression Control in Acetobacteraceae. ACS Synth. Biol.* **8**, 708–723 (2019).
303. Habe, H. et al. *Use of a Gluconobacter frateurii mutant to prevent dihydroxyacetone accumulation during glyceric acid production from glycerol. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2330–2 (2010).
304. Meziadi, A., Greschner, A. A. & Gauthier, M. A. *Microwave-Induced Transient Heating Accelerates Protein PEGylation. Biomacromolecules* **24**, 2856–2863 (2023).
305. Jayakumar, P., Thomas, S. A., Brown, S. P. & Kümmerli, R. *Collective decision-making in Pseudomonas aeruginosa involves transient segregation of quorum-sensing activities across cells. Curr. Biol.* **32**, 5250–5261.e6 (2022).
306. Buljubašić, M. et al. *RecBCD- RecFOR-independent pathway of homologous recombination in Escherichia coli. DNA Repair (Amst).* **83**, (2019).
307. Laureti, L., Lee, L., Philippin, G., Kahi, M. & Pagès, V. *Single strand gap repair: The presynaptic phase plays a pivotal role in modulating lesion tolerance pathways. PLoS Genet.* **18**, 1–20 (2022).
308. Pagès, V. *Single-strand gap repair involves both RecF and RecBCD pathways. Curr. Genet.* **62**, 519–521 (2016).

309. Standage-Beier, K., Zhang, Q. & Wang, X. *Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases*. *ACS Synth. Biol.* **4**, 1217–25 (2015).
310. Li, K., Cai, D., Wang, Z., He, Z. & Chen, S. *Development of an Efficient Genome Editing Tool in Bacillus licheniformis Using CRISPR-Cas9 Nickase*. (2018) doi:10.1128/AEM.
311. Tao, X., Xu, T., Kempfer, M. L., Liu, J. & Zhou, J. *Precise promoter integration improves cellulose bioconversion and thermotolerance in Clostridium cellulolyticum*. *Metab. Eng.* **60**, 110–118 (2020).
312. Xu, T. et al. *Efficient genome editing in clostridium cellulolyticum via CRISPR-Cas9 nickase*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4423–4431 (2015).
313. Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L. & Yang, S. *CRISPR-Cas9 D10A Nickase-Assisted Genome Editing in Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, 1–14 (2017).
314. Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. *L-sorbose reductase and its transcriptional regulator involved in L-sorbose utilization of Gluconobacter frateurii*. *J. Bacteriol.* **189**, 4800–4808 (2007).
315. Hanahan, D. *Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids*. *J. Mol. Biol.* vol. 166 (1983).
316. Martin, C. K. A. & Perlman, D. *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.* **3**, 91–95 (1976).
317. Park, Y. M., Choi, E. S. & Rhee, S.-K. K. *Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells immobilized in calcium alginate*. *Biotechnol. Lett.* **16**, 345–348 (1994).
318. Hekmat, D., Bauer, R. & Neff, V. *Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* **42**, 71–76 (2007).
319. Lidia, S. R. & Stanisław, B. *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.* **235**, 1125–1132 (2012).
320. Wu, J., Wang, J. Le, Li, M. H., Lin, J. P. & Wei, D. Z. *Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by Gluconobacter oxydans using response surface methodology*. *Bioresour. Technol.* **101**,

8936–8941 (2010).

321. Raška, J., Skopal, F., Komers, K. & Machek, J. *Kinetics of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone by immobilized Gluconobacter oxydans and effect of reaction conditions*. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **72**, 1269–1283 (2007).
322. Shiraishi, F. et al. *Characterization of production of free gluconic acid by Gluconobacter suboxydans adsorbed on ceramic honeycomb monolith*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1413–1418 (1989).
323. Dikshit, P. K., Padhi, S. K. & Moholkar, V. S. *Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone production*. *Bioresour. Technol.* **244**, 362–370 (2017).
324. Dikshit, P. K. & Moholkar, V. S. *Optimization of 1,3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized Gluconobacter oxydans MTCC 904*. *Bioresour. Technol.* **216**, 1058–1065 (2016).
325. Trelles, J. A. & Rivero, C. W. *Whole Cell Entrapment Techniques*. en *Immobilization of Enzymes and Cells* (eds. Guisan, J. M., Bolivar, J. M., López-Gallego, F. & Rocha-Martín, J.) 385–394 (Springer US, New York, NY, 2020). doi:10.1007/978-1-0716-0215-7_25.
326. Zhang, B. et al. *Bead-immobilized Pseudomonas stutzeri Y2 prolongs functions to degrade s-triazine herbicides in industrial wastewater and maize fields*. *Sci. Total Environ.* **731**, 139183 (2020).
327. Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Hamdi, M. & Li, H. Z. *Mineral pollutants removal through immobilized microalgae-bacterial flocs in a multitrophic microreactor*. *Environ. Technol. (United Kingdom)* **41**, 1912–1922 (2020).
328. Schlieker, M. & Vorlop, K.-D. *A Novel Immobilization Method for Entrapment: LentiKats®*. en *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells* (ed. Guisán, J. M.) 333–343 (Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006). doi:10.1007/978-1-59745-053-9_29.
329. Dolejš, I. et al. *Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using immobilized clostridium butyricum*. *Catalysts* **9**, 1–13 (2019).
330. Yang, S. Y. et al. *Production of glutaric acid from 5-aminovaleric acid by robust whole-cell immobilized with polyvinyl alcohol and polyethylene glycol*. *Enzyme Microb. Technol.* **128**, 72–78 (2019).
331. Hou, Z. et al. *Production of 2-keto-gluconic acid from glucose by immobilized Pseudomonas plecoglossicida resting cells*. *3 Biotech* **10**, 1–9 (2020).

332. Tuyen, N. V., Ryu, J. H., Kim, H. G. & Ahn, D. H. *Anammox Bacteria Immobilization Using Polyvinyl Alcohol/Sodium Alginate Crosslinked with Sodium Sulfate*. *J. Environ. Eng.* **146**, (2020).
333. Ricardi, N. C. et al. *Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology*. *Food Chem.* **246**, 343–350 (2018).
334. Correa, S. et al. *Design of stable magnetic hybrid nanoparticles of Si-entrapped HRP*. *PLoS One* **14**, 1–19 (2019).
335. Zhai, R., Chen, X., Jin, M. & Hu, J. *Synthesis of a polydopamine nanoparticle/bacterial cellulose composite for use as a biocompatible matrix for laccase immobilization*. *Cellulose* **26**, 8337–8349 (2019).
336. López-Gallego, F., Jackson, E. & Betancor, L. *Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells*. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 17841–17849 (2017).
337. Etcheverry, M., Cappa, V., Trelles, J. & Zanini, G. *Montmorillonite-alginate beads: Natural mineral and biopolymers based sorbent of paraquat herbicides*. *J. Environ. Chem. Eng.* **5**, 5868–5875 (2017).
338. Sezen, S., Thakur, V. K. & Ozmen, M. M. *Highly effective covalently crosslinked composite alginate cryogels for cationic dye removal*. *Gels* **7**, 1–13 (2021).
339. Xu, B. T. et al. *Nanoclay-reinforced alginate aerogels: preparation and properties*. *RSC Adv.* **14**, 954–962 (2024).
340. Bera, H., Abbasi, Y. F. & Thakur, A. *Curdlan/Clay Nanocomposite-Reinforced Alginate Beads as Drug Carriers*. *J. Polym. Environ.* **32**, 854–869 (2024).
341. Meftah Kadmiri, I. et al. *Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation*. *Curr. Microbiol.* **78**, 86–94 (2021).
342. Marangoni Júnior, L., da Silva, R. G., Anjos, C. A. R., Vieira, R. P. & Alves, R. M. V. *Effect of low concentrations of SiO₂ nanoparticles on the physical and chemical properties of sodium alginate-based films*. *Carbohydr. Polym.* **269**, (2021).
343. Hou, X. et al. *Effect of SiO₂ nanoparticle on the physical and chemical properties of eco-friendly agar/sodium alginate nanocomposite film*. *Int. J. Biol. Macromol.* **125**, 1289–1298 (2019).
344. Zhang, X., Huang, C., Zhao, Y. & Jin, X. *Preparation and characterization of nanoparticle reinforced alginate fibers with high porosity for potential wound dressing application*. *RSC Adv.* **7**, 39349–39358 (2017).

345. Mishra, A., Pandey, V. K., Shankar, B. S. & Melo, J. S. *Spray drying as an efficient route for synthesis of silica nanoparticles-sodium alginate biohybrid drug carrier of doxorubicin. Colloids Surfaces B Biointerfaces* **197**, 111445 (2021).
346. Feng, J. & Qian, S. *Nanotechnology in Construction for Circular Economy*. vol. 356 (Springer Nature Singapore, Singapore, 2023).
347. Haffner, F. B. & Pasc, A. *Freeze-dried alginate-silica microparticles as carriers of probiotic bacteria in apple juice and beer. Lwt* **91**, 175–179 (2018).
348. Haffner, F. B., Van De Wiele, T. & Pasc, A. *Original behavior of: L. rhamnosus GG encapsulated in freeze-dried alginate-silica microparticles revealed under simulated gastrointestinal conditions. J. Mater. Chem. B* **5**, 7839–7847 (2017).
349. Simó, G., Vila-Crespo, J., Fernández-Fernández, E., Ruipérez, V. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Highly Efficient Malolactic Fermentation of Red Wine Using Encapsulated Bacteria in a Robust Biocomposite of Silica-Alginate. J. Agric. Food Chem.* **65**, 5188–5197 (2017).
350. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Effect of stressful malolactic fermentation conditions on the operational and chemical stability of silica-alginate encapsulated Oenococcus oeni. Food Chem.* **276**, 643–651 (2019).
351. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Silica–alginate-encapsulated bacteria to enhance malolactic fermentation performance in a stressful environment. Aust. J. Grape Wine Res.* **23**, 342–349 (2017).
352. Rodríguez-Nogales, J. M. et al. *Evaluating the influence of simultaneous inoculation of SiO₂-alginate encapsulated bacteria and yeasts on volatiles, amino acids, biogenic amines and sensory profile of red wine with lysozyme addition. Food Chem.* **327**, (2020).
353. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Malolactic fermentation induced by silica-alginate encapsulated Oenococcus oeni with different inoculation regimes. Aust. J. Grape Wine Res.* **25**, 165–172 (2019).
354. Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J. & Rodríguez-Nogales, J. M. *Continuous malolactic fermentation of red wine in a reactor using silica-alginate encapsulated Oenococcus oeni. Food Bioprod. Process.* **134**, 202–209 (2022).
355. Wang, L., Zhang, B. B., Yang, X. Y. & Su, B. L. *Alginate@polydopamine@SiO₂ microcapsules with controlled*

- porosity for whole-cell based enantioselective biosynthesis of (S)-1-phenylethanol. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **214**, 112454 (2022).
356. Lu, A., Williams, R. O. & Maniruzzaman, M. 3D printing of biologics—what has been accomplished to date? *Drug Discov. Today* **29**, 103823 (2024).
 357. Shen, J., Zhang, S., Fang, X. & Salmon, S. *Advances in 3D Gel Printing for Enzyme Immobilization*. *Gels* **8**, (2022).
 358. Jeon, Y. et al. 3D Printed Bioresponsive Devices with Selective Permeability Inspired by Eggshell Membrane for Effective Biochemical Conversion. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 30112–30119 (2020).
 359. Condi Mainardi, J. et al. 3D bioprinting of hydrogel/ceramic composites with hierarchical porosity. *J. Mater. Sci.* **57**, 3662–3677 (2022).
 360. Zhao, T., Liu, Y., Wu, Y., Zhao, M. & Zhao, Y. Controllable and biocompatible 3D bioprinting technology for microorganisms: Fundamental, environmental applications and challenges. *Biotechnol. Adv.* **69**, 108243 (2023).
 361. Pose-Boirazian, T., Martínez-Costas, J. & Eibes, G. 3D Printing: An Emerging Technology for Biocatalyst Immobilization. *Macromol. Biosci.* **22**, (2022).
 362. Li, Y. et al. Material extrusion-based 3D printing for the fabrication of bacteria into functional biomaterials: The case study of ammonia removal application. *Addit. Manuf.* **60**, 103268 (2022).
 363. Yoon, S. W. et al. 3D-printed *Chlorella vulgaris* biocarriers: A novel approach to wastewater treatment. *J. Water Process Eng.* **57**, 104711 (2024).
 364. Schaffner, M., Rühs, P. A., Coulter, F., Kilcher, S. & Studart, A. R. 3D printing of bacteria into functional complex materials. *Sci. Adv.* **3**, (2017).
 365. Li, K. et al. Waterborne Polyurethane Acrylates Preparation towards 3D Printing for Sewage Treatment. *Materials (Basel)*. **15**, (2022).
 366. Liu, Y. et al. 3D printed lactic acid bacteria hydrogel: cell release kinetics and stability. *Food Sci. Hum. Wellness* **12**, 477–487 (2023).
 367. Dubbin, K. et al. Projection Microstereolithographic Microbial Bioprinting for Engineered Biofilms. *Nano Lett.* **21**, 1352–1359 (2021).

368. Liu, X. et al. *3D Printing of Living Responsive Materials and Devices*. *Adv. Mater.* **30**, 1–9 (2018).
369. Freyman, M. C., Kou, T., Wang, S. & Li, Y. *3D printing of living bacteria electrode*. *Nano Res.* **13**, 1318–1323 (2020).
370. Belgrano, F. dos S., Diegel, O., Pereira, N. & Hatti-Kaul, R. *Cell immobilization on 3D-printed matrices: A model study on propionic acid fermentation*. *Bioresour. Technol.* **249**, 777–782 (2018).
371. Chacón, S. J., Matias, G., Ezeji, T. C., Maciel Filho, R. & Mariano, A. P. *Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates*. *Bioresour. Technol.* **321**, (2021).
372. Johnston, T. G. et al. *Compartmentalized microbes and co-cultures in hydrogels for on-demand bioproduction and preservation*. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).
373. Cui, Z., Feng, Y., Liu, F., Jiang, L. & Yue, J. *3D Bioprinting of Living Materials for Structure-Dependent Production of Hyaluronic Acid*. *ACS Macro Lett.* **11**, 452–459 (2022).
374. Fidaleo, M., Bortone, N., Schulte, M. & Flickinger, M. C. *Ink-jet printing of *Gluconobacter oxydans*: Micropatterned coatings as high surface-to-volume ratio bio-reactive coatings*. *Coatings* **4**, 1–17 (2014).
375. Wu, F. & Liu, J. *Decorated bacteria and the application in drug delivery*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **188**, 114443 (2022).
376. Feng, J., Deng, Q., Han, S. & Ni, H. *Use of nanoparticle-coated bacteria for the bioremediation of organic pollution : A mini review*. *Chemosphere* **313**, 137391 (2023).
377. Kim, B. J., Cho, H., Park, J. H., Mano, J. F. & Choi, I. S. *Strategic Advances in Formation of Cell-in-Shell Structures: From Syntheses to Applications*. *Adv. Mater.* **30**, 1–14 (2018).
378. Fan, G., Cottet, J., Rodriguez-Otero, M. R., Wasuwanich, P. & Furst, A. L. *Metal-Phenolic Networks as Versatile Coating Materials for Biomedical Applications*. *ACS Appl. Bio Mater.* **5**, 4687–4695 (2022).
379. Taghizadeh, S. M. et al. *Efficiency of magnetic immobilization for recombinant *Pichia pastoris* cells harvesting over consecutive production cycles*. *Sep. Sci. Technol.* **58**, 420–434 (2023).
380. Seifi, M. M., Iranmanesh, E., Asadollahi, M. A. & Arpanaei, A. *Biotransformation of benzaldehyde into *l*-phenylacetylcarbinol using magnetic nanoparticles-coated yeast cells*. *Biotechnol. Lett.* **42**, 597–603 (2020).

381. Pires-Santos, M., Nadine, S. & Mano, J. F. *Unveiling the Potential of Single-Cell Encapsulation in Biomedical Applications: Current Advances and Future Perspectives*. *Small Sci.* **2300332**, (2024).
382. Lin, S. et al. *Surface-modified bacteria: synthesis, functionalization and biomedical applications*. *Chem. Soc. Rev.* **52**, 6617–6643 (2023).
383. Jiménez-Jiménez, C., Moreno, V. M. & Vallet-Regí, M. *Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy*. *Nanomaterials* **12**, 1–24 (2022).
384. Joudeh, N. & Linke, D. *Nanoparticle classification , physicochemical properties , characterization , and applications : a comprehensive review for biologists*. *J. Nanobiotechnology* 1–29 (2022) doi:10.1186/s12951-022-01477-8.
385. Firoozi, F. R. et al. *Application of magnetic immobolization for ethanol biosynthesis using Saccharomyces cerevisiae*. *Sep. Sci. Technol.* **57**, 777–787 (2022).
386. Taghizadeh, S. M. et al. *Magnetic immobilization of pichia pastoris cells for the production of recombinant human serum albumin*. *Nanomaterials* **10**, 1–12 (2020).
387. Wang, Q. et al. *Effective degradation of Di-n-butyl phthalate by reusable, magnetic Fe₃O₄ nanoparticle-immobilized Pseudomonas sp. W1 and its application in simulation*. *Chemosphere* **250**, 126339 (2020).
388. Wang, X. N., Niu, M. T., Fan, J. X., Chen, Q. W. & Zhang, X. Z. *Photoelectric Bacteria Enhance the in Situ Production of Tetrodotoxin for Antitumor Therapy*. *Nano Lett.* **21**, 4270–4279 (2021).
389. Pu, F. & Ren, J. *Robust and versatile cell factory based on artificial spores*. *Chem Catal.* **2**, 2443–2445 (2022).
390. Jang, H. & Park, J. H. *Artificial Spores: Bioinspired Architecture of Living Cells with Cytocompatible Nanoshells*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **39**, 845–846 (2018).
391. Li, W. et al. *Manganese Dioxide Nanozymes as Responsive Cytoprotective Shells for Individual Living Cell Encapsulation*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 13661–13665 (2017).
392. Youn, W. et al. *Single-Cell Nanoencapsulation: From Passive to Active Shells*. *Adv. Mater.* **32**, 1–17 (2020).
393. Yuan, Y., Yin, M., Zhai, Q. & Chen, M. *The encapsulation strategy to improve the survival of probiotics for food application: From rough multicellular to single-cell surface engineering and microbial mediation*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **64**, 2794–2810 (2024).

394. Han, J., McClements, D. J., Liu, X. & Liu, F. *Oral delivery of probiotics using single-cell encapsulation. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **23**, 1–32 (2024).
395. Lee, H. et al. *Cell-in-Catalytic-Shell Nanoarchitectonics: Catalytic Empowerment of Individual Living Cells by Single-Cell Nanoencapsulation. Adv. Mater.* **34**, 1–9 (2022).
396. Belluati, A., Harley, I., Lieberwirth, I. & Bruns, N. *An Outer Membrane-Inspired Polymer Coating Protects and Endows Escherichia coli with Novel Functionalities.* **2303384**, 1–8 (2023).
397. Röllig, R., Plikat, C. & Ansorge-Schumacher, M. B. *Efficient and Selective Carboligation with Whole-Cell Biocatalysts in Pickering Emulsion. Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 12960–12963 (2019).
398. Sun, Z., Hübner, R., Li, J. & Wu, C. *Artificially sporulated Escherichia coli cells as a robust cell factory for interfacial biocatalysis. Nat. Commun.* **13**, 3142 (2022).
399. Ortiz, C., Jackson, E. & Betancor, L. *Immobilization and stabilization of enzymes using biomimetic silicification reactions. J. Sol-Gel Sci. Technol.* **102**, 86–95 (2022).
400. Álvarez, E. et al. *Nanoantibiotics based in mesoporous silica nanoparticles: New formulations for bacterial infection treatment. Pharmaceutics* **13**, 1–26 (2021).
401. Selvarajan, V., Obuobi, S. & Ee, P. L. R. *Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections. Front. Chem.* **8**, 1–16 (2020).
402. Ko, E. H. et al. *Bioinspired, cytocompatible mineralization of silica-titania composites: Thermoprotective nanoshell formation for individual chlorella cells. Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 12279–12282 (2013).
403. Niu, X. et al. *‘Fish-in-net’, a novel method for cell immobilization of Zymomonas mobilis. PLoS One* **8**, (2013).
404. Correa, S., Ripoll, M., Jackson, E., Grazú, V. & Betancor, L. *Stabilization of b-Glucuronidase by Immobilization in Magnetic-Silica Hybrid Supports. Catalysts* **10**, 669 (2020).
405. Velasco-Lozano, S., Jackson, E., Ripoll, M., López-Gallego, F. & Betancor, L. *Stabilization of ω -transaminase from Pseudomonas fluorescens by immobilization techniques. Int. J. Biol. Macromol.* **164**, 4318–4328 (2020).
406. Cazaban, D., Illanes, A., Wilson, L. & Betancor, L. *Bio-inspired silica lipase nanobiocatalysts for the synthesis of fatty acid methyl esters. Process Biochem.* **74**, 86–93 (2018).

407. Torres-Herrero, B. et al. *Remote Activation of Enzyme Nanohybrids for Cancer Prodrug Therapy Controlled by Magnetic Heating*. *ACS Nano* **17**, 12358–12373 (2023).
408. Qu, B. & Luo, Y. *Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review*. *Int. J. Biol. Macromol.* **152**, 437–448 (2020).
409. Eshkol-Yogev, I., Gilboa, E., Giladi, S. & Zilberman, M. *Formulation - Properties effects of novel dual composite hydrogels for use as medical sealants*. *Eur. Polym. J.* **152**, 110470 (2021).
410. Li, S., Jiang, C., Chen, X., Wang, H. & Lin, J. *Lactobacillus casei immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt*. *Food Res. Int.* **64**, 822–830 (2014).
411. Su, M. et al. *Effects of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorous release and sorption on montmorillonite*. *Appl. Clay Sci.* **181**, (2019).
412. Ruan, B. et al. *Adhesion of Sphingomonas sp. GY2B onto montmorillonite: A combination study by thermodynamics and the extended DLVO theory*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **192**, 111085 (2020).
413. Betancor, L. & Luckarift, H. R. *Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis*. *Trends Biotechnol.* **26**, 566–572 (2008).
414. El-Taboni, F. et al. *Fluorescence Spectroscopy Analysis of the Bacteria-Mineral Interface: Adsorption of Lipopolysaccharides to Silica and Alumina*. *Langmuir* **36**, 1623–1632 (2020).
415. Kim, H. J., Kim, J. H. & Shin, C. S. *Conversion of d-sorbitol to l-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells co-immobilized with oxygen-carriers in alginate beads*. *Process Biochem.* **35**, 243–248 (1999).
416. Chouhan, G. & Bala Murali, G. *Designs, advancements, and applications of three-dimensional printed gyroid structures: A review*. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part E J. Process Mech. Eng.* **238**, 965–987 (2024).
417. Li, Z. et al. *Bacterial biofilms as platforms engineered for diverse applications*. *Biotechnol. Adv.* **57**, 107932 (2022).
418. Dikshit, P. K. & Moholkar, V. S. *Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of Gluconobacter oxydans MTCC 904*. *Bioresour. Technol.* **216**, 948–957 (2016).
419. Setlow, P. & Christie, G. *New Thoughts on an Old Topic: Secrets of Bacterial Spore Resistance Slowly Being Revealed*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **87**, (2023).

420. Iturralde, M. et al. *Artificial Spores as Multi-Functional Biocatalysts to Perform Biosynthetic Cascades*. *Adv. Funct. Mater.* **2406097**, 1–14 (2024).
421. Park, J. H. et al. *A cytoprotective and degradable metal-polyphenol nanoshell for single-cell encapsulation*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 12420–12425 (2014).
422. Zhou, J. et al. *Three multi-enzyme cascade pathways for conversion of C1 to C2/C4 compounds*. *Chem Catal.* **2**, 2675–2690 (2022).
423. Zhang, J. et al. *Cascade Biocatalysis for Regio- And Stereoselective Aminohydroxylation of Styrenyl Olefins to Enantiopure Arylglycinols*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8**, 18277–18285 (2020).
424. Gandomkar, S. et al. *Biocatalytic Oxidative Cascade for the Conversion of Fatty Acids into α -Ketoacids via Internal H₂O₂ Recycling*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 427–430 (2018).
425. Li, Z. et al. *Enzymatic Cascades for Efficient Biotransformation of Racemic Lactate Derived from Corn Steep Water*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 3456–3464 (2017).
426. Yu, X., Chen, X. Y., Yu, H. L., Xu, J. H. & Zhang, Z. J. *Regio- and stereo-selective amination of fatty acids to d-amino acids by a three-step one-pot cascade*. *Green Chem.* **25**, 3469–3474 (2023).
427. Betancor, L. & López-Gallego, F. *Cell–enzyme tandem systems for sustainable chemistry*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **34**, 100600 (2022).
428. Mathew, S., Renn, D. & Rueping, M. *Advances in One-Pot Chiral Amine Synthesis Enabled by Amine Transaminase Cascades: Pushing the Boundaries of Complexity*. *ACS Catal.* **13**, 5584–5598 (2023).
429. Böhmer, W. et al. *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.* **291**, 52–60 (2019).
430. Luo, W. et al. *One pot cascade synthesis of L-2-aminobutyric acid employing ω -transaminase from *Paracoccus pantotrophus**. *Mol. Catal.* **515**, 111890 (2021).
431. Iglesias, C., Panizza, P. & Rodriguez Giordano, S. *Identification, expression and characterization of an R- ω -transaminase from *Capronia semiimmersa**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 5677–5687 (2017).
432. Roura Padrosa, D. et al. *Enhancing PLP-Binding Capacity of Class-III ω -Transaminase by Single Residue Substitution*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 1–13 (2019).

433. Benítez-Mateos, A. I., Contente, M. L., Velasco-Lozano, S., Paradisi, F. & López-Gallego, F. *Self-Sufficient Flow-Biocatalysis by Coimmobilization of Pyridoxal 5'-Phosphate and ω -Transaminases onto Porous Carriers*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 13151–13159 (2018).
434. Biesinger, M. C. et al. *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni*. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 2717–2730 (2011).
435. Dey, G. R. et al. *Colloidal Nanoparticles of High Entropy Materials: Capabilities, Challenges, and Opportunities in Synthesis and Characterization*. *ACS Nanoscience Au* vol. 4 3–20 at <https://doi.org/10.1021/acsnanoscienceau.3c00049> (2024).
436. Guerrero-Pérez, M. O. & Patience, G. S. *Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR*. *Can. J. Chem. Eng.* **98**, 25–33 (2020).
437. Abidi, N. *Introduction to FTIR Microspectroscopy*. en *FTIR Microspectroscopy* 1–12 (Springer International Publishing, Cham, 2021). doi:10.1007/978-3-030-84426-4_1.
438. Espina, A., Cañamares, M. V., Jurašeková, Z. & Sanchez-Cortes, S. *Analysis of Iron Complexes of Tannic Acid and Other Related Polyphenols as Revealed by Spectroscopic Techniques: Implications in the Identification and Characterization of Iron Gall Inks in Historical Manuscripts*. *ACS Omega* **7**, 27937–27949 (2022).
439. Panwar, K., Jassal, M. & Agrawal, A. K. *In situ synthesis of Ag-SiO₂ Janus particles with epoxy functionality for textile applications*. *Particuology* **19**, 107–112 (2015).
440. Lunardi, C. N., Gomes, A. J., Rocha, F. S., De Tommaso, J. & Patience, G. S. *Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential*. *Canadian Journal of Chemical Engineering* vol. 99 627–639 at <https://doi.org/10.1002/cjce.23914> (2021).
441. Velasco-Lozano, S., Benítez-Mateos, A. I. & López-Gallego, F. *Co-immobilized Phosphorylated Cofactors and Enzymes as Self-Sufficient Heterogeneous Biocatalysts for Chemical Processes*. *Angew. Chemie* **129**, 789–793 (2017).
442. Ejima, H. et al. *One-Step Assembly of Coordination Complexes*. *Science (80-.)*. **341**, 154–157 (2013).
443. Califano, V. et al. *The effect of pore morphology on the catalytic performance of β -glucosidase immobilized into mesoporous silica*. *Pure Appl. Chem.* **91**, 1583–1592 (2019).
444. Jiang, Y. et al. *Improved Performance of Lipase Immobilized on Tannic Acid-Templated Mesoporous Silica*

Nanoparticles. Appl. Biochem. Biotechnol. **179**, 1155–1169 (2016).

- 445. Venezia, V. et al. *Mesoporous silica nanoparticles for β -glucosidase immobilization by templating with a green material: Tannic acid. Microporous Mesoporous Mater.* **302**, 110203 (2020).
- 446. Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L. M. & Pagliaro, M. *Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct. ChemistryOpen* **7**, 233–236 (2018).
- 447. Sun, Y., Lee, S. & Lin, L. *Comparison of Color Development Kinetics of Tanning Reactions of Dihydroxyacetone with Free and Protected Basic Amino Acids. ACS Omega* **7**, 45510–45517 (2022).
- 448. Sun, Y., Al-Zahrani, F. A. M. & Lin, L. *Colour formation of dihydroxyacetone with cysteine and its derivatives via Maillard reaction. Dye. Pigment.* **208**, 110854 (2022).
- 449. Sun, Y., Lin, L. & Zhang, P. *Color Development Kinetics of Maillard Reactions. Ind. Eng. Chem. Res.* **60**, 3495–3501 (2021).
- 450. Zhang, X. et al. *An eco-friendly and low-temperature dyeing for wool fibres using dihydroxyacetone induced Maillard reaction. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **680**, 132695 (2024).
- 451. Brocken, D. J. W., Tark-Dame, M. & Dame, R. T. *dCas9: A versatile tool for epigenome editing. Curr. Issues Mol. Biol.* **26**, 15–32 (2018).
- 452. Ziegler, M., Hägele, L., Gäbele, T. & Takors, R. *CRISPRi enables fast growth followed by stable aerobic pyruvate formation in Escherichia coli without auxotrophy. Eng. Life Sci.* **22**, 70–84 (2022).
- 453. Li, Y. et al. *Fine tuning the glycolytic flux ratio of EP-bifido pathway for mevalonate production by enhancing glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwf) and CRISPRi suppressing 6-phosphofructose kinase (PfkA) in Escherichia coli. Microb. Cell Fact.* **20**, 32 (2021).
- 454. Huang, C.-H. et al. *CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium S. elongatus PCC 7942. Microb. Cell Fact.* **15**, 196 (2016).
- 455. Palo-nieto, C. et al. *Materials Advances Functionalization of cellulose nanofibrils to develop novel ROS-sensitive biomaterials* *f.* 1555–1565 (2023) doi:10.1039/d2ma01056a.
- 456. Tikhomirov, E. et al. *A Simple and Cost-Effective FeCl₃ - Catalyzed Functionalization of Cellulose Nanofibrils: Toward Adhesive Nanocomposite Materials for Medical Implants.* (2024) doi:10.1021/acsami.4c04351.

457. Ripoll, M. & Betancor, L. *Opportunities for the valorization of industrial glycerol via biotransformations*. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **28**, 100430 (2021).
458. Zheng, D. *et al.* *Co-immobilization of whole cells and enzymes by covalent organic framework for biocatalysis process intensification*. *Nat. Commun.* **15**, (2024).