

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

*Aplicació de l'enzim piruvat descarboxilasa
en un sistema multienzimàtic de captura i
conversió de CO₂ per a la síntesi d'àcid
làctic i en un sistema multienzimàtic per a la
síntesi d'acetoïna com a producte bio-basat*

Memòria per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Marina Guillén Montalbán i el Dr. Gregorio Álvaro Campos

per
Albert Carceller Lladó

Bellaterra, Gener 2024

La Dra. Marina Guillén Montalbán, professora lectora del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona i el Dr. Gregorio Álvaro Campos, professor Agregat del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certifiquem:

Que el biotecnòleg Albert Carceller Lladó ha dut a terme sota la nostra direcció el treball titulat **Aplicació de l'enzim piruvat descarboxilasa en un sistema multienzimàtic de captura i conversió de CO₂ per a la síntesi d'àcid làctic i un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'acetoïna com a producte bio-basat**, que presenta en aquesta memòria i constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que se'n prengui coneixement i consti als efectes oportuns, signem la present a Bellaterra, 6 de Gener de 2024

Dra. Marina Guillén Montalbán

Dr. Gregorio Álvaro Campos

Resum

La biocatàlisi és una tecnologia que permet la biotransformació de substrats a productes de forma sostenible i respectuosa amb el medi ambient. Aquest fet és reconegut per la conformitat en 10 dels 12 principis de la química verda, que busca la implantació de processos sostenibles i menys contaminants. En la present tesi doctoral s'utilitza un enzim anomenat piruvat descarboxilasa, aprofitant la peculiaritat d'aquest enzim de catalitzar tant una reacció de carboxilació com una reacció de carbolligació, per al desenvolupament de dos sistemes multienzimàtics: Un sistema multienzimàtic com a tecnologia CCU per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂, mitjançant una carboxilació catalitzada per la PDC i ii) un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un compost bio-basat, l'acetoïna, a partir d'etanol mitjançant una carbolligació catalitzada per la PDC.

El sistema multienzimàtic com a tecnologia CCU per la síntesi de lactat es basa en tres enzims: piruvat decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa i lactat deshidrogenasa; mentre que el sistema multienzimàtic per la síntesi d'un compost biobasat (acetoïna) es basa també en tres enzims: piruvat decarboxilasa, NADH-oxidasa i alcohol deshidrogenasa.

En la primera part de la tesi es duu a terme la producció dels enzims necessaris per als estudis de les reaccions i que no es troben en estoc al grup de recerca (alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (ScADH), piruvat descarboxilasa de *S. cerevisiae* (ScPDC) i lactat deshidrogenasa de *T. maritima* (TmLDH)) a través d'un cultiu *fed-batch* assolint altes densitats cel·lulars. Posteriorment, es duu a terme la purificació dels enzims piruvat descarboxilasa de *Z. palmarum* (ZpPDC), ScADH, ScPDC, TmLDH i NADH oxidasa de *S. pyogenes* (SpNOX), aplicant millores al procés de purificació per cromatografia d'afinitat o d'intercanvi aniònic per tal d'incrementar el rendiment de purificació. La liofilització dels enzims s'aconsegueix amb un rendiment suficient per satisfer les necessitats d'enzims, i la qual permet l'emmagatzematge a llarg termini dels biocatalitzadors.

En la segona part d'aquesta tesi, es desenvolupa el sistema multienzimàtic com a estratègia de captura i conversió del CO₂ (CCU) per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol en el marc del projecte europeu BIOCON-CO₂. Aquest sistema, el qual incorpora un sistema intern de regeneració del cofactor, està format pels enzims alcohol deshidrogenasa, piruvat descarboxilasa i lactat deshidrogenasa, en el qual la PDC catalitza la carboxilació de l'acetaldehid a àcid pirúvic. Aquest sistema presenta una limitació important en el pas de carboxilació, de tal manera que s'estudien diferents estratègies des de l'optimització de les quantitats i proporcions dels enzims, fins a l'enginyeria del medi de reacció, aconseguint obtenir 250 µM d'àcid làctic, la concentració més alta obtinguda per aquest sistema fins al moment. I, per primera vegada, també es posa a prova el sistema utilitzant un gas sintètic que imita la composició d'un gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica, assolint una concentració d'àcid làctic de 69 µM. La immobilització dels enzims en diferents suports indica que el millor suport és la Ni²⁺-IDA-agarosa, amb el qual es duu a terme la reacció en cicles, obtenint un rendiment similar a quan s'utilitzen els enzims solubles.

En la tercera part d'aquesta tesi es desenvolupa el segon sistema multienzimàtic plantejat com a estratègia de síntesi d'un producte bio-basat, l'acetoïna, a partir d'etanol. En aquest cas el sistema consta d'alcohol deshidrogenasa, piruvat descarboxilasa i NADH oxidasa, on la PDC catalitza la reacció de carbolligació de dues molècules d'acetaldehid. A més, la NADH oxidasa permet la regeneració del cofactor. Els estudis de les reaccions involucrades permeten determinar les millors condicions de reacció, mitjançant l'ajust en les proporcions dels enzims, i determinant que la purificació dels enzims és essencial per evitar reaccions secundàries que provoquen el consum del intermediis de reacció, aconseguint la conversió completa (100%) a partir de 50 mM d'etanol en les

millors condicions estudiades. Finalment, s'aconsegueix millorar l'eficiència de la regeneració del cofactor mitjançant l'ajust de la concentració de cofactor, millorant el nombre de recanvi de 5 a 38 mols de producte per mol de cofactor.

Abreviacions

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ADN: Àcid desoxiribonucleic

BF: *Blast furnace* o alts forns

BFG: *Blast furnace gas* o gas d'alts forns

BIOCON-CO2: BIOTEchnological processes based on microbial platforms for the CONversion of CO₂ from the iron and steel industry into commodities for chemicals and plàstics

BOF: *Basic oxygen furnace* o forn bàsic d'oxigen

BOFG: *Basic oxygen furnace gas* o gas de forn bàsic d'oxigen

BRENDA: *BRaunschweig ENzyme DAtabase*

BSA: *Bovine serum albumin* o albúmina de sèrum bovina

CCU: *Carbon Capture and Utilization* o captura i utilització de CO₂

CDI: Carbodiimida

CHO: *Chinese hamster ovary* o ovari de hámster xinès

CLEA: *Cross-linked enzyme aggregates* o agregats d'enzims entrecreuats

COG: *Coke oven gas* o gas del forn de coc

CPME: Ciclopentil metil èter

DCW: *Dried cell weight* o pes sec cel·lular

DES: Solvents eutèctics profunds

DHAD: Àcid dihidroxibenzoic descarboxilasa

ε: Coeficient d'extinció molar

E. coli: *Escherichia coli*

EC: *Enzyme comission*

EE.UU.: Estats Units

FAD: Flavina Adenina Dinucleòtid

FaldDH: Formaldehid deshidrogenasa

FDA: *Food and Drug Administration*

FDC: Àcid ferúlic descarboxilasa

FDH: Format deshidrogenasa

FLS: Formolasa

FMN: Flavina Mononucleòtid

FPLC: *Fast protein liquid chromatography* o cromatografia líquida ràpida de proteïnes

GC: *Gas chromatography* o cromatografia de gasos

GRAS: *Generally recognized as safe* o generalment reconegut com a segur

GDH: Glutamat deshidrogenasa

HEK293: *Human embryonic cells 293* o cèl·lules embrionàries humanes de ronyó 293

HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography* o cromatografia líquida d'alta pressió

IDH: Isocitrat deshidrogenasa

IEA: *International energy agency*

IMAC: *Immobilized metal affinity chromatography* o cromatografia d'afinitat amb metall immobilitzat

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosid

JECFA: *Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives*

KdcA: Cetoàcid descarboxilasa A

KiP: Constant d'inhibició del fosfat

Km: Constant de Michaelis-Menten

L-AlaDH: L-alanina deshidrogenasa

LDH: Lactat deshidrogenasa

LeuDH: Leucina deshidrogenasa

MANA: Monoaminoetil-N-aminoetil agarosa

MD: Medi definit

MeTHF: 2-Metiltetrahidrofurà

MOPS: Àcid 3-morfolinpropà-1-sulfònic

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleòtid

NADH: Nicotinamida adenina dinucleòtid forma reduïda

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat

NOX: NADH oxidasa

NTA: Àcid nitriltriàcètic

PEPC: Fosfoenolpiruvat descarboxilasa

PAD: Àcid fenòlic descarboxilasa

PDC: Piruvat descarboxilasa

prFMN: Flavina Mononucleòtid prelinada

pI: Punt isoelèctric

R-PAC: *R-phenylacetylcarbinol* o R-fenilacetilcarbinol

S: Substrat

***S. cerevisiae*:** *Saccharomyces cerevisiae*

ScADH: Alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*

ScPDC: Piruvat descarboxilasa de *S. cerevisiae*

SDS: *Sodium dodecyl sulphate*

SHMT: Serina hidroximetiltransferasa

t: Temps

t_{1/2}: Vida mitja

***T. maritima*:** *Thermotoga maritima*

TmLDH: Lactat deshidrogenasa de *T. maritima*

TPP: Pirofosfat de tiamina

μ: Velocitat específica de creixement

U: Unitat d'activitat

UE: Unió Europea

Y_{P/S}: Rendiment producte-substrat

Y_{X/S}: Rendiment biomassa-substrat

***Z. palmae*:** *Zymobacter palmae*

ZpPDC: Piruvat descarboxilasa de *Z. palmae*

Taula de continguts

1. Introducció.....	1
1.1. La biocatàlisi: el nou paradigma de la “química verda”	2
1.2. Sistemes multienzimàtics	5
1.2.1. Aplicacions de sistemes multienzimàtics <i>one-pot</i>	7
1.2.1.1. Sistemes multienzimàtics com a tecnologia CCU	7
1.2.1.2. Sistemes multienzimàtics per a la producció de productes bio-basats.....	9
1.2.2. Reptes en el desenvolupament i implantació de sistemes multienzimàtics <i>one-pot</i> 9	
1.2.2.1. La regeneració del cofactor, un repte de la biocatàlisi	10
1.2.2.2. Condicions d’operació, proporció i quantitat dels enzims.....	11
1.2.2.3. Cost del biocatalitzador	12
1.3. Producció i purificació d’enzims	12
1.3.1. Producció d’enzims recombinants	12
1.3.1.1. Producció d’enzims en <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.2. Purificació dels enzims	15
1.4. Immobilització d’enzims	17
1.5. Sistemes multienzimàtics diana d’aquesta tesi.....	19
1.5.1. Sistema CCU basat en la síntesi enzimàtica d’àcid làctic a partir de CO ₂	20
1.5.2. Sistema multienzimàtic per a la síntesi d’un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l’acetoïna.....	22
2. Objectius de la tesi	25
3. Materials i mètodes.....	29
3.1. Reactius i suports d’immobilització i/o purificació	30
3.2. Producció dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH	30
3.2.1. Anàlisi de biomassa i glucosa.....	31
3.3. Purificació dels enzims ScADH, ZpPDC, ScPDC, TmLDH i SpNOX	31
3.3.1. Gel d’electroforesis	32
3.3.2. Concentració de proteïna total	32
3.4. Assaigs d’activitat enzimàtica	33
3.5. Estabilitat i activitat enzimàtica a diferents pHs	33
3.6. Estabilitat i activitat enzimàtica en presència de compostos dels gasos reals de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica	34
3.7. Activitat enzimàtica en presència d’etanol.....	34
3.8. Immobilització dels enzims.....	35
3.8.1. Immobilització en MANA-agarosa i amino-metacrilat.....	35

3.8.2. Immobilització en epoxi-agarosa i epoxi-metacrilat	36
3.8.3. Immobilització en Ni ²⁺ -IDA-agarosa	36
3.9. Reaccions del sistema CCU basat en una reacció multienzimàtica per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO ₂ i etanol	36
3.9.1. Reaccions amb un sol enzim	36
3.9.2. Reaccions de la piruvat descarboxilasa acoblades a la lactat deshidrogenasa	37
3.9.3. Reaccions del sistema multienzimàtic CCU complet	37
3.9.3.1. Reacció del sistema multienzimàtic CCU amb anhidrasa carbònica	37
3.9.3.2. Estudi de la concentració i proporció dels enzims	38
3.9.3.3. Reaccions del sistema multienzimàtic CCU en diferents tampons	38
3.9.4. Reacció del sistema multienzimàtic CCU utilitzant un gas sintètic imitant la composició del gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica	38
3.9.5. Reacció del sistema multienzimàtic CCU amb enzims immobilitzats	39
3.10. Estudi de les reaccions del sistema multienzimàtic per a la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol	39
3.10.1. Reacció enzimàtica amb ZpPDC enfront el pH	39
3.10.2. Reacció enzimàtica de la ZpPDC acoblada amb la ScADH	39
3.10.3. Reacció multienzimàtica amb ZpPDC, ScADH i SpNOX	40
3.11. Mètodes analítics de substrats, intermedis i productes de reacció	40
3.11.1. Quantificació d'acetaldehid, acetoïna, etanol i àcid làctic	40
3.11.2. Anàlisi espectrofotomètrica de NADH	41
4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims	43
4.1. Introducció	44
4.2. Resultats de la producció en <i>Fed-batch</i>	45
4.2.1. Producció de l'enzim His-ScADH	46
4.2.2. Producció de l'enzim His-ScPDC	47
4.2.3. Producció de l'enzim His-TmLDH	49
4.3. Resultats de la purificació per cromatografia en FPLC	50
4.3.1. Purificació de l'enzim ScADH per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines	50
4.3.2. Purificació de l'enzim ScPDC per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines	55
4.3.3. Purificació de l'enzim TmLDH per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines	60
4.3.4. Purificació de ZpPDC per cromatografia d'intercanvi aniònic	64
4.3.5. Purificació de l'enzim SpNOX per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines	67
4.4. Resultats de la liofilització dels enzims	71
4.5. Resum de la purificació dels enzims recombinants	71
4.6. Conclusions	72

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol	73
5.1. Introducció.....	74
5.2. Solubilitat del CO ₂	76
5.3. Caracterització dels enzims	76
5.3.1. Activitat enfront el pH.....	77
5.3.2. Estabilitat enfront el pH	78
5.3.3. Efecte de l'etanol en l'activitat de la ZpPDC i la TmLDH	79
5.3.4. Efecte dels compostos presents al gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica sobre l'activitat dels enzims	79
5.3.5. Efecte dels compostos presents al gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica sobre l'estabilitat dels enzims	81
5.4. Estudi de les reaccions del sistema multienzimàtic.....	82
5.4.1. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim ScADH enfront el pH	82
5.4.2. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim TmLDH enfront el pH.....	83
5.4.3. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim ZpPDC enfront el pH	84
5.4.4. Caracterització de l'enzim ScPDC i caracterització de la reacció catalitzada enfront el pH.....	85
5.5. Reaccions multienzimàtiques amb enzims solubles.....	87
5.5.1. Reacció PDC acoblada a la TmLDH a pressió atmosfèrica amb CO ₂	87
5.5.2. Reacció PDC acoblada a la TmLDH a alta pressió de CO ₂	89
5.5.3. Estudi del sistema multienzimàtic complet	91
5.5.3.1. Reacció de síntesi amb anhidrasa carbònica	92
5.5.3.2. Optimització de la concentració i proporció d'enzims.....	94
5.5.3.3. Enginyeria del medi de reacció.....	95
5.6. Reacció utilitzant una mescla sintètica de gasos imitant el gas de sortida de la indústria metal·lúrgica	98
5.7. Reacció amb enzims immobilitzats.....	99
5.7.1. Immobilització dels enzims en diferents suports.....	100
5.7.2. Reacció multienzimàtica amb els derivats immobilitzats de ScADH, ScPDC i TmLDH en Ni ²⁺ -IDA-agarosa.....	103
5.8. Conclusions.....	105
6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna	107
6.1. Introducció.....	108
6.2. Caracterització dels enzims	110
6.2.1. Estabilitat enfront el pH	110

6.2.2. Activitat enfront el pH.....	111
6.3. Síntesi d'acetoïna a partir d'acetaldehid catalitzada per la ZpPDC.....	112
6.4. Síntesi d'acetoïna a partir d'etanol sense regeneració de cofactor	113
6.5. Síntesi d'acetoïna a partir d'etanol amb regeneració de cofactor	115
6.5.1. Regeneració de cofactor amb SpNOX comparant l'ús de lisats cel·lulars o enzims purificats	115
6.5.2. Efecte de la concentració de NAD ⁺	116
6.6. Conclusions.....	117
7. Conclusions generals	119
8. Agraïments	123
9. Contribucions científiques	127
10. Bibliografia.....	129

1. Introducció

1. Introducció

1.1. La biocatàlisi: el nou paradigma de la “química verda”

La **química verda** es defineix com aquella que “utilitza matèries primeres (preferentment renovables) de forma eficient, elimina residus i evita l'ús de reactius i solvents tòxics o perillosos en la manufactura i aplicació de productes químics”¹. Aquest concepte sorgeix de la preocupació per part de la societat sobre l'increment en la generació de residus i contaminació del medi ambient. En concret, la química verda consta de 12 pilars que la fonamenten (**Taula 1**).

Taula 1. Els 12 principis de la química verda¹.

Principis de la química verda
1. <i>Prevenció</i> : És millor prevenir la formació de residus que tractar els residus un cop formats
2. <i>Economia d'àtoms</i> : Els mètodes de síntesi s'han de dissenyar de tal manera que es maximitzi la incorporació de tots els materials utilitzats en el producte final.
3. <i>Síntesi química menys perillosa</i> : Quan sigui possible, les metodologies de síntesi s'han de dissenyar per utilitzar i generar substàncies que suposin una baixa o nul·la toxicitat cap als humans i el medi ambient.
4. <i>Disseny de químics més segurs</i> : Els productes químics s'han de dissenyar cap a la preservació de l'eficàcia de la seva funció alhora que es redueix la seva toxicitat.
5. <i>Solvents i auxiliars més segurs</i> : La utilització de substàncies auxiliars (solvents, agents de separació, etc...) haurien de ser innecessaris sempre que sigui possible, o bé, que siguin innocus.
6. <i>Eficiència energètica per disseny</i> : Els requeriments energètics dels processos químics haurien de ser considerats pel seu impacte mediambiental i econòmic, i s'haurien de minimitzar.
7. <i>Preferentment matèria primera renovable</i> : Una matèria prima hauria de ser renovable sempre que sigui tècnicament i econòmicament viable.
8. <i>Reducció de la derivatització</i> : Evitar o reduir al mínim possible la derivatització innecessària, ja que aquestes etapes requereixen de reactius addicionals i poden generar residus.
9. <i>Catàlisi</i> : Els reactius catalítics (tant selectius com sigui possible) són superiors als reactius estequiomètrics.
10. <i>Disseny per a la degradació</i> : Els productes químics s'haurien de dissenyar de tal manera que al final del seu ús o funció, es descomponguin en productes de degradació innocus i no persistents en el medi ambient.
11. <i>Anàlisi a temps real per a la prevenció de contaminació</i> : És necessari desenvolupar metodologies analítiques que permetin un monitoratge en línia a temps real i un control previ a la formació de substàncies perilloses.
12. <i>Química inherentment més segura per a la prevenció d'accidents</i> : Les substàncies o la forma d'aquestes utilitzades en processos químics s'haurien d'escollir per minimitzar el potencial d'accidents químics, incloent alliberacions, explosions o incendis.

1. Introducció

Fixant-nos en el principi número 9, és clar que un **catalitzador** (reactiu catalític segons la definició del Principi 9), aquell que pot dur a terme múltiples cicles de reacció sense consumir-se, és més sostenible que un **reactiu estequiomètric**, aquell que s'ha d'afegir en excés i es consumeix durant la reacció, ja que l'ús d'aquest darrer resulta en la generació de residus durant la síntesi orgànica. Un clar exemple és la producció de l'òxid de propilè que s'utilitza en la producció de polímers (**Figura 1**)². En aquest cas, la utilització de reactius estequiomètrics implica l'ús de clor (Cl_2) que és un reactiu amb alta toxicitat, i es genera un residu de clorur de calci (CaCl_2). En canvi, utilitzant un reactiu catalític, anomenat TS-1, s'utilitza peròxid d'hidrogen per generar aigua com a "residu".

Per tant, cal evitar les fonts de residus de la química, com per exemple els reactius inorgànics utilitzats en síntesi orgànica: reduccions amb metalls, reaccions amb hidrurs metàl·lics, oxidacions amb permanganat, diòxid de magnesi, crom, que després de la reacció generen subproductes que es convertiran en residus (baixa economia atòmica). I és que, tal i com exposen Sheldon RA i Woodley JM, "la clau cap a una química verda i sostenible és l'ús de la catàlisi"³.

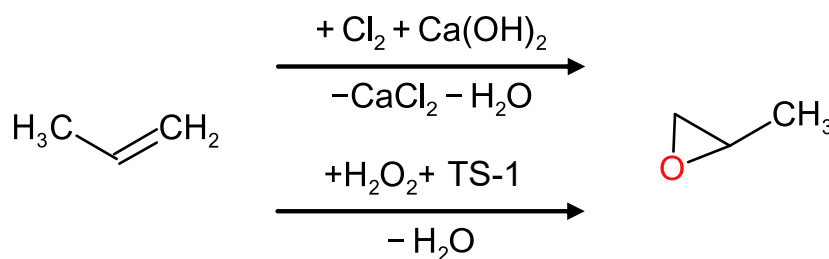


Figura 1. Producció de l'òxid de propilè mitjançant un reactiu estequiomètric o un reactiu catalític².

Seguint amb la línia de la química verda, el catalitzador ideal es podria definir com aquell que permet la màxima conversió d'un substrat a un producte en el mínim temps possible, generant la mínima quantitat de subproductes o residus i amb un baix impacte econòmic i mediambiental.

La **biocatàlisi** sorgeix com a una tecnologia que permet la transformació de substrats en productes de forma sostenible i respectuosa amb el medi ambient, juntament amb una millor eficiència dels costos del procés. Això és possible gràcies a una sèrie de propietats dels biocatalitzadors que destaquen per sobre de la catàlisi química. Per una banda, la producció del biocatalitzador es pot dur a terme a partir de matèries primeres renovables (**Principi 7**) i, a més, al ser proteïnes fa que siguin biodegradables. Per altra banda, permeten dur a terme la catàlisi en condicions més suaus de pH, temperatura, pressió i sovint en medis aquosos, permetent un estalvi dels costos energètics del procés (**Principis 3, 5 i 6**). I el que és més, l'especificitat pel substrat i la selectivitat pel producte obtingut són propietats altament rellevants per a la química verda (**Principis 1 i 8**). En concret, els enzims no només són capaços de reconèixer un substrat en concret (**especificitat**), sinó també de catalitzar la reacció d'un grup químic concret dins del substrat (**regioespecificitat**). Això fa que no siguin necessàries etapes d'activació, protecció i desprotecció de grups químics (**Principi 8**), i per tant, reduint l'ús de reactius químics i la generació de residus derivats d'aquestes reaccions (**Principi 1**), estalviant en els costos de material i processament de residus, que són habituals en la química clàssica. I és que també gràcies a la **quimioselectivitat**, **regioselectivitat** i **estereoselectivitat** que ofereixen els enzims, és possible obtenir productes més **enantiopurs** i reduir la formació de subproductes (**Principi 1**), fet que resulta en una reducció dels costos de purificació del producte d'interès, i que resulta

1. Introducció

molt atractiu per a indústries com la farmacèutica, quan només un dels dos enantiòmers és el principi actiu (i es busca un excés enantiomèric superior al 99%).

D'aquesta manera, la sostenibilitat dels biocatalitzadors es reconeguda per complir amb 10 dels 12 principis de la química verda^{3,4}, corresponent els dos restants (4 i 10) al producte i no al procés *per se*.

Tanmateix, per tal que el procés sigui sostenible, també cal tenir en compte la relació entre el producte generat respecte al residu que en resulta del procés. De fet, la *rule of thumb* per a un procés industrialment atractiu és arribar a una concentració de producte entre $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (per a **productes d'alt valor**), i $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (per a **productes de baix valor**)^{5,6}.

En aquest sentit, hi ha unes característiques que es busquen en un biocatalitzador per a la seva aplicació industrial (**Taula 2**)⁷.

Taula 2. Característiques desitjades per a un biocatalitzador en la seva aplicació industrial.

Opera a altes concentracions de substrats i amb una conversió elevada
No presenta inhibició per substrat a altes concentracions ($>100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Baixa inhibició per producte a altes concentracions ($>100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Resistència a solvents orgànics
Alta estabilitat en condicions industrialment rellevants (alta estabilitat operacional)
Alta activitat enzimàtica
Capacitat de millorar mitjançant enginyeria de proteïnes
Alta tolerància a la immobilització

De forma natural, els enzims estan adaptats a treballar en les condicions que es troba la cèl·lula en el seu entorn i que, per tant, poden diferir en gran mesura amb les condicions del procés. Per aquest motiu, degut a l'efecte d'aquestes condicions, l'estratègia habitual és buscar unes condicions de reacció que s'adaptin a les característiques de l'enzim (estabilitat i activitat enfront el pH i la temperatura, efectes d'inhibició per substrat, producte o impureses, etc...). Tot i que, actualment, s'estan desenvolupant estratègies que busquen modificar l'enzim per tal d'adaptar-lo a les condicions del procés, com és el cas de l'aplicació de tècniques d'evolució dirigida⁴.

Segons el tipus de biocatalitzador (**cèl·lules** o **enzims**) que s'utilitza, podem classificar les bioconversions en dos tipus: producció associada al creixement de microorganismes (fermentació) o biocatàlisi realitzada amb **enzims lliures** o **resting cells**). En el primer cas, la bioconversió del substrat en el producte es produeix de manera simultània al creixement del microorganisme, (la producció del biocatalitzador i la reacció d'interès estan acoblades) mentre que en el segon cas, la bioconversió es duu a terme amb un biocatalitzador obtingut prèviament a l'etapa de biocatàlisi (la producció del biocatalitzador i la reacció d'interès estan desacoblades).

1. Introducció

L'elecció del tipus de biocatalitzador dependrà de les característiques del procés que es vol desenvolupar. L'ús de microorganismes, com a biocatalitzadors, és eficient quan la bioconversió implica un gran nombre d'etapes i les condicions de reacció són compatibles amb el creixement cel·lular. En canvi, quan les reaccions impliquen poques etapes i/o les condicions de reacció són més adverses per al creixement, és més convenient treballar amb enzims aïllats o bé en forma de *resting cells*.

Les bioconversions amb enzims ofereixen l'avantatge d'evitar la formació de productes no desitjats, derivats del metabolisme del microorganisme (per exemple àcid acètic) que redueixen el rendiment del nostre producte i la seva presència en el medi de reacció dificulta la purificació del nostre producte d'interès. A més a més, l'ús de microorganismes, sol anar associat a requeriments del compliment de la normativa en bioseguretat i amb els quals cal considerar la seva bioperillositat.

De vegades és convenient dur a terme les bioconversions en medis no aquosos, ja que algunes no són compatibles amb la presència d'aigua, o bé ofereixen millores de la reacció en comparació amb el medi aquós. Per exemple, les bioconversions basades en la reacció inversa d'una hidròlisi, on l'aigua és un dels productes, no són favorables termodinàmicament en medis aquosos, i per tant, si es duen a terme en solvents orgànics s'afavoreix l'equilibri cap a la formació del producte. Per altra banda, si el substrat és altament hidrofòbic, treballar en medis no aquosos permetria incrementar la seva concentració en el medi de reacció. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que els medis no aquosos poden tenir impactes negatius pel medi ambient, com és el cas dels solvents orgànics. Per aquest motiu, cada vegada hi ha més disponibilitat de medis més segurs. Alguns exemples inclouen els líquids iònics de segona generació, el 2-metiltetrahidrofurà (MeTHF) derivat de residus lignocel·lulòsics, el ciclopentil metil èter (CPME), solvents eutèctics profunds (DES) o el CO₂ supercrític⁵.

1.2. Sistemes multienzimàtics

Els enzims es poden utilitzar individualment per catalitzar una reacció d'interès, però on realment s'explota el seu potencial, com veurem més endavant, és en **sistemes multienzimàtics**, que són aquells on la conversió de substrat al producte final implica la participació de dos o més enzims. De fet, de manera natural aquests ja formen part d'una complexa xarxa de reaccions dins de la cèl·lula (metabolisme), i que la biologia de sistemes i enginyeria metabòlica ha explotat per a la síntesi orgànica en la coneguda com a **whole-cell biocatalysis**⁸, que ofereix alguns avantatges, com la regeneració de cofactors quan s'utilitzen enzims dependents de cofactor, o la capacitat de la cèl·lula de fabricar els biocatalitzadors sense necessitat d'aïllar-los i purificar-los. Tanmateix, aquests sistemes *in vivo* presenten algunes limitacions. Per una banda, la membrana cel·lular actua de barrera i pot dificultar el transport de substrat i producte. Per altra banda, la presència de reaccions secundàries catalitzades per altres enzims presents a l'interior del microorganisme, la presència de limitacions del metabolisme cel·lular (per regulació del metabolisme) o la toxicitat del medi de reacció (incloent el propi substrat o el producte), limiten la seva aplicació industrial⁹.

En canvi, quan es duu a terme la reacció amb els **enzims aïllats** (*in vitro*), s'eliminen algunes d'aquestes limitacions, i això fa que el sistema *in vitro* tinguin, en teoria, un rendiment de producte més elevat (mol de producte format per mol de substrat inicial) en comparació amb l'ús de cèl·lules senceres, a més de tenir més flexibilitat a l'hora de modificar les condicions de reacció^{10,11}. Un altre dels avantatges de treballar amb reaccions multienzimàtiques *in vitro* (d'ara

1. Introducció

en endavant referits com a sistemes multienzimàtics) és la gran versatilitat que ofereixen a l'hora de dissenyar un sistema de reaccions. Per una banda, s'amplia l'espectre de substrats disponibles i de productes que es poden obtenir amb un mateix substrat, ja que la gran varietat d'enzims disponibles en la natura permet dissenyar cascades enzimàtiques fins arribar al producte d'interès. Per altra banda, hi ha casos on la reacció principal genera subproductes inhibitoris o que inactiven els enzims (com per exemple el peròxid d'hidrogen), i afegir un enzim addicional que elimini aquests subproductes permet millorar el rendiment del procés (per exemple, afegir una catalasa per eliminar el peròxid d'hidrogen), i alhora desplaçar l'equilibri cap a la formació de producte¹². A més, la producció per via enzimàtica, en comparació amb la via fermentativa, utilitza medis de reacció menys complexos, degut a que se simplifica la composició del medi de reacció. Per altra banda, els enzims són més tolerants a medis de reacció amb co-solvents o components que podrien ser tòxics per les cèl·lules, o que resulten inhibitoris a altes concentracions.

Durant el disseny del sistema multienzimàtic d'interès, és important considerar com es durà a terme el procés. En aquest sentit, les reaccions es poden dur a terme en dos modes d'operació: en un **procés seqüencial** o en **one-pot** (Figura 2). El primer mode d'operació (**procés seqüencial**) s'inspira en la compartimentalització cel·lular, on les reaccions se separen físicament en diferents compartiments dins la cèl·lula. D'aquesta manera, es busca aïllar les diferents reaccions del sistema per tal d'adaptar les condicions de reacció (temperatura, pH, medi de reacció...) a cada enzim, és a dir, que en cadascun dels reactors (compartiments) s'ajusten les condicions que són les òptimes pels enzims presents en aquell reactor. I fins i tot, en el cas d'immobilitzar els enzims en cada reactor, es poden recanviar aquells amb els enzims menys estables sense necessitat de renovar la resta d'enzims al mateix temps. No obstant això, aquesta configuració presenta uns costos addicionals, ja que incrementa el nombre d'equips a utilitzar i, degut a la necessitat de modificar les condicions de reacció, cada vegada que el medi entra al següent reactor, s'incrementa la complexitat. A més, com que cada reacció està aïllada de l'anterior, això fa que en cada reactor s'acumuli el producte (o intermediari), i pot afectar a la reacció si aquest és inhibitori, o bé que no es formi suficient producte si la reacció està desafavorida termodinàmicament.

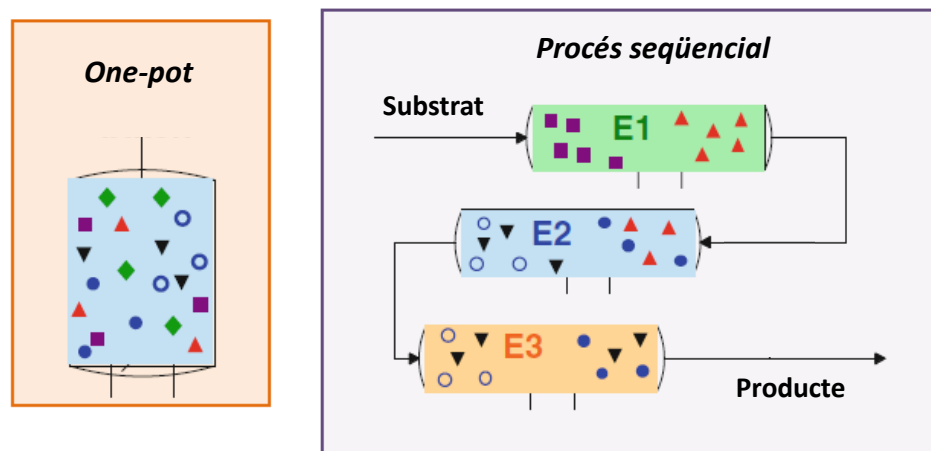


Figura 2. Modes d'operació en sistemes multienzimàtics. (Adaptat de Ardao, I. et al. 2013¹²).

1. Introducció

Per aquest motiu, si el sistema multienzimàtic ho permet, es pot optar pel segon mode d'operació (**one-pot**), ja que és un mode d'operació més simple, i per tant, amb un menor cost d'operació, alhora que s'evita l'acumulació de productes intermediaris, i permet desplaçar els equilibris de la reacció cap a la formació del producte final. Tanmateix, la principal limitació dels sistemes *one-pot* és la necessitat de trobar unes condicions de reacció en les quals puguin treballar tots els enzims presents. D'altra banda, és important tenir en compte les proporcions i quantitats de cadascun dels enzims, sobretot en sistemes on hi ha inhibicions creuades, és a dir, el producte d'una reacció inhibeix una altra de les reaccions, el que implica mantenir una concentració baixa d'aquests productes ajustant les proporcions dels enzims. Per això, és fonamental que les condicions de reacció siguin compatibles amb tots els enzims implicats, i això requereix d'una selecció i caracterització dels biocatalitzadors enfront els paràmetres de reacció (pH, temperatura, concentració de substrats, tampó o força iònica). A més, cal tenir present que, si s'utilitzen enzims solubles i el sistema requereix d'un gran nombre i quantitat d'enzims, les molècules d'enzims són més propenses al fenomen de col·lisió molecular, resultant en l'agregació de les proteïnes i la seva inactivació, i per tant reduint la seva estabilitat¹².

1.2.1. Aplicacions de sistemes multienzimàtics *one-pot*

Gràcies als beneficis que aporta la biocatàlisi basada en sistemes multienzimàtics, amb els anys s'estan desenvolupant més bioprocessos com a substitució o complementació de processos químics convencionals, amb multitud d'exemples en la literatura¹³⁻¹⁵, en concret per aquells on la matèria primera s'obté del petroli i els seus derivats, i sobretot impulsat per polítiques mediambientals dirigides a dependre cada vegada menys de les fonts no renovables. I és que els bioprocessos s'enfoquen cada vegada més en la utilització de **matèries primeres renovables**^{16,17}, com per exemple la glucosa¹⁸, el bioetanol^{11,19} o residus d'olis²⁰, o fins i tot a partir de residus generats per la pròpia indústria, com és el cas del CO₂²¹. A continuació, es presenten dos tipus d'aplicacions d'aquests sistemes en *one-pot*, per una banda aquells basats en el concepte de CCU (**Carbon Capture and Utilization**), i per altra banda, aquells que utilitzen matèries primeres d'origen biològic (bioetanol, glucosa,...) com a substrats per a la síntesi de productes bio-basats (**bioeconomia**).

1.2.1.1. Sistemes multienzimàtics com a tecnologia CCU

Degut als alts nivells de CO₂ que han incrementat els darrers anys, principalment per part de l'acció de l'home (alta industrialització i augment del transport), l'organisme conformat pel panell intergovernamental per al canvi climàtic ha elaborat un informe especial, sobre els efectes de l'escalfament global, indicant que s'ha de situar com a màxim 1,5°C per sobre dels nivells pre-industrials, per respondre eficientment contra l'amenaça del canvi climàtic²². Actualment, existeixen dues estratègies tecnològiques per fer front a aquesta problemàtica: a) la captura i emmagatzematge del CO₂ present en les emissions derivades de l'activitat humana, i b) la captura i utilització del CO₂ com a font de carboni per produir productes d'interès industrial. De les dues estratègies, la b) resulta més interessant, ja que no només es contribueix a reduir les emissions, sinó que es revaloritza un residu i s'obté un producte que es pot incorporar al mercat. Tanmateix, la utilització del CO₂ implica la seva reducció, ja que el carboni es troba en el seu estat més alt d'oxidació (+4), i un requeriment energètic elevat per trencar l'enllaç C=O^{23,24}.

1. Introducció

Aquesta segona estratègia es basa en les tecnologies CCU (captura i utilització del CO₂), que són sistemes que permeten la captació del diòxid de carboni en les fonts d'emissió, i que posteriorment transformen el CO₂ en molècules de valor afegit. Els sistemes CCUs basats en la biocatàlisi ofereixen alguns avantatges (derivats de la *green chemistry*) respecte als CCUs basats en la via química clàssica. Tal i com s'ha mencionat anteriorment, a l'utilitzar biocatalitzadors, es treballa en condicions suaus de pressió, pH i temperatura (reducció dels costos energètics) i generalment en medis aquosos (més segurs que els solvents orgànics). I per altra banda, a diferència dels sistemes químics clàssics, requereixen de menys etapes de reacció, afavorint una menor utilització de reactius i solvents i una menor generació de residus.

Les tecnologies CCU basades en la utilització d'enzims lliures es basen en la fixació del CO₂, inspirada en les rutes de fixació del CO₂ a través de reaccions de carboxilació presents a la natura. I donat que el diòxid de carboni es troba en el seu estat d'oxidació més elevat, qualsevol carboxilació requereix de la reducció del CO₂. Aquesta reducció pot provenir d'un agent reductor extern, o bé de la oxidació d'un segon substrat o producte. Tal i com exposa l'excel·lent revisió de Bierbaumer S. et al. (2023)²³, la carboxilació enzimàtica és catalitzada per dues classes d'enzims: **les carboxilases** que de forma natural s'encarreguen de la fixació de CO₂, i **les descarboxilases**, que de forma natural s'encarreguen de descarboxilar el substrat, però poden revertir-se modificant les condicions de reacció en el sentit de carboxilació. Dins de cada classe podem distingir subclasses segons el mecanisme de reacció. Les carboxilases, per exemple, poden catalitzar la carboxilació sense necessitar un agent reductor extern (com és el cas d'enzims com la RuBisCO o la fosfoenolpiruvat carboxilasa (PEPC)), i enzims que si requereixen d'un agent reductor (com és el cas d'enzims com la format deshidrogenasa (FDH) o la isocitrat deshidrogenasa (IDH)). En canvi, les descarboxilases es poden classificar segons el mecanisme de descarboxilació, on trobem aquells enzims dependents de metalls bivalents (com la àcid dihidroxibenzoic descarboxilasa (DHAD)), dependents del cofactor Flavina mononucleòtid prelinat (prFMN) (com és el cas de la àcid ferúlic descarboxilasa (FDC)), dependents del cofactor TPP (com és el cas de la piruvat descarboxilasa (PDC)) o independents de cofactor (com és el cas dels enzims àcid fenòlic descarboxilases (PADs)).

Malgrat que l'evolució ha permès alguns microorganismes fixar el CO₂ a través de les carboxilases, les rutes *in vivo* són limitades, i no exploren totes les possibilitats (com per exemple la carboxilació a través de descarboxilases). Per aquest motiu, la generació *de novo* de rutes de fixació de CO₂ amplia l'espèctre de productes que es poden obtenir. De fet, a la literatura ja trobem exemples de disseny de sistemes multienzimàtics *in vitro* per a la fixació de CO₂ a compostos d'interès industrial. Un exemple és la utilització de la FDH en sistemes multienzimàtics, com és el cas del sistema desenvolupat per Ren S et al.²⁵ format per la FDH acoblada a una anhidrasa carbònica i la glutamat deshidrogenasa (GDH) per a la síntesi d'àcid fòrmic a partir de CO₂, o el sistema desenvolupat per Wang X. et al. on s'acobla la FDH a la Formaldehid deshidrogenasa (FaldDH) i la Alcohol deshidrogenasa (ADH) per la síntesi de metanol a partir de CO₂²⁶. Un altre exemple és la síntesi d'aminoàcids a través de la carboxilació del metional catalitzada per una descarboxilasa, la cetoàcid descarboxilasa A (KdcA), acoblada a una Leucina deshidrogenasa (LeuDH)²⁷.

1. Introducció

1.2.1.2. Sistemes multienzimàtics per a la producció de productes bio-basats

La unió europea (UE) ha expressat la necessitat de modernitzar la indústria, enfocada en la millora i innovació en la producció i consum de productes i materials, per tal de garantir el manteniment dels recursos del planeta. En aquest sentit, la sostenibilitat és el concepte clau al qual s'ha d'enfocar la investigació de nous (bio)processos, principalment per a permetre la transició cap a l'anomenada **bioeconomia**, que tal i com defineix la UE "representa la utilització de recursos biològics renovables del mar i la terra, com conreus, boscos, peixos, animals i microorganismes per produir aliments, materials i energia" (Principi 7 de la química verda), i permetrà accelerar el progrés cap a l'economia circular i baixa en carboni²⁸. I és que, des de fa temps, el món ha reconegut que l'ús de recursos no renovables no és sostenible a llarg termini.

És aquí on juga un paper rellevant el desenvolupament de sistemes multienzimàtics que utilitzen substrats renovables per a la producció de compostos d'alt valor afegit, o amb un interès industrial. Un exemple d'aquests són els anomenats **chemical building blocks**, o compostos que són la base per a la síntesi de molècules més complexes. Aquests són especialment rellevants en la indústria farmacèutica, ja que són els precursors del principi actiu d'interès, i l'ús d'enzims resulta atractiu gràcies a les propietats d'aquests comentades anteriorment (alta selectivitat, especificitat, condicions de reacció suaus, etc...). Degut a la seva rellevància, a la literatura podem trobar exemples com el sistema desenvolupat per Velasco-Lozano S. et al. (2020)²⁹ per a la síntesi d'aminoalcohols, compostos que poden utilitzar-se com a intermediaris en síntesi asimètrica³⁰, a partir de diols de fonts renovables³¹ utilitzant una cascada enzimàtica de dos enzims (una ADH i una ω -transaminasa) i assistits per un enzim auxiliar (L-Alanina deshidrogenasa (L-AlaDH)). O bé el sistema bi-enzimàtic, format per una glucosa oxidasa i una glucoamilasa, desenvolupat per Rezaei S. et al. (2019)³² per a la síntesi d'àcid glucònic a partir del midó.

D'altra banda, la biocatàlisi també pot ser aplicada per a la generació de materials que podran ser aplicats en sectors com la producció de **biocombustibles**. I aquest és un clar exemple de com la biotecnologia permetrà la substitució dels hidrocarburs, provinents del petroli, per carbohidrats que poden ser biotransformats en productes químics bàsics (**commodity chemicals**). El carbohidrat per excel·lència és la glucosa, i una de les fonts d'obtenció és a través de la hidròlisi del midó. Aquesta hidròlisi consta de dues etapes: en la primera etapa (**la liqüefacció**) el midó s'hidrolitza parcialment per acció de l' α -amilasa, i en la segona etapa (**la sacarificació**) s'obté la glucosa per acció d'una glucoamilasa i una pululanasa. El problema d'aquest procés és que les condicions de reacció de la primera etapa (90°C i pH 7) són significativament diferents a les de la segona (60°C i pH 5). Doncs bé, Talekar S. et al. (2013)³³ van desenvolupar de manera enginyosa la possibilitat de dur a terme la reacció en *one-pot*, co-immobilitzant els tres enzims en forma de CLEA (*cross-linked enzyme aggregates*) aconseguint un 100% de conversió en *batch*.

1.2.2. Reptes en el desenvolupament i implantació de sistemes multienzimàtics *one-pot*

Tal i com s'ha anat comentant fins ara, malgrat els beneficis de treballar en reaccions multienzimàtiques en format *one-pot*, hi ha una sèrie de reptes que cal anar superant durant el desenvolupament del sistema multienzimàtic, amb l'objectiu de ser implementat a escala industrial.

1. Introducció

1.2.2.1. La regeneració del cofactor, un repte de la biocatàlisi

Una de les principals limitacions de la biocatàlisi és quan la reacció implica la utilització de **cofactors** que es consumeixen estequiomètricament, especialment en reaccions d'oxidoreducció, ja que degut al seu elevat cost, dificulten l'aplicació industrial dels enzims que catalitzen aquestes reaccions (oxidoreductases). D'aquests cofactors, els més comunament utilitzats per a les oxidoreductases són la Nicotinamida Adenina Dinucleòtid (NAD), la Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Fosfat (NADP), la Flavina MonoNucleòtid (FMN) i la Flavina Adenina Dinucleòtid (FAD)³⁴. Degut a l'elevat cost d'aquests cofactors, no és econòmicament viable utilitzar-los en proporció estequiomètrica respecte al substrat, i per això, cal dur a terme estratègies de regeneració del cofactor per tal de reduir-ne la seva quantitat en la reacció. De fet, es considera que una regeneració del cofactor és eficient quan el número de recanvi (mols de producte per mol de cofactor) es troba entre 100 – 1000³⁵.

Actualment són tres els principals sistemes regeneració del cofactor: la regeneració química, la electroquímica i la enzimàtica, i cadascun d'ells presenta els seus avantatges i inconvenients (Taula 3).

Taula 3. Avantatges i inconvenients dels tres sistemes de regeneració del cofactor (adaptat de Bachosz et al., 2023³⁴).

<i>Sistema de regeneració</i>	<i>Avantatges</i>	<i>Inconvenients</i>
Regeneració química	- Relativament econòmics - Generalment no generen subproductes - Mètode senzill - Reactius comercialment disponibles	- Baixa selectivitat - Reactius tòxics - Sovint incompatible amb els enzims - Baix nombre de recanvi
Regeneració electroquímica	- Energies netes i renovables - No requereixen de reactius estequiomètrics	- Baixa selectivitat - Incrustació de l'electròde - Complexitat dels equips - Requereixen de potencials elevats
Regeneració enzimàtica	- Alta selectivitat - Sostenible - mediambientalment - Obtenció per expressió heteròloga a partir de matèries primes renovables	- Baixa estabilitat dels enzims - Cost elevat - Afegeix complexitat per a la purificació posterior

La **regeneració química** consisteix en afegir un reactiu en la reacció que s'encarrega de retornar el cofactor al seu estat inicial (oxidat o reduït) un cop es produeix la reacció (oxidació o reducció). El ruteni(II) tris-(1,10-fenantrolina-5,6-diona) és un exemple de regeneració química del NAD⁺.

1. Introducció

La **regeneració electroquímica** utilitza una font externa d'energia i uns elèctrodes (format per un ànode i un càtode) on es produeix la regeneració del cofactor mitjançant la seva reducció (càtode) o oxidació (ànode). Els materials més utilitzats en l'ànode són el platí, i en el càtode metalls com l'alumini, la plata o l'or i també el grafit.

La **regeneració enzimàtica** consisteix en una segona reacció en paral·lel que oxida o redueix el cofactor a través del mateix o d'un altre enzim i substrat (**Figura 3**). A diferència dels sistemes anteriors, aquest sistema de regeneració es caracteritza per la seva alta eficiència, amb un elevat nombre de recanvi, i la seva alta selectivitat. Existeixen múltiples enzims que poden ser utilitzats per a la regeneració del cofactor (sobretot per al NAD(P)⁺/NAD(P)H), com l'alcohol deshidrogenasa (ADH), la glucosa deshidrogenasa (GDH), la NADH oxidasa (NOX), la format deshidrogenasa (FDH), la lactat deshidrogenasa (LDH), entre d'altres.

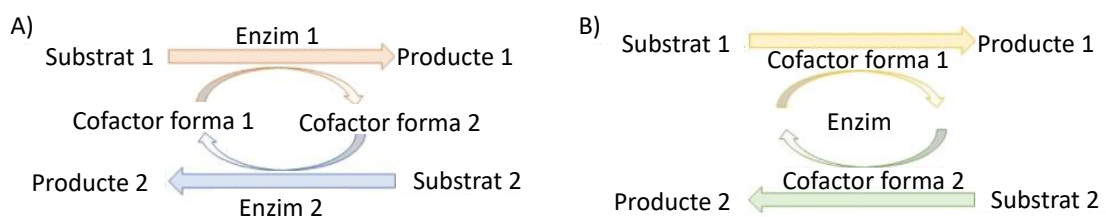


Figura 3. Regeneració enzimàtica del cofactor utilitzant dos enzims (A) o el mateix enzim (B). (Adaptat de Bachosz et al., 2023³⁴)

1.2.2.2. Condicions d'operació, proporció i quantitat dels enzims

Dur a terme la reacció en *one-pot* implica que tots els enzims estan exposats a les mateixes condicions de reacció, tals com el pH, la temperatura i la composició del medi de reacció. Cal tenir present que, els enzims han evolucionat per funcionar en el seu ambient cel·lular particular, amb unes condicions concretes i sota una regulació específica de la seva activitat. Dit d'una altra manera, cada enzim presenta unes condicions òptimes, a les quals ha estat adaptat, que difereixen entre els diferents organismes vius del planeta, i fins i tot, dins de la pròpia cèl·lula. Donada la gran diversitat d'organismes, és clar que cadascun d'ells s'ha adaptat a unes condicions que poden ser inclús totalment oposades, un exemple són les condicions extremes a les que poden viure alguns microorganismes, com són els psicròfils (organismes capaços de viure a temperatures per sota de 15°C³⁶) i els termòfils (organismes capaços de viure a temperatures superiors als 50°C³⁷). Per tant, cal tenir en compte aspectes com la seva activitat enfront de factors com la temperatura i el pH, i és que trobar enzims compatibles des del punt de vista de les condicions d'operació és una tasca desafiant. Gràcies a eines com l'extensa base de dades d'enzims BRENDA³⁸ o de proteïnes UniProt³⁹, es troben a disposició un enorme ventall d'enzims a partir del qual es pot començar la recerca.

D'altra banda, pel fet de formar part d'una cascada enzimàtica, la catàlisi duta a terme per cadascun dels enzims no es troba aïllada, sinó més aviat al contrari, cada reacció està afectada i afecta a la resta de reaccions del sistema, de tal manera que la quantitat i proporció d'enzims no és un paràmetre trivial, i que presenta un efecte important en la formació del producte final. Per tant, una de les fases en el desenvolupament de sistemes multienzimàtics *one-pot*, i com es veurà il·lustrada en aquesta tesi, és l'estudi de la quantitat i proporció dels enzims.

1. Introducció

1.2.2.3. Cost del biocatalitzador

Per últim, però no menys important, cal tenir en compte el cost del biocatalitzador. I és que aquest cost sol representar una part important dels costos globals del procés (entre un 5% i 10%⁴⁰), ja que la producció, i sobretot la purificació acostumen a ser processos costosos, fent que la viabilitat del procés també es vegi influenciada econòmicament. Aquest punt està estretament relacionat amb els dos anteriors (condicions de reacció i quantitat/proporció d'enzims), ja que unes condicions i proporcions òptimes dels enzims resultarà en una reducció de l'activitat enzimàtica a utilitzar, i en conseqüència, en una reducció dels costos. En aquest sentit, la reutilització dels enzims és un factor clau per a la indústria, i per tant, cal considerar estratègies (immobilització d'enzims, ultrafiltració del medi de reacció, etc...) que permetin recuperar, en forma activa, l'enzim al finalitzar el procés. De fet, la baixa disponibilitat d'enzims altament estables i que es puguin produir en elevades quantitats amb un baix cost, és un dels impediments en l'aplicació industrial d'aquests sistemes⁴¹.

1.3. Producció i purificació d'enzims

L'aplicació dels enzims a nivell industrial requereix de la seva producció, i en alguns casos la purificació, a gran escala, i per tant, és imprescindible aconseguir elevades quantitats en la seva obtenció. De forma natural, els nivells d'expressió d'un enzim en concret acostumen a ser relativament baixos en el microorganisme hoste⁴². A més, la forma salvatge de l'enzim (*wild-type*) pot no ser l'adequada per a un processament posterior, com per exemple la purificació o immobilització. Per aquest motiu, l'estratègia més eficient és dur a terme l'**expressió recombinant** de l'enzim en un microorganisme capaç de créixer a **altes densitats cel·lulars**, i amb alts nivells d'expressió de l'enzim recombinant. D'aquesta manera, també es pot modificar la seqüència de la proteïna, aplicant eines de biologia molecular, per tal d'afegir seqüències o dominis capaços d'interaccionar de forma específica amb molècules concretes (per exemple: metalls quelats, carbohidrats, altres proteïnes, etc...).

1.3.1. Producció d'enzims recombinants

La producció **d'enzims recombinants** (o proteïnes en general), es pot dur a terme principalment en tres tipus cel·lulars: bacteris, llevats o fongs, i cèl·lules animals (**Taula 4**).

Taula 4. Microorganismes hoste més utilitzats, segons el tipus cel·lular, en la expressió de proteïnes recombinants^{43,44}.

Tipus cel·lular	Microorganismes utilitzats en expressió heteròloga
Bacteris	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
Llevats/fongs	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Pichia pastoris</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>
Cèl·lules de mamífers	CHO (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)
	HEK293 (<i>Human embryonic kidney cells</i>)

1. Introducció

L'elecció d'un tipus o altre es basarà en la proteïna que es vol expressar, ja que cadascun d'ells presenta avantatges i inconvenients que cal valorar (**Taula 5**). Per exemple, si la proteïna a expressar prové de l'espècie *Homo sapiens*, i és essencial que les **modificacions post-traduccionals** siguin el més similars possible a l'hoste, escollirem cèl·lules animals (o humanes) per a l'expressió de la proteïna recombinant. Si, en canvi, la proteïna prové d'un bacteri, durem a terme l'expressió en plataformes cel·lulars com *E. coli* o *B. subtilis*, gràcies a l'elevada productivitat i baix cost que ofereixen.

Taula 5. Principals característiques de l'expressió de proteïnes recombinants en bacteris, fongs i cèl·lules animals⁴⁵.

Característica	Bacteris	Fongs (llevats)	Cèl·lules animals
Velocitat de creixement	Alta	Alta	Baixa
Cost del medi de cultiu	Baix	Baix	Alt
Nivell d'expressió	Alt	Alt	Baix
Modificacions post-traduccionals	Inexistent	Existent (diferents patrons de glicosilació)	Existent (similar o igual a humana)
Tipus d'expressió	Intracel·lular (<i>E. coli</i>) o extracel·lular (<i>B. subtilis</i> ⁴⁶)	Extracel·lular	Extracel·lular
Risc de contaminació	Baix	Baix	Alt

1.3.1.1. Producció d'enzims en *Escherichia coli*

E. coli és un dels primers microorganismes en ser utilitzat per a la producció recombinant de proteïnes gràcies al baix cost dels medis de cultiu, per ser extensament estudiat a nivell metabòlic i genètic, i a una alta velocitat de creixement fins a elevades densitats cel·lulars, resultant en altes productivitats⁴².

Tanmateix, presenta alguns desavantatges, per exemple no és adequat per a proteïnes que requereixen de modificacions post-traduccionals per a ser actives, en alguns casos forma cossos d'inclusió (sobretot en proteïnes d'origen eucariota), i no està reconegut com a segur (GRAS) degut a la presència d'endotoxines.

Per altra banda, en la majoria de casos, el sistema d'expressió està basat en la presència de plasmidis que contenen el gen d'interès, reguladors de l'expressió i gens de resistència a antibiòtics. Això fa que durant el cultiu sigui necessari afegir antibiòtics, ja que aquests actuen com a marcadors de selecció, fet que dificulta la seva aplicació a nivell industrial. Per aquest motiu, s'han desenvolupat sistemes d'expressió lliures d'antibiòtics, que es basen en auxotrofies que se suplementen amb la presència del plasmidi que conté el gen d'interès i el gen necessari per a la viabilitat de la cèl·lula^{47,48}.

1. Introducció

E. coli no és capaç de créixer quan la concentració de glucosa en el medi és superior a $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, i per tant, la biomassa final màxima que es pot obtenir en un **batch** (creixement en discontinu) es troba limitada per aquesta concentració inicial⁴⁹, i tenint en compte que la expressió de les proteïnes recombinants és intracel·lular en aquest cas, suposa una limitació en la productivitat del sistema. A més, la flexibilitat de control de la velocitat de creixement en **batch** és limitada, ja que la presència de glucosa en el medi fa que *E. coli* creixi a la màxima velocitat que li permetin les condicions del medi⁵⁰. Per altra banda, hi ha soques d'*E. coli* que acumulen acetat quan creixen a velocitats específiques superiors a $0,25 \text{ h}^{-1}$, i aquest és inhibitori per al creixement i expressió de proteïnes recombinants a partir de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ⁵¹. Per tant, tot i ser una estratègia de cultiu senzilla d'operar, no és adequada per assolir altes densitats cel·lulars i tenir un control precís de la velocitat de creixement.

El **fed-batch (creixement en discontinu alimentat)** és una estratègia d'operació alternativa, que permet controlar la velocitat de creixement mitjançant una limitació per substrat i alhora assolir altes densitats cel·lulars⁵² (arribant a densitats cel·lulars de fins a $95 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$), fet que permet incrementar la productivitat volumètrica respecte a un cultiu en **batch**.

Aquesta estratègia consta de dues fases: la primera fase de creixement en discontinu o **batch**, i la segona fase de creixement i inducció en discontinu alimentat o **fed-batch**. La primera fase en **batch** s'inicia amb l'addició de tots els components del medi de cultiu necessaris per al creixement. En aquesta fase es parteix d'una concentració determinada de font de carboni, per tal de permetre una acumulació inicial de biomassa. La segona fase en **fed-batch**, s'inicia quan s'ha consumit la font de carboni en la fase **batch**, alimentant el medi de cultiu amb una solució d'aliment que conté la font de carboni a alta concentració. D'aquesta manera, la velocitat de creixement es controla a partir de la velocitat d'addició de la font de carboni seguint la següent equació derivada del balanç de matèria:

$$F(t) = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \exp(\mu \cdot t)}{S_f \cdot Y_{X/Sap}} \quad (\text{Eq. 1})$$

On:

$F(t)$ = cabal d'alimentació de l'aliment ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$) al temps des de l'inici del **fed-batch**.

μ = velocitat específica de creixement (h^{-1})

X_0 = Concentració de biomassa a l'inici del **fed-batch** ($\text{gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$)

V_0 = Volum de medi al reactor a l'inici del **fed-batch** (L)

t = temps des de l'inici del **fed-batch** (h)

S_f = Concentració de substrat (glucosa) a l'aliment ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$Y_{X/Sap}$ = Rendiment biomassa substrat aparent ($\text{gDCW} \cdot \text{gS}^{-1}$)

1. Introducció

1.3.2. Purificació dels enzims

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, la purificació dels enzims és un procés que afegeix un cost addicional al sistema a desenvolupar. Per això, en general, en les reaccions amb enzims lliures s'acostuma a utilitzar un **lisat cel·lular** (en el cas de produccions intracel·lulars) o **extractes de sobrenedants** (en el cas de produccions extracel·lulars) que contenen l'enzim directament en la reacció, ja que és l'opció més econòmica d'aplicar-lo. Tanmateix, en algunes ocasions pot ser necessari un major grau de puresa, com seria el cas d'enzims terapèutics o en la manufactura de fàrmacs. O fins i tot, degut a la presència d'altres enzims propis de l'hoste, per evitar la presència de reaccions secundàries que disminuirien el rendiment de la reacció principal⁵³. Per exemple, l'expressió d'enzims recombinants en *E. coli*, tal i com hem comentat anteriorment, és intracel·lular i per tant, si l'objectiu és utilitzar l'enzim en forma lliure, cal extreure'l de la cèl·lula. Aquesta extracció consisteix en una **disrupció cel·lular**, en la qual s'allibera tot el contingut del citoplasma en el medi formant part de la **fracció soluble**, i les restes cel·lulars (membrana cel·lular, paret cel·lular, ADN, cossos d'inclusió) es troben en suspensió formant part de la **fracció insoluble**. Un cop separades les fraccions soluble i insoluble, es recupera la fracció soluble (lisat cel·lular) on es troba l'enzim produït junt a la resta de productes i enzims, propis del microorganisme, que estan solubles al citosol cel·lular.

En els casos de necessitar un pas de purificació de l'enzim produït, la cromatografia d'afinitat és una de les eines més utilitzades degut a la seva simplicitat i pels alts graus de puresa que s'assoleixen. Gràcies a les eines de biologia molecular i síntesi *in vitro* de gens, és possible afegir cues als extrems N- i C-terminal que posteriorment serviran per a la separació de l'enzim d'interès de la resta de proteïnes mitjançant la cromatografia d'afinitat. La **cua d'histidines (His-tag)** és una de les més utilitzades gràcies a la seva alta especificitat pels metalls divalents presents en el suport cromatogràfic. Així que se l'anomena **cromatografia d'afinitat de metalls immobilitzats (IMAC)**. Aquesta especificitat és deguda a la capacitat dels residus d'histidina d'interaccionar amb metalls divalents a través del seu grup imidazol de la cadena lateral (**Figura 4**)⁵⁴.

1. Introducció

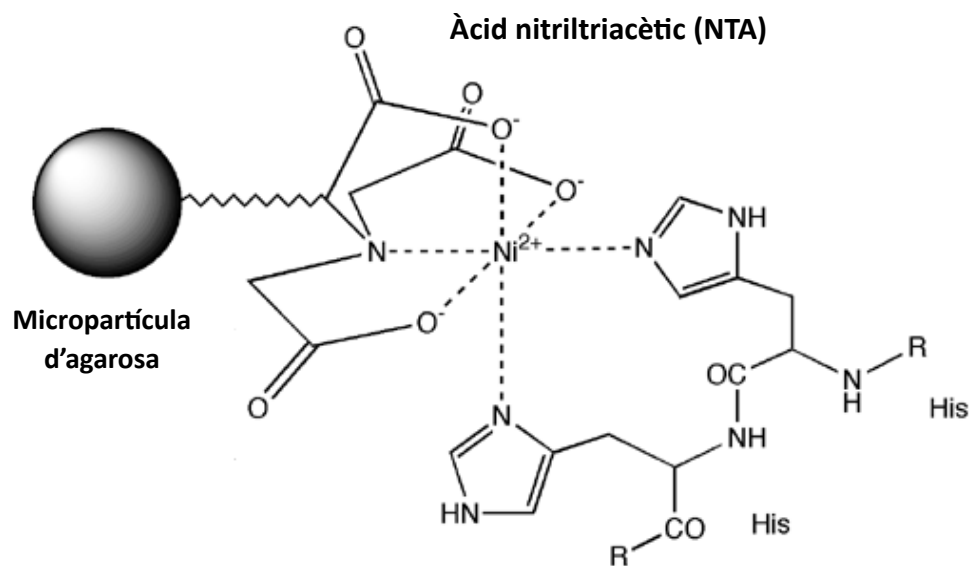


Figura 4. Interacció de la cua d'histidines de les proteïnes amb el Ni^{2+} quelat del suport cromatogràfic d'afinitat. En aquest exemple es mostra la interacció de residus Histidina amb el Ni^{2+} immobilitzat en agarosa-NTA (extret de LibreTexts® Chemistry - Analytical Sciences Digital Library).

Mesurant l'activitat catalítica dels enzims, és possible seguir la seva presència durant la purificació a través de la mesura de la seva activitat. D'aquesta manera, es poden avaluar els paràmetres del procés de purificació: el rendiment, l'activitat específica i el grau de purificació.

El **rendiment de purificació** es defineix com la proporció entre l'activitat recuperada respecte a l'activitat inicial (**Eq. 2**), en termes d'unitats totals (U_T). Ens indica la capacitat de recuperació de l'enzim d'una mostra a purificar, és a dir, quant d'enzim actiu recuperem al final del procés.

$$\text{Rendiment de purificació (\%)} = \frac{\text{Activitat retinguda (} U_T \text{)}}{\text{Activitat inicial (} U_T \text{)}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

L'**activitat específica** es defineix com l'activitat enzimàtica total respecte als mil·ligrams de proteïna totals (**Eq. 3**). Ens indica la proporció d'enzim actiu respecte al conjunt de proteïnes totals presents. Indirectament, permet determinar l'eficàcia dels passos de purificació d'acord al grau d'increment del seu valor i detectar la inactivació de l'enzim durant el procés si s'observa una disminució d'aquest paràmetre.

$$\text{Activitat específica (} U \cdot \text{mg}^{-1} \text{)} = \frac{\text{Activitat enzimàtica total (} U_T \text{)}}{\text{Proteïna total (} U_T \text{)}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

El **grau de purificació** es defineix com la relació entre l'activitat específica inicial respecte a l'activitat específica després del procés de purificació (**Eq. 4**). Ens indica l'eficiència del procés de purificació, és a dir, com d'específica és la separació de l'enzim de la resta de proteïnes presents en la solució enzimàtica.

$$\text{Grau de purificació} = \frac{\text{Activitat específica final (} U \cdot \text{mg}^{-1} \text{)}}{\text{Activitat específica inicial (} U \cdot \text{mg}^{-1} \text{)}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

1. Introducció

D'altra banda, si el procés de purificació està format per més d'una etapa, es poden avaluar els paràmetres per cadascuna d'elles. D'aquesta manera es pot determinar el rendiment i el grau de purificació de cada etapa, i així poder saber quina etapa és el coll d'ampolla del procés de purificació, en el cas que sigui necessari optimitzar els rendiments globals de purificació del nostre enzim.

1.4. Immobilització d'enzims

Treballar amb els enzims en forma soluble presenta alguns desavantatges. Per una banda, degut a que es troben dissolts en el medi de reacció, dificulta la seva recuperació en finalitzar la reacció i per tant, s'acaba perdent el biocatalitzador. Per altra banda, els enzims es caracteritzen per tenir una estabilitat relativament baixa en les condicions d'operació de la biotransformació. Això limita el seu ús durant un cert temps, és a dir, que cal produir-ne i utilitzar-ne elevades quantitats i, en conseqüència, es redueix el rendiment del biocatalitzador.

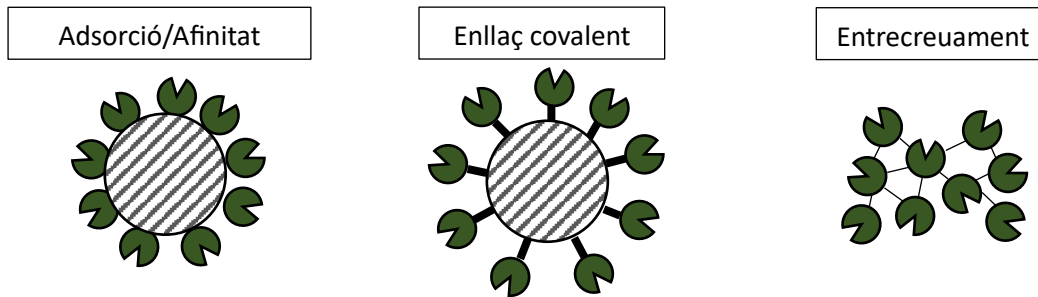
La immobilització dels enzims busca solucionar aquests inconvenients. La immobilització confina físicament el biocatalitzador en una regió definida de l'espai alhora que es manté la seva activitat enzimàtica⁵⁵. Això implica, per una banda, que l'enzim ja no es troba en forma soluble, sinó inclosa en un suport sòlid, en suspensió. D'aquesta manera, es pot separar i recuperar més fàcilment el biocatalitzador del medi de reacció i re-utilitzar-lo de nou. La utilització de biocatalitzadors en forma immobilitzada facilita enormement l'operació del reactor, tant en batch com en continu, respecte a la utilització del biocatalitzador en forma soluble.

Per altra banda, en les partícules on està immobilitzat el biocatalitzador, el mecanisme de transport del substrat i el producte cap als centres actius passa a ser la difusió, ja que desapareix el règim turbulent present en la resta del medi en presència d'agitació. Això implica que si la velocitat de reacció (proporcional a la quantitat d'enzim o centres actius) és superior a la velocitat de difusió, la velocitat de reacció observada estarà limitada per la difusió, és a dir, s'observaran fenòmens de limitacions difusionals, limitant la productivitat del biocatalitzador immobilitzat.

Segons com es produeix la interacció de l'enzim amb la matriu d'immobilització, podem classificar la immobilització en dos tipus: a) aquelles en les que l'enzim està unit al suport mitjançant **enllaços químics** (covalents o no covalents) (**Figura 5A**) i b) aquelles en les que no hi ha enllaços químics amb el suport i aquest és només **una barrera física** que impedeix que el biocatalitzador pugui alliberar-se (**Figura 5B**).

1. Introducció

A)



B)

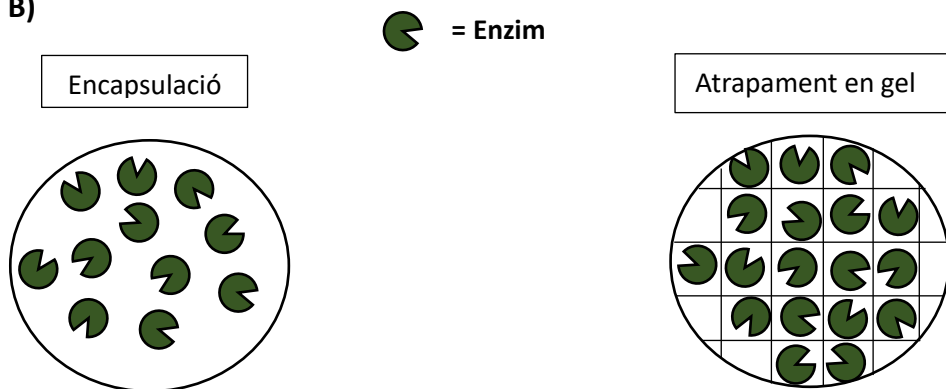


Figura 5. Classificació dels mètodes d'immobilització d'enzims. A) Amb enllaços químics, B) Sense enllaços químics.

Degut a la diversitat de mètodes d'immobilització i suports disponibles, per tal d'escollir quin és el mètode i suport més adient, cal dur a terme la caracterització del procés d'immobilització. Aquesta caracterització busca avaluar dos paràmetres importants de la immobilització: el rendiment d'immobilització i l'activitat retinguda.

El rendiment d'immobilització es defineix com la proporció entre l'activitat total (U_T) del biocatalitzador immobilitzada després del procés d'immobilització, respecte a l'activitat oferta (Eq. 5).

$$\text{Rendiment immobilització (\%)} = \frac{\text{Activitat oferta} - \text{Activitat final del sobrenadant}}{\text{Activitat oferta}} \cdot 100$$

(Eq. 5)

L'**activitat retinguda** es defineix com la proporció entre l'activitat total (U_T) mesurada del derivat respecte a l'activitat total (U_T) oferta. A diferència del rendiment d'immobilització, té en compte la possible inactivació del biocatalitzador degut al procés d'immobilització (Eq. 6).

$$\text{Activitat retinguda (\%)} = \frac{\text{Activitat mesurada del derivat}}{\text{Activitat oferta}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

1. Introducció

On:

- Activitat oferta (U_T): Unitats totals d'activitat ofertes al suport
- Activitat final del sobrenedant (U_T): Unitats totals d'activitat al sobrenedant en finalitzar el procés d'immobilització
- Activitat mesurada del derivat (U_T): Unitats d'activitat totals de la suspensió en rentar i resuspendre el derivat immobilitzat final.

1.5. Sistemes multienzimàtics diana d'aquesta tesi

En la present tesi doctoral, els enzims necessaris s'han produït en cultius de *E. coli* i s'han aïllat/purificat per utilitzar-los com a biocatalitzadors en dos sistemes multienzimàtics *one-pot* diferents per a generar la formació d'enllaços carboni-carboni (C-C) a través d'una **carboxilació**, en el primer sistema i a través d'una **carbolligació**, en el segon sistema. Totes dues reaccions catalitzades per l'enzim **piruvat descarboxilasa** (PDC; EC 4.1.1.1). D'aquesta manera, aprofitem la peculiaritat de la PDC de poder catalitzar tant reaccions de carboxilació com de carbolligació, per a aplicar-les en aquests dos sistemes:

- **Un sistema multienzimàtic com a tecnologia CCU per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO_2 , mitjançant una carboxilació catalitzada per la PDC.**
- **Un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un compost bio-basat, l'acetoïna, a partir d'etanol mitjançant una carbolligació catalitzada per la PDC.**

La PDC és un enzim que, de forma natural, catalitza la descarboxilació no oxidativa de l'àcid pirúvic, generant acetaldehid i CO_2 com a productes. A més, pertany al grup de descarboxilases dependents del cofactor TPP, ja que aquest cofactor és el que participa en el mecanisme de catàlisi (**Figura 6**). A banda d'aquesta reacció, l'enzim també és capaç de catalitzar la carbolligació d'un aldehyd amb una altra molècula d'aldehyd per generar la corresponent 2-hidroxiketona. Aquesta segona reacció es dona per la formació d'un intermedi actiu de l'aldehyd amb el cofactor TPP (enamina – carbanió) que és capaç d'acceptar un segon aldehyd. Aquesta característica el converteix en un enzim versàtil, ja que pot ser utilitzat, per exemple, per catalitzar la descarboxilació del piruvat⁵⁵ o la carbolligació de l'acetaldehid per obtenir acetoïna⁵⁶.

Gràcies a la seva versatilitat, s'ha utilitzat la PDC en la producció de diferents compostos, com el 3-amino-1-fenilbutà (la PDC permet l'eliminació del piruvat generat en la reacció principal)⁵⁵, la efedrina (on la PDC produeix el precursor R-PAC)⁵⁷, o l'acetoïna (per conversió de l'acetaldehid a acetoïna)⁵⁸.

Per altra banda, s'ha identificat la seva presència en diferents llevats com *S. cerevisiae*, dels quals ha pogut ser clonada i caracteritzada. Tanmateix, només s'han identificat sis PDCs en bacteris, en concret, s'ha identificat en els bacteris *Zymomonas mobilis*, *Zymobacter palmae*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Gluconobacter oxydans* i *Sarcina ventriculi*⁵⁹. A més, per a totes elles ja està reportat un procés de producció en *E. coli* a través de cultiu en *fed-batch*, i la seva purificació per cua d'histidines^{60,61}. En aquesta tesi s'han utilitzat dos PDCs diferents, una d'origen bacterià (*Zymobacter palmae*) i l'altre procedent del llevat *S. cerevisiae*.

1. Introducció

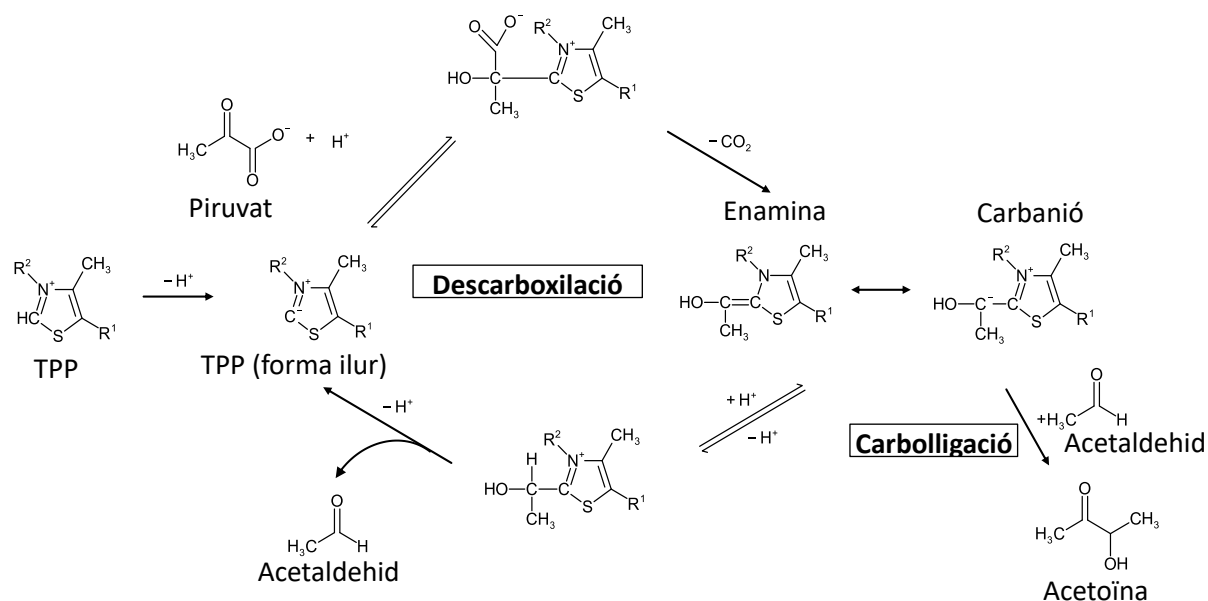


Figura 6. Mecanisme de les reaccions de descarboxilació i carbolligació catalitzades per l'enzim PDC a través del cofactor TPP (Adaptat de Siegert et al., 2005⁶²).

1.5.1. Sistema CCU basat en la síntesi enzimàtica d'àcid làctic a partir de CO_2

El sistema CCU estudiat en aquesta tesi doctoral, forma part del projecte europeu Horizon2020 **BIOCON-CO₂**, en el qual s'estudien diferents factories cel·lulars amb les quals transformar el CO_2 de la indústria en productes de valor afegit⁶³. El projecte busca donar resposta a la necessitat expressada per la Unió Europea, d'aplicar estratègies per a la mitigació de les emissions a l'atmosfera del CO_2 industrial. En aquest sentit, i tal com s'ha comentat anteriorment, les estratègies CCU revaloritzarien el CO_2 com a una font de carboni valuosa, que pot ser utilitzada per a la producció de compostos amb valor afegit, alhora que es redueix l'ús de matèries provinents del petroli utilitzades en les indústries químiques i del plàstic. El cas estudiat en aquesta tesi és la reacció multienzimàtica de síntesi d'**àcid làctic**, ja que aquest genera un valor econòmic respecte al CO_2 consumit per sobre de $400€ \cdot (tona de CO_2 consumida)^{-1}$ (en concret, $700€ \cdot (tona de CO_2 consumida)^{-1}$), suficient per assumir els costos d'energia i de procés (segons l'estudi de mercat dut a terme en el marc del projecte BIOCON-CO₂). A més, la producció d'àcid làctic està en constant creixement, amb un volum de mercat estimat de 1,5 milions de tones l'any 2022 i de 2,8 milions de tones esperat per a l'any 2030⁶⁴, sobretot degut a la seva demanda per ser aplicat com a additiu en pinsos⁶⁵, i per a la producció de PLA (un polímer de l'àcid làctic amb aplicacions en indústries com la del bioplàstic)⁶⁶.

La reacció multienzimàtica estudiada consisteix en una carboxilació de l'acetaldehid a partir del CO_2 a través de l'enzim PDC per produir àcid pirúvic (**Figura 7**). A continuació, a través de l'enzim LDH es redueix l'àcid pirúvic a àcid làctic consumint una molècula de cofactor NADH. Aquest cofactor es regenera amb una reacció acoblada, en la qual l'etanol s'oxida a acetaldehid, i el NAD^+ es consumeix per produir NADH. D'aquesta manera, la reacció acoblada

1. Introducció

proporciona dos dels substrats necessaris per a les reaccions catalitzades per la PDC i la LDH. Aquesta regeneració interna de cofactor fa que el sistema sigui molt atractiu, ja que no es requereix de reaccions addicionals o mecanismes externs de regeneració del NAD^+/NADH .

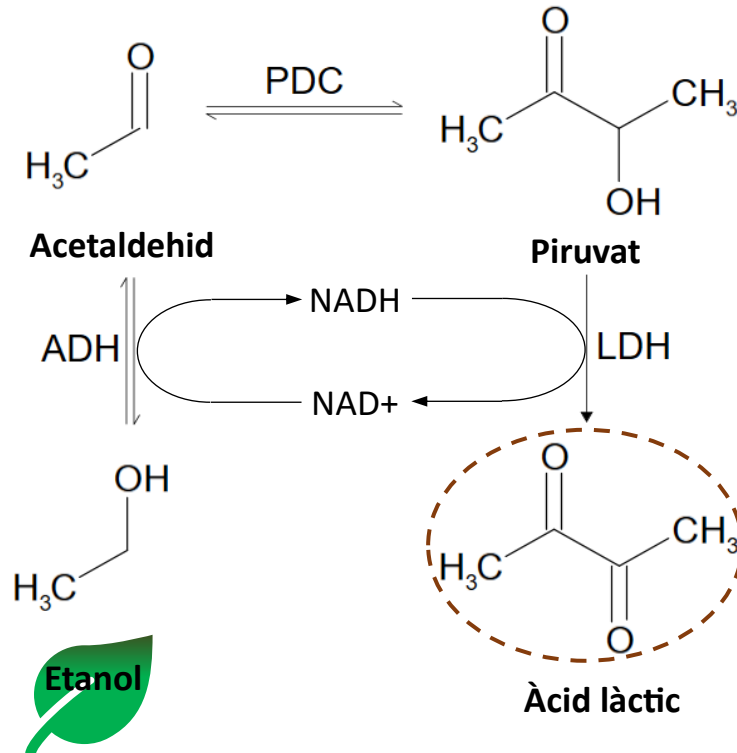


Figura 7. Esquema de reacció de la síntesi d'àcid làctic a partir de CO_2 i etanol, a través del sistema multienzimàtic format per l'alcohol deshidrogenasa (ADH), la piruvat descarboxilasa (PDC) i la lactat deshidrogenasa (LDH).

Tenint en compte que la ruta convencional de síntesi d'àcid làctic per fermentació, i la seva purificació, produeix $1,28 \text{ kg CO}_2 \cdot (\text{kg d'àcid làctic produït})^{-1}$ ⁶⁷, gràcies a aquest sistema multienzimàtic s'espera consumir el CO_2 , ja que a diferència de la fermentació, el sistema el consumeix. En concret, segons l'estequiometria de reacció, es consumeixen 0,488 kg de CO_2 per generar 1 kg d'àcid làctic.

Per a la primera reacció s'utilitza una **alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*** (E.C. 1.1.1.1.), encarregada de catalitzar l'oxidació de l'etanol a acetaldehid a través de la reducció del cofactor NAD^+ . L'enzim consta de quatre subunitats (homotetràmer), amb un pes de 36kDa per subunitat. Cada subunitat conté un domini d'unió al cofactor NAD^+/NADH , un lloc d'unió a un àtom de Zn^{2+} que participa en la catàlisi, i un segon àtom de Zn^{2+} estructural⁶⁸.

Per a la segona reacció s'utilitzen dues variants de PDC (E.C. 4.1.1.1.), una **PDC del bacteri *Z. palmarum***⁶⁹ i una **PDC del llevat *S. cerevisiae***⁷⁰. Aquest enzim catalitza la carboxilació de l'acetaldehid a piruvat utilitzant el CO_2 . La seva estructura consta d'un homotetràmer, on cada subunitat té un pes de 60kDa (*Z. palmarum*) o 61,5 kDa (*S. cerevisiae*) i formen dos dímers que uneixen 2 molècules de TPP i 2 àtoms de Mg^{2+} cadascun.

1. Introducció

Per a la tercera reacció s'utilitza una **LDH del bacteri termòfil *Thermotoga maritima*** (E.C. 1.1.1.27.), que catalitza la reducció del piruvat a lactat a través de la oxidació del NADH. L'enzim consta de quatre subunitats de 35kDa cadascuna que formen un homotetràmer, i fins i tot s'ha detectat la formació d'un homooctàmer (dímer de tetràmers)⁷¹.

1.5.2. Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

L'**acetoïna** (3-hidroxí-2-butanona o acetil metil carbinol) és un compost volàtil amb olor a iogurt i un sabor característic a mantega. Degut a les seves propietats, el seu camp d'aplicació a la indústria és extraordinàriament ampli. Una de les seves aplicacions aprovada és com a aromatitzant per a la indústria alimentària, ja que és un compost reconegut com a segur (GRAS) per la JECFA i la FDA. Altres aplicacions també inclouen la indústria agrària gràcies a la seva bioactivitat com a promotor del creixement en plantes, o activant sistemes de protecció en plantes contra alguns agents infecciosos^{72,73}. Degut al seu interès industrial, el departament d'energia dels estats units (EE.UU.) ha classificat l'acetoïna com un dels 30 productes químics prioritaris per al seu desenvolupament i utilització⁷⁴.

Actualment, però, la major part de l'acetoïna produïda es fa a través de la via química, i per tant, pot tenir implicacions de seguretat en alguns sectors, a més de ser processos energèticament i ambientalment desfavorables⁷⁵. Per aquest motiu, s'està investigant la seva producció mitjançant la biotecnologia, ja que hi ha microorganismes que de forma natural la produeixen, i d'aquesta manera es pot etiquetar el producte com a natural. Meng, W et al.⁷⁶ van publicar el 2022, una revisió excel·lent sobre diferents plataformes biotecnològiques per la producció d'acetoïna, compost d'interès per a indústries com la farmacèutica i l'alimentària, i que es pot aconseguir mitjançant biocatalitzadors.

L'interès industrial de l'acetoïna fa que sigui interessant desenvolupar sistemes per a la seva producció biotecnològica, i és que el preu actual de l'acetoïna es troba al voltant dels 36.000€ per tona⁷⁷, mentre que, per exemple, l'etanol es troba en 500€ per tona⁷⁸, és a dir, que el cost de l'acetoïna és més de 70 vegades superior al de l'etanol. Per tant, des d'un punt de vista econòmic resulta industrialment atractiu dur a terme la seva síntesi a partir d'etanol. I encara més, i és aquí on resulta especialment rellevant l'interès de desenvolupar-lo, és que aquest etanol pot provenir de **fonts renovables (bioetanol)**, com per exemple de residus lignocel·lulòsics dels quals, després d'un pretractament, es poden obtenir sucres fermentables que posteriorment són utilitzats en fermentacions alcohòliques, permetent que el procés sigui **bio-basat**⁷⁹.

En aquesta tesi, s'ha estudiat un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol utilitzant l'enzim PDC (**Figura 8**), un enzim capaç de catalitzar la condensació aldòlica de l'acetaldehid a acetoïna (carbolligació). Per tal de generar el substrat necessari per a la PDC, s'acoba la reacció d'oxidació de l'etanol a acetaldehid catalitzada per la ADH, requerint del cofactor NAD⁺ que es regenera amb l'adició de l'enzim NOX, encarregat d'oxidar el NADH generat a NAD⁺.

1. Introducció

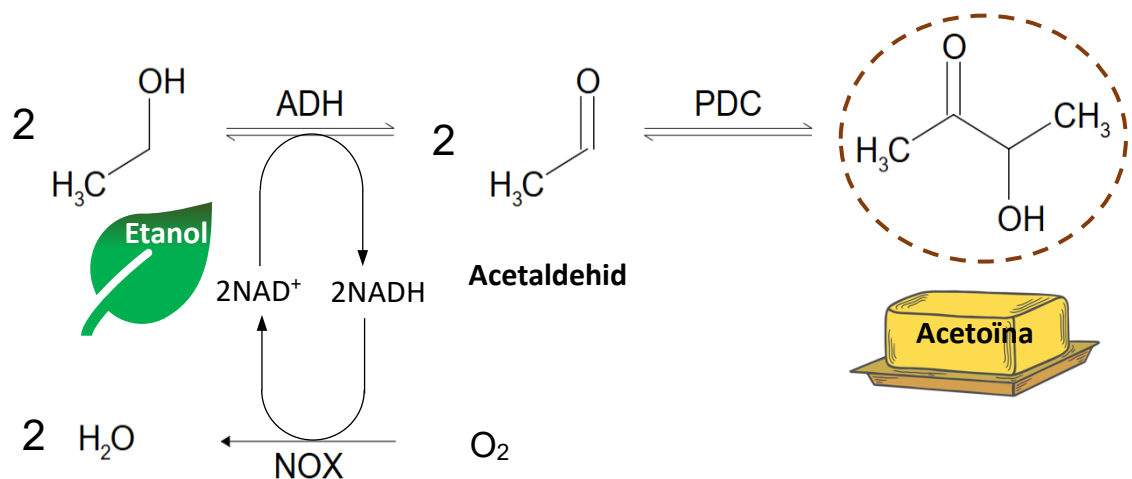


Figura 8. Esquema del sistema multienzimàtic que catalitza la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol i amb regeneració del cofactor NAD^+ . ADH: alcohol deshidrogenasa, PDC: Piruvat descarboxilasa, NOX: NADH oxidasa.

L'enzim utilitzat per a la síntesi d'acetoïna és la PDC de *Z. palmae*, juntament amb la ADH de *S. cerevisiae* per a la síntesi d'acetaldehid a partir d'etanol, ambdós ja descrits en l'apartat anterior (1.5.1).

Per a la regeneració del cofactor NAD^+ , s'ha utilitzat la **NADH oxidasa de *S. pyogenes*** (E.C.1.6.99.3). Aquest enzim catalitza la oxidació del NADH utilitzant O_2 com a co-substrat i formant NAD^+ i H_2O com a productes. Es tracta d'un dímer de 50kDa per subunitat, amb un centre catalític format per un residu de cisteïna, dos dominis d'unió al cofactor FAD i un domini d'unió al NADH⁸⁰.

2. Objectius de la tesi

2. Objectius de la tesi

Els objectius d'aquesta tesi, es poden dividir en tres grans blocs: (i) Producció i purificació d'enzims, (ii) desenvolupament d'un sistema multienzimàtic CCU per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol, mitjançant la reacció de carboxilació catalitzada per la PDC, i (iii) desenvolupament d'un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat, l'acetoïna, a partir d'etanol, mitjançant la reacció de carbolligació catalitzada per la PDC.

Per al **primer bloc** (Producció i purificació d'enzims), els objectius principals han estat els següents:

- 1. Producció dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH, en cultius d'*E. coli* d'alta densitat cel·lular, dels quals no es disposava d'estoc suficient per als estudis de les reaccions.**
- 2. Desenvolupament d'un procés de purificació per als enzims ScADH, ScPDC, TmLDH i SpNOX en un equip FPLC.**
- 3. Caracterització de la liofilització dels enzims en termes de rendiment del procés.**

Per al **segon bloc** (desenvolupament d'un sistema multienzimàtic CCU per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol, mitjançant la reacció de carboxilació catalitzada per la PDC), els objectius principals han estat els següents:

- 1. Sintetitzar àcid làctic a partir d'etanol i CO₂ amb un sistema multienzimàtic amb regeneració interna de cofactor.**

Aquest objectiu general desglossa en els següents objectius específics:

- 1.1. Caracterització dels enzims implicats en el sistema
 - 1.2. Determinació del millor pH de la reacció completa
 - 1.3. Dur a terme la reacció a pressió atmosfèrica i a alta pressió
 - 1.4. Optimització de les proporcions d'enzims per maximitzar la producció d'àcid làctic
 - 1.5. Estudi del medi de reacció per a incrementar la concentració final d'àcid làctic
 - 1.6. Demostrar la capacitat de sintetitzar àcid làctic utilitzant gas sintètic que imita la composició del gas real de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica
- 2. Immobilització dels enzims que participen en el sistema multienzimàtic i dur a terme la reacció en les millors condicions amb els enzims immobilitzats**

Aquest objectiu es desglossa en els següents objectius específics:

- 2.1. Caracterització de la immobilització en diferents suports i selecció del millor suport en termes de rendiment i activitat retinguda
- 2.2. Aplicació dels derivats immobilitzats en la reacció en les millors condicions establertes

2. Objectius de la tesi

Per al **tercer bloc** (desenvolupament d'un sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat, l'acetoïna, a partir d'etanol, mitjançant la reacció de carbolligació catalitzada per la PDC), els objectius principals han estat els següents:

- 1. Sintetitzar acetoïna a partir d'etanol mitjançant un sistema multienzimàtic utilitzant l'enzim PDC i amb regeneració del cofactor NAD^+ /NADH.**

Aquest objectiu es desglossa en els següents objectius específics:

- 1.1. Determinar el millor pH de la reacció multienzimàtica
- 1.2. Millora de les proporcions i quantitats dels enzims que participen en el sistema multienzimàtic
- 1.3. Estudiar l'efecte de la concentració del cofactor NAD^+ en la producció d'acetoïna

3. Materials i mètodes

3. Materials i mètodes

3.1. Reactius i suports d'immobilització i/o purificació

El piruvat de sodi ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$), l'àcid cítric ($(\text{HOOCCH}_2)_2\text{C}(\text{OH})\text{COOH}$), el citrat de sodi ($(\text{NaOOCCH}_2)_2\text{C}(\text{OH})\text{COONa}$), el pirofosfat de tiamina (TPP) i el clorur de magnesi (MgCl_2) van ser obtinguts de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) per a la determinació de l'activitat enzimàtica i els medis de reacció. L'etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), els fosfats de potassi (K_2HPO_4 i KH_2PO_4), l'acetat de sodi (CH_3COONa) i el bicarbonat de sodi (NaHCO_3) van ser obtinguts de Scharlab, S.L. (Barcelona, Espanya) per a la determinació de l'activitat enzimàtica i els medis de reacció. Els estàndards de l'acetoina ($\text{CH}_3\text{COCHOHCH}_3$) i l'àcid làctic ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) van ser obtinguts de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) i utilitzats com a estàndards analítics per a la cromatografia de gasos i l'anàlisi de LC-MS, respectivament. El NADH i el NAD^+ van ser obtinguts de Bontac Bio-engineering Co. (Shenzhen, Xina) com a cofactors de reacció. El gas diòxid de carboni (CO_2) així com la mescla de gasos que imiten la composició real dels gasos emesos pels alts forns d'Arcelor Mittal (24,5% CO_2 , 46,6% N_2 , 23,9% CO , 1,2% O_2 , 3,8% H_2) van ser obtinguts de Carburos Metálicos (Barcelona, Espanya). Els reactius 1,4-butandiol diglicidil èter, NaOH i HCl van ser obtinguts de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), i el NaBH_4 va ser obtingut de Scharlab, S.L. (Barcelona, Espanya).

Les reïnes d'agarosa funcionalitzades amb grups amino (MANA-agarosa), i Ni^{2+} -IDA-agarosa, juntament amb la d'agarosa no funcionalitzada 4BCL per a l'obtenció d'epoxi-agarosa, es van obtenir d'ABT Technologies (Madrid, Espanya).

Les reïnes Purolite® de metacrilat funcionalitzades amb grups amino (ECR8409) o epoxi (Praesto epoxy 45), van ser cedides per Purolite Life Sciences® (Bala Cynwyd, PA, USA).

3.2. Producció dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH

La PDC de *S. cerevisiae* (ScPDC), la ADH de *S. cerevisiae* (ScADH) i la LDH de *T. maritima* (TmLDH) es van expressar en soques recombinants d'*E. coli* M15 ΔglyA transformades amb pVEF-HisScADH, pVEF-HisScPDC o pVEF-HisTmLDH, on tots els enzims es van expressar amb una cua d'histidines. Els cultius es van realitzar segons va descriure Benito M. et al., 2022⁸¹. En concret, es va preparar el cultiu d'un pre-inòcul, afegint 100 μL de crioestocs de glicerol a 20 mL de medi definit (amb la composició descrita per Vidal L. et al., 2008⁴⁷), i es va incubar durant una nit a 37°C amb una agitació de 150 rpm. Els cultius de l'inòcul es van preparar en dos erlenmeyers amb 200 mL de medi definit, inoculats amb el pre-inòcul fins a una OD_{600} inicial de 0,2 i incubats a 37°C amb una agitació de 150 rpm. Quan els cultius de l'inòcul van arribar a una OD_{600} de 1,2, es van transferir a 2,5 L de medi definit preparat en un biorreactor de 5 L per assolir una OD_{600} inicial de 0,2. Es va realitzar una fase *batch* inicial a 37°C, pH 7 i pO_2 30%, on el pH es va controlar amb una solució de NH_4OH al 15% v · v⁻¹. Quan es va consumir tota la glucosa, es va iniciar la fase *fed-bath* amb una addició exponencial preprogramada de medi d'alimentació (composició descrita per Vidal L. et al., 2008⁴⁷), seguint l'equació 1.

$$F(t) = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \exp(\mu \cdot t)}{S_f \cdot Y_{X/Sap}} \quad (\text{Eq. 1})$$

3. Materials i mètodes

On:

$F(t)$ = cabal d'alimentació de l'aliment ($L \cdot h^{-1}$) al temps des de l'inici del *fed-batch*.

μ = velocitat específica de creixement (h^{-1})

X_0 = Concentració de biomassa a l'inici del *fed-batch* ($gDCW \cdot L^{-1}$)

V_0 = Volum de medi al reactor a l'inici del *fed-batch* (L)

t = temps des de l'inici del *fed-batch* (h)

S_f = Concentració de substrat (glucosa) a l'aliment ($g \cdot L^{-1}$)

$Y_{X/Sap}$ = Rendiment biomassa substrat aparent ($gDCW \cdot g^{-1}$ de substrat)

La fase d'inducció es va iniciar quan el cultiu va arribar a una OD_{600} entre 100 i 120, amb l'addició de l'Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosid (IPTG) a una concentració final en el medi de 0,25 mM. Prèviament, la temperatura es va reduir a 30°C per afavorir el correcte plegament de la proteïna recombinant. La fase d'inducció va acabar quan es va detectar l'acumulació de glucosa.

3.2.1. Anàlisi de biomassa i glucosa

El seguiment dels cultius en erlenmeyer i en bioreactor es va dur a terme mitjançant la mesura de la concentració de la biomassa i la glucosa.

La concentració de biomassa es va determinar a través de la mesura de la densitat òptica del cultiu en un equip d'espectrofotometria UV-visible Varian Cary 50 Bio (Agilent®). Per aquesta mesura, es pren 1 mL de cultiu i s'ajusta, si és necessari, en un rang d' OD_{600} entre 0,1 i 0,9 amb aigua destil·lada. Una unitat de densitat òptica del cultiu d'*E. coli* M15 equival a 0,3 $gDCW \cdot L^{-1}$ segons Vidal L. et al. (2008)⁴⁷.

La concentració de glucosa es va determinar a través de la mesura en el sobrenedant del cultiu, en un equip YSI 2700 Biochemistry Analyzer (YSI®). Per a l'obtenció del sobrenedant, se centrifuga la mostra a 13.000xg durant 5 minuts i es filtra a través d'un filtre de 0,22 μm , ajustant, si és necessari, en un rang d'entre 0 i 9 $g \cdot L^{-1}$.

3.3. Purificació dels enzims ScADH, ZpPDC, ScPDC, TmLDH i SpNOX

La biomassa d'*E. coli* que conté l'enzim PDC de *Z. palmarum* (ZpPDC) es va obtenir de l'estoc obtingut per Alcover-Fortuny, N. et al. (2019)⁶⁰ amb una activitat específica de 3.677 $U \cdot gDCW^{-1}$. La biomassa d'*E. coli* que conté l'enzim NOX de *S. pyogenes* (SpNOX) es va obtenir d'un estoc de biomassa produït pel grup de recerca, amb una activitat específica de 1.278 $U \cdot gDCW^{-1}$.

Es recupera la biomassa i es duu a terme la purificació dels enzims descrita a continuació. D'una banda, les biomasses d'*E. coli* que contenen els enzims amb cua d'histidines es van resuspendre, separatament fins a una OD_{600} entre 150 - 200, en un tampó fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM (suplementat amb 0,5 mM TPP i 0,5 mM $MgCl_2$ per a l'enzim ScPDC). D'altra banda, la biomassa d'*E. coli* que conté l'enzim ZpPDC va ser resuspesa en un tampó d'acetat 50 mM pH 5 (suplementat amb 0,5 mM TPP i 0,5 mM $MgCl_2$). Les suspensions cel·lulars es van disruptar amb un disruptor cel·lular Constant Systems Ltd., seguit d'una centrifugació de

3. Materials i mètodes

l'homogenitzat resultant (10,000g durant 30 min a 4°C). Els lisats cel·lulars es van purificar mitjançant un equip FPLC ÄKTA Pure 150 (GE Healthcare®). En el primer pas de purificació, es va utilitzar una cromatografia d'afinitat per metall quelat per a les proteïnes amb cua d'histidines, o una cromatografia d'intercanvi aniònic en MANA-agarosa per a la ZpPDC. A continuació, un cop eluïdes les proteïnes es va intercanviar el tampó utilitzant una reïna de “*desalting*” o d'intercanvi de tampó basada en sefarosa (Sephadex G-10, GE Healthcare®).

La cromatografia d'afinitat va consistir en una reïna de Ni²⁺-IDA-agarosa equilibrada amb un tampó fosfat 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM (suplementat amb 0,5 mM TPP i 0,5 mM MgCl₂ per a l'enzim ScPDC). La mostra es va injectar seguida d'un rentat de la columna amb el mateix tampó d'equilibri. La proteïna retinguda es va eluir amb un tampó fosfat 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 500 mM (suplementat amb 0,5 mM TPP i 0,5 mM MgCl₂ per a l'enzim ScPDC). La cromatografia d'intercanvi aniònic va consistir en una reïna de MANA-agarosa equilibrada amb un tampó acetat 50 mM a pH 5, suplementat amb 0,5 mM TPP i 0,5 mM MgCl₂. La mostra es va injectar seguida d'un rentat de la columna amb el mateix tampó d'equilibri. La proteïna retinguda es va eluir amb un tampó acetat 50 mM a pH 5 i NaCl 1 M.

Les proteïnes eluïdes de la cromatografia d'afinitat i la ZpPDC de la cromatografia d'intercanvi aniònic es van injectar en una columna de “*desalting*” equilibrada amb un tampó fosfat 10 mM (suplementat amb TPP 0,5 mM i MgCl₂ 0,5 mM per als enzims PDC) a pH 7,5. Finalment, les proteïnes purificades es van emmagatzemar durant una nit a -80°C i es van liofilitzar durant 24 h amb un equip de liofilització VirTis Freeze Drying. El sòlid de proteïna liofilitzada es va emmagatzemar a -20°C per conservar els liofilitzats a llarg termini.

3.3.1. Gel d'electroforesis

Per a tots els enzims purificats, totes les fraccions del procés de purificació es van analitzar mitjançant gels d'electroforesis SDS NuPage 12% BisTris (ThermoFisher Scientific®), seguint les instruccions del fabricant, per avaluar la puresa i el pes molecular de les proteïnes. En concret, per cada mostra es prepara una mescla que conté 10 µL de mostra, 5 µL de tampó de càrrega (*Laemmli buffer 4X* i β-mercaptoetanol en una proporció 10:1), 3 µL d'aigua ultrapura i 2 µL de *Reducing agent 10X*. A continuació, s'incuben les mostres a 95°C durant 5 minuts, i es carreguen 15 µL de mescla en un gel d'electroforesis SDS NuPage 12% BisTris (ThermoFisher Scientific®), i s'inicia l'electroforesis en *running buffer* a 120V durant 80 minuts. En finalitzar l'electroforesis, es fixa el gel amb una solució que conté 40% (v · v⁻¹) d'etanol i 10% (v · v⁻¹) d'àcid acètic en aigua, i es tenyeix amb una solució de *Bio-Safe™ Coomassie Stain* (Bio-Rad®). S'analitza el gel d'electroforesis prenent una imatge del gel amb un equip Gel Doc EZ Imaging System (Bio-Rad®) i s'analitza amb el software Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad®).

3.3.2. Concentració de proteïna total

La concentració de proteïna total es va mesurar mitjançant l'assaig de Bradford⁸², utilitzant un estàndard d'albúmina sèrica bovina (BSA) per a generar una recta de calibració (regió lineal dins del rang 0 – 0,5 g · L⁻¹). L'assaig es va dur a terme en plaques de 96 pouets mesclant 7 µL de mostra amb 200 µL de reactiu *Coomassie Protein Assay* (Thermo Scientific®), i incubat durant 15 minuts. A continuació, es mesura l'absorbància a 595 nm en un equip Multiskan FC (Thermo Scientific®). Les anàlisis de la concentració de proteïna total es van fer per duplicat.

3. Materials i mètodes

3.4. Assaigs d'activitat enzimàtica

L'activitat de la piruvat descarboxilasa (PDC) es va determinar acoblant la PDC amb l'alcohol deshidrogenasa (ADH) i seguint l'oxidació del NADH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i a 25°C amb un espectrofotòmetre UV-visible Varian Cary 50 Bio (Agilent®). La mescla de reacció conté 33 mM de piruvat de sodi, 0,11 mM de NADH, 3,5 U · mL⁻¹ d'ADH comercial de *S. cerevisiae* obtinguda de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), 0,1 mM de TPP i 0,1 mM de MgCl₂ en un tampó citrat 200 mM i amb un pH de 6. Una unitat d'activitat enzimàtica correspon a la quantitat de PDC que converteix 1 µmol de piruvat a acetaldehid per minut. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

L'activitat de la lactat deshidrogenasa (LDH) es va determinar seguint l'oxidació del NADH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i a 25°C amb un espectrofotòmetre UV-visible Varian Cary 50 Bio (Agilent®). La mescla de reacció conté 33 mM de piruvat de sodi, 0,11 mM de NADH, en un tampó fosfat 100 mM i amb un pH de 6,7. Una unitat d'activitat enzimàtica correspon a la quantitat de LDH que converteix 1 µmol de piruvat a lactat per minut. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

L'activitat de l'alcohol deshidrogenasa (ADH) es va determinar seguint la reducció del NAD⁺ a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i a 25°C amb un espectrofotòmetre UV-visible Varian Cary 50 Bio (Agilent®). La mescla de reacció conté 567 mM d'etanol, 1,7 mM de NAD⁺, en un tampó fosfat 50 mM i amb un pH de 8,8. Una unitat d'activitat enzimàtica correspon a la quantitat d'ADH que converteix 1 µmol d'etanol a acetaldehid per minut. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

L'activitat de la NADH oxidasa (NOX) es va determinar seguint l'oxidació del NADH a NAD⁺ a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i a 30°C amb un espectrofotòmetre Cary® 50 UV-Vis de Varian (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). La reacció es va realitzar en cubetes de 1,5 mL, contenint 10 mM de NADH en un tampó fosfat 555,55 mM i amb un pH de 6. El tampó s'acondiciona a 30 °C perquè l'activitat disminueix considerablement si la temperatura és més baixa que la indicada. Una unitat d'activitat enzimàtica correspon a la quantitat de NOX que converteix 1 µmol de NADH a NAD⁺ per minut. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

3.5. Estabilitat i activitat enzimàtica a diferents pHs

L'estabilitat enzimàtica de l'alcohol deshidrogenasa, la piruvat descarboxilasa i la lactat deshidrogenasa es va mesurar incubant els enzims en microtubs de 2 mL a un tampó bicarbonat 250 mM (suplementat amb 1 mM de TPP i 1 mM de MgCl₂) a diferents pHs en un rang de 7 a 10, durant 24 hores a 25°C i 300 rpm utilitzant un sistema de bloc de calor Multi Therm (Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA). Les mostres es van prendre a les 0, 2 i 24 hores per avaluar l'activitat enzimàtica mitjançant l'assaig d'activitat corresponent.

L'activitat enzimàtica a diferents pHs es va realitzar canviant el pH del medi d'assaig i realitzant l'assaig corresponent per a cada enzim. Es va utilitzar un tampó Tris-HCl 200 mM (ZpPDC i ScPDC) o un tampó fosfat 100 mM (TmLDH) o 50 mM (ScADH) per a un pH de 7 i 8, i un tampó bicarbonat 200 mM (ZpPDC i ScPDC), 100 mM (TmLDH) o 50 mM (ScADH) per a un pH de 9 i 10.

L'estabilitat de la NAD(P)H oxidasa es va determinar incubant-la en microtubs de 2 mL en un rang de pH de 5 a 10 durant 48 hores a 25°C i 300 rpm utilitzant un sistema de bloc de calor Multi Therm (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, USA). Per al pH 5 es va utilitzar un tampó acetat 100

3. Materials i mètodes

mM; per al pH 6, 7 i 8, un tampó fosfat 100 mM; i per al pH 9 i 10, un tampó bicarbonat 100 mM. Les mostres es van prendre a les 0, 2, 4, 6, 24 i 48 hores per determinar l'activitat enzimàtica a través de l'assaig d'activitat.

L'activitat enzimàtica de la NAD(P)H oxidasa enfront el pH es va mesurar canviant el pH de l'assaig enzimàtic. Per al pH 6, 7 i 8 es va utilitzar un tampó fosfat de potassi 555 mM; per al pH 9 i 10, un tampó de Tris-base 555 mM.

3.6. Estabilitat i activitat enzimàtica en presència de compostos dels gasos reals de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica

L'estabilitat enzimàtica de l'alcohol deshidrogenasa, la piruvat descarboxilasa i la lactat deshidrogenasa, en presència dels compostos presents en el gas real dels alts forns, es va mesurar incubant els enzims en microtubs de 2 mL que contenien un tampó fosfat 100 mM (suplementat amb 1 mM de TPP i 1 mM de $MgCl_2$) a pH 7, i amb la concentració del compost detallada a la **Taula 6**, durant 24 hores a 25°C i 300 rpm utilitzant un sistema de bloc de calor Multi Therm (Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA). En el cas del monòxid de carboni (CO), s'incuba el tampó corresponent bombollejant el CO, prèviament humidificat, durant 10 minuts.

Les mostres es van prendre fins a 350 hores d'incubació, per avaluar l'activitat enzimàtica mitjançant l'assaig d'activitat corresponent (veure apartat 3.4). L'estabilitat en presència de cada compost es defineix amb la vida mitja, és a dir, el temps que ha de transcórrer fins a observar el 50% de l'activitat enzimàtica inicial.

Taula 6. Components del gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica (Dades de l'acereria Arcelor Mittal).

Component	Concentració en el gas	Concentració a estudiar
Monòxid de Carboni (CO)	23,85%	$1,48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Toluè	0,1-4 ppm	$0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Etilbenzè	0,1-0,42ppm	$0,04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Xilè	>5ppm	$0,034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
H ₂ S	6,6 ppm	$0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
HCN	3,32-11ppm	$0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
CO ₂ *	24,5%	-

*CO₂ és substrat de la reacció multi-enzimàtica.

L'activitat enzimàtica, en presència dels compostos, es va dur a terme afegint el compost al tampó d'assaig, per tal d'arribar a la concentració detallada a la **Taula 6** al medi final de l'assaig i amb les condicions descrites a l'apartat 3.4 per als enzims ScADH, ZpPDC i TmLDH.

3.7. Activitat enzimàtica en presència d'etanol

La mesura de l'activitat enzimàtica en presència d'etanol es va dur a terme seguint l'assaig d'activitat de la ZpPDC, ScPDC i TmLDH descrit a l'apartat 3.4, afegint etanol al tampó d'assaig per tal d'arribar a una concentració d'1M al medi final de l'assaig, i amb les condicions del corresponent assaig d'activitat.

3. Materials i mètodes

3.8. Immobilització dels enzims

Primerament, es renten els suports amb aigua destil·lada amb un volum equivalent a 10 volums del suport, seguit d'un rentat amb el tampó d'immobilització emprant el mateix volum. A continuació, es resuspenen els suports amb la solució enzimàtica en una proporció 1:9 ($v \cdot v^{-1}$), amb una càrrega enzimàtica de $10 \text{ U} \cdot (\text{mL de suport})^{-1}$ i s'incuben en agitació amb roller a 25°C o, en cas d'incubació en fred, a 4°C . La solució enzimàtica de la ScPDC se suplementa amb TPP 0,5 mM i MgCl_2 0,5 mM.

El seguiment de la immobilització es duu a terme mitjançant mesures d'activitat del sobrenedant i la suspensió, juntament amb la mesura de l'activitat d'un blanc (sense suport d'immobilització) al llarg del temps. En finalitzar el procés d'immobilització, es filtra la suspensió en una placa porosa, i es renten els suports amb el tampó d'immobilització. A continuació, es mesura l'activitat del derivat immobilitzat resuspenent en el mateix volum al final del procés d'immobilització.

Al final del procés d'immobilització es calcula el rendiment d'immobilització i activitat retinguda mitjançant les següents equacions:

$$\text{Rendiment immobilització (\%)} = \frac{\text{Activitat oferta} - \text{Activitat final del sobrenedant}}{\text{Activitat oferta}} \cdot 100$$

(Eq. 7)

$$\text{Activitat retinguda (\%)} = \frac{\text{Activitat mesurada del derivat}}{\text{Activitat oferta}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

On:

- Activitat oferta: Unitats totals d'activitat ofertes al suport
- Activitat final del sobrenedant (U_T): Unitats totals d'activitat al sobrenedant en finalitzar el procés d'immobilització
- Activitat mesurada del derivat (U_T): Unitats d'activitat totals de la suspensió en rentar i resuspendre el derivat immobilitzat final.

3.8.1. Immobilització en MANA-agarosa i amino-metacrilat

La immobilització en els suports amb grup funcional amino (MANA-agarosa i amino-metacrilat) es duu a terme incubant 9 mL d'una solució enzimàtica de ScADH, ScPDC o TmLDH en tampó fosfat 10 mM a pH 6,5 amb 1 mL de suport, durant un mínim de 30 minuts, i fins a observar una estabilització en l'activitat del sobrenedant. A continuació, es retira un volum de sobrenedant per substituir-lo per un volum d'una solució de 200 mM d'(N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil) carbodiimida (CDI) ajustada a pH 6,5. El volum substituït s'ajusta a la concentració final de CDI (5 mM, 10 mM o 20 mM) a la suspensió, des de 0,25 mL fins a 1 mL de sobrenedant. S'incuba la mescla durant 1 hora per a la immobilització covalent dels enzims. Seguidament, s'afegeix NaCl sòlid fins a arribar a una concentració d'1M a la suspensió per trencar les interaccions iòniques i promoure la desadsorció dels enzims que no

3. Materials i mètodes

es troben units covalentment, incubant la suspensió durant 1 hora. Finalment, es renta el suport amb el tampó d'immobilització i s'analitza l'activitat de la suspensió final.

3.8.2. Immobilització en epoxi-agarosa i epoxi-metacrilat

La preparació d'1g de suport epoxi-agarosa a partir d'agarosa 4BCL es duu a terme afegint en un baló de rotavapor la següent mescla: 0,25 g · mL⁻¹ d'agarosa 4BCL (densitat 1,07 mg · mL⁻¹), NaOH 0,15 M, 1,4-butandiol diglicidil èter 1,30 M, NaBH₄ 0,053 M, i es deixa incubant en un rotavapor Heidolph® durant 8h a 25°C. En acabar el procés, es filtra i renta el suport amb abundant aigua destil·lada.

La immobilització en els suports amb grup funcional epoxi (epoxi-agarosa i epoxi-metacrilat) es duu a terme incubant 9 mL d'una solució enzimàtica de ScADH, ScPDC o TmLDH en tampó fosfat 1 M a pH 8 (ScADH i ScPDC) o pH 10 (TmLDH), amb 1 mL de suport durant 30 minuts a 25°C. A continuació, s'afegeix β-mercaptoetanol fins a una concentració final de 0,2 M, per tal de bloquejar els grups epoxi que no han reaccionat, i es deixa incubant durant 4 hores a 4°C en agitació amb roller. A continuació, es renta el derivat immobilitzat amb tampó fosfat 50 mM pH 8 (ScADH i ScPDC) o pH 10 (TmLDH) utilitzant l'equivalent a 10 volums de derivat immobilitzat, i es resuspen en aquest tampó per analitzar l'activitat del derivat immobilitzat final.

3.8.3. Immobilització en Ni²⁺-IDA-agarosa

La immobilització en el suport Ni²⁺-IDA-agarosa es duu a terme seguint el procediment descrit per Valencia D. et al. (2017)⁸³. En concret, es prepara el suport incubant IDA-agarosa, prèviament rentada amb aigua destil·lada, amb una solució NiSO₄ 0,2 M a pH 7 durant 30 minuts. A continuació, es renta el suport amb aigua destil·lada utilitzant l'equivalent a 10 volums de suport. Seguidament, s'incuben 9 mL d'una solució enzimàtica de ScADH, ScPDC o TmLDH en tampó fosfat 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM amb 1 mL del suport amb el metall quelat, durant 30 minuts a 25°C i agitació amb roller. Es renta el suport amb el tampó d'immobilització, es resuspen en aquest tampó i s'analitza l'activitat del derivat immobilitzat final.

3.9. Reaccions del sistema CCU basat en una reacció multienzimàtica per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

3.9.1. Reaccions amb un sol enzim

Cada reacció enzimàtica es va estudiar individualment a una escala de 2 mL. Per a la ScADH, es va utilitzar un medi de reacció que contenia tampó bicarbonat 250 mM a un pH de 7, 8 o 9, etanol 50 mM, NAD⁺ 10 mM i ScADH purificada 7 U · mL⁻¹. Pel que fa a la ZpPDC i ScPDC, es va utilitzar un medi de reacció que contenia tampó bicarbonat 250 mM a un pH de 7, 8 o 9, amb acetaldehid 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM i ZpPDC o ScPDC purificades 5 U · mL⁻¹. Pel que fa a la TmLDH, es va utilitzar un medi de reacció que contenia tampó bicarbonat 250 mM a un pH de 7, 8 o 9, amb piruvat 10 mM, NADH 20 mM i TmLDH purificada 20 U · mL⁻¹. Cada reacció es va realitzar a 25°C amb una agitació de 500 rpm utilitzant un sistema de bloc de calor Multi Therm (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, USA) durant 20 o 24 hores. Les

3. Materials i mètodes

mostres de reacció es van prendre després de 0, 1, 4 i 20 hores (ScADH) o 0, 1, 4 i 24 hores (ZpPDC, ScPDC i TmLDH), i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3.9.2. Reaccions de la piruvat descarboxilasa acoblades a la lactat deshidrogenasa

Les reaccions enzimàtiques de la PDC acoblades a la TmLDH es van dur a terme en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave acer; Büchi®) amb un volum de treball de 25 mL. Les reaccions a 1 atm de pressió de CO₂ es van realitzar en un tampó fosfat 250 mM amb un pH de 7, acetaldehid 5 mM, NADH 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, 10 U · mL⁻¹ de PDC purificada de *Z. palmae* (ZpPDC) o *S. cerevisiae* (ScPDC) i TmLDH purificada 10 U · mL⁻¹ a 25°C i agitació magnètica de 500 rpm. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Les mostres de reacció es van prendre després de 0 i 24 hores i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

Les reaccions a 9 atm de pressió es van dur a terme en un tampó fosfat 250 mM amb un pH de 7, acetaldehid 5 mM, NADH 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ZpPDC o ScPDC purificades 50 U · mL⁻¹ i TmLDH purificada 20 U · mL⁻¹ a 25°C i agitació de 500 rpm. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Les mostres de reacció es van prendre després de 0 i 24 hores i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3.9.3. Reaccions del sistema multienzimàtic CCU complet

3.9.3.1. Reacció del sistema multienzimàtic CCU amb anhidrasa carbònica

Les reaccions del sistema multienzimàtic complet en presència d'anhidrasa carbònica (CA), proporcionada per Leitat Technological Center (Terrassa, Espanya), es van dur a terme en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave d'acer; Büchi®) amb un volum de treball de 20 mL. Les reaccions es van dur a terme a 1 atm o 9 atm de pressió de CO₂ en un medi de reacció que contenia tampó fosfat 250 mM amb un pH de 7, etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, utilitzant els enzims purificats, ScADH 100 U · mL⁻¹, ScPDC 50 o 150 U · mL⁻¹, TmLDH 20 U · mL⁻¹, i CA 250 mg · L⁻¹ a 25°C i agitació magnètica de 500 rpm. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 2, 4, 6, 24, 48 i 96 hores, afegint una sobrepressió dins del reactor per alliberar medi de reacció a través de la vàlvula de sortida, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3. Materials i mètodes

3.9.3.2. Estudi de la concentració i proporció dels enzims

L'estudi de la concentració i proporció d'enzims va consistir en dur a terme les reaccions utilitzant la proporció ScADH:ScPDC (0,5:1, 1:1 i 1,25:1) i la proporció TmLDH:ScPDC (0,5:1, 1:1 i 1,25:1 i 2:1). Les reaccions es van dur a terme en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave steel; Büchi®) amb un volum de treball de 10 mL. La composició del medi de reacció va ser també fosfat 250 mM amb un pH de 7, etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM a 25°C i 500 rpm d'agitació, utilitzant 150 U · mL⁻¹ de ScPDC, i el rang de proporcions de ScADH:ScPDC i TmLDH:ScPDC de 0,5:1 – 1,25:1. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Es mesura la concentració d'àcid làctic obtinguda al cap de 24 hores de reacció (seguint els mètodes analítics de l'apartat 3.11)

3.9.3.3. Reaccions del sistema multienzimàtic CCU en diferents tampons

Les reaccions es van dur a terme en tres tampons diferents: citrat, MOPS i Tris-HCl, en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave steel; Büchi®) amb un volum de treball de 20 mL. El medi de reacció contenia el tampó citrat, MOPS o Tris-HCl 250 mM amb un pH de 7, etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ScADH purificada 75 U · mL⁻¹, ScPDC purificada 150 U · mL⁻¹ i TmLDH purificada 187,5 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació magnètica. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 4 i 24 hores (Tris-HCl), 0, 4, 24, 48, 72 i 96 hores (citrat) o 0, 4, 24, 48, 72 i 144 hores (MOPS), afegint una sobrepressió dins del reactor per alliberar medi de reacció a través de la vàlvula de sortida, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3.9.4. Reacció del sistema multienzimàtic CCU utilitzant un gas sintètic imitant la composició del gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica

La reacció multienzimàtica utilitzant un gas sintètic que imita la composició dels gasos emesos pels alts forn d'Arcelor Mittal, es va dur a terme en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave d'acer; Büchi®) amb un volum de treball de 25 mL, en condicions de reacció òptimes: també MOPS 250 mM amb un pH de 7, etanol 1 M, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, 1 atm de mescla de gas sintètic, ScADH purificada 75 U · mL⁻¹, ScPDC purificada 150 U · mL⁻¹, TmLDH purificada 187,5 U · mL⁻¹ a 25°C i agitació de 500 rpm. La composició de la mescla de gas era la següent, segons les dades proporcionades per Arcelor Mittal en el marc del projecte BIOCON-CO₂: 24,5% CO₂, 46,6% N₂, 23,9% CO, 1,2% O₂, 3,8% H₂. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 2, 4, 24, 48, 72, 96 i 120 hores, afegint una sobrepressió dins del reactor per alliberar medi de reacció a través de la vàlvula de sortida, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3. Materials i mètodes

3.9.5. Reacció del sistema multienzimàtic CCU amb enzims immobilitzats

Les reaccions amb els enzims immobilitzats es duen a terme, primerament, amb la immobilització per separat de la ScADH, la ScPDC i la TmLDH seguint el procediment descrit en l'apartat 3.8.3, i oferint una activitat enzimàtica suficient per assolir la càrrega màxima del suport, és a dir, afegir els enzims fins a observar que al final del procés d'immobilització s'observa un augment en l'activitat en el sobrenedant, indicant que s'ha superat la càrrega màxima del suport. Un cop recuperats els derivats immobilitzats, es renten amb tampó MOPS 250 mM amb un pH de 7, utilitzant l'equivalent a 10 volums de suport. Seguidament, es duu a terme la reacció en un reactor pressuritzat de 50 mL (Miniclave d'acer; Büchi®) amb un medi de reacció que conté MOPS 250 mM amb un pH de 7, Etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, i els derivats immobilitzats, ScADH 75 U · (mL reacció)⁻¹, ScPDC 150 U · (mL reacció)⁻¹, TmLDH 187,5 U · (mL reacció)⁻¹ a 25°C, 300 rpm d'agitació i 1 atm de gas 100% CO₂. S'afegeixen 10 µL d'antifoam 204 abans d'introduir el CO₂. A continuació, el CO₂ es va introduir al reactor mitjançant bombolleig del gas al medi a l'inici de la reacció. La vàlvula de sortida de gas es va obrir tan aviat com va començar el bombolleig. A continuació, la vàlvula de sortida es va tancar per arribar a la pressió desitjada dins del reactor. La vàlvula d'entrada del gas es va tancar al cap de 5 minuts, quan el CO₂ dissolt va arribar a l'equilibri amb la fase gasosa. Les mostres de reacció es van prendre després de 0 i 24 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3.10. Estudi de les reaccions del sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

3.10.1. Reacció enzimàtica amb ZpPDC enfront el pH

Les reaccions es van dur a terme en un volum de 25 mL en un medi de reacció que contenia tampó citrat 238 mM amb un pH de 5 i 6, o en un tampó Tris-base 238 mM amb un pH de 7 i 8, acetaldehid 50 mM, ZpPDC 1 U · mL⁻¹ a 25°C i 150 rpm d'agitació. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 24 i 96 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3.10.2. Reacció enzimàtica de la ZpPDC acoblada amb la ScADH

La reacció de la ZpPDC acoblada amb la ScADH que es va dur a terme amb 1 U · mL⁻¹ d'ambdós enzims (ScADH i ScPDC), en un volum de 25 mL, contenia un medi de reacció amb tampó citrat 235 mM amb un pH de 6 o un tampó tris-base 235 mM amb un pH de 7 o 8, etanol 50 mM, NAD⁺ 8 mM, a 25°C i 150 rpm d'agitació. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 24, 48 i 96 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

La reacció de la ZpPDC acoblada amb la ScADH que es va dur a terme amb 1 U · mL⁻¹ de ScADH i 10 U · mL⁻¹ de ScPDC, en un volum de 25 mL, contenia un medi de reacció amb tampó citrat 235 mM amb un pH de 6 o un tampó tris-base 235 mM amb un pH de 7 o 8, etanol 50 mM, NAD⁺ 8 mM, a 25°C i 150 rpm d'agitació. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 24, 48 i 96 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

3. Materials i mètodes

3.10.3. Reacció multienzimàtica amb ZpPDC, ScADH i SpNOX

La reacció multienzimàtica es va dur a terme utilitzant lisats cel·lulars o els enzims purificats, en 50 mL d'un medi de reacció que contenia també tris-base 250 mM amb un pH de 7, 7,5 o 8, etanol 50 mM, NAD^+ 10 mM, ScADH $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, ZpPDC $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, SpNOX $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, a 25°C i 500 rpm d'agitació magnètica. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 1, 2, 4, 6, 24 i 48 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

Les reaccions utilitzant els enzims purificats es van dur a terme en 50 mL d'un medi de reacció que contenia també tris-base 250 mM amb un pH de 7,5, etanol 50 mM, NAD^+ 10 mM o 1 mM, ScADH $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, ZpPDC $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i SpNOX $45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 25°C i 500 rpm d'agitació magnètica. Les mostres de reacció es van prendre després de 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 2,7, 4,8 i 24 hores, i analitzades seguint els mètodes analítics (Apartat 3.11).

Les reaccions es duen a terme amb un control de pH mitjançant el titrador Metrohm pHSTAT. En els casos on el pH de la reacció disminueix, s'utilitza una solució NaOH 2 M com a solució correctora. En els casos on el pH puja, s'utilitza una solució HCl 2M com a solució correctora. El titrador es calibra abans de cada reacció amb patrons de pH 4 i pH 7.

3.11. Mètodes analítics de substrats, intermedis i productes de reacció

3.11.1. Quantificació d'acetaldehid, acetoïna, etanol i àcid làctic

La concentració d'acetaldehid, acetoïna i etanol en el medi de reacció es va mesurar amb un sistema Shimadzu GC 2010, utilitzant una columna Stabilwax-DA ($15 \text{ m} \times 0,33 \times 1 \mu\text{m}$). Les condicions eren les següents: volum d'injecció, $3 \mu\text{L}$ en mode de divisió 20:1; temperatura de l'injector, 260°C ; gas portador, He a un flux constant de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La temperatura inicial del forn, 35°C , es va mantenir durant 2 minuts, després es va programar per augmentar a $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ fins a 120°C , i finalment es va programar per augmentar a $40^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ fins a 240°C , on es va mantenir durant 1 minut. Seguint aquest mètode, es van utilitzar estàndards d'acetoïna (21 mM), acetaldehid (20 mM) i etanol (197 mM) per determinar el seu temps de retenció, definit com 1,74 minuts per a l'acetaldehid, 3,38 minuts per a l'etanol i 7,83 minuts per a l'acetoïna. A més, també es van realitzar corbes de calibració dels compostos per determinar la seva concentració en les mostres de reacció. Abans de l'anàlisi, les mostres de reacció es van inactivar afegint $20 \mu\text{L}$ de 36% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) d'àcid clorhídric a $500 \mu\text{L}$ de mostra. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

Pel que fa a l'àcid làctic, la mesura de la concentració es va realitzar amb un Shimadzu LCMS-2010A utilitzant una columna ICsep 87H USP L17 (Transgenomic). Les condicions eren: solució també $640 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ d'àcid acètic, volum d'injecció $5 \mu\text{L}$, amb una velocitat de flux de $0,15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; el gas nebulitzador era N_2 amb un flux de $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; la temperatura del CDL, 200°C ; la temperatura del bloc de calor, 200°C . La relació massa-carrega es va fixar a 89 m/z per determinar l'elució de l'àcid làctic amb un temps de funcionament de 25 minuts. Es va utilitzar un estàndard d'àcid làctic (1 mM) per determinar el seu temps de retenció, corresponent a 15 minuts. A més, també es van realitzar corbes de calibració per determinar la seva concentració en les mostres de reacció. Abans de l'anàlisi, les mostres de reacció es van inactivar afegint $20 \mu\text{L}$ de 98% H_2SO_4 a $500 \mu\text{L}$ de mostra. Les anàlisis es van dur a terme per duplicat.

3. Materials i mètodes

3.11.2. Anàlisi espectrofotomètrica de NADH

El NADH es va mesurar utilitzant un espectrofotòmetre UV-visible Varian Cary 50 Bio (Agilent®). Les mostres es van mesurar en una cubeta de 1,5 mL a 340 nm i 25°C, i es van diluir amb aigua destil·lada si era necessari. La concentració de NADH es va calcular utilitzant l'equació de Lambert-Beer amb $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.1. Introducció

Una de les primeres etapes, per al desenvolupament de processos biocatalítics, és l'obtenció del biocatalitzador. Per una banda, es poden trobar proveïdors d'enzims comercials per poder adquirir els enzims. Però, degut al nombre d'enzims i les quantitats que es necessiten per als sistemes multienzimàtics que es volen desenvolupar en aquesta tesi doctoral, els preus són massa elevats, i fins i tot, n'hi ha que no estan disponibles. Per altra banda, hi ha l'opció de produir-los mitjançant expressió heteròloga en un microorganisme. Això permetria disposar en qualsevol moment de tots els enzims que es necessiten, i de la quantitat necessària per a utilitzar-los. A més, es poden expressar afegint a la proteïna seqüències d'aminoàcids, com per exemple una cua d'histidines, per una purificació o immobilització posterior.

És per aquest motiu que s'ha dut a terme la producció i purificació dels enzims (**Taula 7**), concretament la producció i purificació de ScADH, ScPDC i TmLDH, doncs la biomassa per a la purificació de la ZpPDC⁶⁰ i SpNOX ja havia estat produïda en cultius *fed-batch* anteriorment en el grup. En concret, no s'ha fet un estudi o una optimització de la producció, ja que l'objectiu principal era produir enzim per als estudis de reacció. Per altra banda, s'ha escollit *E. coli* com a microorganisme productor, ja que en el grup de recerca hi ha un ampli coneixement en el seu ús per a la producció recombinant de proteïnes. A més, es disposava dels mètodes i soques per dur-la a terme, tal i com van publicar Alcover, N. et al., (2019)⁶⁰ i Benito, M. et al., (2022)⁸¹.

Taula 7. Enzims a produir i/o purificar en el present treball. Les caselles marcades en gris indiquen els enzims que s'han de produir i/o purificar.

Enzim	A produir	A purificar	Metodologia de purificació
ScADH			Cromatografia d'afinitat per metall quelat en resina Ni ²⁺ -IDA-agarosa i "desalting" en resina de gel filtració
ScPDC			Cromatografia d'afinitat per metall quelat en resina Ni ²⁺ -IDA-agarosa i "desalting" en resina de gel filtració
TmLDH			Cromatografia d'afinitat per metall quelat en resina Ni ²⁺ -IDA-agarosa i "desalting" en resina de gel filtració
ZpPDC			Cromatografia d'intercanvi iònic en resina de MANA-agarosa i "desalting" en resina de gel filtració
SpNOX			Cromatografia d'afinitat per metall quelat en resina Ni ²⁺ -IDA-agarosa i "desalting" en resina de gel filtració

La soca utilitzada per a la producció dels enzims va ser dissenyada prèviament pel grup de recerca^{47,84}. Aquesta soca derivada de la *E. coli* M15 es caracteritza per la possibilitat de créixer en medi definit (MD) sense necessitat d'afegir antibiòtic com a marcador de selecció. Això es possible perquè la soca presenta una deleció en el gen *glyA*, que codifica l'enzim serina hidroximetiltransferasa (SHMT), de tal manera que en la nomenclatura s'indiqui aquesta deleció anomenant-la *E. coli* M15 Δ *glyA*. Aquest enzim s'encarrega de la conversió de la serina a glicina, essencial per al creixement d'*E. coli*. Aquesta deficiència se suplementa amb la introducció del

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

plasmidi pVEF que conté el gen *glyA*, juntament amb el gen de l'enzim recombinant que es vol produir seguit d'una cua de 6 histidines. D'aquesta manera, en MD la soca només pot créixer si presenta el plasmidi, eliminant la necessitat d'afegir l'antibiòtic com a marcador de selecció. La soca va ser transformada prèviament en el grup amb 3 versions del plasmidi pVEF, una per cada enzim (*ScADH*, *ScPDC* i *TmLDH*).

Pel que fa al mode d'operació, es va seguir una estratègia en discontinu alimentat (*Fed-Batch*), la qual permet un creixement cel·lular controlat per la font de carboni (en aquest cas la glucosa) i poder assolir elevades densitats cel·lulars, ja que l'enzim s'expressa intracel·lularment. La velocitat de creixement es controla a partir de la velocitat d'adició de la font de carboni, utilitzant l'(Eq. 1).

Un cop obtenim els enzims amb la cua d'histidines, és possible dur a terme un procés de purificació per tal d'obtenir una solució enzimàtica més pura, separant el nostre enzim de la resta de proteïnes de l'hoste. Aquest procés de purificació es basa en una cromatografia de metall quelat descrita per primera vegada el 1975 per Porath et al.⁸⁵, en la qual un metall divalent es troba immobilitzat en una resina cromatogràfica. Les cues d'histidines presenten afinitat per aquests metalls, permetent l'adsorció específica de les proteïnes que només presenten la cua d'histidines. Després d'un rentat per tal d'eliminar aquelles proteïnes que no s'uneixen a la columna, s'elueix la proteïna d'interès afegint imidazol (anàleg estructural del grup funcional de la histidina). Donat que l'elució arrossega totes les proteïnes unides a la columna, és possible obtenir una solució enzimàtica concentrada respecte al volum inicial.

Per altra banda, l'enzim *ZpPDC* no conté una cua d'histidines, ja que en el procés d'obtenció de la soca productora, no es va aconseguir expressar-la. Per tant, la seva purificació es basa en un altre tipus de metodologia. Previs estudis del grup van permetre desenvolupar un procés de purificació d'aquest enzim que consisteix en un intercanvi aniónic, aprofitant el seu *pI* teòric de 4,93 (Alcover et al., 2019). Aquest mètode de purificació es basa en un suport d'agarosa funcionalitzat amb grups amino (MANA-agarosa) que presenta un *pKa* de 6,7 de tal manera que a pHs per sota de 6,7 el suport presenta càrrega positiva, i per tant, s'uneixen per interacció electroestàtica al suport aquelles proteïnes que tinguin una càrrega neta negativa, és a dir, amb un *pI* per sota de 6,7⁸⁶.

4.2. Resultats de la producció en *Fed-batch*

Els enzims implicats en la reacció de síntesi d'àcid làctic es van produir en un bioreactor de 5L a través d'un cultiu *fed-batch* de la soca *E. coli M15 ΔGlyA*. L'estratègia de cultiu s'inicia amb una fase *batch* en medi definit, inoculat amb una OD_{600nm} de 0,2 per tal d'aconseguir un creixement durant aproximadament 12 hores, seguit d'una fase *starving* on les cèl·lules acaben de consumir els àcids orgànics produïts durant la primera fase de creixement. A continuació, s'inicia la fase de *fed-batch*, durant la qual s'addiciona medi d'aliment que conté com a font de carboni $500\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa. La velocitat d'adició està controlada per tal que el cabal augmenti exponencialment, mantenint una velocitat específica de creixement (μ) de $0,22\text{ h}^{-1}$. Aquesta velocitat específica de creixement es va fixar en aquest valor, ja que, en estudis previs en el grup de recerca, s'havia determinat que aquesta soca acumula àcid acètic quan la velocitat específica de creixement és superior a $0,25\text{ h}^{-1}$ ⁵¹.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.2.1. Producció de l'enzim His-ScADH

La producció de His-ScADH (d'ara en endavant ScADH), tal i com s'ha comentat anteriorment, es va dur a terme en un bioreactor de 5L mitjançant un cultiu en *fed-batch*, per tal d'aconseguir elevades quantitats de biomassa i obtenir suficient enzim per a posteriors estudis de les reaccions enzimàtiques.

Primerament, tal i com es mostra a la **Figura 9**, el cultiu comença amb una fase *batch* amb una OD_{600} de 0,2 i finalitza satisfactòriament a les 16 hores de cultiu, ja que s'observa que les cèl·lules han consumit tota la glucosa i s'obté un rendiment biomassa-substrat ($Y_{X/S}$) de 0,28 gDCW · gS⁻¹. També es va observar que a partir de les 12 hores de *batch*, l'oxigen dissolt en el medi augmenta, indicant que s'esgota la glucosa i el cultiu entra en la fase d'*starving*. Un cop finalitzada l'etapa *batch*, s'inicia la fase *fed-batch* amb l'addició del medi d'aliment per tal de mantenir una velocitat específica de creixement de 0,22 h⁻¹ fins al moment de la inducció. S'observa que el cultiu és capaç de mantenir aquesta velocitat de creixement durant les primeres hores de *fed-batch*. A les 8 hores d'aquesta etapa, s'addiciona IPTG al medi fins arribar a una concentració de 0,25 mM, per tal d'induir l'expressió de l'enzim. A partir d'aquest moment la velocitat específica decreix, degut a que la cèl·lula dedica part dels recursos a la síntesi de proteïnes (mostrant un increment en l'activitat específica), i no només al creixement. La fase d'inducció finalitza a les 16 hores de *fed-batch* on s'observa una acumulació de glucosa, indicant que les cèl·lules ja no són capaces de mantenir la velocitat de consum fixada.

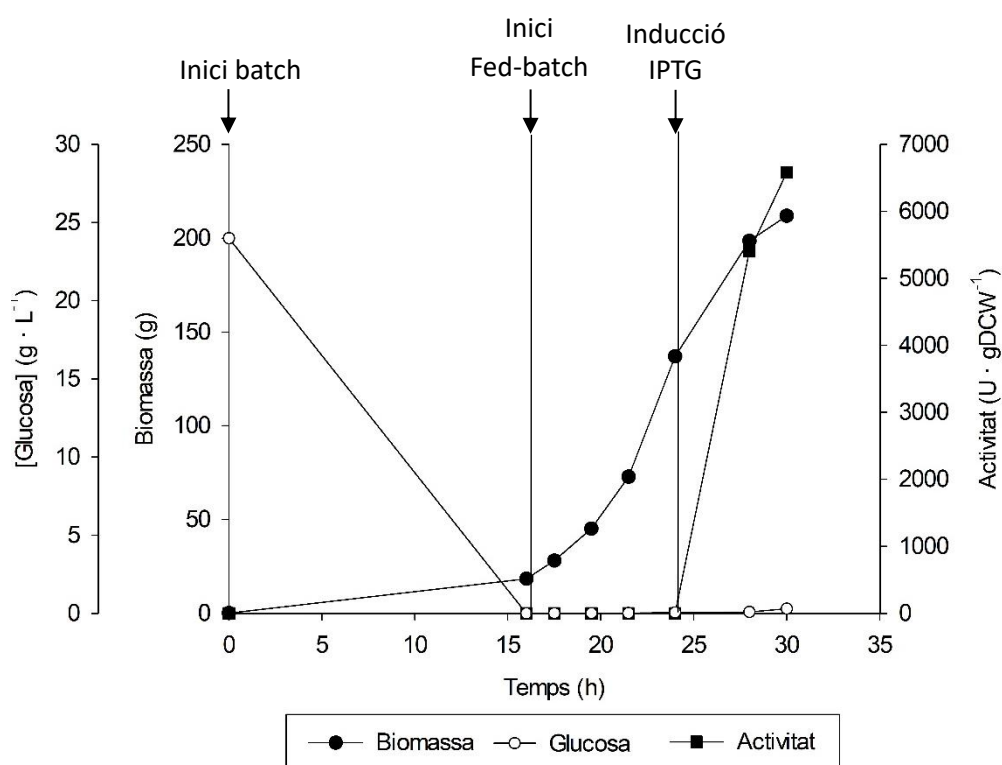


Figura 9. Perfil del cultiu per a la producció de His-ScADH en E. coli M15 ΔglyA pVEF-His_ScADH. Temperatura de cultiu, 37°C. Inici fase batch amb 24 g · L⁻¹ de glucosa. A les 16 s'inicia la fase *fed-batch* a una velocitat específica de creixement de 0,22 h⁻¹. A les 24 hores de cultiu s'indueix el cultiu addicionant IPTG fins a 0,25 mM per induir l'expressió de la ScADH.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Al final de el cultiu s'aconsegueix una concentració de biomassa de $55,77 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ i una producció de $6.579,7 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$ (**Taula 8**), valors propers als que es van obtenir en produccions anteriors⁸⁷.

Taula 8. Resultats de la producció de His-ScADH. Biomassa obtinguda per litre de cultiu, activitat específica i enzim produït respecte la biomassa, i el volum de cultiu que s'obté en finalitzar el procés de producció.

Resultats de la producció de His-ScADH	
Biomassa	$55,77 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$
Activitat específica respecte la biomassa	$6.579,7 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$
Activitat total per litre de cultiu	$321.761,66 \text{ U totals} \cdot \text{L}^{-1}$
Enzim produït respecte la biomassa ($Y_{p/x}$)	$110,8 \text{ mg ScADH} / \text{gDCW}$
Volum final de cultiu	$3,80 \text{ L}$

4.2.2. Producció de l'enzim His-ScPDC

Com en el cas de la ScADH, la producció de la His-ScPDC (d'ara en endavant ScPDC) també es va dur a terme en un bioreactor de 5L a través d'un cultiu en *fed-batch*, per tal d'arribar a altes densitats cel·lulars i tenir suficient enzim amb la realització d'un sol cultiu.

En el cas de la producció de ScPDC, tal i com es pot observar a la **Figura 10**, la fase *batch* també finalitza satisfactòriament a les 16 hores de cultiu, observant un resultat similar al cas anterior. Tanmateix, en la fase *fed-batch*, s'observa que no es pot mantenir una velocitat específica de creixement de $0,22 \text{ h}^{-1}$. Això provoca que es comenci a acumular glucosa al medi ($0,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a les 2 hores de *fed-batch*), és a dir, l'adició exponencial de glucosa és més ràpida que la velocitat de consum de les cèl·lules. Per aquest motiu, es decideix rebaixar l'adició d'aliment per mantenir una velocitat de creixement de $0,05 \text{ h}^{-1}$ i evitar l'acumulació de glucosa, fet que també provoca que el volum final de cultiu acabi sent inferior en comparació amb la producció d'ScADH (**Taula 9**). Pel que fa a la inducció, en aquest cas, té una durada de 4 hores fins que comença a acumular glucosa.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

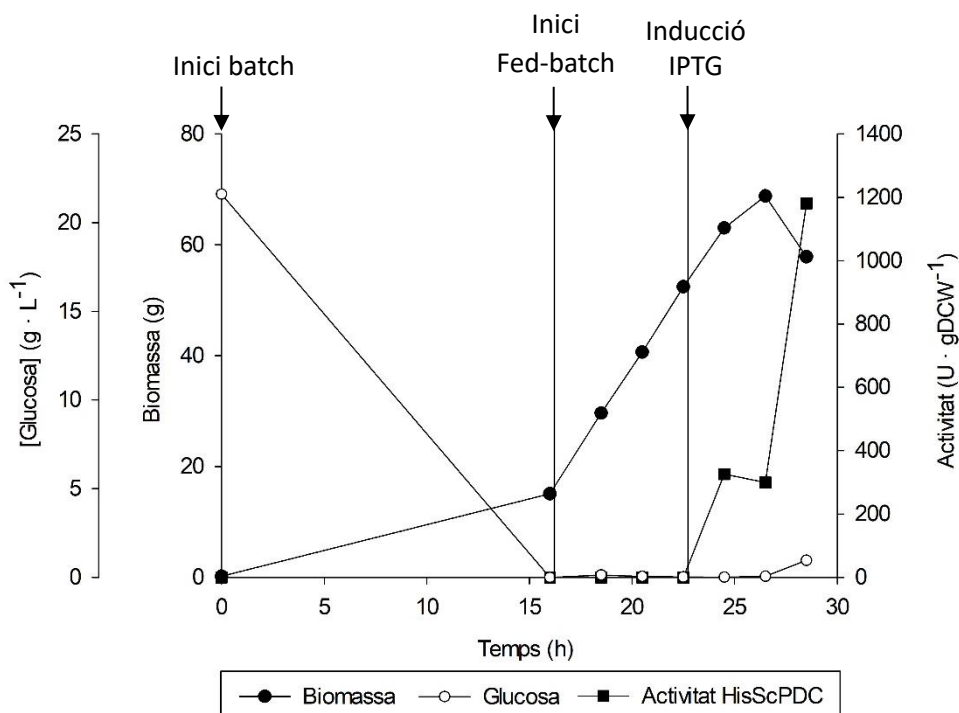


Figura 10. Perfil de cultiu per a la producció de His-ScPDC en *E. coli* M15 Δ GlyA pVEF-His_ScPDC. Temperatura de cultiu, 37°C. Inici fase batch amb 21,6 g · L⁻¹ de glucosa. A les 16 s'inicia la fase fed-batch a una velocitat específica de creixement de 0,05 h⁻¹. A les 24 hores de cultiu s'indueix el cultiu addicionant IPTG fins a 0,25 mM per induir l'expressió de la ScPDC.

Al final de el cultiu s'aconsegueix una concentració de biomassa de 21,33 gDCW · L⁻¹ i una producció de 1.181,43 U · gDCW⁻¹ (Taula 9), valors similars als que es van obtenir en produccions anteriors ⁸⁷.

Taula 9. Resultats de la producció de His-ScPDC. Biomassa obtinguda per litre de cultiu, activitat específica i enzim produït respecte la biomassa, i el volum de cultiu que s'obté en finalitzar el procés de producció.

<i>Resultats de la producció de His-ScPDC</i>	
Biomassa	21,33 gDCW · L ⁻¹
Activitat específica respecte la biomassa	1.181,43 U · gDCW ⁻¹
Activitat total per litre de cultiu	25.199,90 U totals · L ⁻¹
Enzim produït respecte la biomassa ($Y_{P/X}$)	132,7 mg ScPDC · gDCW ⁻¹
Volum final de cultiu	3,10 L

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.2.3. Producció de l'enzim His-TmLDH

Finalment, el tercer enzim del qual es necessita dur a terme la producció és la His-TmLDH (d'ara en endavant TmLDH). Com en els dos casos anteriors, es duu a terme el cultiu en *fed-batch* en un bioreactor de 5L per tal de disposar d'altres quantitats de biomassa amb un únic cultiu.

En la producció de TmLDH, en la fase *batch* s'obté un rendiment biomassa-substrat ($Y_{x/s}$) de $0,26 \text{ gDCW} \cdot \text{gS}^{-1}$, tot i que la durada és la mateixa que en els casos anteriors (**Figura 11**). Per altra banda, la fase *fed-batch* va durar 11 hores, i es pot observar que el creixement segueix una velocitat específica de creixement de $0,2 \text{ h}^{-1}$, tot i que no s'observa una acumulació de glucosa amb una adició programada per una velocitat específica de creixement de $0,22 \text{ h}^{-1}$. Això es pot explicar degut a un rendiment biomassa/substrat diferent al de les anteriors soques ($0,26 \text{ gDCW} \cdot \text{gS}^{-1}$ respecte a $0,28 \text{ gDCW} \cdot \text{gS}^{-1}$). En aquest cas, la inducció dura 3 hores fins que s'acumula la glucosa en el medi de cultiu.

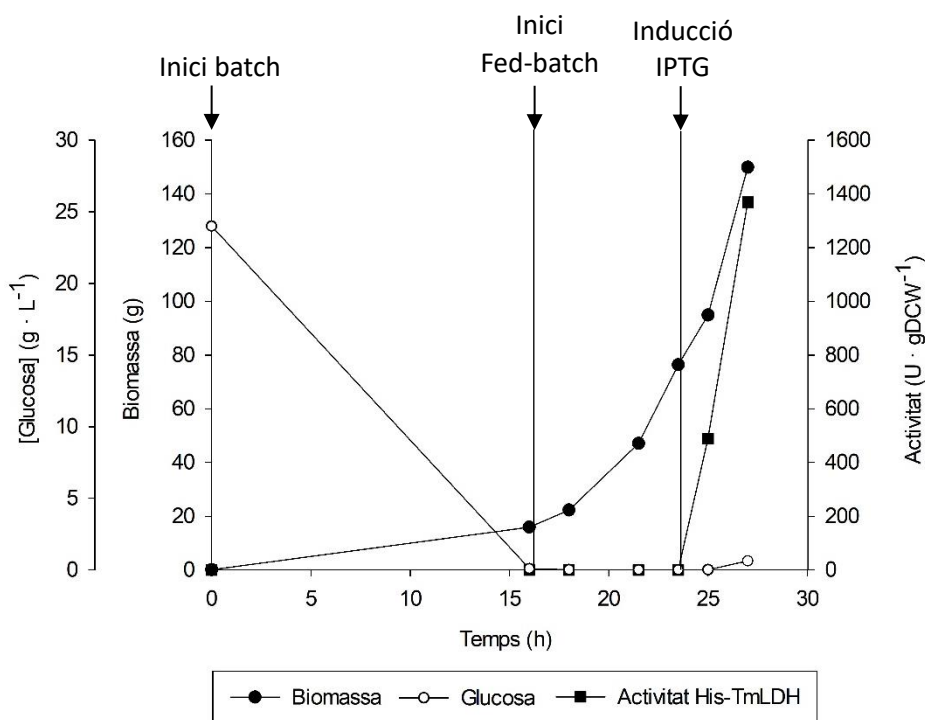


Figura 11. Perfil de cultiu per a la producció de His-TmLDH en *E. coli* M15 ΔGlyA pVEF-His_TmLDH. Temperatura de cultiu, 37°C . Inici fase batch amb $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa. A les 16 s'inicia la fase *fed-batch* a una velocitat específica de creixement de $0,22 \text{ h}^{-1}$. A les 24 hores de cultiu s'indueix el cultiu addicionant IPTG fins a $0,25 \text{ mM}$ per induir l'expressió de la TmLDH.

Al final del cultiu s'aconsegueix una concentració de biomassa de $41,7 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ i una producció de $1.369,30 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$ (**Taula 10**), sent també valors comparables als que es van obtenir en produccions anteriors⁸⁷.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 10. Resultats de la producció de His-TmLDH. Biomassa obtinguda per litre de cultiu, activitat específica i enzim produït respecte la biomassa, i el volum de cultiu que s'obté en finalitzar el procés de producció.

<i>Resultats de la producció de His-TmLDH</i>	
Biomassa	41,7 gDCW · L ⁻¹
Activitat específica respecte la biomassa	1.369,30 U · gDCW ⁻¹
Activitat total per litre de cultiu	57.099,81 U totals · L ⁻¹
Enzim produït respecte la biomassa (Y_{P/X})	72,6 mg TmLDH · gDCW ⁻¹
Volum final de cultiu	3,65 L

4.3. Resultats de la purificació per cromatografia en FPLC

4.3.1. Purificació de l'enzim ScADH per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines

L'enzim ScADH produït (veure apartat 4.2.1) que conté una cua d'histidines, per tant, la seva purificació es durà a terme a través d'una cromatografia d'afinitat per metall quelat en una resina Ni²⁺-IDA-agarosa. Per a la realització de la purificació, es disrupta una fracció de la biomassa recuperada i s'aconsegueix un lisat cel·lular que passarà per una etapa de captura per cromatografia d'afinitat, i a continuació una etapa de "desalting" per eliminar l'imidazol utilitzat per a la seva elució.

En aquest cas, el lisat cel·lular conté una activitat de 719,6 U · mL⁻¹ i una concentració de proteïna de 25,24 mg · mL⁻¹, del qual s'injecten 300 mL en una columna amb 60 mL de Ni²⁺-IDA-agarosa. A continuació, es fa un rentat de la columna per eliminar les proteïnes que no s'han unit al suport i finalment es recupera la ScADH fent passar un tampó d'elució que conté imidazol. Un cop realitzada la cromatografia, es recuperen 98.179,6 unitats totals (45,5% de rendiment) amb una activitat específica de 154,7 U · mg⁻¹ (veure **Taula 11**). Aquest rendiment es considera baix per una etapa de cromatografia d'afinitat^{54,88}, i es pot explicar per una precipitació en la fracció d'elució. Això podria ser degut a l'efecte de concentració durant l'elució, en la qual es redueix el volum en el que es troba dissolt l'enzim (de 300 mL de lisat a 60 mL en l'elució), provocant que les proteïnes agreguin i formin el precipitat. Aquest efecte també s'observa en la proteïna total, ja que dels 7.572,0 mg de proteïna soluble presents en el lisat, recuperem 4.729,5 mg solubles (62,5% del total). La resta de proteïna que es troba en forma de precipitat correspon a la ScADH que s'ha perdut al precipitar durant l'elució. A continuació, la fracció soluble de l'elució, que conté una alta concentració d'imidazol, passa per una etapa de "desalting" utilitzant 120 mL d'una resina de gel filtració. Un cop s'obté la mostra dessalinitzada, s'avalua el rendiment de l'etapa en termes d'activitat i proteïna (**Taula 12**), obtenint un 66,6% i un 73,7% en activitat i proteïna recuperada, respectivament.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 11. Purificació de l'enzim ScADH a través d'una cromatografia d'afinitat per Ni^{2+} , amb una etapa posterior de "desalting". S'utilitza un lisat cel·lular que presenta una activitat de $719,6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i una [proteïna total] de $25,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ amb un tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM. Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 500 mM imidazol; el cabal de procés és de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ per a la injecció del lisat). "desalting": Volum de columna, 120 mL; la composició del tampó és fosfat 20 mM pH 7,5; el cabal de procés és de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ i la temperatura de procés és a temperatura ambient.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	[Proteïna] ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Lisat	300,0	719,6	25,2	215.880,0 (100%)	7.572,0 (100%)	28,5
No retintut	300,0	1,1	11,9	342,0 (0,16%)	3.570,0 (47,1%)	0,1
Rentat	200,0	0,2	2,6	38,9 (0,02%)	524,9,0 (6,9%)	0,1
Elució	60,0	1.636,3	10,6	98.179,6 (45,5%)	634,6 (8,4%)	154,7
"Desalting"	90,0	726,9	5,2	65.425,3 (30%)	468,0 (6,2%)	139,8

Els resultats que s'han obtingut en aquesta purificació de la ScADH mostren que a partir d'un lisat amb $28,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, s'obté una preparació de ScADH amb $139,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, és a dir, un grau de purificació de 5.

A continuació, es mostra l'avaluació dels rendiments d'activitat i proteïna recuperada de cadascuna de les etapes del procés de purificació, juntament amb els rendiments globals del procés (**Taula 12**). Observant el rendiment global de la purificació es pot comprovar que el procés de purificació presenta un rendiment baix, ja que es recupera un 30% de l'activitat present en el lisat.

Taula 12. Avaluació de les etapes de cromatografia d'afinitat i "desalting" per a l'enzim ScADH. El rendiment d'activitat i de proteïna es calcula a partir de l'activitat total de l'etapa anterior detallada a la **Taula 11**.

Etapa	Rendiment en activitat (%)	Rendiment en proteïna (%)
Cromatografia d'afinitat Ni^{2+} -IDA-agarosa	45,5	8,4
"desalting"	66,6	73,7
Global (cromatografia + "desalting")	30,3	6,2

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

En vista del baix rendiment obtingut en aquesta purificació, es decideix repetir-la però carregant menys quantitat de proteïna a la columna, per tal de reduir la concentració durant l'elució i evitar la precipitació de l'enzim. En aquest cas, per a la cromatografia d'afinitat s'injecten 150 mL d'un lisat amb una activitat de $1179,7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i $25,39 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna total, resultant en el cromatograma de la **Figura 12**.

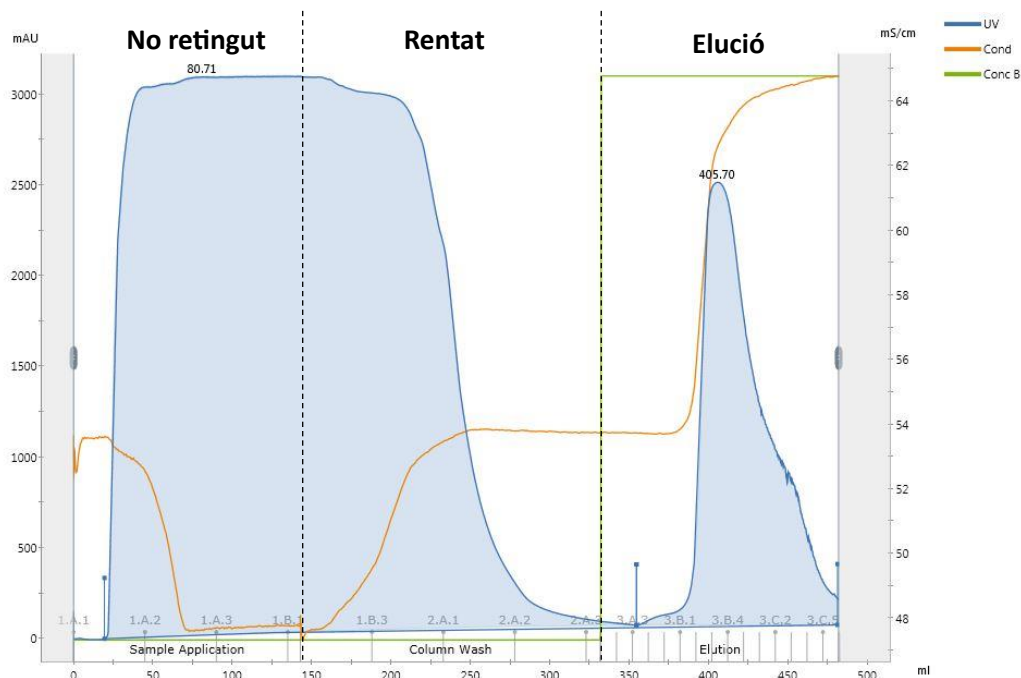


Figura 12. Cromatograma de la purificació de l'enzim ScADH en una columna de Ni^{2+} -IDA-agarosa. S'apliquen 150 mL de lisat que conté $1.179,7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'activitat enzimàtica i $25,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna total en tampó de lisi (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM). Seguidament, el rentat de la columna es duu a terme amb el tampó de rentat (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM) fins que l'absorbència a 280 nm arriba a 0, indicant que ja no hi ha proteïnes en la sortida de la columna. En aquest moment, comença l'elució sense gradient amb el tampó d'elució (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 500 mM imidazol), observant un augment en l'absorbència a 280 nm que indica l'elució de proteïnes que s'havien adsorbit a la reïna. La purificació es realitza amb un cabal de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a excepció de l'aplicació de la mostra que es duu a terme a $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. En tot moment, la temperatura de procés és 25°C , i el volum de columna és de 60 mL de Ni^{2+} -IDA-agarosa. La línia blava correspon al valor d'absorbència a 280 nm (senyal de les proteïnes), la línia taronja correspon a la conductivitat del medi en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ i la línia verda correspon al percentatge de tampó d'elució.

Els resultats obtinguts d'aquesta cromatografia (veure **Taula 13**) mostren que, per una banda, ja no s'observa la formació del precipitat en l'elució i per tant, obtenint un rendiment del 100% en activitat i un grau de purificació de 4. També es pot comprovar que tota la proteïna del lisat ($3.809,3 \text{ mg}$ de proteïna) es recupera en les fraccions obtingudes després de la cromatografia ($4.587,9 \text{ mg}$ de proteïna sumant les fraccions de no retintut, rentat i elució). Seguidament, es realitza el "desalting" per eliminar l'imidazol obtenint el cromatograma de la **Figura 13**, on s'aconsegueix un millor rendiment del 62% i 100% en activitat i proteïna recuperada (**Taula 13**), respectivament. El valor superior al 100% per la proteïna recuperada s'assumeix que és un error del mètode Bradford, ja que no es possible generar proteïna, i es considera com el 100%.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Per altra banda, en l'etapa de "desalting" s'obté un rendiment en activitat del 62,1% respecte l'etapa anterior (**Taula 13**). Això es degut a una pèrdua d'activitat de la ScADH durant el "desalting", ja que es recupera el 100% de la proteïna total, però en canvi disminueix l'activitat específica de 188,39 U · mg⁻¹ a 103,60 U · mg⁻¹.

Taula 13. Purificació amb menor càrrega de l'enzim ScADH a través d'una cromatografia d'afinitat per Ni²⁺, amb una etapa posterior de "desalting". S'utilitza un lisat cel·lular que presenta una activitat de 1.179,7 U · mL⁻¹ i una [proteïna total] de 25,4 mg · mL⁻¹ amb un tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM. Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i imidazol 50 mM; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 500 mM imidazol; el cabal de procés és de 5 mL · min⁻¹ (2 mL · min⁻¹ per a la injecció del lisat). L'elució es duu a terme amb un gradient de 0 a 100% de tampó d'elució durant 5 volums de columna (120 mL). "desalting": Volum de columna, 120 mL; la composició del tampó és fosfat 20 mM pH 7,5; el cabal de procés és de 10 mL · min⁻¹. Tot el procés es realitza a una temperatura de 25°C.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica (U · mL ⁻¹)	[Proteïna] (mg · mL ⁻¹)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica (U · mg ⁻¹)
Lisat	150,0	1.179,7	25,4	176.955,0 (100%)	3.809,3 (100%)	46,4
No retintut	150,0	1,6	14,6	240,6 (0,14%)	2.183,5 (57,3%)	0,1
Rentat	200,0	0,4	7,0	88,0 (0,1%)	1.392,8 (36,6%)	0,1
Elució	80,0	2.382,2	25,3	190.578,0 (107,7%)	1.011,6 (26,56%)	188,4
"Desalting"	110,0	1.076,4	31,8	118.399,5 (62,1%)	1.142,8 (113,0%)	103,6

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

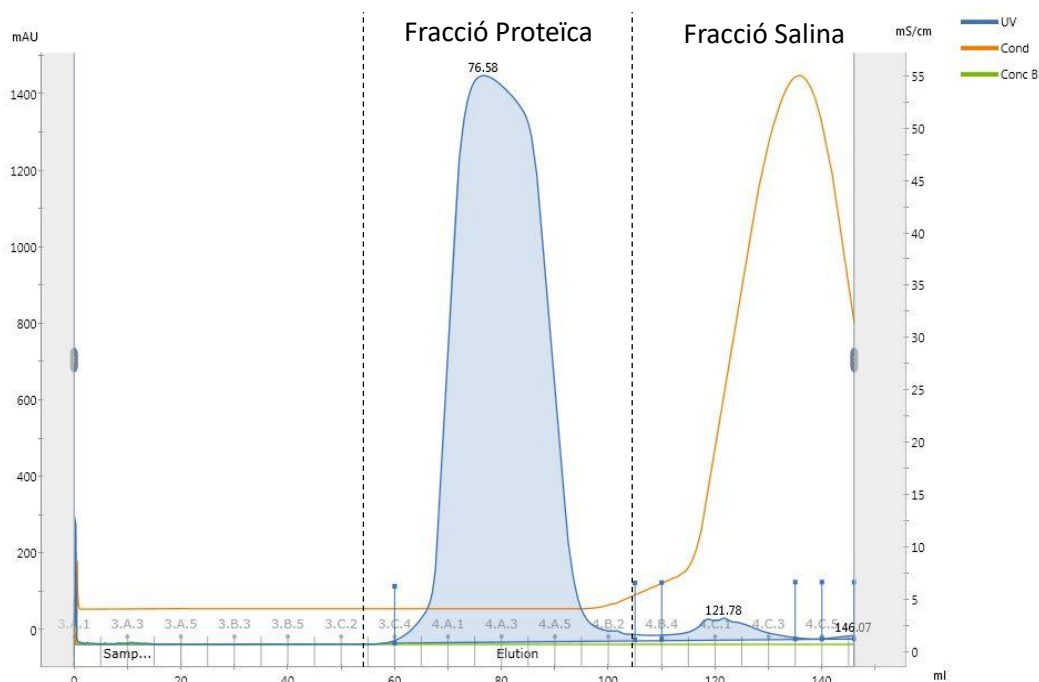


Figura 13. Cromatograma del “desalting” en columna per a la purificació de la ScADH. El cromatograma representa el resultat obtingut en un cicle de “desalting”, és a dir, el resultat d’injectar 12 mL (10% del volum de la columna de “desalting” amb 120 mL de reïna) dels 80 mL obtinguts en l’elució. Després de la injecció, se segueix una elució isocràtica amb el tampó de “desalting” corresponent (fosfat 20 mM pH 7,5) a un cabal de 10 mL · min⁻¹ i a una temperatura de 25°C. La línia blava representa la senyal de proteïna (absorbància a 280 nm) i la línia taronja representa la conductivitat del medi (mS · cm⁻¹).

Fent una avaluació del procés, es comprova que aplicant un gradient d’elució en l’etapa de cromatografia d’afinitat i posterior “desalting”, s’aconsegueix obtenir una solució enzimàtica de ScADH amb 103,6 U · mg⁻¹ partint d’un lisat amb 28,5 U · mg⁻¹, és a dir, un grau de purificació de 3,6, i un rendiment global en activitat de purificació del 66,9%. Per tant, s’implementa amb èxit una millora en el procés de cromatografia d’afinitat que permet millorar el rendiment global en activitat del 30,3% al 66,9% (**Taula 14**).

Taula 14. Avaluació de les etapes de cromatografia d’intercanvi iònic i “desalting” en la segona purificació de la ScADH. El rendiment d’activitat i de proteïna es calcula a partir de l’activitat total de l’etapa anterior detallada a la **Taula 13**.

Etapa	Rendiment en activitat (%)	Rendiment en proteïna (%)
Cromatografia d’afinitat Ni ²⁺ -IDA-agarosa	107,7	26,6
“desalting”	62,1	113,0
Global (cromatografia + “desalting”)	66,9	30,0

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.3.2. Purificació de l'enzim ScPDC per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines

L'enzim ScPDC produït (veure apartat 4.2.2) també es va poder expressar amb una cua d'histidines, per tant, com s'ha comentat en el cas de la ScADH, es durà a terme la seva purificació a través d'una cromatografia d'afinitat per metall quelat. Com en el cas anterior, s'obté un lisat cel·lular a partir de la disrupció de la biomassa que conté l'enzim. A continuació, es purifica el lisat en una columna amb una resina Ni^{2+} -IDA-agarosa, i després s'eliminen les sals i l'imidazol amb un "desalting" en una columna de gel filtració.

El lisat que s'ha obtingut conté una activitat de $240 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i una concentració de proteïna de $17,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. D'aquest lisat es prenen 300 mL i s'injecten a la columna utilitzada en la purificació anterior que conté 60 mL de Ni^{2+} -IDA-agarosa, seguit d'un rentat amb tampó de lisis. Un cop s'han rentat totes les proteïnes no unides a la columna, i en vista dels resultats obtinguts en la purificació de la ScADH, es decideix fer un gradient de concentració d'imidazol en l'etapa d'elució. D'aquesta manera, l'elució és més gradual i reduïm l'efecte de concentració que provocava la precipitació en la ScADH. Amb els resultats obtinguts en aquesta cromatografia (**Taula 15**) es pot observar que el rendiment en activitat és del 40,0%. Aquest baix rendiment s'explica novament per una precipitació en la fracció d'elució, atribuït també a l'efecte de concentració durant aquesta etapa tot i dur-la a terme en gradient. Fixant-nos en la proteïna total, dels 5.121,5 mg de proteïna soluble presents en el lisat, recuperem 4.022,7 mg solubles (sumant les fraccions de no retengut, rentat i elució). Un cop recuperada la fracció soluble de l'elució, on hi ha l'enzim purificat, es duu a terme l'etapa de "desalting" comentada en la purificació anterior (veure apartat 4.3.1) en la columna de 120 mL. Després de recuperar la fracció on hi ha l'enzim, s'analitza l'activitat i la proteïna total per avaluar el procés de dessalinització (veure **Taula 16**), obtenint un rendiment en activitat recuperada del 88,7% i en proteïna recuperada del 91,1%, valors acceptables per a aquesta etapa.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 15. Purificació de la ScPDC a través d'una cromatografia d'afinitat per Ni^{2+} , amb una posterior etapa de "desalting". Es parteix d'un lisat amb una activitat de $240,0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i una [proteïna total] de $17,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 . Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 ; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 500 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 ; el cabal de procés és de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ per la injecció de mostra) amb un gradient en l'elució de 0 a 100% de tampó d'elució durant 2 volums de columna. "desalting": Volum de columna, 120 mL; el tampó de "desalting" és tris-base 50 mM pH 7,5, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2 ; el cabal de procés és $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Tot el procés es duu a terme a temperatura ambient.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	[Proteïna] ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Lisat	300,0	240,0	17,1	72.000,0 (100%)	5.121,5 (100%)	14,1
No retintut	310,0	2,7	7,2	837,0 (1,2%)	2.228,0 (43,5%)	0,4
Rentat	250,0	1,0	4,2	250,0 (0,3%)	1.040,65 (20,0%)	0,2
Elució	90,0	319,0	20,6	28.710,0 (40,0%)	754,1 (14,7%)	38,1
"Desalting"	140,0	182,0	9,8	25.480,0 (88,7%)	687,4 (91,1%)	37,1

Tenint en compte que el lisat cel·lular presentava una activitat específica de $14,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, i obtenint una solució enzimàtica purificada de ScPDC amb una activitat específica de $38,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, s'aconsegueix un grau de purificació de 2,6. Si es mira el rendiment global del procés de purificació (**Taula 16**), de les 72.000 unitats totals inicials es recuperen 25.480 unitats totals (35,4%).

Taula 16. Avaluació de les etapes de cromatografia d'intercanvi iònic i "desalting" en la purificació de la ScPDC. El rendiment d'activitat i de proteïna es calcula a partir de l'activitat total de l'etapa anterior detallada a la **Taula 15**.

Etapa	Rendiment en activitat (%)	Rendiment en proteïna (%)
Cromatografia d'afinitat Ni^{2+} -IDA-agarosa	40,0	14,7
"desalting"	88,7	91,1
Global (Cromatografia + "desalting")	35,4	13,4

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

S'ha vist, doncs, que en l'etapa d'elució de la cromatografia d'afinitat es torna a veure una precipitació, probablement deguda a l'increment en la concentració de proteïna. Per tal d'evitar-la, es prova també de reduir la quantitat de lisat injectat a la columna, reduint així la quantitat de proteïna. Per tant, s'injecten 124 mL de lisat amb una activitat de $150 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i una concentració de proteïna total de $27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, és a dir, es carrega la columna amb 3.351,72 mg de proteïna (en comparació amb els 5.121,50 mg de proteïna de la purificació anterior). Seguint el mateix procediment anterior, els resultats d'aquesta segona cromatografia es mostren a la **Taula 17** i el cromatograma de la **Figura 14**. Comparant-los amb els de la purificació anterior, es pot comprovar que s'aconsegueix amb èxit augmentar el rendiment de la purificació fins al 100%. Un cop recuperada la fracció d'elució, es realitza el "desalting" descrit anteriorment (veure apartat 4.3.1) i representat en el cromatograma de la **Figura 15**. Amb els resultats obtinguts, es recupera el 88,7% de l'enzim de l'etapa anterior (veure **Taula 18**) i mantenint més del 80% d'activitat, passant de $20,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ a $16,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'activitat específica.

Taula 17. Purificació amb càrrega reduïda de l'enzim ScPDC a través d'una cromatografia d'afinitat per Ni^{2+} , i a continuació, una etapa de "desalting". Es parteix d'un lisat amb una activitat de $150,0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i una [proteïna total] de $27,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 . Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 ; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 500 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2 ; el cabal de procés és de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ per la injecció de mostra) i el gradient d'elució es realitza amb tampó d'elució de 0 a 100% durant 2 volums de columna. "desalting": Volum de columna, 120 mL; el tampó de "desalting" és tris-base 50 mM pH 7,5, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2 ; el cabal de procés és $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Tot el procés es duu a terme a temperatura ambient.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	[Proteïna] ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Lisat	124,0	150,0	27,0	18.600,0 (100%)	3.351,7 (100%)	5,5
No retingut	124,0	1,1	39,0	139,0 (0,74%)	4.840,8 (144%)	0,03
Rentat	222,0	0,4	2,5	91,0 (0,48%)	553,2 (16,5%)	0,2
Elució	90,0	270,4	13,1	24.338,0 (130%)	1.178,8 (35%)	20,6
"Desalting"	135,0	160,0	9,7	21.600,0 (88,7%)	1.303,6 (110,6%)	16,6

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

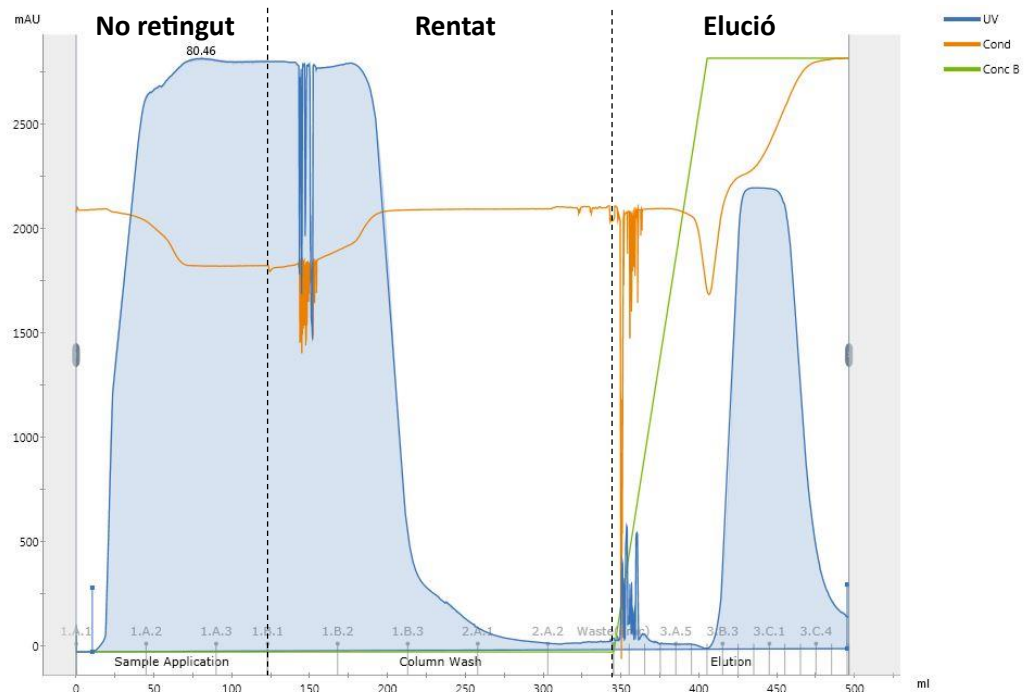
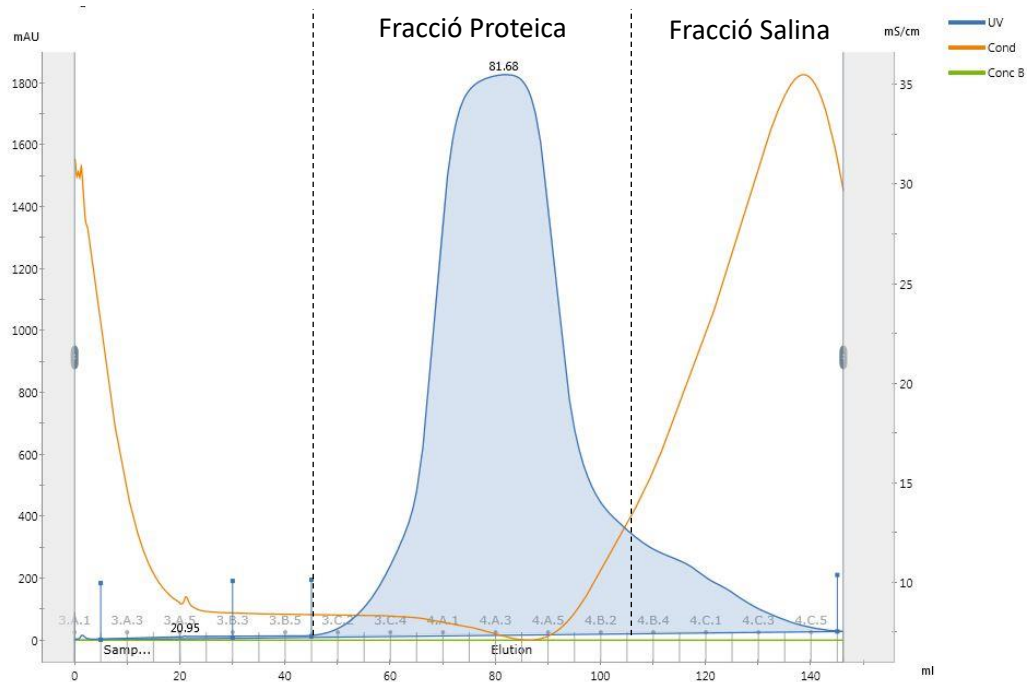


Figura 14. Cromatograma de la purificació de l'enzim ScPDC en una columna de Ni^{2+} -IDA-agarosa. La purificació correspon a la injecció de 150 mL de lisat amb $150 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'activitat enzimàtica i $27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna total. Un cop aplicada la mostra, es fa un rentat de la columna amb el tampó de rentat (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2), observant una caiguda en l'absorbància a 280 nm, és a dir, que totes les proteïnes que no s'havien unit a la columna ja han sortit. En aquest punt s'inicia l'elució amb el tampó d'elució (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 500 mM imidazol, 0,1 mM TPP i 0,1 mM MgCl_2) aplicant un gradient de 0 a 100% per tal d'incrementar de manera gradual la concentració d'imidazol a la columna. Es pot observar la formació d'un pic en l'absorbància a 280 nm corresponent a les proteïnes que s'havien adsorbit a la reïna. El cabal de procés en l'aplicació de la mostra és de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, en el rentat i l'elució és de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La purificació es duu a terme a temperatura ambient. La línia blava correspon al valor d'absorbància a 280 nm (senyal de les proteïnes), la línia taronja correspon a la conductivitat del medi en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ i la línia verda correspon al percentatge de tampó d'elució.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims



4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.3.3. Purificació de l'enzim TmLDH per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines

L'enzim TmLDH també conté una cua d'histidines, per tant, també es adient dur a terme la seva purificació mitjançant una cromatografia d'afinitat per metall quelat. Seguint els procediments que s'han comentat anteriorment, es pren una fracció de la biomassa produïda (veure apartat 4.2.3) per disruptar-la i recuperar el lisat cel·lular resultant. Aquest lisat, que conté la TmLDH, passarà per una primera etapa de cromatografia d'afinitat a través d'una resina de Ni²⁺-IDA-agarosa, per després aplicar l'enzim purificat en una etapa de “desalting”, amb l'objectiu d'emmagatzemar-lo en un tampó sense sal ni l'imidazol utilitzat per recuperar l'enzim en la cromatografia d'afinitat.

Per aquesta purificació, el lisat obtingut conté 112,3 U · mL⁻¹ d'activitat enzimàtica i 20,2 mg · mL⁻¹ de proteïna. En aquest cas, donat que en la purificació dels enzims ScADH i ScPDC s'observava el fenomen de precipitació, i per tal d'evitar-ho en la TmLDH, es carrega una quantitat de proteïna menor a la utilitzada en els casos on s'observa precipitació. Concretament, es carrega la columna amb 230 mL de lisat, és a dir, 4.650,5 mg de proteïna total en la columna de 60 mL de Ni²⁺-IDA-agarosa, obtenint els resultats mostrats a la **Taula 19** i el cromatograma de la **Figura 16**. Després d'injectar el lisat i rentar la columna per eliminar les proteïnes que no s'han unit a la reïna, el primer que es pot observar és que hi ha un 17,8% de la TmLDH que no s'uneix a la columna i es recull a les fraccions de no retengut (15,4% de l'activitat inicial), i rentat (2,45% de l'activitat inicial). Tenint en compte que la càrrega màxima teòrica d'aquesta reïna és de 40 mg de proteïna amb cua d'histidines · mL reïna⁻¹, i que s'han adsorbit 544,3 mg de proteïna (fracció d'elució), és a dir 9,1 mg · mL reïna⁻¹, només s'ha arribat a un 22,7% de la càrrega màxima. Per tant, tot i que no s'ha fet un estudi concret ja que l'activitat no recuperada és baixa, és evident que hi ha una part de la TmLDH que no interacciona amb la columna, possiblement per una pèrdua de la cua d'histidines. Tot i això, després de la cromatografia d'afinitat es recupera un 77,2% de l'activitat total en l'elució (veure **Taula 19**) amb un grau de purificació de 6,5 (increment de l'activitat específica de 5,6 U · mg⁻¹ en el lisat a 36,6 U · mg⁻¹ en l'elució).

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 19. Purificació de l'enzim TmLDH mitjançant una cromatografia d'afinitat per Ni²⁺, seguit d'una etapa de "desalting". La purificació es duu a terme amb un lisat que conté 112,3 U · mL⁻¹ d'activitat enzimàtica i 20,2 mg · mL⁻¹ de proteïna total en tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 20 mM imidazol. Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 500 mM imidazol; el cabal de procés és de 5 mL · min⁻¹ (2 mL · min⁻¹ per la injecció de mostra) i el gradient d'elució es realitza amb tampó d'elució de 0 a 100% durant 2 volums de columna. "desalting": Volum de columna, 120 mL; el tampó de "desalting" és fosfat 20 mM pH 7,5; el cabal de procés és 10 mL · min⁻¹. Tot el procés de purificació es realitza a temperatura ambient.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica (U · mL ⁻¹)	[Proteïna] (mg · mL ⁻¹)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica (U · mg ⁻¹)
Lisat	230	112,3	20,2	25.837,0 (100%)	4.650,5 (100%)	5,6
No retintut	230	16,6	15,2	3.991,2 (15,4%)	3.643,6 (78,3%)	1,1
Rentat	220	2,9	2,6	633,6 (2,45%)	577,1 (12,4%)	1,1
Elució	70	285,0	7,8	19.950,0 (77,21%)	544,3 (11,7%)	36,6
"Desalting"	140	123,3	2,7	17.220 (86,3%)	376,2 (69,1%)	45,8

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

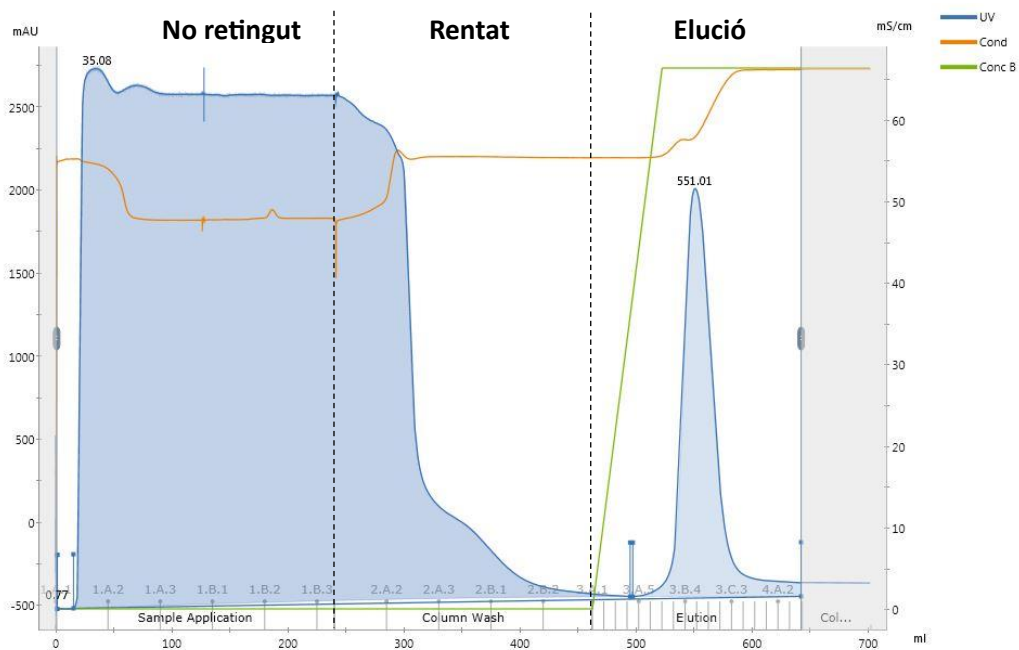


Figura 16. Cromatograma de la purificació de l'enzim TmLDH en una columna de Ni²⁺-IDA-agarosa. La purificació s'inicia amb l'aplicació dels 230 mL de lisat amb 112,3 U · mL⁻¹ i 20,2 mg · mL⁻¹ de proteïna, observant l'increment en l'absorbància a 280 nm que correspon a aquelles proteïnes que no s'adsorbeixen a la columna. Després, es renta la columna amb el tampó de rentat (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 50 mM imidazol) fins que l'absorbància a 280 nm arriba a 0, indicant que ja han sortit aquelles proteïnes que no s'adsorbeixen a la columna. A continuació, s'elueixen les que s'han adsorbit a la reïna fent un gradient amb el tampó d'elució (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 500 mM imidazol) del 0 al 100%. Es confirma l'elució de les proteïnes amb la formació d'un pic d'absorbància. Com en els casos anteriors, el cabal de procés en l'aplicació de la mostra és de 2 mL · min⁻¹, mentre que en el rentat i l'elució és de 10 mL · min⁻¹. La purificació es duu a terme a temperatura ambient. La línia blava correspon al valor d'absorbància a 280 nm (senyal de les proteïnes), la línia taronja correspon a la conductivitat del medi en mS · cm⁻¹ i la línia verda correspon al percentatge de tampó d'elució.

Després de recuperar la fracció pura de l'enzim, i tal com s'ha fet per als anteriors enzims, es realitza el "desalting" en la columna amb 120 mL de reïna de "desalting" per emmagatzemar l'enzim sense les restes de sal i imidazol, amb el cromatograma obtingut mostrat a la **Figura 17**. Aquesta etapa finalitza amb èxit, recuperant un 86,3% de l'activitat resultant de la cromatografia d'afinitat i un 69,1% de la proteïna (**Taula 20**), fent que el valor d'activitat específica incrementi de 36,6 U · mg⁻¹ a 45,8 U · mg⁻¹. Aquest increment en l'activitat específica indica que, tot i que l'etapa de "desalting" no s'espera que purifiqui, l'enzim és més pur ja que els mg de proteïna totals s'han reduït respecte a l'activitat total, que representa l'enzim que és actiu. Tot i no observar aquest fenomen amb els altres enzims (veure **Taula 13**, **Taula 15** i **Taula 21**), part de les proteïnes en l'elució de la TmLDH queden retingudes en la columna de "desalting", indicant que s'està produint algun tipus d'interacció amb el suport, i que aquesta interacció afecta més a proteïnes diferents a la TmLDH (reducció de la proteïna total superior a la reducció en activitat a la sortida de la columna).

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

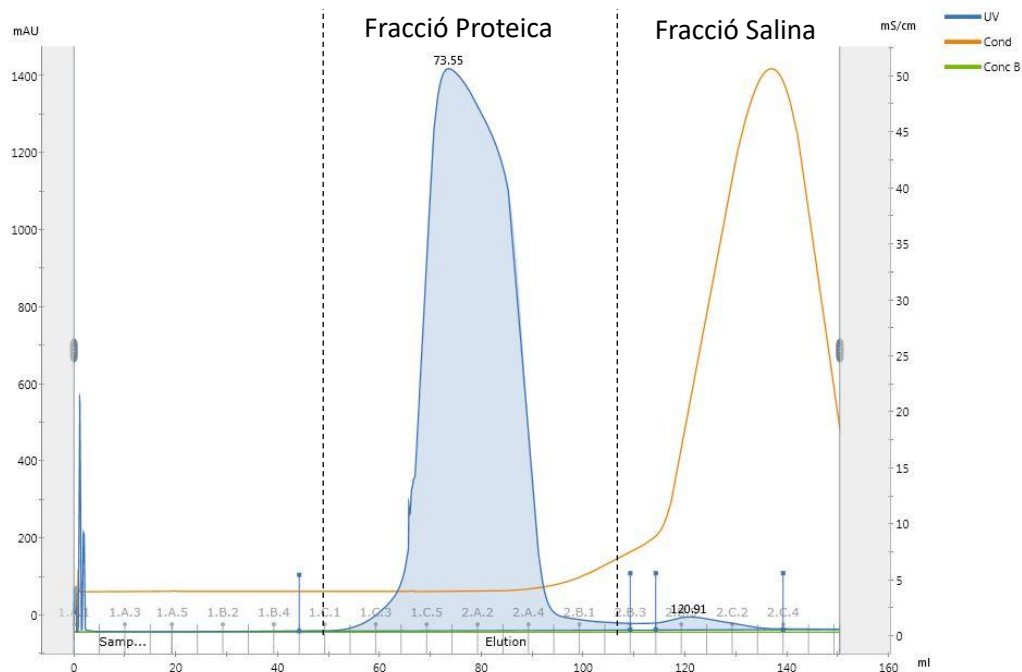


Figura 17. Cromatograma del “desalting” de la fracció d’elució en la purificació de la *Tm*LDH. Es mostra un dels cicles de “desalting” després d’injectar dels 50 mL d’elució (Taula 19) l’equivalent al 10% del volum de la columna amb 120 mL de reïna. Seguidament, s’elueix isocràticament amb el tampó de “desalting” (fosfat 20 mM pH 7, 5) a un cabal de 10 mL · min⁻¹ i a temperatura ambient. La línia blava representa la senyal de proteïna (absorbància a 280 nm) i la línia taronja representa la conductivitat del medi (mS · cm⁻¹).

Fent una avaluació de les etapes de purificació es pot concloure, doncs, que la reducció en la càrrega de proteïna i l’elució amb un gradient, és una estratègia efectiva per millorar el rendiment de purificació i evitar la precipitació de les proteïnes (Taula 20). En aquest cas, un cop finalitzada amb èxit la purificació a partir d’un lisat amb 5,6 U · mg⁻¹, s’arriba a una *Tm*LDH purificada amb 45,8 U · mg⁻¹, obtenint un rendiment global en activitat del 66,6%.

Taula 20. Avaluació de les etapes de cromatografia d’intercanvi iònic i “desalting” en la purificació de la *Tm*LDH. El rendiment en activitat i en proteïna es calcula a partir de l’activitat total de l’etapa anterior detallada a la Taula 19.

Etapa	Rendiment en activitat		Rendiment en proteïna	
	(%)		(%)	
Cromatografia d’afinitat Ni ²⁺ -IDA-agarosa	77,2		11,7	
“desalting”	86,3		69,1	
Global (cromatografia + “desalting”)	66,6		8,1	

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.3.4. Purificació de l'enzim ZpPDC per cromatografia d'intercanvi aniònic

Es recupera la biomassa que conté l'enzim ZpPDC per tal de disruptar-la i obtenir el lisat cel·lular amb el qual es durà a terme la purificació. L'enzim produït no conté la cua d'histidines que es va introduir durant el procés de clonatge de la soca. Per aquest motiu, anteriorment en el grup, es va haver de posar a punt un mètode per a la purificació de ZpPDC en cromatografia d'intercanvi aniònic en MANA-agarosa, determinant el grau de purificació i el rendiment de la purificació a diferents pHs ⁶⁰. Un cop recuperat l'enzim purificat, es duu a terme una etapa de "desalting" per tal d'eliminar l'excés de clorur de sodi.

Per a la purificació de la ZpPDC es va partir d'un lisat cel·lular que conté una activitat de 178,2 U · mL⁻¹ i una concentració de proteïna total de 12,4 mg · mL⁻¹. D'aquest lisat, es van injectar 75 mL en una columna amb 60 mL de MANA-agarosa. A continuació, es renta la columna amb una mescla de 69% de tampó de lisi (acetat 50 mM pH 5, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂) i 31% de tampó d'elució (acetat 50 mM pH 5, 1M NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂) amb l'objectiu d'eluir proteïnes que s'uneixen de manera feble a la reïna. Seguidament, s'elueix l'enzim que s'ha unit a la reïna incrementant la força iònica amb clorur de sodi, fent servir un 100% del tampó d'elució en la mescla (amb el cromatograma obtingut de la purificació a la **Figura 18**). A la **Taula 21** es mostren els resultats de la purificació, on a l'etapa de cromatografia d'intercanvi aniònic es va aconseguir recuperar el 100% de l'activitat total del lisat, incrementant l'activitat específica fins a 57,7 U · mg⁻¹. Per altra banda, si es fa un balanç entre els mg de proteïnes al lisat i de les fraccions recuperades ("no retingut", "rentat" i "elució"), dels 930 mg de proteïna injectats es recuperen 558,5 mg (60,0% de les proteïnes del lisat). Per tant, hi ha proteïnes que queden retingudes a la columna un cop finalitzada la cromatografia, possiblement degut a alguna interacció inespecífica amb el suport suficientment forta que impedeix la seva elució.

Taula 21. Purificació de l'enzim ZpPDC a través d'una cromatografia d'intercanvi aniònic, seguit d'una etapa de "desalting". El lisat cel·lular inicial presenta una activitat de 178,2 U · mL⁻¹ i una [proteïna total] de 12,4 mg · mL⁻¹, i el tampó de lisi conté acetat 50 mM pH 5, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂. Cromatografia d'intercanvi aniònic: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és acetat 50 mM pH 5, 310 mM NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂; la composició del tampó d'elució és acetat 50 mM pH 5, 1M NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂; el cabal de procés és 5 mL · min⁻¹. Desalting: Volum de columna, 120 mL; la composició del tampó de "desalting" és citrat 200 mM, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂.

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica (U · mL ⁻¹)	[Proteïna] (mg · mL ⁻¹)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica (U · mg ⁻¹)
Lisat	75	178,2	12,4	13.368,2 (100%)	930,0 (100%)	14,4
No retingut	75	0,0	0,3	0,0 (0,0%)	22,5 (2,4%)	0,0
Rentat	100	3,9	3,0	390,0 (2,9%)	300,0 (32,2%)	1,3
Elució	40	340,5	5,9	13.622,2 (101,9%)	236,0 (25,4%)	57,7
"Desalting"	80	172,0	2,7	13.758,4 (101,0%)	216,0 (91,5%)	63,7

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

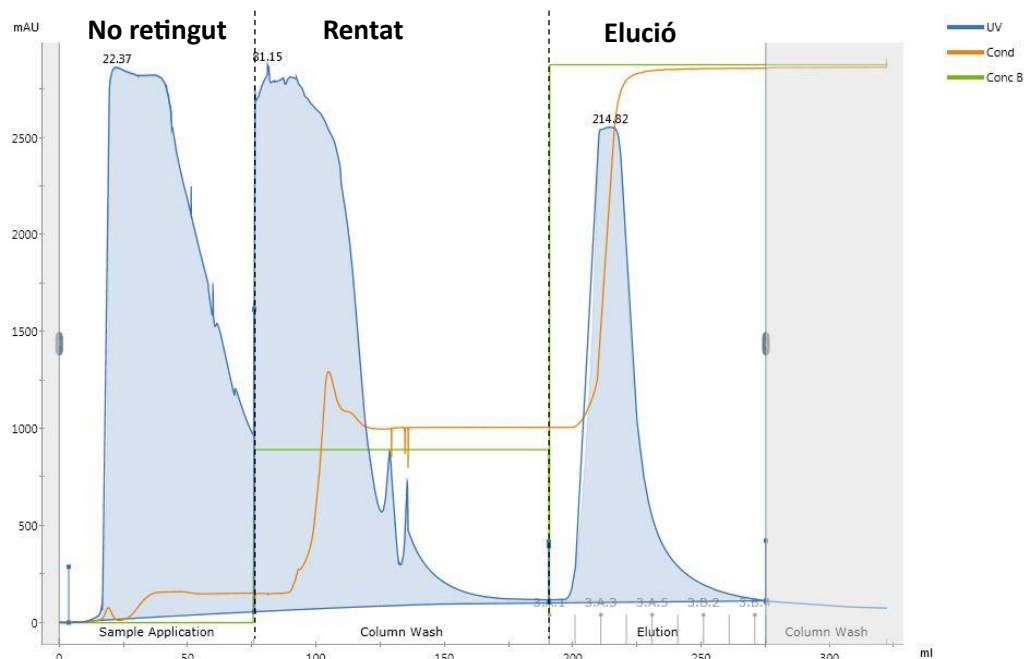


Figura 18. Cromatograma de la purificació de la ZpPDC en una columna de MANA-agarosa. L'aplicació de la mostra correspondria a 75 mL del lisat cel·lular que conté $178,2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'activitat i $12,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna total en tampó de lisi (acetat 50 mM pH 5, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2). A continuació, es duu a terme el rentat de la columna i l'elució mitjançant la mescla de dos tamps (A i B), la composició del tampó A és acetat 50 mM, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2 i la composició del tampó B és acetat 50 mM, 1M NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2 . D'aquesta manera, es fa el rentat de la columna amb una mescla de 69% tampó A i 31% tampó B (composició resultant de la mescla: acetat 50 mM pH 5, 310 mM NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2), observant el primer augment en la conductivitat. Finalment, s'elueix sense gradient la proteïna amb el 100% de tampó B (acetat 50 mM pH 5, 1M NaCl, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl_2), corresponent al segon augment en la conductivitat. El cabal de procés és de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, excepte durant la injecció del lisat on el cabal és de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, la temperatura de procés és a temperatura ambient i el volum de columna és 60 mL de MANA-agarosa. La línia blava correspon al valor d'absorbència a 280 nm (senyal de les proteïnes), la línia taronja correspon a la conductivitat del medi en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ i la línia verda correspon al percentatge de tampó B en la mescla.

Un cop finalitzada la cromatografia d'intercanvi aniònic, es duu a terme una etapa de "desalting", mitjançant una cromatografia de gel filtració amb 120 mL de reïna descrita a materials i mètodes (Apartat 3.3), amb l'objectiu d'eliminar l'excés de clorur de sodi present en la fracció d'elució. Després de realitzar el "desalting" en columna, s'obté el cromatograma de la **Figura 19**, on es pot observar la separació de les proteïnes (senyal d'absorbència, UV) de les sals del tampó d'elució (senyal de conductivitat, $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$). La fracció que conté les proteïnes es troba en tampó de "desalting", i tal com es mostra a la **Taula 22** es recupera un 100% de l'activitat i un 91,5% de la proteïna, i per tant, s'obté un rendiment excel·lent d'aquesta etapa.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

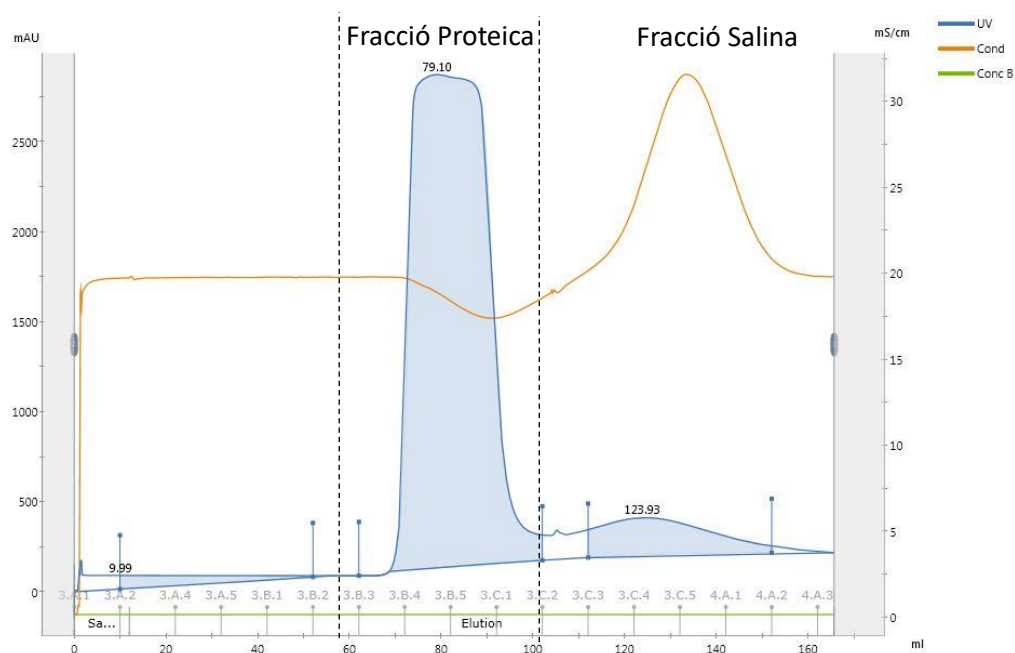


Figura 19. Cromatograma del “desalting” en columna per a la purificació de la ZpPDC. El cromatograma correspon a un cicle de “desalting”, en el qual s’injecta un volum de fracció d’elució de la cromatografia d’intercanvi iònic equivalent al 10% del volum de columna (volum de columna: 120 mL). Seguidament, s’elueix de forma isocràtica amb el tampó de “desalting” (citrat 200 mM, 0,1 mM TPP, 0,1 mM MgCl₂) a un cabal de 10 mL · min⁻¹, a temperatura ambient. La línia blava representa la senyal de proteïna (absorbància a 280 nm) i la línia taronja representa la conductivitat del medi (mS · cm⁻¹).

Amb els resultats d’aquesta purificació, s’observa que a partir d’un lisat amb una activitat específica de 14,4 U · mg⁻¹, es pot arribar a obtenir una solució enzimàtica de ZpPDC més pura amb 63,7 U · mg⁻¹, amb un grau de purificació de 4,4, és a dir amb 4,4 vegades més d’enzim respecte a la resta de proteïnes. Aquest mètode de purificació mostra una activitat recuperada del 100%, un valor excel·lent i el màxim rendiment en activitat possible, similars als valors obtinguts prèviament al grup de recerca per la purificació d’aquest enzim ⁶⁰.

A continuació, es mostra una avaluació dels rendiments d’activitat i proteïna recuperada de cadascuna de les etapes del procés de purificació, juntament amb els rendiments globals del procés (**Taula 22**).

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 22. Avaluació de les etapes de cromatografia d'intercanvi iònic i “desalting” per a l'enzim ZpPDC. El rendiment d'activitat i de proteïna es calcula a partir de l'activitat total de l'etapa anterior.

Etapa	Rendiment en activitat (%)	Rendiment en proteïna (%)
Cromatografia d'intercanvi aniónic	101,9	25,4
“desalting”	101,0	91,5
Global (cromatografia + desalting)	102,9	23,2

4.3.5. Purificació de l'enzim SpNOX per cromatografia d'afinitat a cua d'histidines

L'enzim SpNOX va ser clonat amb una cua d'histidines, i posteriorment produït en bioreactor per altres integrants del grup de recerca. D'aquesta producció, es recupera una fracció per disruptar-la, recuperar el lisat cel·lular que conté l'enzim, i dur a terme la seva purificació en una cromatografia d'afinitat en Ni^{2+} -IDA-agarosa. Degut a la seva alta inestabilitat (veure apartat 6.2.1) a temperatura ambient, tot el procés es va dur a terme en fred per tal d'evitar perdre activitat enzimàtica.

Després de la disruptió, el lisat cel·lular obtingut conté $67,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'activitat i $54,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna. D'aquest lisat s'injecten 320 mL en la columna amb 60 mL de Ni^{2+} -IDA-agarosa, obtenint el cromatograma de la **Figura 20**. La major part de proteïnes se separen de la SpNOX en les fraccions de “no retintut” i “rentat” (**Taula 23**), on només hi ha el 7,3% de l'activitat inicial de l'enzim (3,7% en el “no retintut” i 3,6% en el “rentat”). A continuació, s'elueixen les proteïnes unides a la reïna, recuperant un 156,6% de l'activitat inicial, és a dir, que recuperem més activitat de la injectada inicialment. Això podria ser degut a una hiperactivació per la presència de FAD^+ als tampons de rentat i elució, que anteriorment en el grup s'havia vist que augmentava l'activitat en addicionar-lo al lisat cel·lular. Amb aquesta etapa de cromatografia d'afinitat, l'activitat específica s'incrementa de $1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ del lisat a $7,7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ en l'elució, és a dir, el grau de purificació ha estat de 6,4, tot i que amb la hiperactivació se sobreestima aquest valor.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

Taula 23. Purificació de l'enzim *SpNOX* a través d'una cromatografia d'afinitat per Ni^{2+} , amb una etapa de "desalting" posterior. Es purifica un lisat amb $67,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'activitat enzimàtica i $54,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna total en tampó de lisis que conté fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 20 mM d'imidazol. Cromatografia d'afinitat: Volum de columna, 60 mL; la composició del tampó de rentat és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 50 mM imidazol; la composició del tampó d'elució és fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 500 mM imidazol; el cabal de procés és de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ per la injecció de mostra) i el gradient d'elució es realitza amb tampó d'elució de 0 a 100% durant 5 volums de columna. "desalting": Volum de columna, 120 mL; el tampó de "desalting" és fosfat 20 mM pH 7,5; el cabal de procés és $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Durant tot el procés es mantenen els tampons i la columna en gel, i les fraccions un cop recuperades es guarden immediatament a la nevera a 4°C .

	Volum (mL)	Activitat enzimàtica ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	[Proteïna] ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activitat total (U)	Proteïna total (mg)	Activitat específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Lisat	320,0	67,1	54,1	21.472,0 (100%)	17.312,0 (100%)	1,2
No retintut	320,0	2,5	22,7	800,0 (3,7%)	7.264,0 (41,7%)	0,1
Rentat	350,0	2,2	9,1	770,0 (3,6%)	3.185,0 (18,4%)	0,2
Elució	120,0	280,2	36,3	33.624,0 (156,6%)	4.356,0 (25,2%)	7,7
"Desalting"	120,0	153,8	41,1	18.456,0 (54,9%)	4932,0 (113,2%)	3,7

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

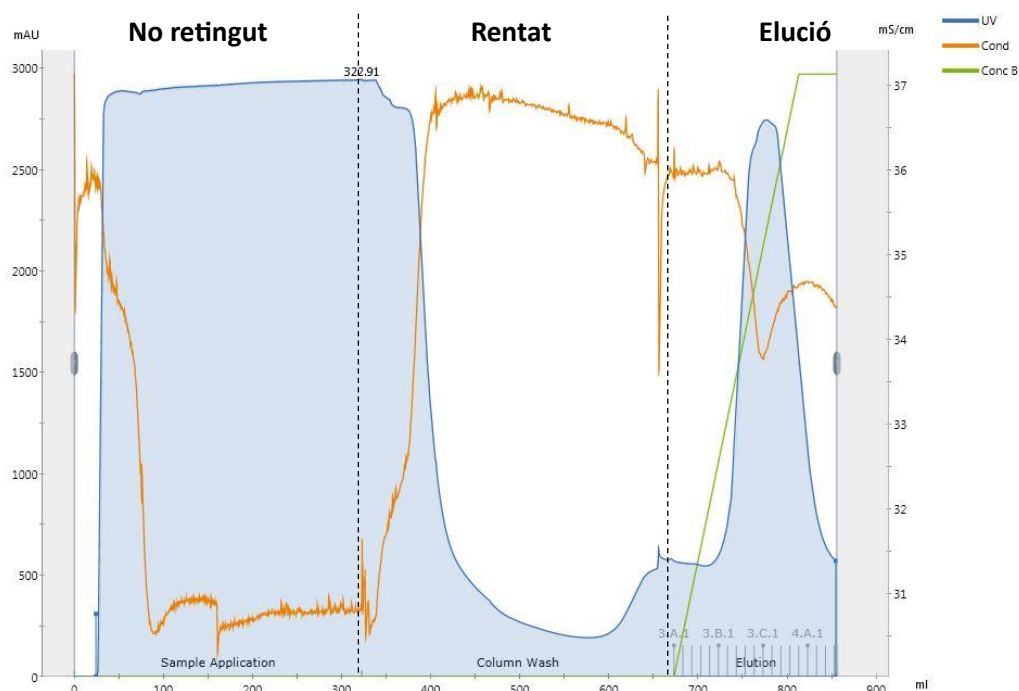


Figura 20. Cromatograma de la purificació de l'enzim *SpNOX* en una columna de Ni^{2+} -IDA-agarosa. En aquest cas, la purificació s'inicia amb l'aplicació dels 80 mL de lisat amb $67,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i $54,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteïna, i s'observa l'increment en l'absorbància a 280 nm que correspon a aquelles proteïnes que no s'adsorbeixen a la columna. Per acabar d'eliminar les proteïnes no adsorbides, es renta la columna amb el tampó de rentat (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 50 mM imidazol) fins que l'absorbància a 280 nm arriba a 0, indicant que ja han sortit aquelles proteïnes que no s'adsorbeixen a la columna. Un cop rentada la columna, s'aplica el tampó d'elució (fosfat 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM i 500 mM imidazol) seguint un gradient de 0 a 100% per recuperar les proteïnes adsorbides, que es confirma amb la formació d'un pic d'absorbància a 280 nm (tot i que en aquest cromatograma es va aturar prematurament el procés, i el pic d'elució no es va registrar correctament, tot i que després es va reiniciar de manera manual per recuperar la fracció). Com s'ha descrit en les purificacions anteriors, el cabal de procés en l'aplicació de la mostra és de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, mentre que en el rentat i l'elució és de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La purificació es duu a terme a temperatura ambient. La línia blava correspon al valor d'absorbància a 280 nm (senyal de les proteïnes), la línia taronja correspon a la conductivitat del medi en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ i la línia verda correspon al percentatge de tampó d'elució.

Seguidament, es recuperen les fraccions d'elució i s'injecten en una columna amb 120 mL de reïna de "desalting" per tal d'eliminar l'excés de sal i l'imidazol, i el cromatograma obtingut es mostra a la **Figura 21**. Tal i com es detalla a la **Taula 23**, tot i recuperar tota la proteïna injectada, l'activitat recuperada és el 54,9% de l'activitat en l'elució. Aquesta pèrdua pot ser deguda a la falta d'estabilitat de l'enzim en aquestes condicions, ja que es recupera el 100% de proteïna però l'activitat específica disminueix de $7,7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ a $3,7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

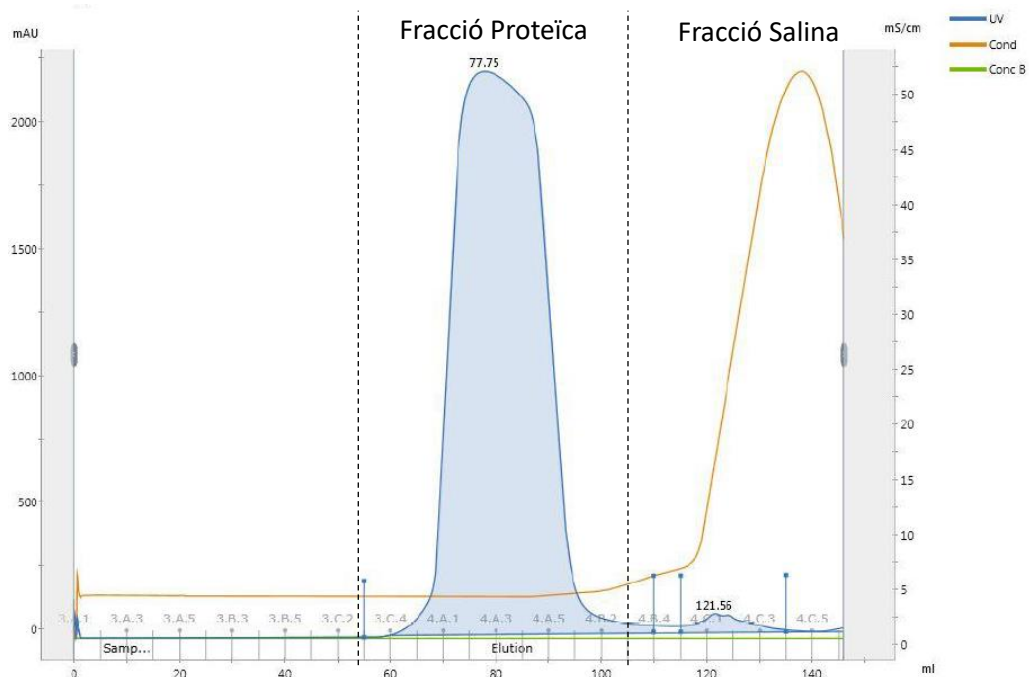


Figura 21. Cromatograma del “desalting” de la fracció d’elució en la purificació de la *SpNOX*. Es mostra un dels cicles de “desalting” després d’injectar dels 90 mL d’elució (**Taula 23**) l’equivalent al 10% del volum de la columna amb 120 mL de reïna. L’elució es duu a terme isocràticament amb el tampó de “desalting” (fosfat 20 mM pH 7,5) a un cabal de 10 mL · min⁻¹ i a temperatura ambient. La línia blava representa la senyal de proteïna (absorbància a 280 nm) i la línia taronja representa la conductivitat del medi (mS · cm⁻¹).

En avaluar el rendiment de les etapes de purificació (**Taula 24**), amb aquestes condicions, s’aconsegueix purificar la *SpNOX* amb un rendiment global en activitat del 86% i un grau de purificació de 3,1 partint d’un lisat amb 1,2 U · mg⁻¹ i obtenint una solució enzimàtica més pura amb 3,7 U · mg⁻¹.

Taula 24. Avaluació de les etapes de cromatografia d’intercanvi iònic i “desalting” en la purificació de la *SpNOX*. El rendiment en activitat i en proteïna es calcula a partir de l’activitat total de l’etapa anterior detallada a la **Taula 23**.

Etapa	Rendiment en activitat (%)	Rendiment en proteïna (%)
Cromatografia d’afinitat Ni ²⁺ -IDA-agarosa	156,6	25,2
“desalting”	54,9	113,2
Global (cromatografia + “desalting”)	86,0	28,5

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

4.4. Resultats de la liofilització dels enzims

Un cop duta a terme la purificació dels enzims, aquests es liofilitzen per tal de emmagatzemar-los, ja que en forma de liofilitzat augmenta l'estabilitat de les proteïnes⁸⁹. El resultat de liofilitzar els enzims purificats es mostra a la **Taula 25**, on s'observa que el rendiment de la liofilització és superior al 50% en tots els casos. Només per a la *SpNOX* i la *ScADH* és on s'observa la major pèrdua d'activitat després de la liofilització. En canvi, per a les *PDCs* i la *TmLDH* el rendiment de liofilització és superior al 70%. Per tant, dels enzims purificats, els més sensibles al procés de liofilització són la *SpNOX* i la *ScADH*. En aquest cas, com que l'objectiu era emmagatzemar els enzims a llarg termini i el rendiment és superior al 50%, no s'ha realitzat un estudi en profunditat del procés de liofilització per tal d'optimitzar-lo. Tanmateix, es coneix que alguns sucres són capaços de donar major estabilitat estructural durant el procés de liofilització⁸⁹, però no s'han utilitzat ja que podrien alterar el medi de reacció i, per tant, requerir d'un pas addicional de "desalting". A més, no sempre s'aconsegueix millorar el rendiment, i per tant, caldria fer un estudi més detallat del procés, el qual requeriria d'equips de liofilització més sofisticats amb la possibilitat de controlar les variables del procés.

Taula 25. Liofilització dels enzims produïts i purificats per a l'estudi de les reaccions. Caracterització de la liofilització de cadascun dels enzims purificats. Es mesuren els mil·ligrams de liofilitzat, l'activitat abans i després de liofilitzar, i es calcula les unitats d'activitat enzimàtica per mil·ligram i el rendiment de la liofilització. Condicions de liofilització: Congelació a -80°C durant 24 hores en fraccions de 10 mL, i posterior liofilització aplicant el buit a temperatura ambient.

Enzim	Proteïna total (mg)	Pes liofilitzat (mg)	Activitat abans de liofilitzar	Activitat després de liofilitzar	UA · mg liofilitzat ⁻¹	Rendiment (%)
<i>ScADH</i>	1.142,8	1.020,0	118.399,5	76.124,0	74,6	64,2
<i>ScPDC</i>	1.303,6	1.420,0	21.600,0	18.576,0	13,1	86,0
<i>ZpPDC</i>	216,0	240,0	13.758,4	9.919,8	41,3	72,1
<i>TmLDH</i>	376,2	450,1	17.220,0	13.793,2	30,6	80,1
<i>SpNOX</i>	4.932,0	4.330,0	18.456,0	10.335,4	1,8	56,0

4.5. Resum de la purificació dels enzims recombinants

A la **Taula 26** es mostra una recopilació dels rendiments en activitat, obtinguts per a cadascuna de les etapes de purificació per als enzims *ScADH*, *ScPDC*, *TmLDH*, *ZpPDC* i *SpNOX*, a més del rendiment global abans i després de liofilitzar. A primera vista, es pot comprovar que en tots els casos, exceptuant la *TmLDH*, l'etapa de cromatografia mostra un rendiment del 100%, és a dir, es recupera la totalitat de l'activitat injectada a la columna. En canvi, tal i com mostren els resultats, l'etapa de "desalting" i liofilització són les etapes més delicades del procés, ja que són les que resulten en rendiments inferiors al 100%, i en el cas de la *SpNOX* i *ScADH* propers al 50%. Això es pot explicar per les condicions a les quals s'han dut a terme, que han estat les mateixes en tots els casos, i per tant, cada enzim s'ha comportat de manera diferent en aquestes condicions. Donat que l'objectiu de la purificació no era la optimització de cada procés, sinó

4. Resultats I: Producció i purificació dels enzims

aconseguir un rendiment suficient per a poder obtenir l'enzim necessari per a l'estudi de les reaccions, el rendiment global després de la liofilització ha estat suficient per satisfer aquest requisit.

Taula 26. Rendiments en activitat de les etapes de cromatografia, “desalting” i liofilització, juntament amb el rendiment en activitat global abans i després de liofilitzar, per a cadascun dels enzims purificats (ScADH, ScPDC, TmLDH, ZpPDC i SpNOX).

Enzim	Tipus de cromatografia	Rendiment cromatografia (%)	Rendiment “desalting” (%)	Rendiment global abans de liofilitzar (%)	Rendiment liofilització (%)	Rendiment global després de liofilitzar (%)
ScADH	Afinitat	107,7	62,1	66,9	64,2	42,9
ScPDC	Afinitat	130,0	88,7	116,1	86,0	99,8
TmLDH	Afinitat	77,2	86,3	66,6	80,1	53,3
ZpPDC	Intercanvi aniònic	101,9	101,0	102,9	72,1	74,2
SpNOX	Afinitat	156,6	54,9	86,0	56,0	48,2

4.6. Conclusions

Un dels objectius en aquest capítol, ha estat la producció dels enzims necessaris per als estudis de les reaccions posteriors. En aquest cas, s'ha necessitat dur a terme la producció de la ScADH, ScPDC i TmLDH. A través dels cultius en *fed-batch*, cada cultiu ha permès obtenir 1.394.409 Unitats totals en el cas de la ScADH ($321.761,66 \text{ U totals} \cdot \text{L}^{-1}$ en 3,80L), 78.119 Unitats totals en el cas de la ScPDC ($25.199,90 \text{ U totals} \cdot \text{L}^{-1}$ en 3,10 L) i 208.173 Unitats totals en el cas de la TmLDH ($57.099,81 \text{ U totals} \cdot \text{L}^{-1}$ en 3,65 L).

L'altre objectiu ha estat poder tenir un mètode de purificació amb un bon rendiment i grau de purificació per satisfer les necessitats d'enzims per a les reaccions. En aquest sentit, s'ha desenvolupat un mètode de purificació per a cadascun dels enzims (ScADH, ZpPDC, ScPDC, TmLDH i SpNOX) que ha permès obtenir un alt rendiment de purificació (més del 60% en el pitjor dels casos, i un 100% de rendiment per als millors) i un major grau de puresa (incrementant més de 4 vegades l'activitat específica del lisat cel·lular de partida).

I, tal i com s'ha comentat, l'objectiu de la liofilització dels enzims és permetre el seu emmagatzematge a llarg termini. Amb els resultats obtinguts, es pot concloure que és possible dur a terme la liofilització de tots els enzims en les condicions utilitzades, tot i que el rendiment ha estat inferior a l'esperat en alguns casos, però en general el rendiment es troba al voltant del 80%. Es conclou que, tot i ser una primera aproximació al procés de liofilització, aquest requereix d'un control molt més precís de les condicions del procés, que permetria una optimització del procés.

El desenvolupament del procés de producció i purificació de l'enzim ZpPDC ha estat publicat a la revista *Q1 Engineering in Life Sciences*⁶⁰ amb un factor d'impacte de 2,7.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.1. Introducció

Aquest capítol de tesi s'emmarca dins del projecte europeu Horizon2020 BIOCON-CO₂, en el qual es desenvolupen diferents factories cel·lulars amb les quals es vol transformar el CO₂ de la indústria, com la metal·lúrgica, en productes de valor afegit, amb l'objectiu de reduir les emissions d'aquest gas a l'atmosfera i convertir-lo en un recurs⁶³. Tal i com s'ha comentat en la introducció general, la idea és implementar aquests sistemes com a tecnologia CCU (captura i utilització del CO₂).

La indústria metal·lúrgica és una de les grans emissores de CO₂, en concret, segons un informe de la IEA (*International Energy Agency*), s'estima que aquest sector va emetre 2,6 gigatones de CO₂ el 2019 (un 25% de les emissions industrials de CO₂)⁹⁰. Una de les rutes per a la fabricació d'acer és la mostrada a la **Figura 22**, i és la utilitzada per l'acereria Arcelor Mittal, la qual utilitza carbó com a font de calor i poder reductor per als alts forns. De fet, els gasos que s'emeten dels alts forns (BF) i els forns bàsics d'oxigen (BOF) són els que contenen les majors concentracions de CO₂, convertint-los en una font d'aquest gas per a les factories cel·lulars desenvolupades en el marc del projecte BIOCON-CO₂. Tenint en compte que una de les etapes del projecte és la implementació d'una planta pilot a la pròpia fàbrica, amb una localització ja definida, només es tindria accés a les línies de gasos dels alts forns (BFG) i del forn de coc (COG).

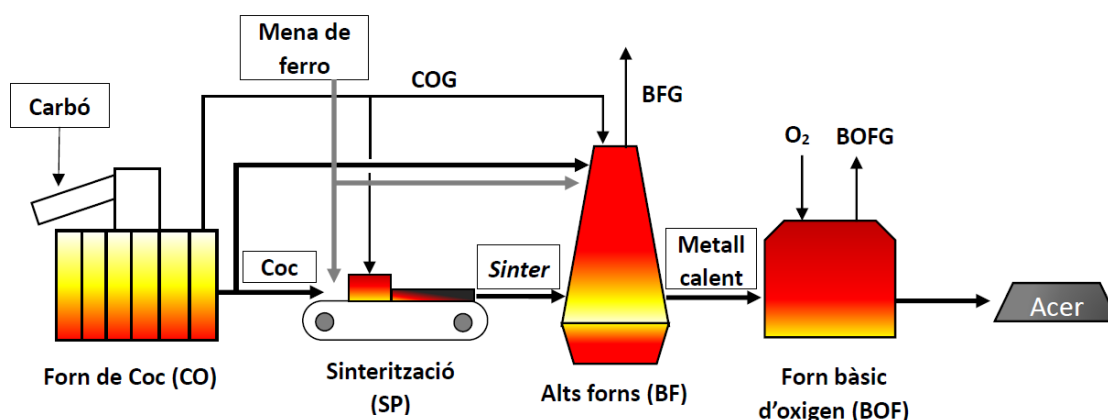


Figura 22. Esquema de les etapes de fabricació de l'acer seguint la ruta BF-BOF (Blast furnace -Basic oxygen furnace). CO: Coke oven; COG: Coke oven gas; SP: Sinter plant; BF: Blast furnace; BFG: Blast furnace gas; BOF: Basic oxygen furnace; BOFG: Basic oxygen furnace gas.

El cas estudiat en aquesta tesi, com s'ha introduït en la introducció general, és un sistema CCU basat en una reacció multienzimàtica de síntesi d'un compost d'interès industrial, l'àcid làctic, a partir d'etanol i CO₂ (**Figura 23**). La reacció principal consisteix en una carboxilació de l'acetaldehid a través del CO₂ catalitzada per l'enzim Piruvat descarboxilasa (PDC) per produir àcid pirúvic. A continuació, a través de l'enzim Lactat deshidrogenasa (LDH) es redueix l'àcid pirúvic a àcid làctic consumint una molècula de cofactor NADH. Aquest cofactor es regenera amb una reacció acoblada catalitzada per l'alcohol deshidrogenasa (ADH), en la qual l'etanol s'oxida a acetaldehid, i el NAD⁺ es consumeix per produir NADH. D'aquesta manera, la reacció acoblada també proporciona el substrat (acetaldehid) necessari per a la reacció catalitzada per la PDC, evitant utilitzar l'acetaldehid, un compost tòxic per als humans, com a substrat de partida. El fet de regenerar de manera interna el cofactor, fa que el sistema sigui molt atractiu, ja que no es requereix de reaccions addicionals o mecanismes externs de regeneració del NAD⁺/NADH. A més,

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

si l'etanol utilitzat prové de fonts renovables, com per exemple mitjançant processos biotecnològics basats en la fermentació de llevats (producció de bio-etanol), s'incrementa encara més la sostenibilitat del procés.

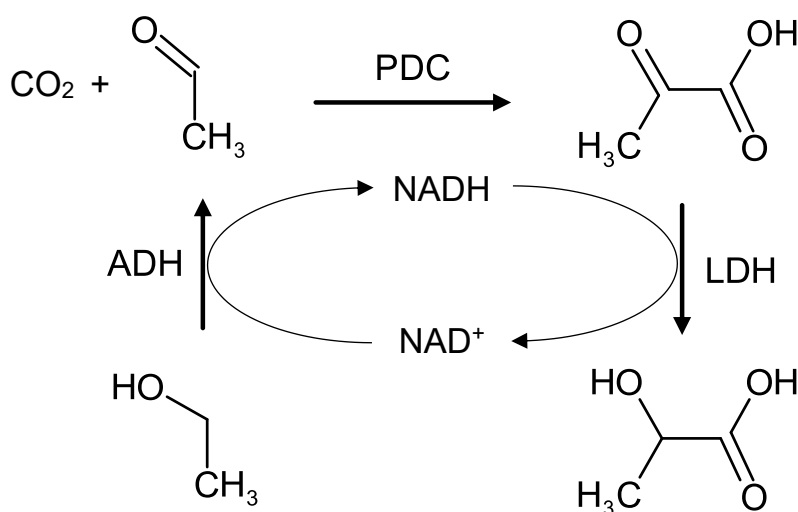


Figura 23. Esquema de reacció de la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol, a través del sistema multienzimàtic format per l'alcohol deshidrogenasa (ADH), la piruvat descarboxilasa (PDC) i la lactat deshidrogenasa (LDH).

Aquest sistema multienzimàtic va ser presentat per Tong X et al. l'any 2011⁹¹, en el qual van desenvolupar un model cinètic del sistema, el qual indica que el pas limitant del sistema és la reacció catalitzada per la PDC.

En aquest capítol de tesi s'ha fet un estudi més detallat d'aquest sistema, a més de demostrar que el sistema és capaç de produir àcid làctic fins i tot en condicions industrialment rellevants, en concret, utilitzant gasos que imiten la composició dels gasos de la indústria metal·lúrgica. Cal tenir en compte que, dels gasos disponibles per al projecte BIOCON-CO₂ (alts forns i forn de coc) comentats anteriorment, s'escull el gas de sortida dels alts forns, ja que conté una major concentració de CO₂ (24,5%) que el del forn de coc (1,68 %).

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.2. Solubilitat del CO₂

Tot i que a la bibliografia està descrita la solubilitat del CO₂ i els diferents equilibris amb les espècies de carbonat^{92,93}, primerament es determina la solubilitat del CO₂ en el tampó de reacció a diferents pHs, ja que aquestes condicions difereixen de les condicions bibliogràfiques. En aquest sentit, es mesura la concentració de CO₂ dissolt d'una solució de tampó bicarbonat 250 mM a diferents pHs, tenint en compte que el pH mínim al qual s'ha pogut ajustar el tampó és pH 7. Tal i com s'observa a la **Figura 24**, i d'acord amb el que es descriu en la literatura, a pHs més àcids la concentració de CO₂ dissolt és superior que a pHs més alcalins (22,73 mM a pH 7 respecte a 0,05 mM a pH 10), on les espècies predominants són els carbonats. Per tant, es tindrà en compte pel pH de treball de la reacció segons el resultat obtingut de la mesura de la concentració de CO₂. A pHs per sobre de 10 es considera que la concentració és 0 mM, ja que per limitació de l'instrument de mesura, no es poden mesurar concentracions inferiors a 0,05 mM.

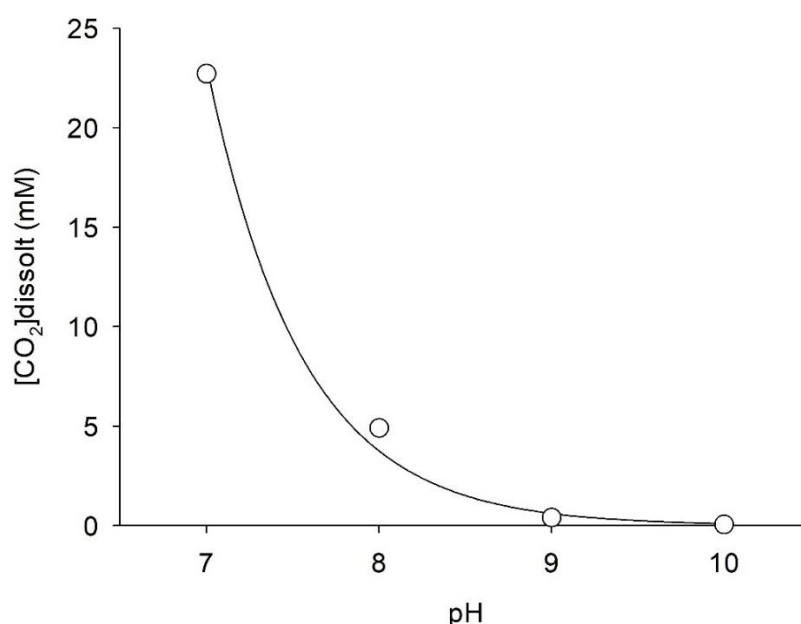


Figura 24. Perfil de concentració de CO₂ dissolt en tampó bicarbonat a diferents pHs. Condicions de mesura: Tampó bicarbonat 250 mM, 1 atm i temperatura de 25°C.

5.3. Caracterització dels enzims

Donat que la reacció es pretén dur-la a terme en *one-pot* (els tres enzims en el mateix reactor i en les mateixes condicions de reacció), és necessari determinar el rang de pH al qual es pot dur a terme l'estudi del sistema multienzimàtic. En aquest sentit, tots els enzims del sistema es van caracteritzar en termes d'activitat i estabilitat enfront el pH. En concret, es va estudiar la PDC bacteriana de *Z. palmarum* (ZpPDC) que ja es trobava disponible al grup de recerca, una ADH de *S. cerevisiae* (ScADH) i una LDH de *T. maritima* (TmLDH), ambdues escollides en el marc del projecte BIOCON-CO₂.

Per altra banda, s'estudia l'efecte del substrat (etanol) en l'activitat dels enzims. I donat que un dels objectius és dur a terme la reacció utilitzant el gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica, també es va estudiar l'efecte dels compostos, presents al gas de sortida, sobre l'activitat i estabilitat dels enzims.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.3.1. Activitat enfront el pH

El sistema multienzimàtic consta de 3 enzims diferents (ScADH, ZpPDC i TmLDH) i, per tant, amb activitats catalítiques que es poden veure afectades pel pH de manera diferent. És a dir, que cada enzim pot tenir un pH òptim, on l'activitat catalítica és màxima, diferent als altres. Per aquesta raó es va determinar el perfil de l'activitat enzimàtica de cada enzim a diferents pHs, i així poder determinar quin és el pH de compromís per als tres enzims. S'escull un rang de pH entre 7 i 10, fixant el pH mínim al qual es pot ajustar el tampó bicarbonat i el pH màxim en el qual el CO₂ dissolt observat s'aproxima a 0 mM (**Figura 24**).

El resultat d'aquest estudi es mostra a la **Figura 25**, on es pot observar que la ZpPDC i la TmLDH mostren l'activitat més alta al voltant de pH 7. Els dos enzims són cada vegada menys actius a mesura que el pH s'incrementa, fins a ser completament inactius a pH 10. En canvi, l'enzim ScADH mostra una activitat superior a mesura que el pH s'alcalinitza, arribant al seu màxim d'activitat a pH 9 i 10.

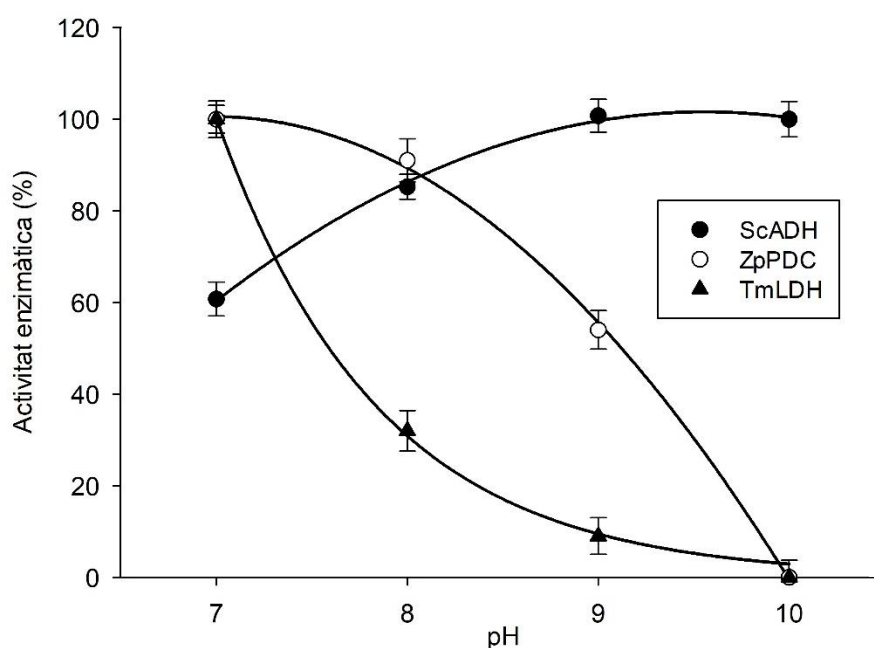


Figura 25. Perfil d'activitat enzimàtica de la ScADH, ZpPDC i TmLDH enfront el pH. L'activitat es representa com a el percentatge de la màxima activitat observada (100%). El test d'activitat (veure apartat 3.4) es realitza a diferents pHs fent servir els següents tampons: Tampó citrat 200 mM (ZpPDC), 100 mM (TmLDH) o 50 mM (ScADH) a pH 6, Tampó Tris-HCl 200 mM (ZpPDC) a pH 7 i 8, tampó fosfat 100 mM (TmLDH) o 50 mM (ScADH) a pH 7 i 8, i tampó bicarbonat 200 mM (ZpPDC), 100 mM (TmLDH) o 50 mM (ScADH) a pH 9 i 10, amb una temperatura de mesura de 25°C. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.3.2. Estabilitat enfront el pH

Un cop determinat el pH òptim de cada enzim, a continuació s'estudia la seva estabilitat enfront el pH. Aquesta caracterització ens aporta informació sobre el temps durant el qual els enzims són actius en les condicions de reacció, i per tant, ens donarà una primera aproximació sobre quin serà el pH on l'activitat es manté durant més temps. En aquest sentit, es fixa un temps de 24 hores per tal de determinar a quins pHs els enzims retenen més activitat enzimàtica.

Un cop mesurada l'activitat després de 24 hores d'incubació, es representa la seva activitat al cap de 2 hores i 24 hores com a percentatge de l'activitat inicial a la **Figura 26**. S'observa que tots els enzims mostren una activitat romanent alta (per sobre del 50%) a pH 7 i 8. En canvi, a pH 10 tots els enzims perden la seva activitat a les 24 hores d'incubació, exceptuant la *TmLDH* que manté el 100% de l'activitat catalítica, probablement degut al seu origen extremòfil⁹⁴. A pH 9, la *TmLDH* també mostra una elevada estabilitat. Respecte a la *ZpPDC* i *ScADH*, tot i que mantenen fins a un 80% de l'activitat inicial a les 2h, la *ZpPDC* ja és inactiva a les 24h i la *ScADH* mostra menys d'un 20% de l'activitat inicial.

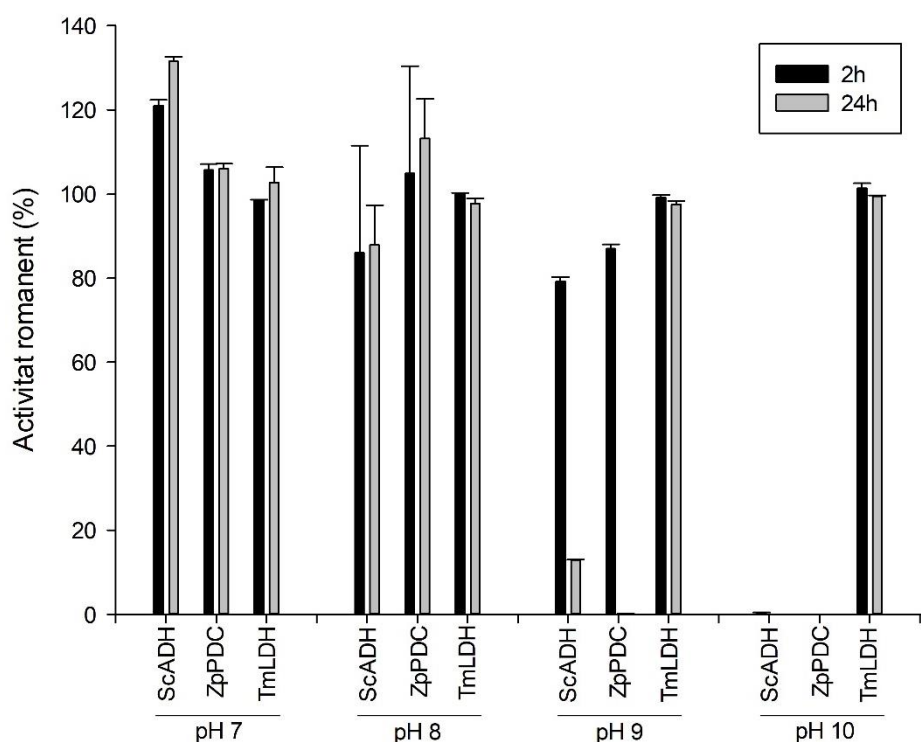


Figura 26. Estabilitat dels enzims ScADH, ZpPDC i TmLDH a diferents pHs. Es mesura l'activitat inicial com a referència, i després es mesura al cap de 2 i 24 hores d'incubació a 25°C i en tampó bicarbonat 250 mM a pH 7, 8, 9 i 10. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.3.3. Efecte de l'etanol en l'activitat de la ZpPDC i la TmLDH

L'etanol és una molècula polar, i per tant, la seva presència pot alterar les interaccions de solvatació entre la molècula d'enzim i la capa de molècules d'aigua que l'envolten. De fet, aquestes molècules d'aigua que interaccionen a la superfície de l'enzim participen en el manteniment de l'estructura terciària de la proteïna, i per tant la forma de l'enzim amb capacitat catalítica⁹⁵, i per aquest motiu se la denomina aigua estructural.

Degut a la presència d'etanol en el medi de reacció, ja que és el substrat de la ScADH, es determina si aquest substrat pot tenir una afectació en l'activitat enzimàtica dels enzims ZpPDC i TmLDH, sobretot quan es treballa a altes concentracions. En el cas de la ScADH, Dickinson FM et al. (1972)⁹⁶ van estudiar la cinètica de l'enzim en un rang de 0,01 a 1 M d'etanol, sense detectar pèrdues d'activitat dins del rang estudiat, i per tant, no es va considerar necessari provar l'efecte de l'etanol a 1 M sobre aquest enzim.

Es duu a terme l'assaig enzimàtic de la ZpPDC i la TmLDH en absència i presència d'etanol. Concretament, es va provar una concentració d'1 M en el medi d'assaig i es va comparar amb l'activitat obtinguda sense etanol, amb els resultats corresponents mostrats a la **Taula 27**. En dur a terme els assajos enzimàtics en presència o en absència d'etanol, s'observa que l'activitat mesurada en presència d'etanol és la mateixa que en absència d'aquest, fins i tot, superior en el cas de la TmLDH. Per tant, es comprova que l'etanol no té un efecte negatiu per a la ZpPDC ni la TmLDH quan la concentració d'aquest substrat de la reacció arriba fins a 1 M.

Taula 27. Activitat enzimàtica mesurada dels enzims ZpPDC i TmLDH en absència d'etanol i a una concentració d'1M en el medi d'assaig d'activitat, tal i com es descriu a l'apartat 3.7.

	1 M Etanol	0 M Etanol
ZpPDC	5,80±0,13 U · mL ⁻¹	6,07±0,08 U · mL ⁻¹
TmLDH	2,81±0,02 U · mL ⁻¹	2,05±0,15 U · mL ⁻¹

5.3.4. Efecte dels compostos presents al gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica sobre l'activitat dels enzims

Com s'ha comentat anteriorment, un dels objectiu del projecte BIOCON-CO₂ és treballar amb gasos provinents de la indústria com la metal·lúrgica. Aquests gasos contenen, a més del CO₂, altres compostos provinents del procés industrial (per exemple, per combustió del carbó necessari per la fabricació del metall). A més, una de les limitacions de la biocatàlisi industrial és la presència de compostos en el medi de reacció que poden afectar a l'activitat o estabilitat dels enzims⁹⁷⁻¹⁰⁰ i per aquest motiu, cal estudiar l'efecte d'aquells compostos que podrien presentar un efecte negatiu sobre l'activitat enzimàtica. Aquesta informació també ens indicarà si cal fer algun tipus de pretractament als gasos, per tal d'eliminar determinats components o reduir-ne la concentració.

A la **Taula 28** es mostra un llistat dels components presents en els gasos de sortida dels alts forns de l'acereria Arcelor Mittal i la concentració a estudiar en els tests d'activitat, seguint la directriu del projecte BIOCON-CO₂ de considerar el 20% de la seva solubilitat en aigua. En el cas del monòxid de carboni s'estudia bombollejant gas pur de CO en el tampó d'assaig, i

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

respecte a l'HCN es decideix reduir la concentració fins a 0,75 g · L⁻¹ degut a l'alta perillositat del gas cianur que s'allibera.

Taula 28. Components del gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica (Dades de l'acereria Arcelor Mittal).

Component	Concentració en el gas	Concentració a estudiar
Monòxid de Carboni (CO)	23,85%	1,48 g · L ⁻¹
Toluè	0,1-4 ppm	0,1 g · L ⁻¹
Etilbenzè	0,1-0,42ppm	0,04 g · L ⁻¹
Xilè	>5ppm	0,034 g · L ⁻¹
H ₂ S	6,6 ppm	0,75 g · L ⁻¹
HCN	3,32-11ppm	0,75 g · L ⁻¹
CO ₂ *	24,5%	-

*CO₂ és substrat de la reacció multi-enzimàtica.

Per aquest estudi, es determina l'activitat enzimàtica en les condicions de l'assaig de cada enzim, afegint el compost que es vol estudiar en el tampó d'assaig. Tal i com es mostra a la **Taula 29** es compara l'activitat de l'enzim en presència del compost a estudiar prenent com a referència l'activitat en absència d'ells.

Taula 29. Efecte dels compostos presents als gasos reals de la indústria metal·lúrgica sobre l'activitat enzimàtica dels enzims ScADH, ZpPDC i TmLDH. Els assajos d'activitat, realitzats a 25°C, de cada enzim es realitzen en presència i en absència de cadascun d'aquests compostos. Es treballa a les següents concentracions: [Toluè] = 0,1 g · L⁻¹, [H₂S] = 0,75 g · L⁻¹, [CO] = 1,48 g · L⁻¹, [HCN] = 0,75 g · L⁻¹*, [etilbenzè] = 0,04 g · L⁻¹, [xilè] = 0,034 g · L⁻¹.

Enzim	Activitat sense compostos (%)	Activitat amb toluè (%)	Activitat amb H ₂ S (%)	Activitat amb CO (%)	Activitat amb HCN (%)	Activitat amb etilbenzè (%)	Activitat amb Xilè (%)
ScADH	100,0±1,3	97,9±0,1	91,5±1,9	82,2±0,7	103,7±1,7	103,3±4,5	95,6±1,1
ZpPDC	100,0±1,4	97,5±0,5	0,0±0	90,5±2,7	108,0±4,0	88,8±0,1	89,1±4,9
TmLDH	100,0±1,1	96,5±2,5	0,0±0	80,2±0,4	97,3±2,3	98,8±3,9	96,6±2,1

* Per qüestions de seguretat al laboratori, es redueix la concentració a 0,75 g · L⁻¹.

Observant els resultats obtinguts es pot concloure que l'únic component del gas que presenta un efecte negatiu significatiu sobre l'activitat enzimàtica és l'H₂S ja que, en presència d'aquest compost, tant la ZpPDC com la TmLDH perden totalment la seva capacitat catalítica. Per altra banda, amb la resta de compostos l'activitat enzimàtica és molt similar en l'assaig sense compostos. Per tant, podem assegurar que si la concentració a la que s'arriba per aquests compostos és igual o inferior, no hi haurà afectació a cap dels enzims.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.3.5. Efecte dels compostos presents al gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica sobre l'estabilitat dels enzims

A més de l'activitat enzimàtica, els diferents compostos presents als gasos de sortida de la indústria metal·lúrgica també podrien tenir un efecte sobre l'estabilitat dels enzims. Per aquesta raó, també s'estudia l'estabilitat de cada enzim del sistema multienzimàtic, en absència i presència d'aquests compostos (**Taula 30**).

Taula 30. Efecte dels compostos presents als gasos reals (indústria metal·lúrgica) sobre l'estabilitat dels enzims ScADH, ZpPDC i TmLDH. Els enzims ScADH, ZpPDC i TmLDH s'incuben en absència (control) i en presència (a les concentracions indicades) dels compostos que hi han al gas reals i es determina l'evolució de l'activitat enzimàtica amb el temps. La vida mitja ($t_{1/2}$) es defineix com a el temps que triga l'enzim en perdre el 50% de la seva activitat en les condicions d'incubació (tampó fosfat 100 mM pH 7 i 25°C). Es treballa a les següents concentracions: [Toluè] = 0,1 g · L⁻¹, [H₂S] = 0,75 g · L⁻¹, [CO] = 1,48 g · L⁻¹, [HCN] = 0,75 g · L⁻¹*, [etilbenzè] = 0,04 g · L⁻¹, [xilè] = 0,034 g · L⁻¹.

Enzim	T _{1/2} control (h)	T _{1/2} Toluè (h)	T _{1/2} H ₂ S (h)	T _{1/2} CO (h)	T _{1/2} HCN (h)	T _{1/2} Etilbenzè (h)	T _{1/2} Xilè (h)
ScADH	180,0	140,0	0,3	24,0	17,0	2,0	150,0
ZpPDC	>350,0	>350,0	0,0	48,0	48,0	300,0	>350
TmLDH	180,0	120,0	140,0	35,0	48,0	180,0	70,0

* Per seguretat al laboratori, es redueix la concentració a 0,75 g · L⁻¹

Dels compostos estudiats, els que tenen un efecte en l'estabilitat són el H₂S, el CO, l'HCN, l'etil benzè i el xilè. En el cas de l'H₂S, aquest provoca una alta inestabilitat de la ScADH i la ZpPDC quan es troba a 0,75 g · L⁻¹, indicant que si s'arriba a aquesta concentració els enzims perden ràpidament la seva activitat. El segon compost amb un efecte significatiu sobre l'estabilitat és l'etilbenzè, ja que redueix la vida mitja de la ScADH de 180,0 hores a 2,0 hores, per tant, de la mateixa manera que el H₂S, també afectaria al sistema enzimàtic si s'arriba a aquesta concentració. Respecte al CO, l'HCN i el xilè, el seu efecte en l'estabilitat es menor, i per tant, no són tant crítics per al sistema en comparació amb els dos anteriors.

Per altra banda, aquest estudi també ens indica que l'H₂S no inactiva l'enzim TmLDH, ja que l'enzim s'incuba en presència de H₂S, però es detecta la mateixa activitat enzimàtica (en absència d'H₂S en el tampó d'assaig) que en el control, mentre que si el compost també es troba present en el tampó d'assaig si que s'observa una inhibició de l'activitat (**Taula 29**).

Dels estudis realitzats relacionats amb la caracterització enzimàtica es pot concloure que, és aconsellable descartar el pH 10 degut a la baixa estabilitat dels enzims ZpPDC i ScADH, i l'absència d'activitat de la TmLDH a aquest pH. Per aquest motiu, l'estudi del sistema multienzimàtic es durà a terme a pHs 7, 8 i 9. A més, dels estudis d'estabilitat i activitat enfront els compostos presents als gasos reals, el H₂S té un efecte molt significatiu tant en l'activitat com en l'estabilitat dels enzims del sistema. Mentre que el CO, l'HCN, l'etilbenzè i el xilè només tenen un efecte en l'estabilitat dels enzims. Per tant, es considera plantejar dues alternatives per a l'estudi posterior amb gasos reals en el marc del projecte BIOCON-CO₂: (i) eliminar els compostos del gas que afecten als enzims abans que entrin al medi de reacció, o

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

bé (ii) determinar la concentració real d'aquests compostos al medi líquid al treballar amb gasos reals i determinar-ne el seu efecte.

5.4. Estudi de les reaccions del sistema multienzimàtic

Després de determinar el rang de pH de treball i l'efecte dels compostos presents en els gasos dels alts forns de l'acereria Arcelor Mittal (veure apartat 5.3), es pot procedir a fer l'estudi de les reaccions implicades en el sistema multienzimàtic. Primerament, es fa un estudi individual de cada enzim en el rang de pH establert en la caracterització dels enzims. D'aquesta manera es determina quin és el millor pH per a cada reacció, i establir el pH de compromís per als tres enzims alhora. A continuació, s'estudien diferents estratègies per tal de millorar el rendiment del procés: (i) estudiar dues PDCs de microorganismes diferents, (ii) subministrant el CO₂ en forma de gas a través de bombolleig en el reactor, (iii) modificant la proporció dels enzims per a optimitzar-la i (iv) enginyeria del medi de reacció per estudiar l'efecte del tampó en la producció d'àcid làctic.

5.4.1. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim ScADH enfront el pH

La primera reacció del sistema multienzimàtic consisteix en la oxidació de l'etanol a acetaldehid a través el cofactor NAD⁺, catalitzada per la ScADH (**Figura 27**).

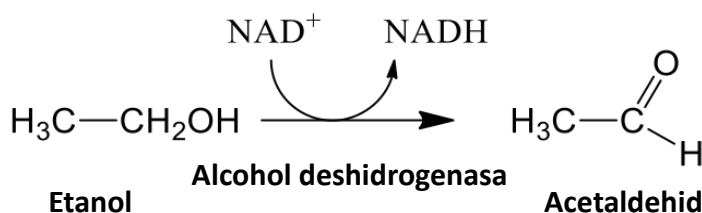


Figura 27. Esquema de reacció d'oxidació de l'etanol a acetaldehid catalitzada per la ScADH.

S'estudia aquesta reacció individualment al rang de pHs determinat anteriorment (veure apartat 5.3) per estudiar l'efecte del pH en la producció d'acetaldehid. En aquest sentit, s'estudia la síntesi d'acetaldehid duent a terme la reacció a un rang de pH entre 7 i 9, i a una temperatura de 25°C, partint d'una concentració inicial d'etanol de 50 mM i de NAD⁺ de 10 mM. A la **Figura 28**, es representa la concentració d'acetaldehid format després de 20 hores de reacció a cadascun dels pHs estudiats, juntament amb l'activitat que es mesura al llarg de les 20 hores. Es pot comprovar com aquesta reacció està fortament afectada pel pH, obtenint el màxim rendiment de reacció al pH més alcalí, on s'arriba a una concentració de només 2,45 mM d'acetaldehid (**Figura 28A**). Aquest resultat es lògic ja que tal i com prediu la termodinàmica de la reacció, aquesta està desfavorida en el sentit de formació d'acetaldehid ($\Delta G'^m = 21,7 \text{ KJ/mol}^{11}$). Tanmateix, en aquestes condicions de reacció, l'enzim és més estable a pH 7 que a pH 9 (**Figura 28B**). Concretament, la vida mitja de l'enzim és de 20h a pH 7 i només d'1h a pH 9, per tant, si la reacció s'ha de mantenir durant més temps, serà més interessant treballar a pH 7 en comptes de pH 9.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

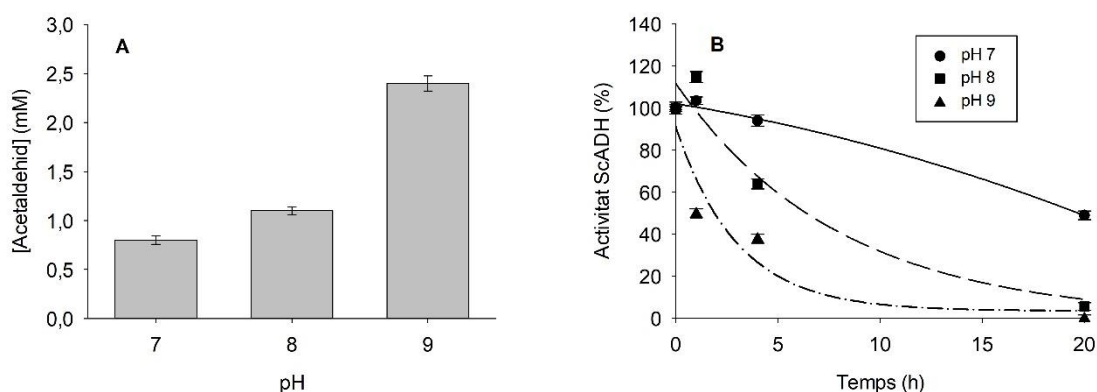


Figura 28. Formació d'acetaldehid a partir d'etanol catalitzat per la ScADH a diferents pHs després de 20h de reacció (A) i estabilitat de la ScADH, expressat en percentatge d'activitat inicial, durant la reacció a diferents pHs (B). Condicions de reacció de síntesi d'acetaldehid: Tampó bicarbonat 250 mM, etanol 50 mM, NAD⁺ 10 mM i ADH 7 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació amb un temps de reacció de 20h. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5.4.2. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim TmLDH enfront el pH

En el sistema multienzimàtic, l'enzim TmLDH catalitza la reducció de l'àcid pirúvic a àcid làctic oxidant una molècula de NADH (

Figura 29). Aquesta reacció està altament afavorida termodinàmicament ($\Delta G'^0 = -25$ KJ/mol¹⁰¹), i per tant, és la que desplaçarà l'equilibri de la cascada enzimàtica cap a la formació de producte.

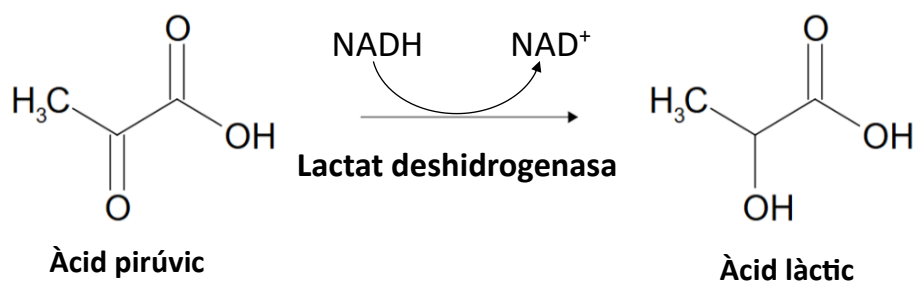


Figura 29. Esquema de reacció de la reducció de l'àcid pirúvic a àcid làctic catalitzada per l'enzim LDH.

Es caracteritza la catàlisi d'aquesta reacció duta a terme per la TmLDH a diferents pHs, juntament amb l'estabilitat en les condicions de reacció, a una temperatura de 25°C i amb una concentració inicial de piruvat de 10 mM i NADH de 20 mM. Els resultats obtinguts després de 24 hores de reacció es mostren a la **Figura 30**, on es pot observar que la concentració de làctic produït per la TmLDH es semblant als pHs estudiats (**Figura 30A**). A més, l'enzim mostra una baixa dependència enfront el pH en comparació amb la que s'observava en el cas de la ScADH (**Figura 28**). En aquest cas, el rendiment més alt s'obté a pH 7, amb un rendiment i conversió del 100%. A més, l'enzim mostra una alta estabilitat en tots els pHs, ja que manté més del 90% de l'activitat inicial després de 24 hores de reacció (**Figura 30B**). Per tant, tal i com indicava la seva termodinàmica, aquesta reacció és la que desplaçarà l'equilibri del sistema cap a la formació d'àcid làctic.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

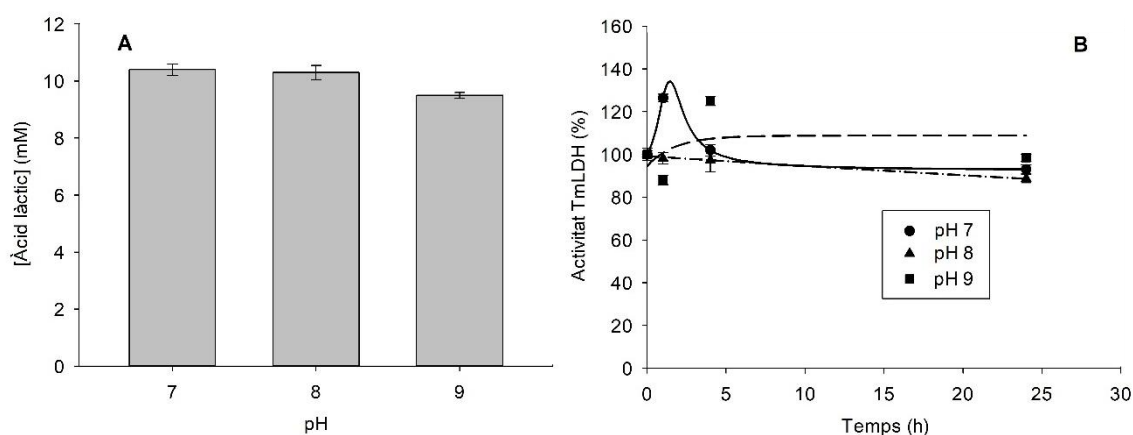


Figura 30. Formació de lactat a partir de piruvat catalitzada per la TmLDH a diferents pHs després de 24h de reacció (A) i estabilitat de la TmLDH, expressat en percentatge d'activitat inicial, durant la reacció a diferents pHs (B). Condicions de reacció: Tampó bicarbonat 250 mM, piruvat 10 mM, NADH 20 mM i LDH 20 U · mL⁻¹ a 25°C, una agitació de 500 rpm i un temps de reacció de 24 hores. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5.4.3. Caracterització de la reacció catalitzada per l'enzim ZpPDC enfront el pH

La reacció del sistema multienzimàtic consistent en la síntesi de piruvat a partir d'acetaldehid i CO₂, és catalitzada per la ZpPDC (**Figura 31**). Tal i com s'ha comentat anteriorment, s'estudia aquesta reacció individualment al rang de pHs determinat en l'apartat 5.3, per estudiar l'efecte del pH sobre el rendiment de la reacció. En aquest sentit, es duu a terme la reacció de síntesi d'àcid pirúvic en un rang de pH entre 7 i 9, i a una temperatura de 25°C, partint d'una concentració inicial d'acetaldehid de 10 mM en tampó bicarbonat com a font de CO₂.

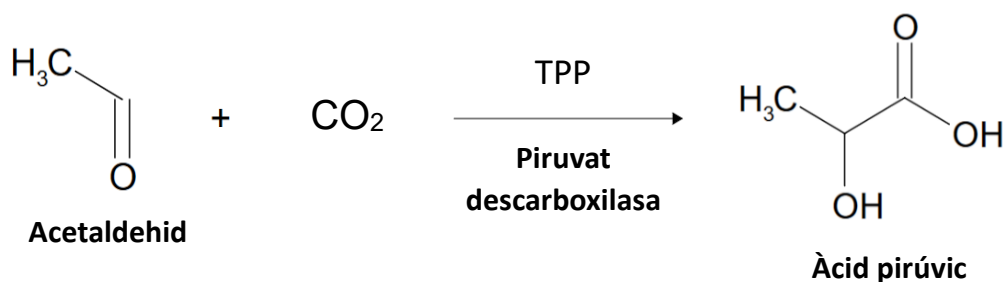


Figura 31. Esquema de reacció de carboxilació de l'acetaldehid a àcid pirúvic catalitzada per l'enzim ZpPDC.

Després d'analitzar per HPLC el medi de reacció en els diferents pHs, no es detecta la formació d'àcid pirúvic a les 24h de reacció, sinó la formació d'un altre producte, indicant que la ZpPDC catalitza una reacció secundària. Mitjançant un anàlisi per cromatografia de gasos, s'identifica que el compost és acetoïna. A la **Figura 32** es representen els resultats de la formació d'acetoïna als diferents pHs estudiats després de 24 hores de reacció, juntament amb l'estabilitat de la ZpPDC després d'1 hora i 24 hores de reacció. Tal i com indiquen aquests resultats (**Figura 32**), en el cas de la ZpPDC aquesta reacció secundària de formació de acetoïna també es pot donar quan l'acetaldehid és el substrat. Per altra banda, els resultats

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

suggereixen que la reacció de síntesi d'acetoïna està més afavorida que la síntesi d'àcid pirúvic (**Figura 32A**). El fet de no detectar la formació d'àcid pirúvic però sí l'acetoïna, en aquestes condicions de reacció, pot estar justificat perquè la reacció de carboxilació es troba desafavorida en el sentit de formació del piruvat ($\Delta G'^0 = 13,5 \text{ kJ/mol}^{101}$), mentre que la formació d'acetoïna està desplaçada cap a la formació de producte ($\Delta G'^0 = -12,6 \text{ kJ/mol}^{101}$).

Respecte a l'estabilitat de la ZpPDC en reacció (**Figura 32B**), es pot comprovar que a pH 7 i 8, l'enzim manté el 100% de l'activitat inicial després de 24 hores de reacció, en canvi, a pH 9 l'activitat romanent és inferior després d'1h (91,7%) i 24 hores (56,6%), és a dir, que l'estabilitat en reacció a pH 9 és inferior que a pH 7 i 8, d'acord amb els resultats de la caracterització descrits a l'apartat 5.3.2.

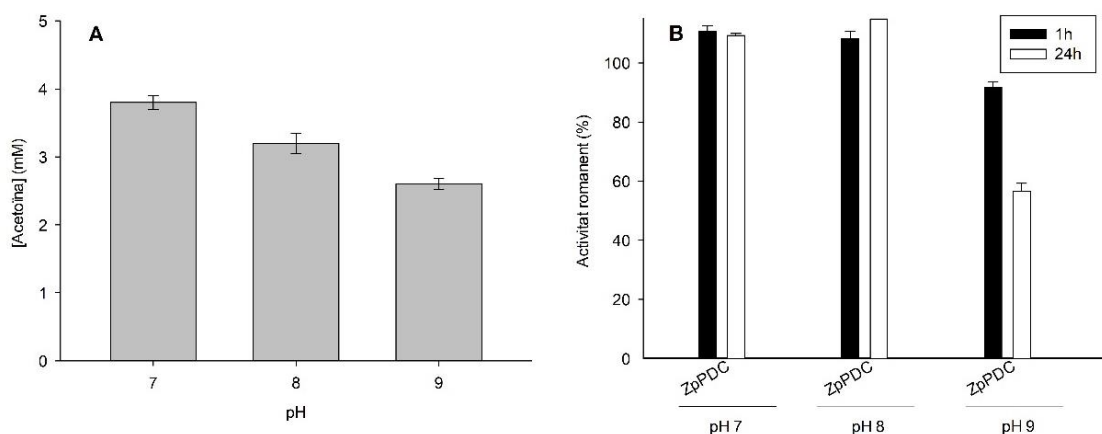


Figura 32. Formació d'acetoïna a partir d'acetaldehid per la ZpPDC a diferents pHs després de 24h de reacció (A) i estabilitat de la ZpPDC, expressat en percentatge d'activitat inicial, després de 1h i 24h de reacció a diferents pHs (B). Condicions de reacció: Tampó bicarbonat 250 mM, acetaldehid 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ZpPDC 5 U · mL⁻¹ a 25°C i agitació a 500 rpm. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Pels motius exposats anteriorment, la universitat de Groningen (RUG), participant del projecte BIOCON-CO₂, proposa estudiar una altra PDC, concretament una variant provinent de *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC), amb l'objectiu de trobar un enzim amb una afinitat superior per al CO₂.

5.4.4. Caracterització de l'enzim ScPDC i caracterització de la reacció catalitzada enfront el pH

Una vegada seleccionada la ScPDC com a possible alternativa a considerar, es va estudiar la reacció en les mateixes condicions que amb la ZpPDC. Tot i això, prèviament es caracteritza l'activitat i l'estabilitat de l'enzim enfront el pH, tal i com s'havia realitzat amb la resta d'enzims (veure apartats 5.3.1. i 5.3.2), i els resultats obtinguts d'aquesta caracterització es mostren a la **Figura 33**.

El perfil d'activitat obtingut (**Figura 33A**) mostra que l'activitat de la ScPDC màxima en el rang de pH testat es troba a pH 7. A més, tal i com passava amb la ZpPDC i TmLDH, l'activitat disminueix a mesura que augmenta el pH. Pel que fa a l'estabilitat en les condicions estudiades (**Figura 33B**), l'enzim mostra la màxima estabilitat a pH 7, amb el 100% d'activitat

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

romanent després de 24 hores, mentre que a mesura que el pH és més alcalí, l'estabilitat disminueix fins a ser completament inestable a partir de pH 9.

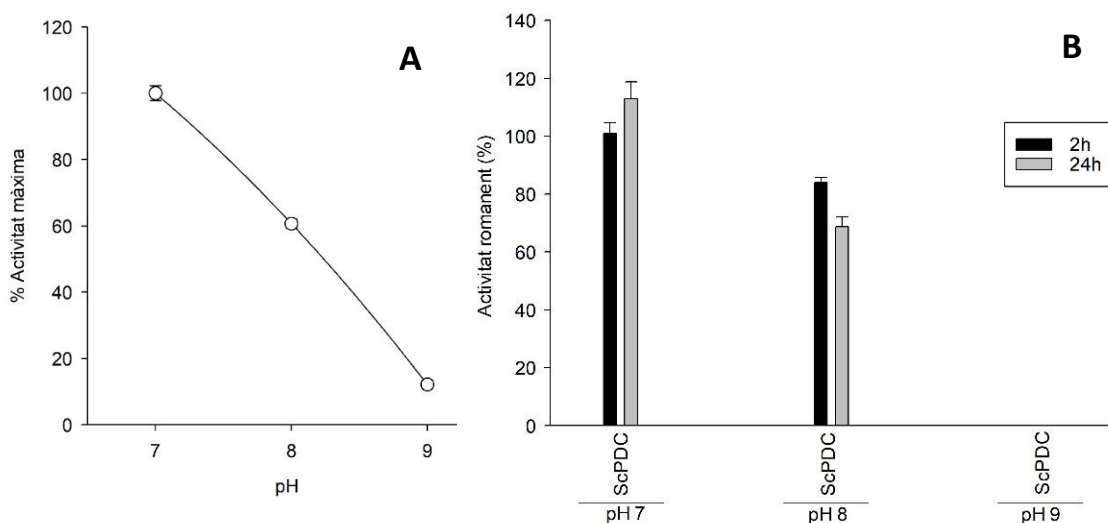


Figura 33. Perfil de l'activitat de la ScPDC enfront el pH (A) i de la seva estabilitat enfront el pH (B). Condicions d'assaig d'activitat enfront el pH: Tampó citrat 200 mM a pH 6, Tampó Tris-HCl 200 mM a pH 7 i 8, i tampó bicarbonat 200 mM a pH 9 i 10, amb una temperatura de mesura de 25°C. Condicions d'assaig d'estabilitat enfront el pH: Es mesura l'activitat inicial com a referència, i després es mesura al cap de 2 i 24 hores d'incubació a 25°C i en tampó bicarbonat 250 mM a pH 7, 8, 9 i 10. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Respecte a la caracterització de la ScPDC enfront l'etanol, s'avalua la seva activitat en presència o absència d'1M d'etanol en el medi d'assaig. El resultat d'aquest assaig, tal i com s'ha vist amb la ZpPDC i TmLDH, és que la presència de fins a 1 M d'etanol no té cap efecte negatiu en l'activitat de la ScPDC, ja que l'activitat sense etanol ($2,21 \pm 0,03 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) és la mateixa que en presència d'1M d'etanol ($2,24 \pm 0,03 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), una característica desitjada per la viabilitat del sistema multienzimàtic complet.

Pel que fa a la caracterització enfront els compostos presents en el gas de sortida dels alts forns de la indústria metal·lúrgica, on s'ha vist que hi ha compostos que afecten a l'activitat i l'estabilitat dels enzims del sistema (veure apartats 5.3.4 i 5.3.5), i tenint en compte el baix rendiment de la síntesi d'àcid pirúvic de la ZpPDC (que ja suggeria la termodinàmica de la reacció), es decideix avaluar primerament els resultats que s'obtenen en el cas de la ScPDC, abans de decidir quina de les dues alternatives proposades (veure final de l'apartat 5.3) caldrà adoptar, i per tant, si és necessari també caracteritzar l'efecte d'aquests compostos sobre la ScPDC.

Un cop caracteritzat l'enzim ScPDC, es duu a terme l'estudi de la síntesi d'àcid pirúvic en el rang de pH entre 7 i 9, a partir d'acetaldehid 10 mM i utilitzant també tampó bicarbonat com a font de CO₂. Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 34**, on veiem que amb la ScPDC també es detecta acetoïna en comptes d'àcid pirúvic en aquestes condicions. En aquest cas però, es produeix aproximadament 20 vegades menys acetoïna que la ZpPDC (comprar **Figura 32A** amb **Figura 34A**), indicant que utilitzar la ScPDC seria més favorable per la síntesi d'àcid pirúvic.

Respecte a l'estabilitat de l'enzim en reacció (**Figura 34B**), la ScPDC mostra una hiperactivació, incrementant 5 vegades la seva activitat inicial després d'1h de reacció, fet que podria

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

explicar-se per les condicions del medi de reacció, ja que la concentració del cofactor TTP en reacció (1 mM) és el doble que la del tampó de "desalting" (0,5 mM), i aquest cofactor és el que participa directament en el mecanisme de catàlisi (veure **Figura 6**). A diferència de la ZpPDC, després de 24 hores es redueix significativament la seva activitat inicial.

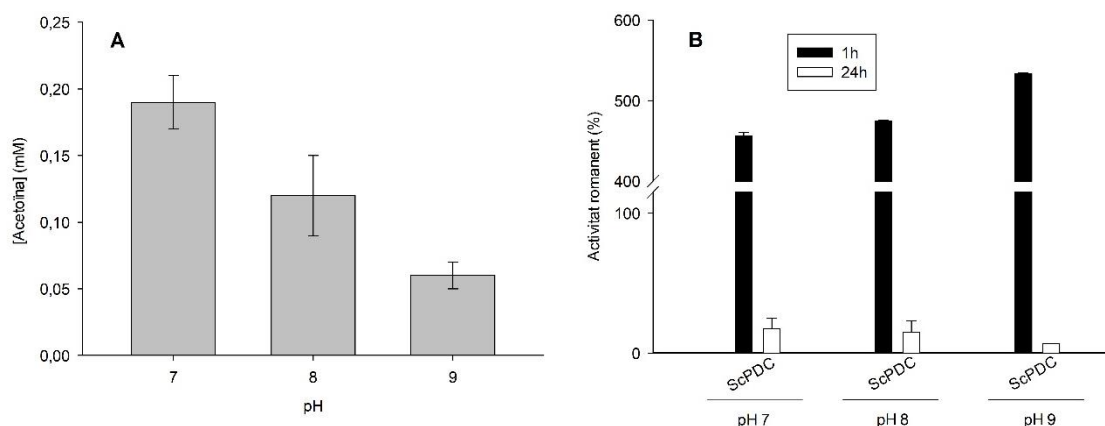


Figura 34. Formació d'acetoïna a partir d'acetaldehid catalitzada per la ScPDC a diferents pHs després de 24 hores de reacció (A), i estabilitat de la ScPDC, expressat en percentatge d'activitat inicial, després de 1h i 24h de reacció a diferents pHs (B). Condicions de reacció: Tampó bicarbonat 250 mM, acetaldehid 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ScPDC 5 U · mL⁻¹ a 25°C i agitació a 500 rpm. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Amb aquests resultats s'evidencia el baix rendiment de la reacció de carboxilació, independentment de l'enzim PDC utilitzat. Per tant, respecte a l'efecte dels compostos presents en el gas real, caldrà avaluar primer com es comporta el sistema amb els tres enzims presents (ScADH, ZpPDC o ScPDC i TmLDH), tot i que sembla apuntar que serà necessari eliminar-los del corrent de gas, ja que qualsevol efecte advers contra l'activitat i estabilitat dels enzims perjudicaria encara més la viabilitat del sistema.

5.5. Reaccions multienzimàtiques amb enzims solubles

5.5.1. Reacció PDC acoblada a la TmLDH a pressió atmosfèrica amb CO₂

Tenint en compte els resultats obtinguts en l'estudi de la reacció catalitzada per la PDC (veure apartat 5.4.3), no es pot seleccionar quin enzim (ZpPDC o ScPDC) millora la producció de piruvat, ja que no es va detectar la seva formació en cap dels dos casos. Per tant, i per tal de desplaçar l'equilibri cap a la formació del cetoàcid, es van aplicar dues estratègies de modificació de les condicions de reacció. En aquest sentit, les estratègies considerades són: i) introduir CO₂ gas pur per assolir 1 atm amb 100% de CO₂ i ii) acoblant la reacció de síntesi de piruvat catalitzada per la PDC amb la reacció de síntesi de lactat catalitzada pel enzim TmLDH, ja que aquesta última reacció es troba fortament desplaçada cap a la formació d'àcid làctic. Aplicant aquestes estratègies, s'analitza la formació d'àcid làctic per avaluar el rendiment de les dues PDCs i escollir l'enzim adient per a la seva aplicació al sistema multienzimàtic. A més, s'avalua també la formació d'acetoïna com a paràmetre a considerar en la selecció. Les reaccions es duen a terme a pH 7 per tal d'afavorir la formació d'àcid làctic per la TmLDH. Cal tenir en compte que, en afegir CO₂ per assolir un 100% de CO₂ en la

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

composició de la fase gas, s'utilitza també fosfat en comptes de bicarbonat per mantenir el pH a 7.

Primerament s'estudia, comparativament, la reacció partint d'acetaldehid i en presència de CO₂ pur, a 1 atm de pressió, catalitzada per les dues PDCs (ZpPDC o ScPDC) i la TmLDH. A la **Figura 35** es mostren les concentracions de acetoïna i àcid làctic produïts pel sistema enzimàtic acoblat entre les dues variants de PDC (ZpPDC o ScPDC) i la TmLDH. Els resultats obtinguts mostren que la ScPDC produeix significativament menys acetoïna que la ZpPDC en les mateixes condicions de reacció, indicant que la ZpPDC és més eficient que la ScPDC en la síntesi d'aquest compost. Tanmateix, no es detecta la formació d'àcid làctic en cap de les reaccions utilitzant les dues variants, fins i tot treballant en condicions de reacció que haurien d'afavorir la formació de producte (increment del substrat i acoblament d'una reacció altament desplaçada cap a producte), fet que demostra el repte que suposa revertir la reacció de descarboxilació. Amb els resultats obtinguts fins ara, tenint en compte la menor producció de subproducte i la hiperactivació detectada, la ScPDC presenta unes característiques prometedores respecte la ZpPDC.

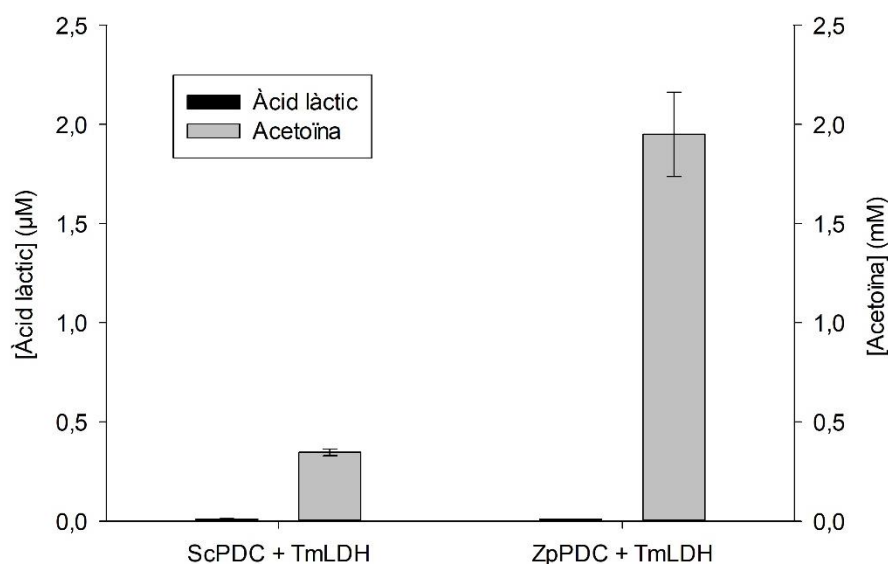


Figura 35. Concentració de lactat i acetoïna obtinguda, després de 24h de reacció, amb les dues variants de PDC acoblades a la reacció catalitzada per la TmLDH. Condicions de reacció: tampó fosfat 250 mM a pH 7, acetaldehid 5 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NADH 10 mM, 1 atm de CO₂, ZpPDC o ScPDC 10 U · mL⁻¹, TmLDH 10 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació amb un temps de reacció de 24h. PDC de *Z. palmarum* (ZpPDC) o PDC de *S. cerevisiae* (ScPDC) utilitzades independentment. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.5.2. Reacció PDC acoblada a la TmLDH a alta pressió de CO₂

Com que amb la reacció de la PDC acoblada a la TmLDH utilitzant CO₂ pur a una pressió d'1 atm no s'ha detectat la síntesi de lactat en cap dels casos, aquest fet no ha permès determinar amb quina variant de PDC obtenim més àcid làctic. Per tant, cal continuar modificant les condicions de la reacció per tal de desplaçar la reacció cap a la formació de producte. Tal i com hem vist en l'apartat 5.4.1, la reacció de síntesi de l'acetaldehid catalitzada per la ADH està fortament desplaçada cap a l'etanol. Per tant, una estratègia enfocada en incrementar la concentració de CO₂, que és l'únic substrat per a l'enzim PDC que es pot incrementar de manera independent a la reacció anterior, hauria de permetre desplaçar la reacció, acoblada a la LDH, cap a la formació d'àcid làctic.

Per tal d'estudiar l'efecte de la concentració de CO₂, es duu a terme la reacció en les mateixes condicions anteriors (veure **Figura 35**), però treballant a una lleugera sobrepressió (1,5 atm) de CO₂ pur. En aquestes condicions s'aconsegueix detectar 2 µM d'àcid làctic al cap de 24 hores de reacció. Per tant, i veient el baix increment en la concentració de producte, es decideix arribar fins a 9 atm de pressió, i comparar la formació de producte duent a terme la reacció també a 1 atm. Transcorregudes 24 hores de reacció, s'analitza la concentració d'àcid làctic en el medi, obtenint els resultats que es mostren a la **Figura 36**. En aquest cas, s'aconsegueix observar més àcid làctic a 9 atm de pressió, concretament, amb la ScPDC s'obtenen 13,16 µM, mentre que amb la ZpPDC s'obtenen 11,03 µM. Aquests resultats demostren que, per una banda, és possible la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i acetaldehid, i el fet de requerir alts nivells de CO₂ per desplaçar la reacció cap a la formació de producte, és una clara indicació que la reacció està molt desafavorida, tal i com suggeria la termodinàmica de la reacció. Per altra banda, tant amb la ZpPDC com amb la ScPDC s'obtenen quantitats similars d'àcid làctic, i per tant, també cal avaluar la formació d'acetoïna en aquestes condicions, per poder escollir quin dels dos enzims és el candidat final a ser aplicat en el sistema multienzimàtic complet.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

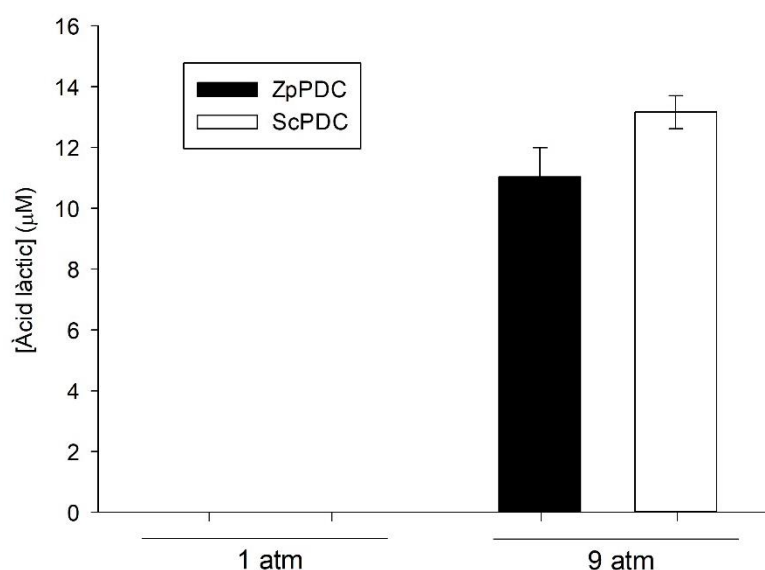


Figura 36. Concentració d'àcid làctic a diferents pressions de CO₂ en la reacció catalitzada per la PDC, acoblada a la TmLDH, després de 24h de reacció. Condicions de reacció: Tampó fosfat 250 mM a pH 7, acetaldehid 5 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NADH 10 mM, PDC 10 U · mL⁻¹, LDH 10 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació amb un temps de reacció de 24h. ZpPDC (Piruvat descarboxilasa de *Z. Palmae*); ScPDC (Piruvat descarboxilasa de *S. cerevisiae*). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

En avaluar la formació de subproducte, s'obtenen els resultats representats a la **Figura 37**, on la ScPDC clarament produeix menys acetoïna que la ZpPDC en les mateixes condicions de reacció. Tenint en compte que s'afegeix la mateixa quantitat d'activitat d'ambdós enzims, aquesta diferència es podria explicar per la K_M enfront l'acetaldehid, la qual segurament és més petita en el cas de la ZpPDC que en el cas de la ScPDC. Per tant, a partir d'aquests resultats, se selecciona la ScPDC com a enzim candidat per a desenvolupar el sistema multienzimàtic complet.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

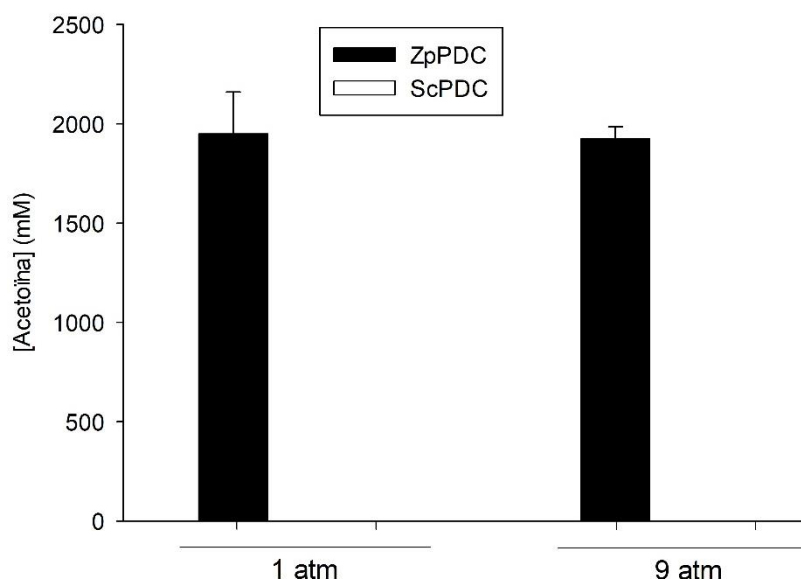


Figura 37. Concentració d'acetoïna a diferents pressions de CO₂ en la reacció catalitzada per la PDC, acoblada a la LDH, després de 24h de reacció. Condicions de reacció: Tampó fosfat 250 mM a pH 7, acetaldehid 5 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NADH 10 mM, PDC 10 U · mL⁻¹, LDH 10 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació. El temps de reacció es de 24h. ZpPDC (Piruvat descarboxilasa de *Z. palmarum*); ScPDC (Piruvat descarboxilasa de *S. cerevisiae*). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5.5.3. Estudi del sistema multienzimàtic complet

Després d'aconseguir amb èxit unes condicions en les quals es detecta la formació d'àcid làctic, i seleccionant la ScPDC per al sistema complet, el següent pas és completar el sistema multienzimàtic afegint l'enzim ScADH, que s'encarrega de proporcionar el substrat (acetaldehid) a la ScPDC i regenerar el cofactor per a la TmLDH.

Primerament, en vista de la importància del CO₂ en el medi, s'estudia la reacció afegint anhidrasa carbònica i avaluant-la juntament amb l'efecte de la pressió de CO₂ en el reactor. A continuació, s'optimitza les quantitats dels enzims en reacció i les seves proporcions amb l'objectiu de millorar el rendiment del procés, juntament amb l'enginyeria del medi de reacció.

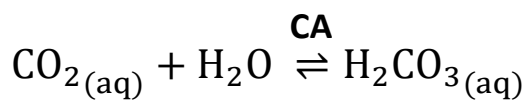


Figura 38. Esquema de reacció d'hidratació del CO₂ dissolt en medi líquid catalitzada per l'anhidrasa carbònica (CA).

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.5.3.1. Reacció de síntesi amb anhidrasa carbònica

Els resultats obtinguts de la síntesi de lactat a partir d'acetaldehid (veure apartat 5.5.2), indiquen que la concentració de CO₂ en el medi de reacció és un factor clau per afavorir la reacció de formació de piruvat, que es troba fortament desplaçada cap al substrat, resultant en el pas limitant del sistema. I per tant, augmentant la quantitat de CO₂ a través de l'increment en la pressió del gas en el reactor, s'aconsegueix detectar la formació d'àcid làctic.

Per tal de veure aquest efecte de la concentració de CO₂ en el sistema multienzimàtic complet, es duu a terme la reacció utilitzant els tres enzims a 1 atm de CO₂ pur i afegint l'enzim anhidrasa carbònica per incrementar la velocitat de solubilització del CO₂ (**Figura 39**). Addicionalment, s'incrementa la quantitat d'enzims de 10 U · mL⁻¹ a 100 U · mL⁻¹ de ScADH, 50 U · mL⁻¹ de ScPDC i 20 U · mL⁻¹ de TmLDH, per tal d'afavorir la síntesi de làctic, especialment de les dues primeres reaccions que són les que es troben desfavorides. En aquestes condicions, el resultats obtinguts es mostren a la **Figura 39**, on no s'observa la formació d'àcid làctic. Per tant, tot i incrementar la velocitat de solubilització del CO₂ i la de cadascuna de les reaccions, no són factors suficients per observar la formació d'àcid làctic en aquestes condicions. A més, en comparació amb les reaccions de l'apartat 5.5.2, on en el medi hi ha present 5 mM d'acetaldehid, la concentració en aquest cas és inferior i arriba a 1,4 mM a les 96h de reacció, limitant encara més el pas de carboxilació.

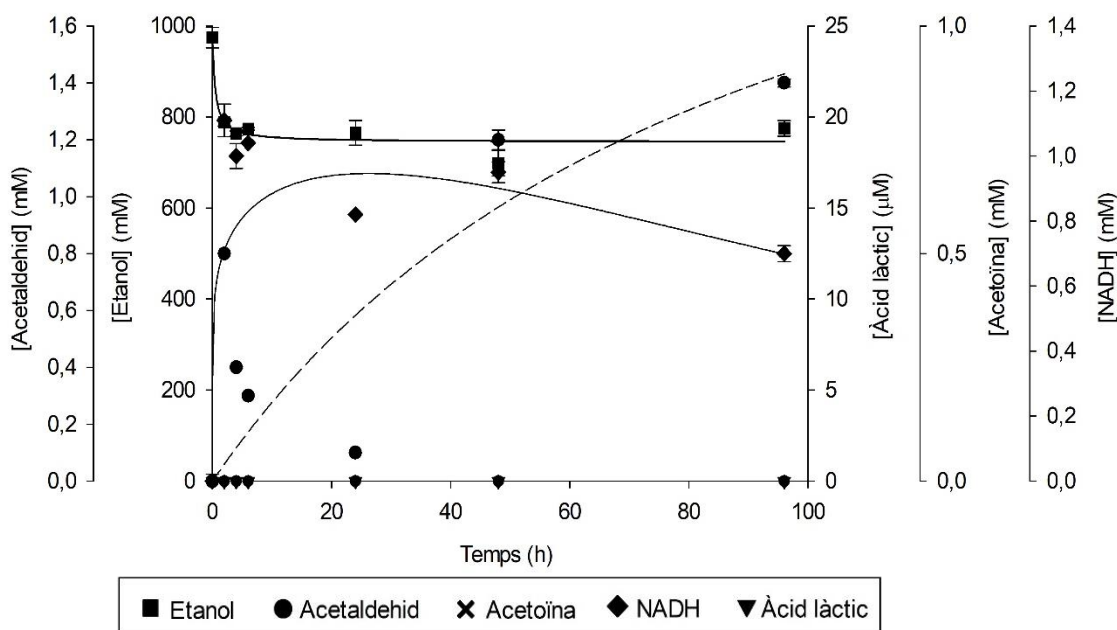


Figura 39. Curs de la reacció del sistema multienzimàtic en presència d'anhidrasa carbònica (CA) a 1 atm de CO₂. Condicions de reacció: tampó fosfat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ScADH 100 U · mL⁻¹, ScPDC 50 U · mL⁻¹, TmLDH 20 U · mL⁻¹, CA 250 mg · L⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i 1 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

En vista dels resultats obtinguts, es considera aplicar dues estratègies per tal d'afavorir i accelerar la síntesi d'àcid pirúvic: (i) incrementar la quantitat de CO₂ en la reacció treballant a alta pressió o (ii) incrementar la quantitat de ScPDC en la reacció.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

Per començar, s'aplica la primera estratègia (incrementar la pressió de CO₂) a les condicions de reacció anteriors (veure **Figura 39**), obtenint el curs de reacció que es mostra a la **Figura 40**. En aquest cas, es pot comprovar que l'efecte d'incrementar la pressió de CO₂ afavoreix la síntesi d'àcid làctic, ja que a 1 atm no es pot detectar la seva presència (**Figura 39**), mentre que a 9 atm s'arriba a una concentració de 9,0 µM a les 24 hores de reacció (**Figura 40**). Tanmateix, afegir més CO₂ implica un increment en la formació d'àcid carbònic (**Figura 38**), i per tant una baixada en el pH causada per la desprotonació de l'àcid carbònic, fet que afecta sobretot a la ScADH (**Figura 25**).

De fet, al final de la reacció, el pH mesurat és 6 en aquestes condicions de reacció. Això explicaria perquè la concentració d'àcid làctic obtinguda és inferior a la observada en la reacció de PDC acoblada a la TmLDH (**Figura 36**).

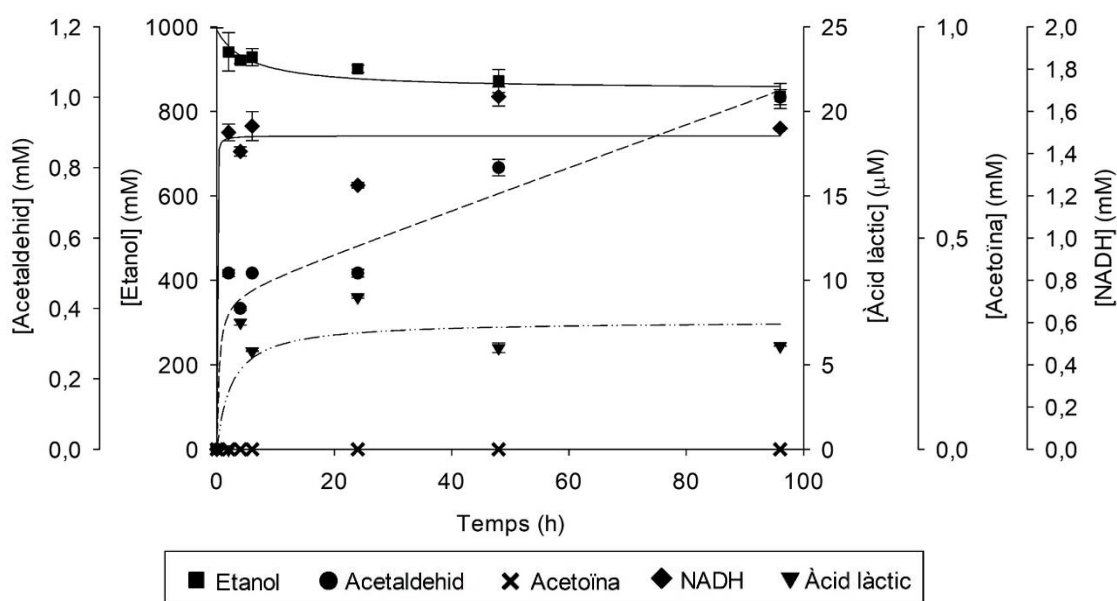


Figura 40. Curs de reacció del sistema multienzimàtic (ScADH, ScPDC i TmLDH) en presència d'anhidrasa carbònica (CA) a 9 atm de pressió de CO₂. Condicions de reacció: tampó citra t 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 100 U · mL⁻¹, PDC 50 U · mL⁻¹, LDH 20 U · mL⁻¹, CA 250 m g · L⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i 9 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Tot seguit, es duu a terme la reacció aplicant la segona estratègia, mantenint la pressió de CO₂ a 1 atm i la presència d'anhidrasa carbònica, incrementant la concentració de ScPDC fins a 150 U · mL⁻¹, i mantenint la resta de condicions de reacció iguals que les utilitzades per a la reacció anterior (veure **Figura 39**). Després d'analitzar el medi de reacció al llarg del temps, s'obté el curs de reacció que es mostra a la **Figura 40**. Tal i com es pot observar, s'obtenen fins a 69 µM de làctic a les 96 hores de reacció, valor 7,6 vegades superior a la concentració obtinguda amb 50 U · mL⁻¹ i 9 atm de CO₂ (veure **Figura 40**), i més de 5 vegades superior que en la reacció a partir de 5 mM d'acetaldehid i 9 atm de pressió (veure **Figura 36**). Aquests resultats suggereixen que no només la quantitat de CO₂ en el medi, sinó també la quantitat de ScPDC en el sistema multienzimàtic, són factors clau en la producció d'àcid làctic.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

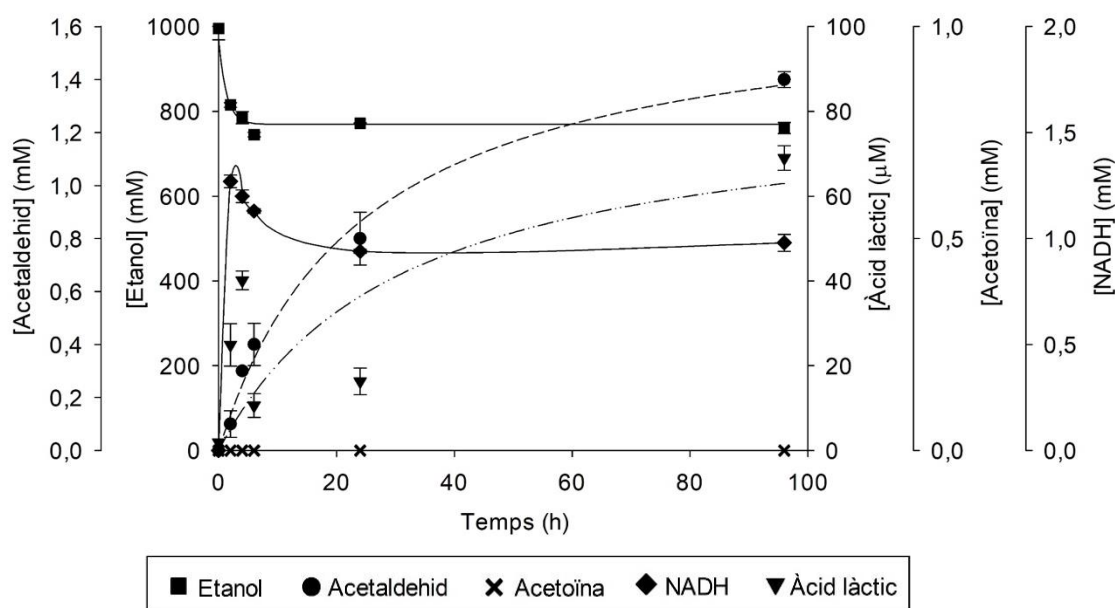


Figura 41. Curs de reacció del sistema multienzimàtic (ADH, PDC i LDH) en presència d'anhidrasa carbònica (CA) a 1 atm de CO₂ i 150 U · mL⁻¹ de ScPDC. Condicions de reacció: tampó fosfat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 100 U/mL, PDC 150 U/mL, LDH 20 U/mL, CA 250 mg · L⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

En conjunt, amb els resultats obtinguts en aquest apartat, no s'aprecia una millora significativa per l'addició d'anhidrasa carbònica. D'una banda podem observar que en la reacció a 9 atm en presència de CA (anhidrasa carbònica) es formen 9,0 μM d'àcid làctic (Figura 40), mentre que a 9 atm i en absència de CA es formen 13,2 μM d'àcid làctic (Figura 36). A més, quan la pressió és inferior (1 atm) i s'incrementa l'activitat de la ScPDC en presència de CA es formen 69 μM d'àcid làctic (Figura 41). Si l'enzim CA afavoreix la solubilització del CO₂, la reacció de síntesi s'hauria de veure afavorida respecte a la reacció en absència de CA. Però el que observem és el contrari, i això pot explicar-se pel fet que el substrat de la reacció és el CO₂ i no les espècies carbonat que es formen com a resultat de la catàlisi de l'enzim CA. Per aquest motiu, observem una major concentració d'àcid làctic quan augmenta la ScPDC (tot i treballar a una pressió inferior), confirmant la limitació per la velocitat de reacció de carboxilació. Per tant, si el fet d'afegir CA no millora el rendiment de la reacció, però si el d'afegir més ScPDC, no afegir CA a la reacció suposaria un estalvi en el cost del biocatalitzador i menor complexitat del sistema.

5.5.3.2. Optimització de la concentració i proporció d'enzims

En vista de l'efecte observat en incrementar la quantitat de ScPDC en el medi de reacció, es duu a terme la optimització, mitjançant l'estudi de les proporcions dels enzims que participen en la cascada enzimàtica, ja que en la literatura s'ha reportat com a un factor clau en el rendiment global dels sistemes multienzimàtics^{18,54,102-105}.

S'estudia la proporció ScADH:ScPDC i la proporció TmLDH:ScPDC. Respecte a la quantitat de ScPDC, en els experiments anteriors es detecta la formació d'àcid làctic quan la ScPDC es troba a 150 U · mL⁻¹ (veure apartat 5.5.3.1), per tant, es decideix fixar la quantitat de ScPDC i ajustar les proporcions d'ADH i LDH respecte a la PDC en un rang d'entre 0,5 i 2 (0,5U · mL⁻¹ o 2U ·

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

mL⁻¹ d'ADH o LDH per cada 1U · mL⁻¹ de PDC afegida). La resta de condicions de reacció es fixen per tal que siguin iguals en cada experiment.

Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 31**, on s'observa que les proporcions d'enzims afecten fortament la concentració d'àcid làctic. El valor més baix (10,87 µM) s'obté quan tant l'activitat de la ScADH com de la TmLDH són iguals a la de ScPDC (1:1 per ScADH:ScPDC i 1:1 per TmLDH:ScPDC). En canvi, el millor resultat s'obté quan l'activitat de la ScADH és inferior que la de ScPDC (0,5:1 per ScADH:ScPDC) i l'activitat de la TmLDH és superior que la de ScPDC (1,25:1 per TmLDH:ScPDC), assolint una concentració de 29,29 µM d'àcid làctic. Tenint en compte aquestes proporcions dels enzims ScADH i TmLDH respecte la ScPDC, els resultats suggereixen que hi ha dos esdeveniments que s'han de produir simultàniament per tal d'incrementar la concentració d'àcid làctic: (i) la reacció catalitzada per la ScPDC ha d'estar afavorida respecte a la de formació d'acetaldehid, mentre la reacció de síntesi d'àcid làctic ha de ser suficientment alta per desplaçar la reacció multienzimàtica cap a la formació de producte.

Taula 31. Formació d'àcid làctic a partir d'etanol i CO₂ catalitzada pel sistema multienzimàtic format per ScADH, ScPDC i TmLDH a diferents proporcions d'enzims ScADH:ScPDC i TmLDH:ScPDC. Condições de reacció: Tampó fosfat 250 mM pH 7, Etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ScPDC 150 U · mL⁻¹ a 25°C, 500 rpm d'agitació i 1 atm de CO₂ amb un temps de reacció de 24 hores.

ScADH:ScPDC	TmLDH:ScPDC	[àcid làctic] (µM)
0,50:1,00	1,25:1,00	29,29±0,30
1,25:1,00	0,50:1,00	15,54±0,83
1,00:1,00	1,00:1,00	10,87±1,19

Per tant, la màxima concentració d'àcid làctic s'obté quan en el medi de reacció tenim **150 U · mL⁻¹ de ScPDC, amb unes proporcions d'enzims de 0,5:1 ScADH:ScPDC i 1,25:1 TmLDH:ScPDC.**

5.5.3.3. Enginyeria del medi de reacció

Un cop determinades les quantitats òptimes dels enzims en tampó fosfat, es planteja dur a terme la reacció en altres tampons per tal de comprovar si hi ha una millora en la producció d'àcid làctic. En aquest sentit, s'estudia la reacció en els següents tampons: Tris-HCl, citrat i MOPS (àcid 3-morfolinopropà-1-sulfònic), utilitzant les proporcions d'enzims amb les quals s'obté la major concentració d'àcid làctic en tampó fosfat, 0,5 ScADH/ScPDC, 1,25 TmLDH/ScPDC i 150 U · mL⁻¹ de ScPDC.

El primer tampó que s'estudia és el Tris-HCl, amb el qual es duu a terme la reacció en les condicions de l'òptim (Tris-HCl 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació i 1 atm de CO₂). S'inicia la reacció i se segueix durant les primeres 24 hores de reacció, però no es detecta la formació d'àcid làctic, i per tant, es descarta utilitzar aquest tampó en aquest sistema multienzimàtic.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

A continuació, s'estudia la reacció utilitzant el tampó citrat duent-la a terme en les condicions de l'òptim en aquest tampó (Citrat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació i 1 atm de CO₂). Un cop iniciada la reacció, com en el cas anterior, se segueix la reacció durant les primeres 24 hores, i els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 42**. Per una banda, s'observa una reducció important en la concentració d'etanol de 1049,67 mM a 684,23 mM que no es correspon amb la formació de 0,88 mM d'acetaldehid, i per tant, s'atribueix a una evaporació degut al bombolleig de CO₂ en iniciar la reacció. Per altra banda, s'arriba a una concentració de 24,2 µM al cap de 24 hores, la qual és molt similar a la màxima obtinguda amb fosfats (29,29 µM). Tanmateix, s'observa que el perfil de l'àcid làctic no s'estabilitza a les 24 hores, indicant que pot seguir augmentant la concentració si s'allarga el temps de reacció.

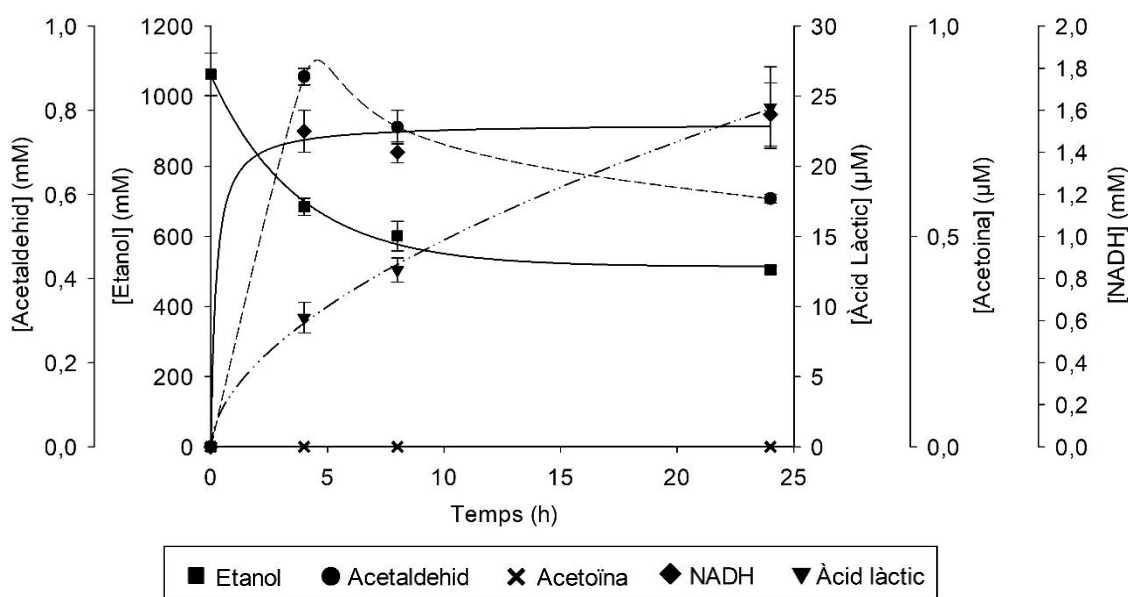


Figura 42. Curs de la reacció multienzimàtica en l'òptim en tampó citrat. Condicions de reacció: tampó citrat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Amb l'objectiu de veure fins a quina concentració d'àcid làctic s'arriba en tampó citrat amb aquestes condicions de reacció, es repeteix la reacció però seguint-la fins a observar que s'estabilitza la concentració d'àcid làctic. Amb les condicions esmentades anteriorment (tampó citrat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur) se segueix la reacció, obtenint el curs de reacció que es mostra a la **Figura 43**. Es pot observar que la concentració d'àcid làctic segueix una forma sigmoidal, que es podria explicar per l'increment de la concentració d'acetaldehid des de 2,36 mM a les 24 hores fins a 3,95 mM a les 96 hores, on l'àcid làctic mostra un segon augment degut a l'increment del substrat disponible per a la ScPDC. Al cap de 96 hores de reacció, la concentració d'àcid làctic arriba a 49,24 µM, 2 vegades superior a l'obtinguda en l'experiment a 24 hores i 1,7 vegades a l'obtinguda en tampó fosfat. Per altra banda, s'observa la formació d'un pic en la concentració de NADH a les 24 hores (2,58 mM), i després disminueix progressivament, indicant que el cofactor es consumeix més ràpid del que es produeix. Tanmateix, el NADH consumit no es correspon amb l'àcid làctic produït, i per tant, aquesta

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

disminució és més probable que sigui deguda a una inestabilitat d'aquest compost en aquestes condicions de reacció.

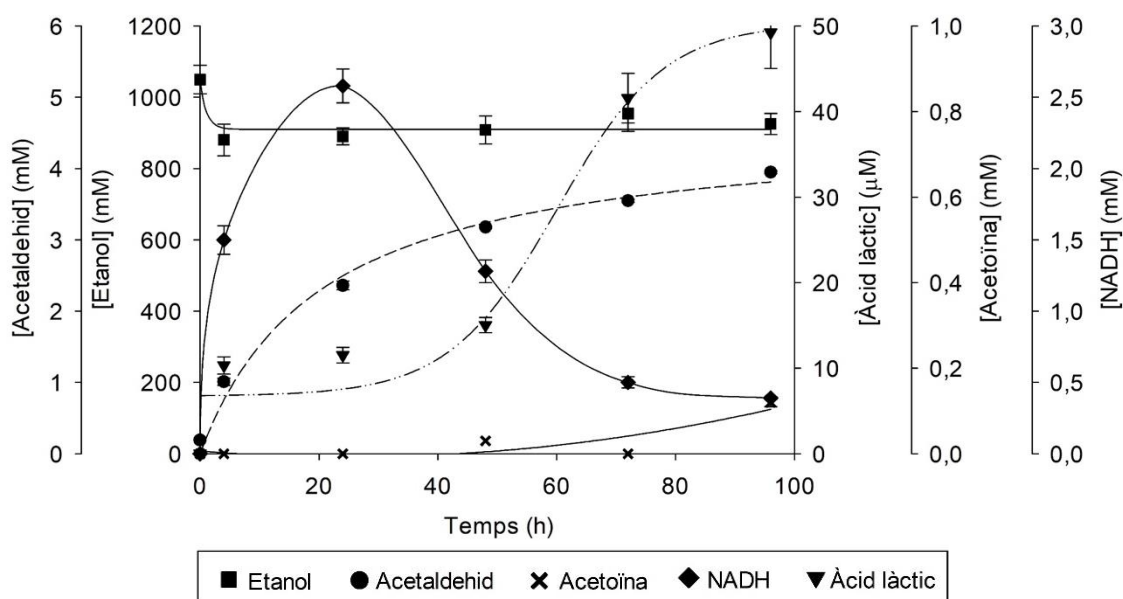


Figura 43. Curs de la reacció multienzimàtica en condicions de l'òptim en tampó citrat. Condicions de reacció: tampó citrat 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Seguint els experiments anteriors, s'estudia també l'efecte del tampó MOPS en la reacció. En aquest sentit, es duu a terme en les mateixes condicions però utilitzant el tampó MOPS (tampó MOPS 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur). El resultat obtingut es mostra a la **Figura 44**, observant que el curs de reacció obtingut és similar comparat amb el que s'obté en tampó citrat. Tanmateix, la concentració d'àcid làctic és més alta, arribant a 250 μM al final de la reacció, superant en 5 i 8,5 vegades la concentració obtinguda utilitzant citrat o fosfat, respectivament. Tenint en compte que el pKa del MOPS és de 7,2¹⁰⁶, la reacció es tampona millor a pH 7 (resultant en un pH final de reacció de 6,6) i tal com es mostrava en experiments anteriors, tant la ScPDC com la TmLDH són més actives al voltant de pH 6 i 7. Com que el pH amb MOPS es manté dins d'aquest rang, ambdós enzims tenen més activitat i estabilitat, fet que podria explicar la major producció d'àcid làctic.

L'increment en la concentració d'àcid làctic utilitzant els tampons citrat i MOPS, en comparació amb els resultats obtinguts en tampó fosfat, es poden explicar degut al menor rendiment catalític de la ScPDC, ja que ha estat reportat prèviament que l'enzim presenta una inhibició competitiva pels fosfats, amb una constant d'inhibició K_{IP} de 14,7 mM¹⁰⁷.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

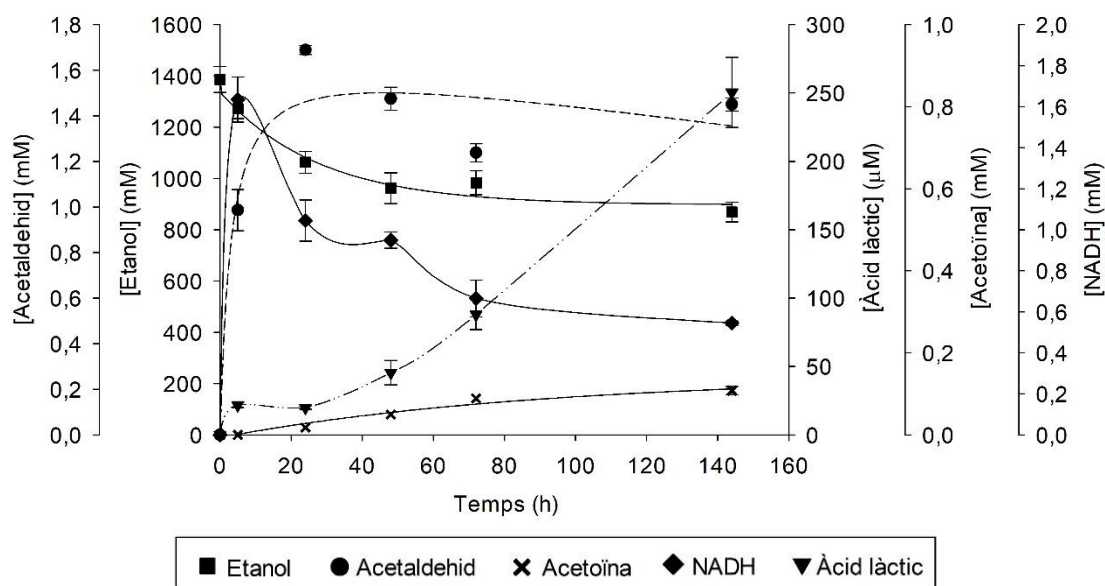


Figura 44. Curs de la reacció multienzimàtica en condicions de l'òptim en tampó MOPS. Condicions de reacció: tampó MOPS 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm de CO₂ pur. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

En treballs anteriors, on es descriu aquest sistema multienzimàtic per primera vegada, es reporta una concentració d'àcid làctic de 87 μM com al valor màxim obtingut⁹¹. Per tant, aquest treball de tesi doctoral representa un pas endavant en el desenvolupament d'aquest sistema multienzimàtic, obtenint la concentració d'àcid làctic més alta fins a dia d'avui utilitzant aquest sistema.

5.6. Reacció utilitzant una mescla sintètica de gasos imitant el gas de sortida de la indústria metal·lúrgica

Després de definir les condicions de reacció en les quals s'obté la quantitat més elevada d'àcid làctic, un pas molt rellevant és posar a prova el sistema en unes condicions industrialment significatives.

En aquest sentit, i tal com s'ha comentat durant la introducció d'aquest capítol, s'utilitza la composició de les emissions de gasos dels alts forns de l'empresa Arcelor Mittal, participant del projecte BIOCON-CO₂, pel seu alt contingut en CO₂, i que conté: 24,5% CO₂, 46,6% N₂, 23,9% CO, 1,2% O₂, 3,8% H₂. Pel que fa a la resta de condicions de reacció, es mantenen les obtingudes de la optimització de la reacció (tampó MOPS 250 mM pH 7, Etanol 1M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació).

Un cop duta a terme la reacció, el curs de reacció obtingut es mostra a la **Figura 45**, on podem observar que la reacció es divideix en dues fases. En la primera fase, l'enzim ScADH consumeix etanol i NAD⁺ per produir acetaldehid i NADH, i aquest acetaldehid es va acumulant durant les primeres hores de reacció (72h). En la segona fase, l'enzim ScPDC comença a consumir acetaldehid per generar piruvat, que es consumit per l'enzim TmLDH generant el producte final, l'àcid làctic, que arriba a una concentració de 62 μM. Es pot observar que durant aquesta segona fase, el subproducte generat per la ScPDC es comença a acumular. Aquesta menor concentració

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

d'àcid làctic i la producció d'acetoïna pot ser causada per la menor concentració de CO₂ en el medi. Després que una molècula d'acetaldehid s'uneix al TPP dins del centre actiu de la PDC, el CO₂ i una segona molècula d'acetaldehid competeixen per produir àcid pirúvic o acetoïna, respectivament. Per tant, aquest sistema multienzimàtic mostra que es necessiten quantitats més elevades de CO₂ per afavorir la reacció de carboxilació per sobre de la reacció de carbolligació. A més, la concentració de NADH disminueix abans que es produeixi l'àcid làctic, afectant negativament a l'últim enzim de la cascada, ja que requereix d'aquest cofactor per reduir l'àcid pirúvic a àcid làctic. Tanmateix, malgrat treballar en unes condicions simulant la composició del gas de la indústria metal·lúrgica que són desfavorables, el sistema segueix sent capaç de produir àcid làctic.

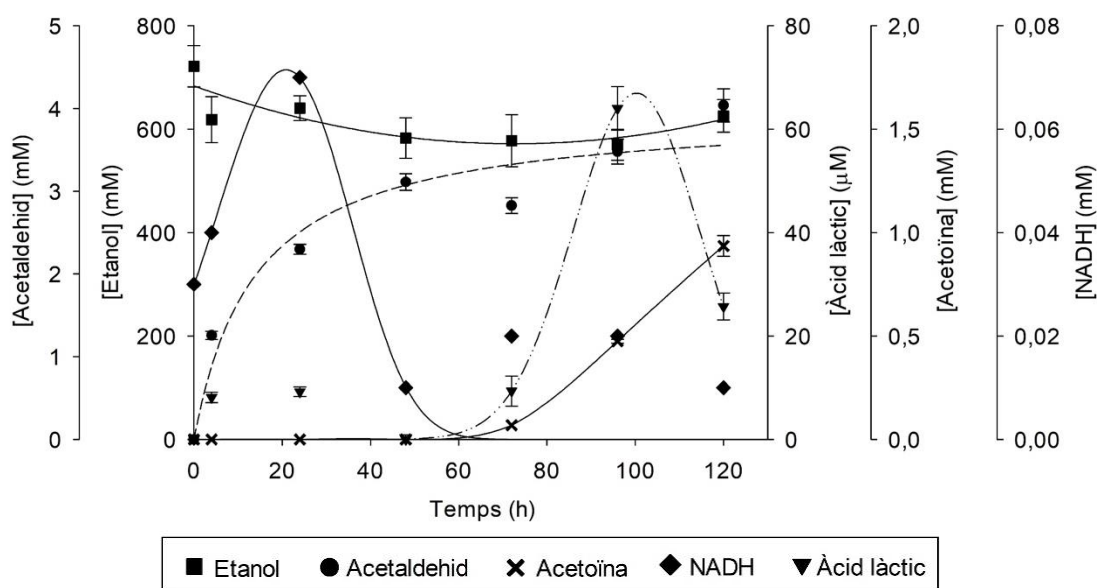


Figura 45. Curs de la reacció multienzimàtica amb gas sintètic en tampó MOPS. Condicions de reacció: tampó MOPS 250 mM pH 7, Etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a una temperatura de 25°C, 500 rpm d'agitació i a 1 atm d'una mescla sintètica de gas (1,2% O₂, 3,8% H₂, 23,9% CO, 24,5% CO₂, 46,6% N₂). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5.7. Reacció amb enzims immobilitzats

Finalment, es planteja dur a terme la reacció amb enzims immobilitzats, ja que en les reaccions amb enzims solubles, un cop finalitza la reacció, no és possible recuperar els enzims per iniciar un altre cicle de reacció. Gràcies a la immobilització, la recuperació dels enzims en finalitzar la reacció es pot dur a terme amb un pas de filtració. Per altra banda, la injecció de CO₂ en el medi de reacció implica la formació d'interfases entre les fases gas i líquid, les quals promouen el desplegament de les proteïnes, i per tant, resulten en la inactivació dels enzims. La immobilització en l'interior de suports sòlids fa que els enzims ja no estiguin exposats a aquestes interfases, millorant la seva estabilitat en aquest sentit.

Així doncs, primerament s'estudia la immobilització en diferents suports, avaluant el rendiment de la immobilització i l'activitat retinguda. D'aquesta manera, s'escull el suport amb el que s'obtenen els millors paràmetres d'immobilització. A continuació, es realitza la reacció en les millors condicions trobades amb els derivats immobilitzats a màxima càrrega.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.7.1. Immobilització dels enzims en diferents suports

Prèviament a la reacció, es realitza un estudi de la immobilització dels enzims en diferents suports amb matrius i grups funcionals diferents, amb l'objectiu de millorar la seva estabilitat i permetre la seva reutilització. Es van escollir matrius basades en agarosa i basades en metacrilat, tal i com es detalla a la **Taula 32**.

Taula 32. Característiques dels suports utilitzats per a la immobilització de la ScADH, ScPDC i TmLDH.

Suport	Tipus de matriu	Grup funcional	Tipus d'immobilització
Epoxi-metacrilat	Metacrilat (Hidrofòbica)	Epoxi	Enllaç covalent amb grups -NH ₂ principalment
Amino-metacrilat	Metacrilat (Hidrofòbica)	Amino	Enllaç covalent amb grups -COOH
Epoxi-agarosa	Agarosa (Hidrofílica)	Epoxi	Enllaç covalent amb grups -NH ₂ principalment
MANA-agarosa	Agarosa (Hidrofílica)	Amino	Enllaç covalent amb grups -COOH
Ni ²⁺ -IDA-agarosa	Agarosa (Hidrofílica)	Ni ²⁺ -IDA	Afinetat per cua d'histidines

Per una banda, la immobilització en suports amb grups amino es produeix en dues etapes, primerament l'enzim s'adsorbeix al suport per una interacció iònica, i a continuació es forma l'enllaç covalent entre els grups amino del suport amb els grups carboxil de l'enzim, a través de l'adició de carbodiimida (CDI) que s'encarrega d'activar els grups carboxil. Es duu a terme la immobilització a diferents concentracions de CDI (carbodiimida) per determinar la concentració en la qual s'obté millor rendiment d'immobilització i activitat retinguda.

Per altra banda, la immobilització en suport amb grups epoxi es produeix per la formació d'un enllaç covalent entre el grup epoxi del suport i el grup amino de l'enzim. Per tal de promoure la formació d'aquest enllaç, els grups amino han de trobar-se en la forma desprotonada (-NH₂), i per tant és necessari treballar a pHs alcalins. En aquest sentit, es duu a terme la immobilització a diferents pHs alcalins per determinar el millor rendiment d'immobilització i activitat retinguda possibles.

En el cas de la immobilització en Ni²⁺-IDA-agarosa, la immobilització es dona per adsorció deguda a la interacció dels grups imidazol dels residus histidina, presents en forma de cua d'histidines, amb el metall bivalent que es troba immobilitzat al suport per enllaços de coordinació (**Figura 4**). En aquest cas, se segueixen les condicions d'immobilització definides en la bibliografia⁸³, caracteritzades per una alta força iònica per evitar interaccions iòniques, i una concentració d'imidazol suficient per evitar interaccions específiques però permetre la interacció de la cua d'histidines amb el suport.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

La caracterització de la immobilització es duu a terme amb la mínima càrrega enzimàtica detectable per l'assaig enzimàtic corresponent, i així també assegurar que no hi ha presents limitacions difusionals.

El resultat de les immobilitzacions es mostren a la **Taula 33**, i tal i com es pot comprovar, en tots els casos s'obtenen rendiments d'immobilització per sobre del 70%, indicant que tots els enzims són capaços d'immobilitzar-se en els suports estudiats. En canvi, pel que fa a l'activitat retinguda, en més del 50% de les immobilitzacions (8 de 15) és inferior al 20%. En el cas de la ScADH, el millor suport és la Ni²⁺-IDA-agarosa amb una activitat retinguda del 38,9%. Per a la ScPDC, els millors suports són la epoxi-agarosa amb una activitat retinguda del 92,7%, i la Ni²⁺-IDA-agarosa amb una activitat retinguda del 100,0%. La TmLDH és la que obté millors resultats en general, amb els millors rendiments en epoxi-agarosa amb un 65,9% d'activitat retinguda, amino-c6-metacrilat amb un 81,5% d'activitat retinguda i Ni²⁺-IDA-agarosa amb un 86,5% d'activitat retinguda.

Per tant, tenint en compte aquests resultats, el millor suport per als tres enzims és la Ni²⁺-IDA-agarosa, i serà el suport amb el que es durà a terme la reacció enzimàtica amb els enzims immobilitzats.

Taula 33. Caracterització de la immobilització dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH en suports de matrius d'agarosa i metacrilat.

Suport	Enzim	Rendiment immobilització (%)	Activitat retinguda (%)
MANA-agarosa	ScADH	98,5	0,0
	ScPDC	97,9	1,1
	TmLDH	96,5	35,0
Epoxi-agarosa	ScADH	99,3	9,7
	ScPDC	77,2	92,7
	TmLDH	85,0	65,9
Amino-c6-metacrilat	ScADH	100,0	6,4
	ScPDC	98,9	9,7
	TmLDH	71,5	81,5
Epoxi-metacrilat	ScADH	97,8	15,8
	ScPDC	100,0	13,3
	TmLDH	97,0	18,4
Ni²⁺-IDA-agarosa	ScADH	97,9	38,9
	ScPDC	100,0	100,0
	TmLDH	84,6	86,5

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

A tall d'exemple, a la **Figura 46** es mostren els cursos d'immobilització obtinguts durant la immobilització per separat dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH en el suport Ni²⁺-IDA-agarosa. Tal i com es pot observar, en tots els casos la immobilització és pràcticament immediata, ja que en la mesura d'activitat als 5 minuts ja s'ha acabat el procés d'immobilització. En el cas de la ScADH, l'activitat de la suspensió disminueix respecte la del blanc un cop s'ha immobilitzat l'enzim, i es manté fins als 30 minuts, això ens indica que hi ha una pèrdua d'activitat deguda al procés d'immobilització. A més, l'enzim no és estable en les condicions d'immobilització, ja que s'observa una caiguda en l'activitat del blanc (en absència de suport). En canvi, tant amb la ScPDC com amb la TmLDH no s'observa una pèrdua d'activitat degut al procés d'immobilització, sinó més aviat un increment respecte a l'activitat del blanc, tot i que podria ser degut a la mesura d'activitat, ja que les partícules de suport generen soroll durant la mesura d'absorbància. I tampoc s'observa una pèrdua d'activitat deguda a les condicions d'immobilització, ja que en els dos casos el blanc manté el 100% de l'activitat inicial.

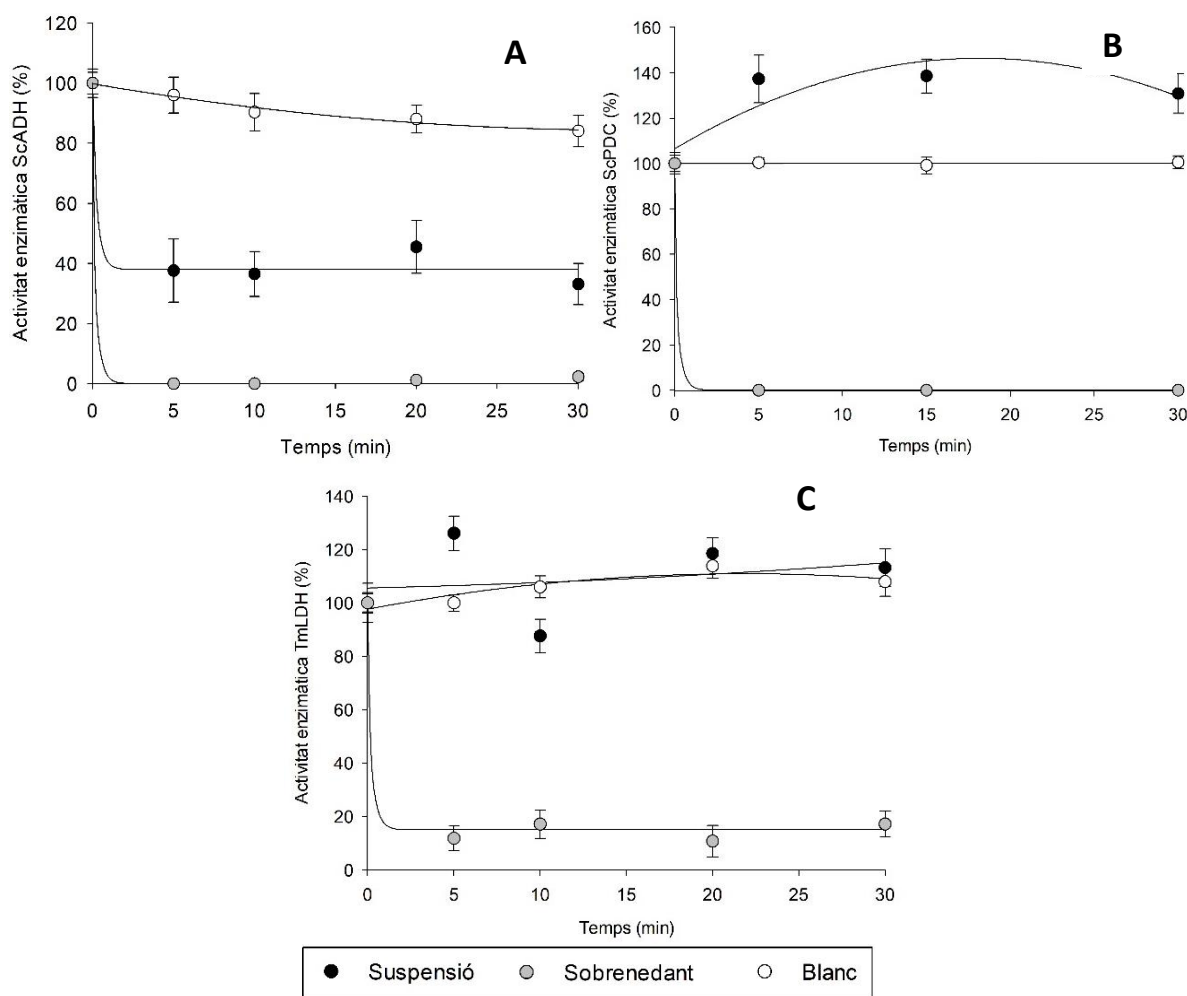


Figura 46. Cursos d'immobilització en Ni²⁺-IDA-agarosa dels enzims ScADH (A), ScPDC (B) i TmLDH (C). Condicions d'immobilització: Tampó fosfat 200 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, TPP 1 mM (ScPDC), MgCl₂ 1 mM (ScPDC) a 25°C i agitació en roller. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

5.7.2. Reacció multienzimàtica amb els derivats immobilitzats de ScADH, ScPDC i TmLDH en Ni²⁺-IDA-agarosa

Un cop determinat el millor suport per a la immobilització dels tres enzims, es duu a terme la seva immobilització per separat en Ni²⁺-IDA-agarosa, aplicant la màxima càrrega admesa pel suport. En aquest cas, el suport presenta una capacitat màxima de càrrega teòrica de 40 mg proteïna · (mg suport)⁻¹ segons les especificacions tècniques del fabricant ABT Technologies. Tenint en compte les U/mg de cada enzim, es calcula la màxima activitat que es pot oferir per gram de suport, per tal de calcular la quantitat necessària de derivat immobilitzat per assolir les U · mL⁻¹ òptimes (**Taula 34**).

Taula 34. Quantitat de suport a afegir en reacció segons la càrrega màxima teòrica i les U · mL⁻¹ a afegir en reacció. La càrrega màxima teòrica correspon a 40 mg d'enzim per gram de suport, considerant l'activitat retinguda obtinguda de la caracterització de la immobilització a baixa càrrega (**Taula 33**). Els grams de suport en reacció es calculen per a un volum de reacció de 50 mL.

Enzim	Càrrega màxima teòrica (U · g ⁻¹)	U · mL de reacció ⁻¹ òptimes	Suport en reacció (g)
<i>ScADH</i>	1556	75	2,34
<i>ScPDC</i>	1200	150	6,22
<i>TmLDH</i>	1269	175	7,30

Per a la immobilització, es carrega el suport fins assolir la càrrega màxima. Al final de la immobilització, es mesura l'activitat en el sobrenedant i s'obtenen els resultats que es mostren a la **Taula 35**, on es comprova que hi ha activitat residual al sobrenedant, és a dir, que s'ha assolit la màxima càrrega amb èxit i amb valors d' U · g suport⁻¹ d'acord amb els valors teòrics de la **Taula 34**.

Taula 35. Resultats d'immobilització en càrrega màxima dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH en Ni²⁺-IDA-agarosa. Condicions d'immobilització: tampó fosfat 200 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM amb una proporció 1:10 (volum suport : volum tampó d'immobilització), incubació a una temperatura de 25°C i agitació en roller. L'activitat retinguda correspon als valors obtinguts en la caracterització de la immobilització a baixa càrrega (**Taula 33**).

Enzim	Unitats totals oferides	Unitats finals sobrenedant	Activitat retinguda (%)	U retingudes teòriques g suport ⁻¹
<i>ScADH</i>	9490	659	38,9	1468,06
<i>ScPDC</i>	11300	1322	100,0	1603,43
<i>TmLDH</i>	11880	3753	84,6	1177,58

Després de la preparació dels derivats immobilitzats, es duu a terme la reacció en les millors condicions estudiades (MOPS 250 mM pH 7, etanol 1 M, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹, a una temperatura de 25°C i 1 atm de CO₂ pur), utilitzant els derivats immobilitzats mostrats a la **Taula 35**. En aquest cas, es duen a terme cicles de reacció de 24 hores cadascuna fins a observar una disminució del 50% en la producció d'àcid làctic respecte al primer cicle. A les 24 hores de reacció, en el primer

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

cicle de reacció s'obté una concentració d'àcid làctic de 8,05 μM , en el segon cicle s'arriba a 9,65 μM i en el tercer cicle a 1,67 μM (**Figura 47**). Per tant, els derivats immobilitzats només es poden reutilitzar 1 vegada abans d'observar una reducció en la producció d'àcid làctic. Per altra banda, en comparació amb la reacció utilitzant els enzims solubles, on s'obté 19,8 μM a les 24 hores de reacció, la producció d'àcid làctic és 2,4 vegades inferior en el primer cicle, 2,05 vegades inferior en el segon cicle i 11,8 vegades inferior en el tercer cicle. Per altra banda, en comparació amb la reacció utilitzant els enzims solubles (**Figura 44**), la concentració d'àcid làctic màxima és 12,8 vegades inferior. Això s'explicaria pel fet que els enzims es troben immobilitzats en partícules de suport diferents, dificultant el transport del producte d'un enzim del sistema multienzimàtic al següent enzim.

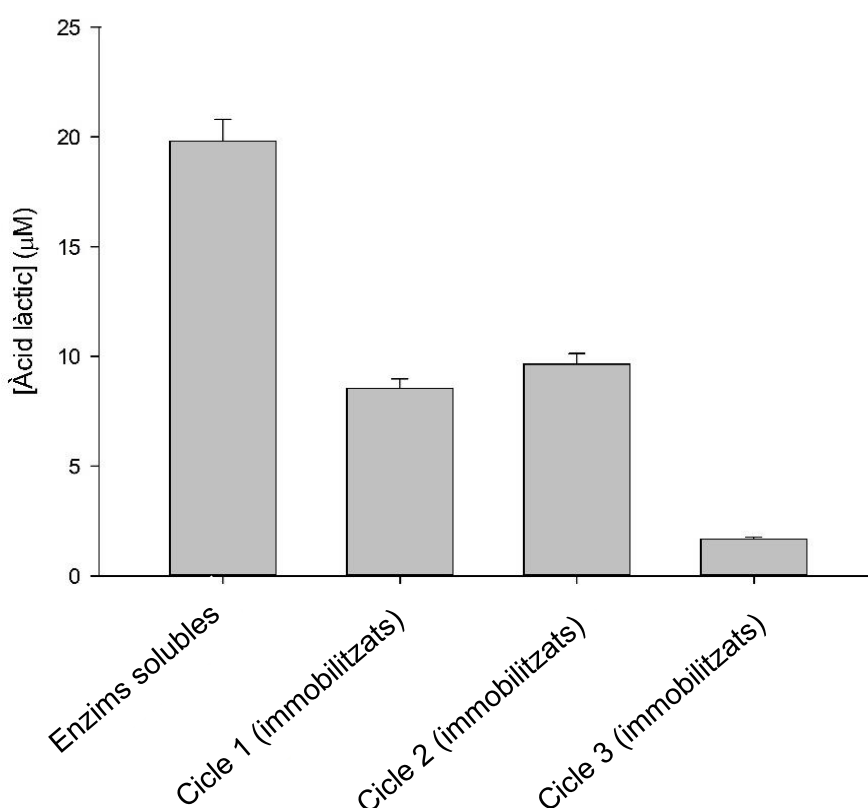


Figura 47. Concentració d'àcid làctic a les 24 hores de reacció amb enzims solubles i en cada cicle de reacció amb els derivats immobilitzats de la Taula 35. Condicions de reacció: MOPS 250 mM pH 7, Etanol 1000 mM, NAD⁺ 10 mM, TPP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ADH 75 U · mL⁻¹, PDC 150 U · mL⁻¹, LDH 187,5 U · mL⁻¹ a 25°C, 300 rpm d'agitació magnètica i 1 atm gas 100% CO₂. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

Comparant el rendiment del biocatalitzador (μmol làctic total produït per cada unitat d'activitat de l'enzim afegida a la reacció), els enzims immobilitzats tenen un rendiment del biocatalitzador similar o lleugerament inferior que els enzims solubles (**Taula 36**). És a dir, que la reacció amb els biocatalitzadors immobilitzats produeix la mateixa quantitat de làctic que pot produir el sistema utilitzant els enzims en forma soluble, mantenint les quantitats i proporcions dels enzims.

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

Taula 36. Rendiment dels biocatalitzadors en forma soluble o immobilitzats en Ni²⁺-IDA-agarosa en la reacció de producció d'àcid làctic després de 24 hores. El rendiment del biocatalitzador immobilitzat es calcula com al total d'àcid làctic produït en els 3 cicles de reacció.

<i>Enzim</i>	<i>Rendiment biocatalitzador Soluble</i>	<i>Rendiment biocatalitzador Immobilitzat</i>
	<i>($\mu\text{mol làctic Unitat d'activitat}^{-1}$)</i>	<i>($\mu\text{mol làctic Unitat d'activitat}^{-1}$)</i>
ScADH	0,264	0,258
ScPDC	0,132	0,129
TmLDH	0,113	0,110

Això ens indica que l'ús dels enzims immobilitzats d'aquest sistema enzimàtic no ofereix un avantatge respecte als enzims solubles, ja que, a més, la productivitat amb els biocatalitzadors immobilitzats és 3 vegades inferior que amb els biocatalitzadors solubles (**Taula 37**), és a dir, els enzims immobilitzats requereixen 3 vegades més temps que els enzims solubles, per obtenir la mateixa quantitat d'àcid làctic. Amb aquests resultats, es pot concloure que la immobilització per separat dels enzims redueix la seva capacitat catalítica, ja que el substrat d'una reacció ha d'entrar a la partícula, transformar-se en producte, sortir de la partícula i entrar, com a substrat, en una altra partícula on hi hagi immobilitzat l'enzim que catalitza la següent reacció. Això fa que s'intensifiqui el fenomen de la limitació difusional, provocant una major limitació en la reacció catalitzada per la ScPDC.

Taula 37. Productivitat dels biocatalitzadors en forma soluble o immobilitzats en Ni²⁺-IDA-agarosa en la reacció de producció d'àcid làctic després de 24 hores. La productivitat del biocatalitzador immobilitzat es calcula com al total d'àcid làctic produït en els 3 cicles de reacció amb un temps total de reacció de 72 hores (24 hores · cicle⁻¹ per 3 cicles).

	<i>Productivitat</i>
	<i>($\mu\text{mol làctic} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)</i>
Biocatalitzadors immobilitzats	0,269
Biocatalitzadors solubles	0,825

5.8. Conclusions

Com hem pogut veure, el desenvolupament d'un sistema CCU per a la fixació del CO₂ basat en l'enzim PDC ha resultat tècnicament complex i desafiant. La caracterització dels enzims ha permès trobar una finestra d'operació, doncs el pH del medi no només té un impacte en l'activitat i estabilitat dels enzims, sinó en la concentració de CO₂ dissolt en el medi de reacció, acotant el rang de pH entre 7 i 9. D'altra banda, la caracterització enfront els compostos presents en el gas dels alts forns de l'acereria demostra que hi ha compostos que no son innocus pels enzims, i afecten tant a la seva estabilitat com a la seva activitat.

La caracterització individual de les reaccions implicades ha permès determinar que, tant la reacció catalitzada per la ScADH com la catalitzada per la ZpPDC/ScPDC estan fortament desplaçades cap al substrat. En el cas de la ScADH, la reacció es veu afavorida a pHs alcalins,

5. Resultats II: Sistema CCU basat en la síntesi multienzimàtica de l'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol

obtenint 2,45 mM d'acetaldehid a pH 9, però l'estabilitat de l'enzim disminueix i deixa de ser actiu a les 24 hores de reacció. El cas de la reacció catalitzada per la ZpPDC/ScPDC, la seva caracterització ha demostrat la dificultat de trobar unes condicions que afavoreixin la síntesi d'àcid pirúvic, fins i tot resultant en la producció d'acetoïna en comptes del producte desitjat. De fet, la selecció de dues variants de l'enzim (ZpPDC i ScPDC) demostra que diferents variants de l'enzim es comporten de manera diferent en reacció, obtenint 20 vegades menys acetoïna en el cas de la ScPDC respecte a la ZpPDC.

Tal i com s'ha comentat en la introducció general, i com es pot concloure d'aquest estudi, la quantitat i proporció dels enzims, així com les condicions de reacció, han estat els factors clau per a la formació d'àcid làctic. Per una banda, l'increment en la quantitat de ScPDC a $150 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, juntament amb l'optimització de les proporcions d'enzims a 0,5 ScADH/ScPDC i 1,25 TmLDH/ScPDC, ha permès obtenir $29,29 \text{ } \mu\text{M}$ d'àcid làctic. D'altra banda, la modificació del tampó de reacció ha permès determinar que amb el tampó MOPS es pot arribar a $250 \text{ } \mu\text{M}$ d'àcid làctic ($0,022 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), que és la concentració més alta assolida amb aquest sistema. Tanmateix, la conclusió d'aquests resultats és que el rendiment del sistema segueix sent massa baix per a la seva implementació a la indústria ja que, tal i com s'ha comentat en la introducció general, s'hauria d'assolir una concentració, com a mínim, de $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Tot i això, s'ha pogut demostrar que el sistema també és capaç de produir àcid làctic en condicions industrialment significatives, és a dir, utilitzant com a font de CO₂ un gas que imita la composició del gas de sortida dels alts forns d'una acereria, obtenint $62 \text{ } \mu\text{M}$ d'àcid làctic.

Respecte a l'estudi dels derivats immobilitzats, es conclou que de tots els suports estudiats, el suport Ni²⁺-IDA-agarosa és el que ofereix un alt rendiment d'immobilització i activitat retinguda per a tots tres enzims. Tanmateix, els avantatges que ofereix la immobilització: evitar el contacte dels enzims amb les interfases gas-líquid que provoca la seva inactivació, i reutilitzar els enzims en finalitzar un cicle de reacció, no compensen la pèrdua en productivitat respecte als enzims solubles ($0,269 \text{ } \mu\text{mol làctic} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ amb enzims immobilitzats respecte a $0,825 \text{ } \mu\text{mol làctic} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ amb enzims solubles), i mantenint el mateix rendiment del biocatalitzador ($0,260 \text{ } \mu\text{mol làctic} \cdot (\text{Unitat d'activitat ScADH})^{-1}$, $0,130 \text{ } \mu\text{mol làctic} \cdot (\text{Unitat d'activitat ScPDC})^{-1}$ i $0,110 \text{ } \mu\text{mol làctic} \cdot (\text{Unitat d'activitat TmLDH})^{-1}$).

Part dels resultats d'aquest capítol han estat publicats a la revista *Environmental Science & Technology* (Revista Q1 amb un factor d'impacte de 11,5 (2022))¹⁰⁸

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

6.1. Introducció

L'acetoïna (3-hidroxi-2-butanona o acetil metil carbinol) és un compost volàtil amb olor a iogurt i un sabor característic a mantega. Degut a les seves propietats, el seu camp d'aplicació a la indústria és extraordinàriament ampli, amb algunes d'aquestes resumides a la **Taula 38**. Una de les seves aplicacions aprovada és com a aromatitzant per a la indústria alimentària, ja que és un compost reconegut com a segur (GRAS) per la JECFA i la FDA. Altres aplicacions també inclouen la indústria agrària gràcies a la seva bioactivitat com a promotor del creixement en plantes, o activant sistemes de protecció en plantes contra alguns agents infecciosos^{72,73}. Degut al seu interès industrial, el departament d'energia dels EE.UU. ha classificat l'acetoïna com un dels 30 productes químics prioritaris per al seu desenvolupament i utilització⁷⁴.

Taula 38. Aplicacions industrials de l'acetoïna (adaptat de Xiao Z and Lu JR, 2014⁷⁵).

Aplicació	Funció	Referència
Alimentació, productes cosmètics, sabons, detergents, locions, cigarrets	Aromatitzant	Burdock Group (2002) ¹⁰⁹
Síntesi de pirazines	Precursor	Rizzi (1988) ¹¹⁰
Atracció i atrapament de mosques i escarabats	Atraient d'insectes	Negishi et al. (2001) ¹¹¹ Chen and Li (2011) ¹¹²
Fabricació de films d'SBT	Agent quelant	Frattoni et al., 2006 ¹¹³ ; Machado et al., 2008 ¹¹⁴
Síntesi de diacetil, acetilbutanediol	Precursor	Chen et al. (2007) ¹¹⁵ Xiao et al. (2009) ¹¹⁶
Promotor del creixement en plantes	Compost bioactiu	Ping and Boland, 2004 ¹¹⁷

Actualment, però, la major part de l'acetoïna produïda es fa a través de la via química (**Figura 48**), concretament mitjançant dues rutes: (1) a partir de la butanona es realitza un primer pas d'halogenació amb bromat de potassi per obtenir 3-bromobutan-2-ona, seguit d'una hidròlisi en medi bàsic per obtenir l'acetoïna o (2) a partir d'acetaldehid es realitza la condensació aldòlica utilitzant ilur de tiazol o triazolium⁷⁵. Aquestes rutes químiques presenten alguns desavantatges, per exemple la butanona presenta altres regions reactives que resulten en la formació de subproductes i que acaben dificultant la purificació final. En el cas de la segona via, la preparació del catalitzador és un procés complex, i el fet de treballar amb l'acetaldehid dificulta encara més el procés, ja que és un compost amb una elevada volatilitat i altament inflamable. Per tant, en

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

alguns sectors, pot generar preocupació sobre la seguretat d'aquests processos, a més de ser energèticament i ambientalment desfavorables. A més, tal i com s'ha comentat en la introducció general, aquests processos industrials s'haurien d'enfocar en la utilització de matèries primeres renovables (productes bio-basats), en línia amb la transició cap a la bioeconomia impulsada per la UE.

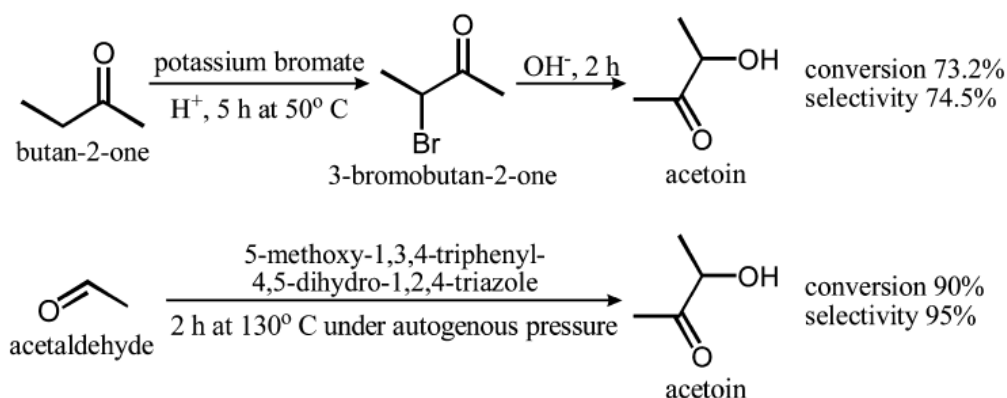


Figura 48. Rutes de síntesi química de l'acetoïna. Extret de Xiao and Lu, 2014⁷⁵.

Per aquests motius, s'està investigant la seva producció biotecnològica, ja que hi ha microorganismes que de forma natural la produeixen, i d'aquesta manera es pot etiquetar el producte com a natural, a més de ser més sostenible pel medi ambient. En l'actualitat, existeixen dues vies biotecnològiques per produir aquest compost: la producció microbiana i la producció enzimàtica. Meng, W et al.⁷⁶ van publicar el 2022 una revisió excel·lent sobre diferents plataformes biotecnològiques per produir acetoïna.

Zhang L, et al. (2018)¹¹⁸ van aconseguir desenvolupar un sistema multienzimàtic per a la producció d'acetoïna a partir d'etanol. El sistema consisteix de tres enzims: una etanol deshidrogenasa (EDH), la formolasa (FLS) i una NADH oxidasa (NOX). Concretament, la formolasa és un enzim que ha estat dissenyat computacionalment per catalitzar la carbolligació de tres molècules de formaldehid per formar una molècula de dihidroxiacetona⁴¹. Segons el treball de Zhang, et al. (2018), aquest enzim és capaç també de catalitzar la carbolligació de dues molècules d'acetaldehid per formar acetoïna. La rellevància d'aquest treball rau en el fet que l'etanol, que és el substrat de la reacció, pot provenir de fonts renovables, el qual s'anomena bio-etanol, permetent que el bioprocés també sigui bio-basat.

En aquesta tesi, s'ha estudiat aquest sistema multienzimàtic utilitzant l'enzim ZpPDC, un enzim termoestable capaç de catalitzar la condensació aldòlica de l'acetaldehid a acetoïna. Per tal de generar el substrat necessari per a la PDC, s'acoba la reacció d'oxidació de l'etanol a acetaldehid catalitzada per la ADH, requerint del cofactor NAD⁺ que es regenera amb l'adició de l'enzim NOX, encarregat d'oxidar el NADH generat utilitzant O₂ i generant H₂O com a subproducte (**Figura 49**).

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

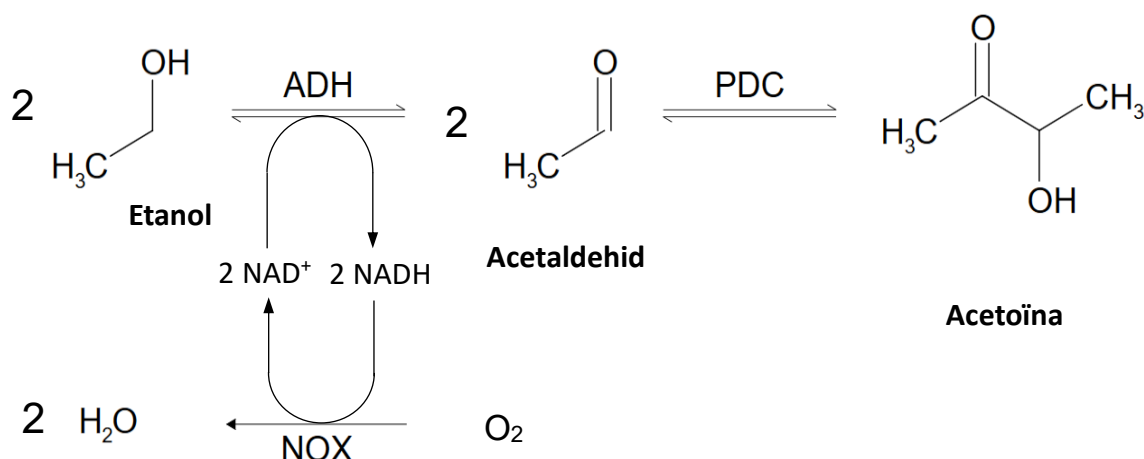


Figura 49. Esquema del sistema multienzimàtic que catalitza la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol i amb regeneració del cofactor NAD^+ . ScADH: alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, ZpPDC: Piruvat descarboxilasa de *Z. palmarum*, SpNOX: NADH oxidasa de *S. pyogenes*.

6.2. Caracterització dels enzims

6.2.1. Estabilitat enfront el pH

Com ja s'ha comentat anteriorment, la caracterització de l'estabilitat dels enzims implicats en el sistema enfront el pH serà determinant per a seleccionar les condicions de reacció. En el cas dels enzims ZpPDC i ScADH, la seva estabilitat enfront el pH és la que s'havia comentat en el capítol de reacció de síntesi de làctic (veure apartat 5.3.2).

En el cas de la SpNOX, s'estudia la seva estabilitat en un rang de pH entre 5 i 10 amb una temperatura d'incubació de 25°C. Durant la incubació, es mesura l'activitat a diferents temps, obtenint els resultats que es mostren en la **Figura 50**. Els resultats mostren que l'enzim és altament inestable a qualsevol pH en comparació amb els enzims ZpPDC i ScADH, ja que en 2 hores perd el 50% de l'activitat inicial a pH 7 i 8, corresponent als pHs on l'enzim és més estable. Per tant, per tal que l'acoblament d'aquest enzim per a la regeneració del cofactor sigui eficient, el pH de la reacció estarà limitat en un rang de pH d'entre 7 i 8.

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

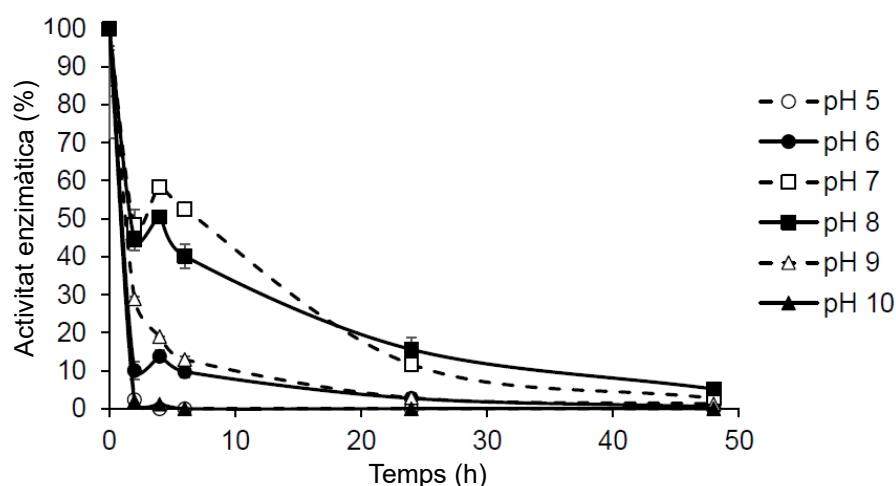


Figura 50. Estabilitat de la SpNOX mesurada a diferents pHs - Condicions d'incubació: Tampó acetat 100 mM (pH 5), tampó citrat 100 mM (pH 6), tampó fosfat 100 mM (pHs 7 i 8), tampó bicarbonat 100 mM (pHs 9 i 10) a una temperatura de 25°C i amb agitació a 300 rpm. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

6.2.2. Activitat enfront el pH

Un altre factor a tenir en compte, per determinar les condicions de treball de la reacció, és caracteritzar l'activitat dels enzims enfront el pH. Aquesta caracterització es duu a terme per als tres enzims (*ZpPDC*, *ScADH* i *SpNOX*). Per a la *ZpPDC* i la *ScADH*, aquesta ja s'ha comentat en el capítol anterior (Apartat 5.3.1).

Per la *SpNOX*, es mesura l'activitat en un rang de pH entre 5 i 10 (**Figura 51**). En aquest cas, l'enzim presenta el seu òptim a pH 7 que coincideix amb el rang de pH on l'estabilitat és més alta. Per tant, segueix sent favorable la seva aplicació en un rang d'entre 7 i 8. A partir de pH 9 l'activitat es redueix significativament a un 15% de l'activitat al pH òptim, i per tant es descarta treballar a pHs superiors a 8, com també es donava en el cas de l'enzim *ZpPDC* (veure Apartat 5.3.1).

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

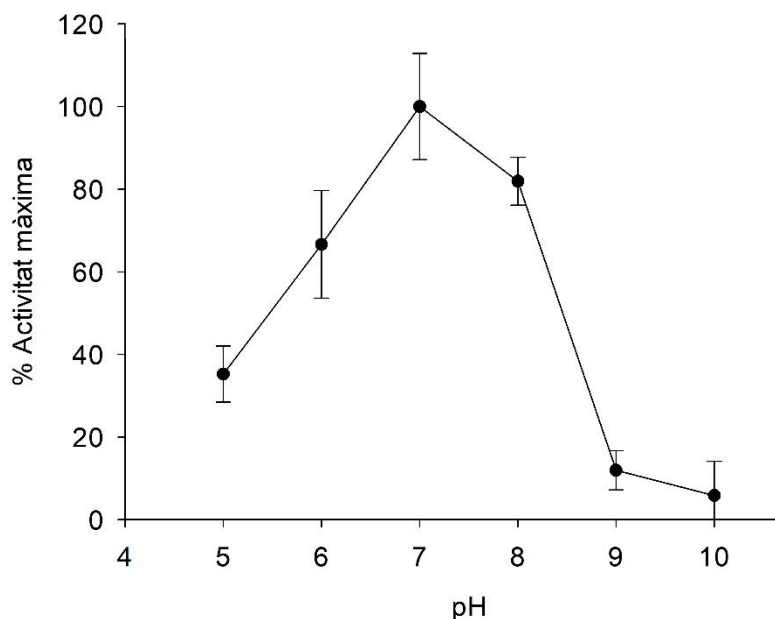


Figura 51. Perfil d'Activitat de l'enzim SpNOX enfront al pH. L'activitat es representa com a el percentatge de la màxima activitat observada (100%). El test d'activitat (veure apartat 3.4) es realitza a diferents pHs fent servir els següents tampons: Tampó fosfat 100 mM (pHs 6, 7 i 8), tampó tris-base 100 mM (pHs 9 i 10). Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

6.3. Síntesi d'acetoïna a partir d'acetaldehid catalitzada per la ZpPDC

L'estudi del sistema multienzimàtic comença amb la caracterització de la reacció de síntesi d'acetoïna, mitjançant la condensació de dues molècules d'acetaldehid, catalitzada per la ZpPDC. Per tal de determinar en quin rang de pH està afavorida la reacció de la ZpPDC, es caracteritza la reacció de síntesi a diferents pHs i amb un temps de reacció de 96 hores. Aquesta caracterització es duu a terme fixant totes les condicions de reacció (temperatura, concentració de substrat i d'enzim i agitació) exceptuant el pH, que es fixarà en un rang d'entre 5 i 8, ja que és el rang on l'enzim és més actiu i estable. El resultat d'aquest estudi es mostra en la **Taula 39** on es pot veure que el pH en el qual la reacció està menys afavorida és a pH 8. En canvi, a pH 6 és on s'obté la conversió més alta amb un 92,9% i obtenint 28,3 mM d'acetoïna. A més, a pHs superiors o inferiors a aquest, la conversió disminueix, sent de 87,5% a pH 5 (27,2 mM d'acetoïna), 71,1% a pH 7 (22,2 mM d'acetoïna) i 36,8% a pH 8 (7,7 mM d'acetoïna). Per altra banda, després de 4 hores de reacció s'observa la formació d'un precipitat en la reacció a pH 5, que s'explicaria per ser un valor pròxim al pI de la ZpPDC de 4,95, on l'enzim té càrrega neutra i això podria afavorir la seva precipitació per agregació. Per tant, descartant el pH 5, es determina que el rang de treball de la ZpPDC es troba entre pH 6 i 8. A més, tot i treballar amb lisats cel·lulars d'*E. coli*, no s'observa la formació de productes secundaris, i obtenint rendiments superiors al 80% en les reaccions a pH 5, 6 i 7. Avaluant els paràmetres de la reacció mostrats a la **Taula 39**, es pot comprovar que a pH 6 és on la reacció és catalitzada més ràpidament, amb una velocitat de reacció inicial de $3,01 \text{ mM acetoïna} \cdot \text{h}^{-1}$. Per tant, es determina que l'enzim que catalitza la conversió d'acetaldehid a acetoïna treballa millor quan el medi de reacció es troba a pH 6. Tanmateix, l'enzim és capaç de produir acetoïna a un rang de pH més ample, una propietat desitjada quan en el sistema multienzimàtic les condicions òptimes de cada enzim no coincideixen.

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

Taula 39. Paràmetres d'avaluació de la síntesi d'acetoïna a partir d'acetaldehid catalitzada per la ZpPDC a diferents pHs de reacció, després de 96 hores de reacció. $[\text{acetaldehid}]_0 = 50 \text{ mM}$. El volum de reacció és de 50 mL i s'utilitza ZpPDC a $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. La reacció es duu a terme a 25°C amb agitació orbital a 150 rpm i pHs diferents: pH 5, 6 (citrat 238 mM), 7 i 8 (Tris-base 238 mM). Temps de reacció: 96 hores.

pH	[Acetoïna] Final	Conversió (%)	Rendiment (%)	Velocitat inicial de reacció (mM acetoïna $\cdot \text{h}^{-1}$)
5	27,2	87,5	84,8	1,3
6	28,3	92,9	96,0	3,0
7	22,1	71,1	88,4	1,7
8	7,7	36,8	28,5	0,6

6.4. Síntesi d'acetoïna a partir d'etanol sense regeneració de cofactor

Un cop determinat els paràmetres de síntesi de acetoïna al rang de pH de treball per a la ZpPDC, el següent pas és estudiar l'acoblament de la reacció de síntesi d'acetaldehid a partir d'etanol catalitzada per la ScADH, és a dir, fer una caracterització de la cascada de reacció de síntesi d'acetoïna a partir d'etanol. En aquest cas, la reacció necessita de cofactor NAD^+ i, primerament, s'estudiarà aquest sistema sense regeneració de cofactor.

A partir de l'estudi de la reacció catalitzada per la ZpPDC (apartat 6.3) i de la caracterització prèvia de la ScADH (apartat 5.4.1) sabem que a pHs alcalins es troba afavorida la síntesi d'acetaldehid, mentre que a pHs àcids s'afavoreix la síntesi d'acetoïna. Per aquest motiu, per a la caracterització s'estudia la reacció en cascada a pH 6, 7 i 8.

Tanmateix, no s'observa la formació d'acetoïna en cap dels pHs provats. A més, es detecta la formació de baixes concentracions d'acetaldehid, assolint 4,8 mM, 1,3 mM i 0,3 mM a pH 8, 7 i 6, respectivament. Aquests resultats concorden amb la caracterització de la ADH en el capítol 2 de resultats, ja que la seva màxima activitat i es troba a pHs alcalins, on ja s'observava que el rendiment de reacció era superior.

Tenint en compte aquests resultats, es decideix per una banda i) incrementar la concentració de NAD^+ de 8 mM a 10 mM per afavorir la síntesi d'acetaldehid i ii) incrementar l'activitat de la ZpPDC de $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ per tal d'afavorir la síntesi d'acetoïna.

Els resultats obtinguts després d'aplicar aquestes dues estratègies es mostren a la **Figura 52**, observant la formació de fins a 11 mM d'acetoïna a pH 8 després de 50 hores de reacció, mentre que no es detecten quantitats significatives d'acetaldehid ni d'acetoïna a pH 6 i 7. D'altra banda, a pH 8 s'observa que no es compleix el balanç de matèria ja que, d'acord amb la concentració de NAD^+ afegida (10 mM), sent el substrat limitant, i l'estequiometria de la reacció de síntesi d'acetoïna (1 mol d'acetoïna produïda per cada 2 mol d'acetaldehid consumit), s'hauria d'arribar a una concentració màxima de 5 mM d'acetoïna. A més, l'etanol, l'acetaldehid i l'acetoïna es consumeixen després de 50h de reacció. Aquests resultats es podrien explicar per l'ús de lisats cel·lulars d'*E. coli*, que contenen altres enzims que podrien catalitzar reaccions secundàries, incloent la regeneració de cofactor dins del seu metabolisme. A més, cal tenir en compte que a pH 8, s'afavoreix la reacció catalitzada per la ScADH, ja que l'activitat enzimàtica es veu afectada pel pH en major mesura que la ZpPDC, d'acord amb la seva caracterització.

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

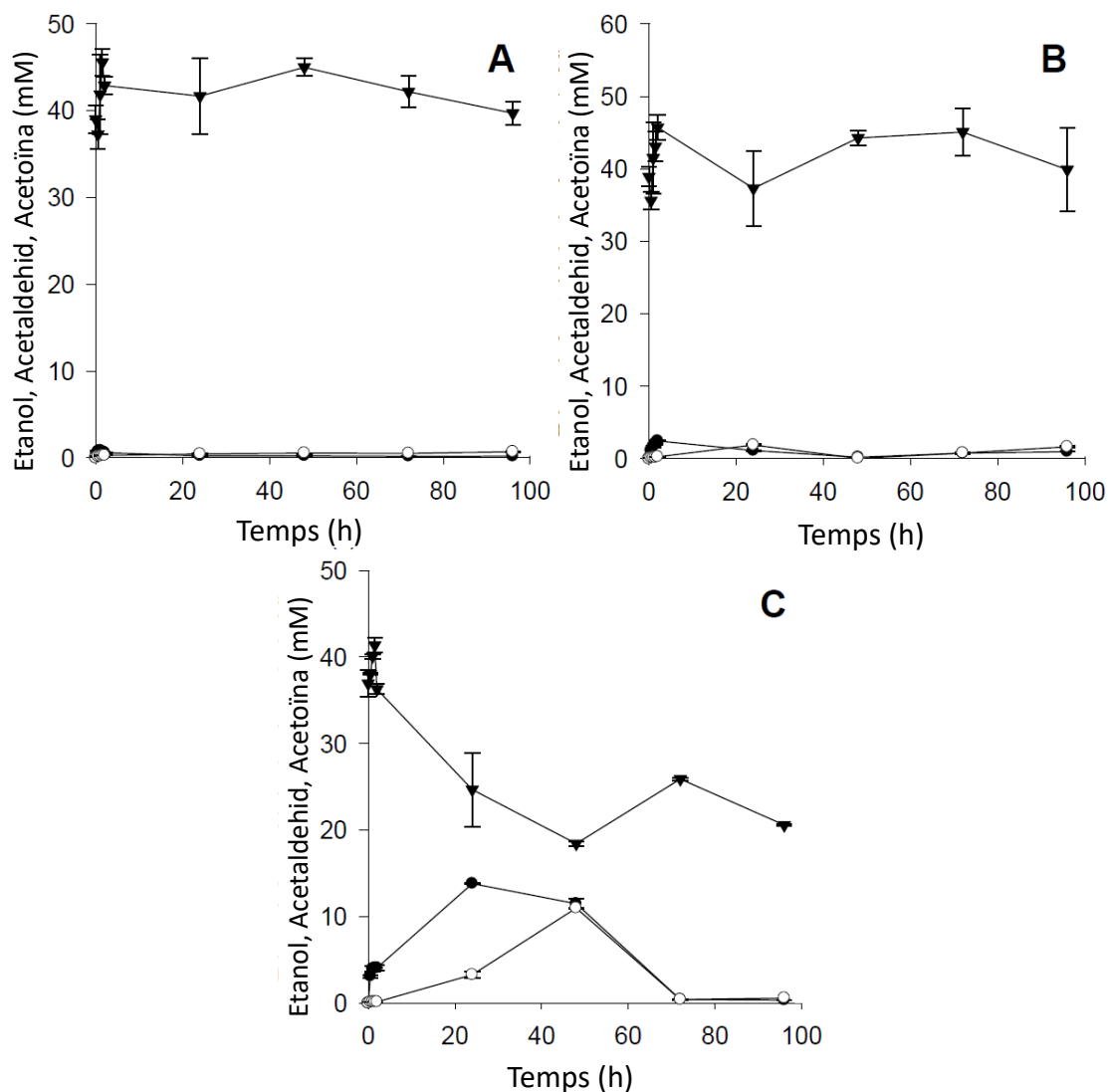


Figura 52. Cursos de reacció, a diferent pHs, de la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol catalitzada per ScADH i ZpPDC Perfils de concentració de l'etanol (▲), l'acetaldehid (○) i l'acetoïna (●) durant la reacció. Condicions de reacció: tampó citrat 238 mM pH 6 (A), tampó tris-base 238 mM pH 7 (B) o 8 (C), [etanol]₀ = 40 mM, [NAD⁺]₀ 10 mM de, 10 U · mL⁻¹ de ZpPDC, 1 U · mL⁻¹ de ScADH a 25°C amb 150 rpm d'agitació.

Adicionalment, es va monitoritzar el pH en línia (**Figura 53**), el qual es pot observar que canvia al llarg de la reacció. Aquest fet és especialment rellevant, ja que les reaccions catalitzades per la ZpPDC com la ScADH són fortament dependents del pH. En el cas de pH 7 és on s'observa la major caiguda del pH, arribant a pH 5 al final de la reacció. A pH 8 el pH baixa fins a 7, i a pH 6 puja de manera regular fins a 6,5 a les 96 hores de reacció.

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

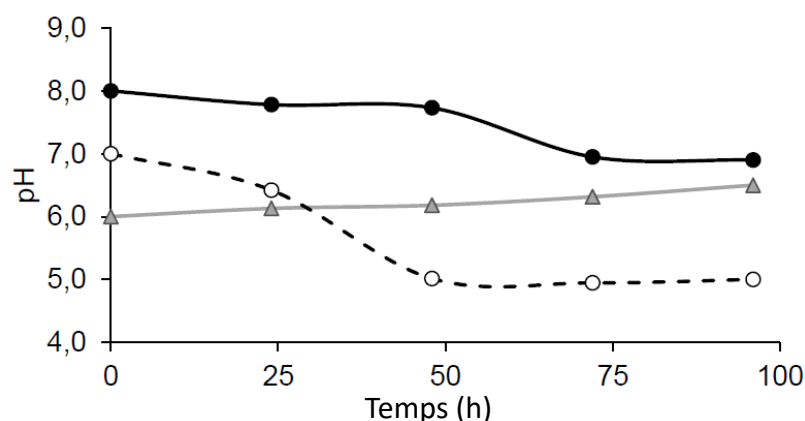


Figura 53. Evolució del pH durant la reacció de síntesi d'acetoïna a partir d'etanol catalitzada per ScADH i ZpPDC. Condicions de reacció: tampó citrat 238 mM pH 6 (▲), tampó tris-base 238 mM pH 7 (○) o 8 (●), 50 mM d'etanol, 10 mM de NAD⁺, 10 U · mL⁻¹ de ZpPDC, 1 U · mL⁻¹ de ScADH a 25°C amb 150 rpm d'agitació.

6.5. Síntesi d'acetoïna a partir d'etanol amb regeneració de cofactor

6.5.1. Regeneració de cofactor amb SpNOX comparant l'ús de lisats cel·lulars o enzims purificats

Com ja s'ha comentat anteriorment a la introducció, la viabilitat d'un sistema multienzimàtic que necessita de cofactors com el NAD⁺/NADH és possible gràcies a la regeneració del cofactor. Això fa que no es necessitin quantitats estequiomètriques del cofactor per una conversió completa. Per aquest sistema, s'ha estudiat la regeneració del cofactor utilitzant l'enzim NADH oxidasa de *S. pyogenes* (SpNOX), que utilitza l'O₂ com a substrat per oxidar el NADH, amb l'avantatge de generar H₂O com a subproducte.

A partir dels resultats anteriors, i per tal d'afavorir l'enzim més inestable (SpNOX), el rang de pH s'acota encara més de 7, 7,5 i 8. Per tal de demostrar la hipòtesi sobre la influència dels enzims endògens d'*E. coli* sobre el sistema multienzimàtic, es comparen les reaccions utilitzant lisats cel·lulars amb les que s'utilitzen els enzims purificats.

Tal i com es mostra a la **Taula 40** quan s'utilitzen lisats cel·lulars, la concentració d'acetoïna és inferior respecte a quan s'utilitzen enzims purificats a pH 7,5 (1,42 mM utilitzant lisats respecte a 15,74 mM utilitzant enzims purificats) i 8 (0,18 mM utilitzant lisats respecte a 10,84 mM utilitzant enzims purificats), mentre que a pH 7 és superior (9,11 mM utilitzant lisats respecte a 2,33 mM utilitzant enzims purificats). Tanmateix, durant la reacció s'observa un màxim en la concentració d'acetoïna a les 24 hores de reacció en tots els pHs estudiats, que posteriorment es consumeix, confirmant la presència d'altres biotransformacions no desitjades. Pel que fa a l'acetaldehid i l'etanol, aquests també es consumeixen després de 24 hores de reacció en tots els pHs, confirmant la presència d'altres reaccions no desitjades. En canvi, quan s'utilitzen enzims purificats, la disminució de l'acetaldehid i l'acetoïna ja no s'observa en aquestes condicions, demostrant que la presència d'altres enzims era la causa d'aquest consum, resultant en un increment del rendiment a pH 7,5 (del 2,8% al 31,5%) i 8 (del 0,4% al 21,7%). En aquestes condicions (enzims purificats), la màxima concentració

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

d'acetoïna (15,74 mM) s'assoleix a pH 7,5 després de 48 hores de reacció i, tenint en compte l'acetaldehid format, el nombre total de recanvi és de 4 mols d'acetaldehid format per mol de cofactor, indicant que la regeneració del cofactor NAD^+ s'acompleix satisfactòriament. A pH 8, destaca la acumulació de més acetaldehid (fins a 22 mM a les 24 hores de reacció) degut a la major activitat per part de la ScADH, i menor activitat de la ZpPDC, assolint 11 mM d'acetoïna. Mentre que a pH 7, la màxima concentració d'acetaldehid assolida és de 5,52 mM (a les 6 hores de reacció) utilitzant els enzims purificats, indicant que la reacció catalitzada per la ScADH és el pas limitant en aquestes condicions. Per aquests motius, se selecciona el pH 7,5 com a pH òptim per aquest sistema multienzimàtic, i utilitzant els enzims purificats.

Taula 40. Paràmetres d'avaluació de la síntesi d'acetoïna a partir d'acetaldehid catalitzada pel sistema multienzimàtic format per ScADH, ZpPDC i SpNOX a diferents pHs de reacció, després de 48 hores de reacció. $[\text{etanol}]_0 = 50 \text{ mM}$. El volum de reacció és de 50 mL i s'utilitza ScADH a $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, ZpPDC a $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i SpNOX a $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. La reacció es duu a terme a 25°C amb agitació a 500 rpm i pHs diferents: pH 7, 7,5 i 8 (Tris-base 250 mM). Temps de reacció: 96 hores. L'error correspon a la desviació estàndard de dues mesures.

pH	Format dels enzims	[Acetoïna] Final (mM)	Conversió (%)	Rendiment (%)
7	Lisat	9,11±0,40	53,6	18,2
7	Purificat	2,33±0,04	36,0	4,7
7,5	Lisat	1,42±0,08	56,8	2,8
7,5	Purificat	15,74±0,25	80,3	31,5
8	Lisat	0,18±0,03	48,7	0,4
8	Purificat	10,84±0,30	81,1	21,7

6.5.2. Efecte de la concentració de NAD^+

Un cop determinat que el pH on s'obté el major rendiment de reacció (pH 7,5), i que això s'aconsegueix utilitzant els enzims purificats, s'estudia dur a terme la reacció amb els enzims purs i a pH 7,5. I a més, com s'ha mencionat anteriorment, l'ús de cofactors com el NAD^+/NADH representen un cost econòmic important en els sistemes biocatalítics. Per aquest motiu, es decideix estudiar també com afecta la concentració del NAD^+ en el rendiment de la reacció, amb l'objectiu de reduir-lo per tal de fer més econòmic el sistema multienzimàtic.

Per aquest estudi, es duu a terme dues reaccions de síntesi d'acetoïna amb regeneració de cofactor en les millors condicions provades, i es considera reduir la concentració de NAD^+ de 10 mM a 1 mM. A més, degut a la inestabilitat de l'enzim SpNOX, es decideix escurçar el temps de reacció a 24 hores incrementant l'activitat enzimàtica afegida de cada enzim: s'incrementa la ScADH purificada de 1 a $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, la ZpPDC purificada de 10 a $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ i la SpNOX purificada de 10 a $45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Tal i com es mostra a la **Figura 54**, l'increment en l'activitat enzimàtica resulta en la formació de més acetoïna (25,4 mM) en comparació amb els resultats sota les mateixes condicions de pH (**Taula 40** fila 4), destacant l'alt grau de conversió (98,7%) i rendiment (100%) obtinguts en comparació amb el 88,78% de rendiment obtingut amb el sistema multienzimàtic que utilitza l'enzim formolasa¹¹⁸. La reducció en la concentració de

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

NAD⁺ resulta en una menor quantitat d'acetoïna, de 25,4 mM a 17,1 mM, resultant en un grau de conversió (69,2%) i rendiment (30,6%) inferiors. Tanmateix, tot i la reducció de 10 vegades la concentració de NAD⁺, la concentració d'acetoïna només es redueix 1,5 vegades, incrementant el nombre total de recanvi del sistema de 5 a 38 mols de producte per mol de cofactor. Per tant, el sistema multienzimàtic passa a ser més eficient en termes de reutilització del cofactor.

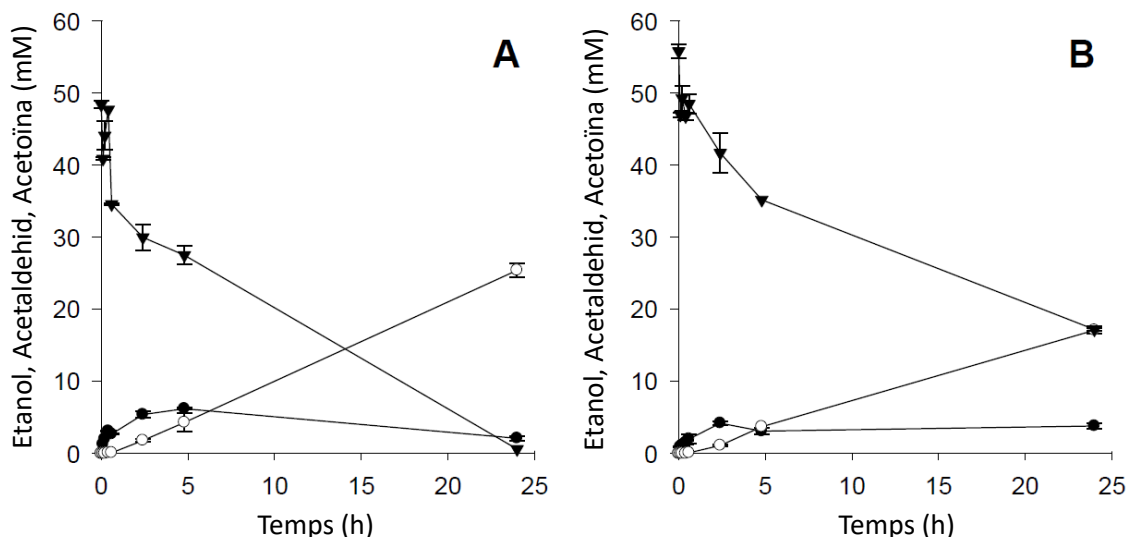


Figura 54. Influència de la concentració de cofactor, NAD⁺, en els cursos de reacció de la síntesi d'acetoïna a partir d'etanol catalitzada per ScADH i ZpPDC amb regeneració de cofactor. Perfils de concentració d'etanol (▼), acetaldehid (●) i acetoïna (○) de la reacció multienzimàtica de síntesi d'acetoïna. Condicions de reacció: Tampó tris-base 250 mM pH 7,5, etanol 50 mM, NAD⁺ 10 mM (A) o 1 mM (B), ScADH 10 U · mL⁻¹, ZpPDC 100 U · mL⁻¹, SpNOX 45 U · mL⁻¹ a 25°C i 500 rpm d'agitació magnètica. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard de dues mesures.

A més, el sistema no només destaca per l'alta eficiència catalítica i rendiment, sinó per la seva simplicitat, ja que en altres treballs es desenvolupen sistemes multienzimàtics més complexos, com és el cas del sistema multienzimàtic desenvolupat per Guo, S. et al. (2021), utilitzant com a substrat glicerol, amb 5 etapes i 4 enzims (on la formació de peròxid d'hidrogen requereix afegir una catalasa)¹¹⁹, o el sistema desenvolupat per Tan, X. et al. (2023), utilitzant glucosa com a substrat, amb 6 etapes i 6 enzims¹²⁰. L'avantatge d'aquests sistemes recau en el fet de no requerir cofactors com el NAD⁺/NADH, però caldria valorar si el cost d'afegir més etapes i enzims és inferior al cost del cofactor en un sistema amb regeneració de cofactor.

6.6. Conclusions

La caracterització enzimàtica indica que, dels tres enzims implicats en el sistema (ScADH, ZpPDC i SpNOX), la SpNOX és l'enzim menys estable, amb unes condicions de pH òptimes al voltant de pH 7 i 8, i per tant, és l'enzim que acaba de definir les condicions de reacció. Per altra banda, la caracterització de la reacció de carbolligació catalitzada per la ZpPDC indica que el pH òptim es troba al voltant de 6, on la velocitat de reacció de síntesi és màxima (3,01 mM acetoïna · h⁻¹), mentre que la caracterització de la reacció acoblada catalitzada per la ScADH indica que s'afavoreix la síntesi d'acetoïna a pHs més alcalins, arribant a una concentració d'11,0 mM a pH 8. En afegir la reacció de regeneració del cofactor es quan es determina que el millor pH per dur

6. Resultats III: Sistema multienzimàtic per a la síntesi d'un producte bio-basat a partir de bio-etanol: l'acetoïna

a terme la síntesi d'acetoïna és pH 7,5, que coincideix amb el pH al voltant del qual la SpNOX és més estable i presenta més activitat. A més, es conclou que s'ha de dur a terme la purificació dels enzims implicats, ja que l'ús de lisats cel·lulars interfereix en les reaccions del sistema, observant un consum d'acetaldehid i acetoïna que no s'observa en treballar amb els enzims purificats.

Per altra banda, s'aconsegueix amb èxit una regeneració del cofactor, el que permet incrementar el rendiment de la reacció de generació d'acetaldehid i aconseguint una conversió completa de 25 mM d'acetoïna ($2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) a partir de 50 mM d'etanol, tot i que per sota de la concentració de $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ comentada en la introducció general. A més, la reducció de la concentració inicial de NAD^+ permet incrementar el número de recanvi de 5 a 38, indicant una utilització més eficient del cofactor.

Amb aquests resultats s'aconsegueix millorar el procés de síntesi d'acetoïna a partir d'etanol utilitzant un sistema multienzimàtic al qual participa l'enzim piruvat descarboxilasa, que juntament amb un estudi de les proporcions dels enzims ha permès maximitzar la conversió a acetoïna, resultant en un sistema relativament més simple en comparació amb altres sistemes multienzimàtic per a la síntesi d'acetoïna. Actualment s'està estudiant aquest sistema per tal d'optimitzar-lo i arribar a concentracions de, com a mínim, $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (681 mM).

Aquest resultats formen part d'un article en preparació, sota el títol *Synthetic biocatalytic route for the synthesis of biobased acetoin from ethanol*.

7. Conclusions generals

7. Conclusions generals

En aquesta tesi, s'ha dut a terme el desenvolupament de dos sistemes multienzimàtics utilitzant enzims lliures, fent servir l'enzim PDC com a nexa comú entre els dos.

Per una banda s'ha desenvolupat un sistema multienzimàtic com a tecnologia CCU per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO_2 i etanol, aprofitant la reacció de carboxilació catalitzada per la PDC.

Per altra banda s'ha estudiat un sistema multienzimàtic com a bioprocés bio-basat per a la producció d'acetoina a partir d'etanol, aprofitant la reacció de carbolligació catalitzada per la PDC.

Per a tots dos casos, s'ha dut a terme la producció dels enzims ScADH, ScPDC i TmLDH i purificació dels enzims ScADH, ZpPDC, ScPDC, TmLDH i SpNOX.

Del primer objectiu, que ha estat **la obtenció dels enzims necessaris per a les reaccions**, amb els resultats obtinguts podem extreure les següents conclusions:

- S'ha aconseguit dur a terme la producció de la ScADH, ScPDC i TmLDH (expressades amb una cua d'histidines) en cultius d'alta densitat cel·lular, utilitzant una soca d'*E. coli* amb un sistema de selecció basat en una auxotròfia. D'aquesta manera, s'ha pogut dur a terme la producció dels tres enzims sense necessitar d'aplicar antibiòtics durant el cultiu, i aconseguint les quantitats necessàries per satisfer les necessitats d'enzims per als estudis posteriors. En aquest sentit, el cultiu *fed-batch* de l'enzim ScADH ha assolit una concentració de biomassa de $55,8 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ i una producció específica de $6.579,7 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$, el de l'enzim ScPDC ha assolit una concentració de biomassa de $21,3 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ i una producció específica de $1.181,4 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$ i el de l'enzim TmLDH ha assolit una concentració de biomassa de $41,7 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ i una producció específica de $1.369,3 \text{ U} \cdot \text{gDCW}^{-1}$. En concret, cada cultiu d'alta densitat cel·lular ha permès produir 1.394.409 unitats d'ScADH, 78.119 unitats d'ScPDC i 208.173 unitats de TmLDH.
- S'han desenvolupat dos mètodes de purificació: un mètode basat en una cromatografia d'intercanvi iònic, amb una resina de MANA-agarosa, per a la purificació de l'enzim ZpPDC, i un altre mètode basat en una cromatografia d'afinitat, amb una resina de Ni^{2+} -IDA-agarosa, per a la purificació dels enzims ScADH, ScPDC, TmLDH i SpNOX. Els dos mètodes, juntament amb un procés de "*desalting*" per eliminar l'excés de sals i/o imidazol han permès obtenir un alt rendiment de purificació i puresa. En el cas de la ZpPDC s'obté un rendiment global en activitat del 100% i un grau de purificació de 4,4. En el cas de la ScADH, la millora del procés ha permès obtenir un rendiment global en activitat del 66,9%, on es detecta que el "*desalting*" és el procés limitant amb un rendiment del 62,1%, i un grau de purificació de 3,6. En el cas de la ScPDC, després de la millora del procés, s'aconsegueix passar d'un rendiment global en activitat del 35,4 al 100% amb un grau de purificació de 5,5. En el cas de la TmLDH, es detecta que en la cromatografia d'afinitat hi ha una fracció de l'enzim que es dirigeix a la fracció de "No retint" obtenint un rendiment en aquesta etapa del 77,2% i sent l'etapa limitant, obtenint un rendiment global en activitat del 66,6% i un grau de purificació de 8,2. En el cas de la SpNOX, la millora en el procés de purificació permet recuperar el 86,0% de l'activitat al final del procés amb un grau de purificació de 3,1, sent el procés de "*desalting*" el pas limitant de la purificació.
- Ha estat possible dur a terme la liofilització de tots els enzims, tot i que el rendiment ha estat inferior a l'esperat en els casos de la ScADH (amb un rendiment del 64,2%) i de la SpNOX (amb un rendiment del 56%), però en general el rendiment es troba al voltant del

7. Conclusions generals

80%, en concret, s'obté un rendiment del 86% per a la ScPDC, un 72,1% per a la ZpPDC i un 80,1% per a la TmLDH. Es conclou que, tot i ser una primera aproximació al procés de liofilització, aquest requereix d'un control més precís de les condicions del procés per tal de millorar encara més els rendiments obtinguts en aquesta tesi.

Del segon objectiu de la tesi, que ha estat el **desenvolupament d'un sistema CCU basat en una reacció multienzimàtica per a la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol**, amb els resultats obtinguts podem extreure les següents conclusions:

- La caracterització dels enzims ha permès determinar la finestra d'operació del sistema en *one pot*, a més de determinar les seves limitacions. En concret, es conclou que el rang de pH s'ha de trobar entre 7 i 9, que l'etanol no afecta als enzims implicats fins a una concentració d'1 M, i que hi ha compostos del gas dels alts forns de l'acereria que tenen efecte sobre l'activitat i/o estabilitat dels enzims.
- L'estudi de les reaccions individuals ha permès detectar les limitacions del sistema multienzimàtic. Per una banda, la reacció catalitzada per la ScADH, tal i com predia la termodinàmica, es troba desplaçada cap a l'etanol, i fortament afectada pel pH, obtenint 2,45 mM d'acetaldehid a partir de 50 mM d'etanol i 10 mM de NAD⁺. I per altra banda, la reacció catalitzada per la PDC que també es troba desplaçada cap als substrats (CO₂ i acetaldehid). Ha estat rellevant l'estudi de dues variants de l'enzim (la ZpPDC bacteriana i la ScPDC de llevat), ja que aquest enzim també és capaç de produir acetoïna a partir de dues molècules d'acetaldehid, escollint la ScPDC en comptes de la ZpPDC per la menor producció d'aquest compost, fins i tot quan s'aconsegueix produir àcid làctic per acoblament amb l'enzim TmLDH. Es demostra també, que les quantitats d'enzim (sobretot la ScPDC) i les proporcions entre enzims són un factor clau per a la millora del procés, obtenint la major concentració d'àcid làctic (29,29 µM) amb 150 U · mL⁻¹ de ScPDC i una proporció de 0,5 ScADH/ScPDC i 1,25 TmLDH/ScPDC, concloent que és possible la síntesi d'àcid làctic a partir de CO₂ i etanol en les condicions estudiades. A més, el medi de reacció també té un efecte important sobre la producció d'àcid làctic, sent el tampó MOPS el que presenta millors resultats (250 µM d'àcid làctic) en les millors condicions estudiades, superant la concentració d'àcid làctic mai reportada amb aquest sistema (87 µM). Tanmateix, es conclou que la producció encara és massa baixa per a la seva viabilitat econòmica en una futura aplicació industrial, i amb els resultats obtinguts destaca la necessitat d'eliminar qualsevol compost que pugui tenir un efecte negatiu sobre el sistema, i la de millorar la reacció limitant del sistema (la síntesi d'àcid pirúvic) per exemple a través de la millora, per enginyeria de proteïnes, de l'afinitat pel CO₂ de l'enzim ScPDC.
- Es demostra la capacitat del sistema multienzimàtics de produir 69 µM d'àcid làctic fins i tot en condicions industrialment rellevants, utilitzant una mescla de gasos que imita la composició del gas dels alts forns, fet que no s'havia demostrat mai fins ara.
- S'estudia la immobilització dels enzims en diferents suports, basats en una matriu hidrofòbica (metacrilat) funcionalitzada amb grups epòxid o amino, i un altra hidrofílica (agarosa) funcionalitzada amb grups epòxid, amino o Ni²⁺-IDA. Els millors resultats per a la immobilització per separat de la ScADH, ScPDC i TmLDH s'aconsegueix amb la

7. Conclusions generals

immobilització a través de la cua d'histidines utilitzant el suport Ni^{2+} -IDA-agarosa. S'aconsegueixen alts rendiments d'immobilització i activitats retingudes de fins al 100%. En el cas de la ScADH, la que es comporta pitjor en la immobilització, s'obté un rendiment d'immobilització del 98% i la millor activitat retinguda utilitzant aquest suport (38,90%). En el cas de la ScPDC, s'obté un rendiment del 100% amb una activitat retinguda del 100%, i en el cas de la TmLDH, s'obté un rendiment del 84,62% i una activitat retinguda del 86,54%.

- Es van immobilitzar a màxima càrrega, i per separat, els tres enzims en el suport Ni^{2+} -IDA-agarosa, amb $1.468,0 \text{ U} \cdot \text{g suport}^{-1}$ obtingudes per a la ScADH, $1.603,4 \text{ U} \cdot \text{g suport}^{-1}$ obtingudes per a la ScPDC, i $1.177,6 \text{ U} \cdot \text{g suport}^{-1}$ per a la TmLDH, concordant amb els valors teòrics segons especificacions del fabricant del suport. Aquests derivats, amb les proporcions adequades per arribar a les condicions òptimes de quantitats i proporcions dels enzims, s'utilitzen en les condicions de reacció on s'obté la millor concentració d'àcid làctic, obtenint uns resultats similars als enzims solubles durant les 24h de reacció. La reutilització dels derivats és possible fins al segon cicle de reacció, observant una reducció en el rendiment de reacció al tercer cicle.

Finalment, del tercer objectiu de la tesi, que ha estat el **desenvolupament d'un sistema de reacció multienzimàtic per a la síntesi l'acetoïna bio-basada**, amb els resultats obtinguts podem extreure les següents conclusions:

- Se selecciona la ZpPDC, la PDC bacteriana, degut a les seves característiques observades en l'estudi del sistema multienzimàtic anterior, pel que fa a la síntesi d'acetoïna.
- L'estudi més detallat d'aquesta reacció revela que la ZpPDC és capaç de catalitzar, amb un alt rendiment i conversió, la reacció de síntesi d'acetoïna a partir d'acetaldehid, aconseguint més d'un 90% de rendiment i conversió a pH 6 en 96 hores de reacció.
- La comparativa entre les reaccions amb enzims purificats o lisats cel·lulars, demostra que és imprescindible la utilització d'enzims purificats per evitar les reaccions secundàries que consumeixen els components del sistema (etanol, acetaldehid i acetoïna), ja que s'aconsegueix passar de 1,0 mM a 15,7 mM d'acetoïna a les 48 hores de reacció a pH 7,5.
- L'aplicació d'un sistema de regeneració de cofactor basat en la reacció catalitzada per l'enzim SpNOX permet millorar l'eficiència del procés, resultant en una conversió completa (100%) a partir de 50 mM d'etanol i 10 mM de NAD^+ . Si es redueix la concentració de NAD^+ a 1 mM s'aconsegueix millorar el nombre de recanvi de 5 a 38 mols de producte per mol de cofactor. Tanmateix, la baixa estabilitat de la SpNOX en les condicions de reacció és el factor limitant del procés, i per tant cal tenir en compte per a l'aplicació de millores, com la millora en l'estabilitat de l'enzim (per enginyeria de proteïnes o immobilització de l'enzim), enfocades a una futura aplicació industrial.

8. Agraïments

8. Agraïments

8.1. Finançament

La realització d'aquesta tesi ha format part dels projectes BIOCON-CO2 i DEMUBI.

El projecte BIOCONCO-2 ha rebut fons del programa de recerca i innovació de la UE Horizon 2020 sota el conveni de subvenció núm. **761042**.

"This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation programme under Grant Agreement n°761042 (BIOCON-CO2). This output reflects the views only of the author and the European Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein."



El projecte DEMUBI (**PID2022-139725OA-I00**) ha rebut Fons per part del ministeri de ciència i innovació (MCIN) i l'agència estatal d'investigació (AEI).

L'autor d'aquesta tesi també agraeix l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca (Generalitat de Catalunya) per la beca doctoral FI (**2019FI_B 00139**).

Aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme en el grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada - Eng4Bio, el qual està reconegut per la Generalitat de Catalunya amb l'SGR **2017SGR01462** i **2021SGR00143**.

8. Agraïments

8.2. Contribuïdors

I per concloure aquesta memòria de tesi doctoral, voldria agrair a totes les persones que d'alguna manera o altra han contribuït al llarg de la tesi, des del treball al laboratori, gestions acadèmiques o realització d'aquesta memòria, fins a tot el suport i ànim, i que sense elles no hagués arribat fins on sóc ara.

Primerament agrair als meus directors, Goyo i Marina, que s'han implicat a fons des del principi fins al final. Agraeixo tota l'ajuda rebuda per part seva, i la paciència en un camí que no ha estat gens fàcil, ple d'obstacles i reptes que hem anat superant un a un. Vull destacar que el treball que aquí presento no són només els resultats obtinguts del meu treball, sinó que són un reflex de l'enorme contribució i treball com a directors durant aquest anys. Per tot això, i més, moltíssimes gràcies, el que he après durant aquests anys té molt valor per a mi.

En segon lloc, agrair a tots els companys i companyes de doctorat, estudiants i alumnes de grau i màster, per no fer-me sentir sol i acompanyar-me en aquesta odissea de la tesi doctoral. Pels que ja han marxat (Miquel, Jordi, Lusimi, Natàlia, Mario, i al grup de lipases) i pels que han vingut (David, Ivan, Garazi, Darly, Yerko, Roberto), eternament agraït per fer més suportable les penes, i gaudir al màxim de les glòries i els bons moments.

En tercer lloc, un racó molt especial per a la meua família (mama, papa i Carla), per ser un exemple de superació, i que de tot se'n pot sortir, sigui com sigui. I és que cadascun de nosaltres som peces d'un trencaclosques anomenat família, i que no estaria complet si faltés algú de nosaltres. No hi ha paraules que descriguin l'amor que he rebut, i l'ajuda emocional que he necessitat per fer front a aquest gran repte que finalment ha conclòs. Gràcies infinites, ja que sense ells aquesta memòria no existiria. I no voldria deixar de banda a la resta de la família, per compartir bons moments i records. Als avis i l'àvia que ens han deixat (i que en pau descansin), i la iaia que encara segueix al meu costat, gràcies.

Finalment, i no per això menys important, a la resta de persones que han format part d'aquest viatge, la secretaria, professors i altres membres del departament, i per a què consti en aquest document, gràcies per tota l'ajuda proporcionada.

A tots i totes,

Gràcies per tot.

9. Contribucions científiques

9. Contribucions científiques

- *Zymobacter palmae* Pyruvate Decarboxylase Production Process Development: Cloning in *Escherichia coli*.

Alcover, N.; Carceller, A.; Álvaro, G.; Guillén, M. Engineering in Life Sciences. **2019**, 19 (7), 502–512.

<https://doi.org/10.1002/elsc.201900010>.

- Lactic Acid from CO₂: A Carbon Capture and Utilization Strategy Based on a Biocatalytic Approach

Carceller, A., Guillén, M., & Álvaro, G. *Environmental science & technology*,. Advance online publication, **2023**.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.3c05455>

- Synthetic biocatalytic route for the synthesis of biobased acetoin from ethanol.

Carceller, A., Muñoz, D., Guillén, M., & Álvaro, G. Pendent de publicació.

10. Bibliografia

10. Bibliografia

- (1) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- (2) Delidovich, I.; Palkovits, R. Catalytic versus Stoichiometric Reagents as a Key Concept for Green Chemistry. *Green Chem.* **2016**, *18* (3), 590–593. <https://doi.org/10.1039/c5gc90070k>.
- (3) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (2), 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- (4) Sheldon, R. A.; Brady, D. Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. *ChemSusChem* **2022**, *15* (9). <https://doi.org/10.1002/cssc.202102628>.
- (5) Domínguez de María, P. Biocatalysis, Sustainability, and Industrial Applications: Show Me the Metrics. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *31*, 100514. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100514>.
- (6) Lima-Ramos, J.; Tufvesson, P.; Woodley, J. M. Application of Environmental and Economic Metrics to Guide the Development of Biocatalytic Processes. *Green Process. Synth.* **2014**, *3* (3), 195–213. <https://doi.org/10.1515/gps-2013-0094>.
- (7) 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), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.
- (8) Lin, B.; Tao, Y. Whole-Cell Biocatalysts by Design. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0724-7>.
- (9) Benítez-Mateos, A. I.; Roura Padrosa, D.; Paradisi, F. Multistep Enzyme Cascades as a Route towards Green and Sustainable Pharmaceutical Syntheses. *Nature Chemistry*. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41557-022-00931-2>.
- (10) Dudley, Q. M.; Karim, A. S.; Jewett, M. C. Cell-Free Metabolic Engineering: Biomanufacturing beyond the Cell. *Biotechnology Journal*. 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201400330>.
- (11) Liu, H.; Bowie, J. U. Cell-Free Synthetic Biochemistry Upgrading of Ethanol to 1,3 Butanediol. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88899-w>.
- (12) Ardao, I.; Hwang, E. T. ae.; Zeng, A. P. In Vitro Multienzymatic Reaction Systems for Biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2013**, *137*, 153–184. https://doi.org/10.1007/10_2013_232.
- (13) Beigi, M.; Gauchenova, E.; Walter, L.; Waltzer, S.; Bonina, F.; Stillger, T.; Rother, D.; Pohl, M.; Müller, M. Regio- and Stereoselective Aliphatic–Aromatic Cross-Benzoin Reaction: Enzymatic Divergent Catalysis. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (39). <https://doi.org/10.1002/chem.201602084>.
- (14) Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A. A Green-by-Design Biocatalytic Process for Atorvastatin Intermediate. *Green Chem.* **2010**, *12* (1). <https://doi.org/10.1039/b919115c>.
- (15) Huffman, M. A.; Fryszkowska, A.; Alvizo, O.; Borra-Garske, M.; Campos, K. R.; Canada, K. A.; Devine, P. N.; Duan, D.; Forstater, J. H.; Grosser, S. T.; Halsey, H. M.; Hughes, G. J.; Jo, J.; Joyce, L. A.; Kolev, J. N.; Liang, J.; Maloney, K. M.; Mann, B. F.; Marshall, N. M.; McLaughlin, M.; Moore, J. C.; Murphy, G. S.; Nawrat, C. C.; Nazor, J.; Novick, S.; Patel, N. R.; Rodriguez-

10. Bibliografia

- Granillo, A.; Robaire, S. A.; Sherer, E. C.; Truppo, M. D.; Whittaker, A. M.; Verma, D.; Xiao, L.; Xu, Y.; Yang, H. Design of an in Vitro Biocatalytic Cascade for the Manufacture of Islatravir. *Science* (80-.). **2019**, 366 (6470). <https://doi.org/10.1126/science.aay8484>.
- (16) Ruales-Salcedo, A. V.; Higuera, J. C.; Fontalvo, J.; Woodley, J. M. Design of Enzymatic Cascade Processes for the Production of Low-Priced Chemicals. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2019**, 74 (3–4). <https://doi.org/10.1515/znc-2018-0190>.
- (17) Engelmann, C.; Johannsen, J.; Waluga, T.; Fieg, G.; Liese, A.; Bubenheim, P. A Multi-Enzyme Cascade for the Production of Highvalue Aromatic Compounds. *Catalysts* **2020**, 10 (10). <https://doi.org/10.3390/catal10101216>.
- (18) Gmelch, T. J.; Sperl, J. M.; Sieber, V. Optimization of a Reduced Enzymatic Reaction Cascade for the Production of L-Alanine. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48151-y>.
- (19) Li, X. Y.; Huang, J. Y.; Zhou, Q.; Xu, Y. Y.; Prabhu, P.; Zhang, Y. W. Immobilization of Alcohol Dehydrogenase, Acetaldehyde Lyase, and NADH Oxidase for Cascade Enzymatic Conversion of Ethanol to Acetoin. *Energies* **2022**, 15 (12). <https://doi.org/10.3390/en15124242>.
- (20) Jiang, Y.; Li, Z.; Zheng, S.; Xu, H.; Zhou, Y. J.; Gao, Z.; Meng, C.; Li, S. Establishing an Enzyme Cascade for One-Pot Production of α -Olefins from Low-Cost Triglycerides and Oils without Exogenous H₂O₂ Addition. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01684-1>.
- (21) Zezzi Do Valle Gomes, M.; Masdeu, G.; Eiring, P.; Kuhlemann, A.; Sauer, M.; Åkerman, B.; Palmqvist, A. E. C. Improved Biocatalytic Cascade Conversion of CO₂ to Methanol by Enzymes Co-Immobilized in Tailored Siliceous Mesostructured Cellular Foams. *Catal. Sci. Technol.* **2021**, 11 (21). <https://doi.org/10.1039/d1cy01354h>.
- (22) Chen, Y.; Connors, S. *Global Warming of 1.5°C : Summary for Policymakers, Technical Summary and Frequently Asked Questions*; Masson-Delmotte, V., Pörtner, H.-O., Skea, J., Zhai, P., Roberts, D., Shukla, P. R., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Matthews, J. B. R., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M. I., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M., Waterfield, T., Eds.; Intergovernmental Panel on Climate Change, 2019.
- (23) Bierbaumer, S.; Nattermann, M.; Schulz, L.; Zschoche, R.; Erb, T. J.; Winkler, C. K.; Tinzl, M.; Glueck, S. M. Enzymatic Conversion of CO₂: From Natural to Artificial Utilization. *Chem. Rev.* **2023**, 123 (9), 5702–5754. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00581>.
- (24) Xu, L.; Xiu, Y.; Liu, F.; Liang, Y.; Wang, S. Research Progress in Conversion of CO₂ to Valuable Fuels. *Molecules* **2020**, 25 (16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163653>.
- (25) Ren, S.; Wang, Z.; Bilal, M.; Feng, Y.; Jiang, Y.; Jia, S.; Cui, J. Co-Immobilization Multienzyme Nanoreactor with Co-Factor Regeneration for Conversion of CO₂. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 155, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.177>.
- (26) Wang, X.; Li, Z.; Shi, J.; Wu, H.; Jiang, Z.; Zhang, W.; Song, X.; Ai, Q. Bioinspired Approach to Multienzyme Cascade System Construction for Efficient Carbon Dioxide Reduction. *ACS Catal.* **2014**, 4 (3). <https://doi.org/10.1021/cs401096c>.
- (27) Martin, J.; Eisoldt, L.; Skerra, A. Fixation of Gaseous CO₂ by Reversing a Decarboxylase for the Biocatalytic Synthesis of the Essential Amino Acid L-Methionine. *Nat. Catal. J., Eisoldt, L., Skerra, A., 2018. Fixat. gaseous CO2 by reversing a decarboxylase Biocatal. Synth.*

10. Bibliografia

- Essent. Amin. acid l-methionine. Nat. Catal.* <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0107-4> **2018**. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0107-4>.
- (28) European Commission. *A Sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the Connection between Economy, Society and the Environment*; EU Publications Office: Brussels, 2018. <https://doi.org/10.2777/478385>.
- (29) Velasco-Lozano, S.; Santiago-Arcos, J.; Mayoral, J. A.; López-Gallego, F. Co-Immobilization and Colocalization of Multi-Enzyme Systems for the Cell-Free Biosynthesis of Aminoalcohols. *ChemCatChem* **2020**, *12* (11). <https://doi.org/10.1002/cctc.201902404>.
- (30) Lait, S. M.; Ranric, D. A.; Keay, B. A. 1,3-Aminoalcohols and Their Derivatives in Asymmetric Organic Synthesis. *Chemical Reviews*. 2007. <https://doi.org/10.1021/cr050065q>.
- (31) Zhang, Y.; Liu, D.; Chen, Z. Production of C2-C4 Diols from Renewable Bioresources: New Metabolic Pathways and Metabolic Engineering Strategies. *Biotechnology for Biofuels*. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0992-9>.
- (32) Rezaei, S.; Landarani-Isfahani, A.; Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.; Mirkhani, V.; Mohammadpoor-Baltork, I. Development of a Novel Bi-Enzymatic Silver Dendritic Hierarchical Nanostructure Cascade Catalytic System for Efficient Conversion of Starch into Gluconic Acid. *Chem. Eng. J.* **2019**, *356*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.046>.
- (33) Talekar, S.; Pandharbale, A.; Ladole, M.; Nadar, S.; Mulla, M.; Japhalekar, K.; Pattankude, K.; Arage, D. Carrier Free Co-Immobilization of Alpha Amylase, Glucoamylase and Pullulanase as Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates (Combi-Cleas): A Tri-Enzyme Biocatalyst with One Pot Starch Hydrolytic Activity. *Bioresour. Technol.* **2013**, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.035>.
- (34) Bachosz, K.; Zdarta, J.; Bilal, M.; Meyer, A. S.; Jesionowski, T. Enzymatic Cofactor Regeneration Systems: A New Perspective on Efficiency Assessment. *Sci. Total Environ.* **2023**, *868* (November 2022). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161630>.
- (35) Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M. Cofactor Regeneration for Enzyme-Catalysed Synthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6* (1), 221–270. <https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647849>.
- (36) Moyer, C. L.; Eric Collins, R.; Morita, R. Y. Psychrophiles and Psychrotrophs. In *Reference Module in Life Sciences*; 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.02282-2>.
- (37) Bajpai, P. *Developments and Applications of Enzymes From Thermophilic Microorganisms*; 2023. <https://doi.org/10.1016/C2022-0-01208-3>.
- (38) Chang, A.; Jeske, L.; Ulbrich, S.; Hofmann, J.; Koblit, J.; Schomburg, I.; Neumann-Schaal, M.; Jahn, D.; Schomburg, D. BRENDA, the ELIXIR Core Data Resource in 2021: New Developments and Updates. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>.
- (39) Bairoch, A.; Apweiler, R.; Wu, C. H.; Barker, W. C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Gasteiger, E.; Huang, H.; Lopez, R.; Magrane, M.; Martin, M. J.; Natale, D. A.; O'Donovan, C.; Redaschi, N.; Yeh, L. S. L. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (DATABASE ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>.
- (40) Robinson, P. K. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem.* **2015**, *59*. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>.

10. Bibliografía

- (41) Siegel, J. B.; Smith, A. L.; Poust, S.; Wargacki, A. J.; Bar-Even, A.; Louw, C.; Shen, B. W.; Eiben, C. B.; Tran, H. M.; Noor, E.; Gallaher, J. L.; Bale, J.; Yoshikuni, Y.; Gelb, M. H.; Keasling, J. D.; Stoddard, B. L.; Lidstrom, M. E.; Baker, D. Computational Protein Design Enables a Novel One-Carbon Assimilation Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1500545112>.
- (42) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* **2014**, *5* (APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
- (43) Brondyk, W. H. *Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 463. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1).
- (44) Gómez, S.; Fernández, F. J.; Vega, M. C. Heterologous Expression of Proteins in Aspergillus. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*; 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00004-X>.
- (45) Bio-rad laboratories. *Protein Expression and Purification Series*, Ver. C.; Bio-Rad Laboratories, Inc, 2017.
- (46) Zhang, K.; Su, L.; Duan, X.; Liu, L.; Wu, J. High-Level Extracellular Protein Production in Bacillus Subtilis Using an Optimized Dual-Promoter Expression System. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0649-1>.
- (47) Vidal, L.; López-Santín, J.; Caminal, G.; Ferrer, P. Development of an Antibiotic-Free Plasmid Selection System Based on Glycine Auxotrophy for Recombinant Protein Overproduction in Escherichia Coli. *J. Biotechnol.* **2008**, *134* (2), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0950-8>.
- (48) Peubez, I.; Chaudet, N.; Mignon, C.; Hild, G.; Husson, S.; Courtois, V.; De Luca, K.; Speck, D.; Sodoier, R. Antibiotic-Free Selection in E. Coli: New Considerations for Optimal Design and Improved Production. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-65>.
- (49) Shiloach, J.; Fass, R. Growing E. Coli to High Cell Density - A Historical Perspective on Method Development. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23* (5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>.
- (50) Yee, L.; Blanch, H. W. Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of Escherichia Coli. *Bio/Technology* **1992**, *10* (12), 1550–1556. <https://doi.org/10.1038/nbt1292-1550>.
- (51) Pinsach, J.; de Mas, C.; López-Santín, J. Induction Strategies in Fed-Batch Cultures for Recombinant Protein Production in Escherichia Coli: Application to Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase. *Biochem. Eng. J.* **2008**, *41* (2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.04.013>.
- (52) Vidal, L.; Ferrer, P.; Álvaro, G.; Benaiges, M. D.; Caminal, G. Influence of Induction and Operation Mode on Recombinant Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase Production by Escherichia Coli Using the T5 Promoter. *J. Biotechnol.* **2005**, *118* (1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.02.012>.
- (53) de Gonzalo, G.; Lavandera, I. *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and*

10. Bibliografia

- Applications*; 2021. <https://doi.org/10.1002/9783527824465>.
- (54) Bornhorst, J. A.; Falke, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol.* **2000**, 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8).
- (55) Alcover, N.; Álvaro, G.; Guillén, M. Chiral Synthesis of 3-Amino-1-Phenylbutane by a Multi-Enzymatic Cascade System. *Catalysts* **2021**, 11 (8). <https://doi.org/10.3390/catal11080973>.
- (56) Siegert, P.; McLeish, M. J.; Baumann, M.; Iding, H.; Kneen, M. M.; Kenyon, G. L.; Pohl, M. Exchanging the Substrate Specificities of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas Mobilis* and Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas Putida*. *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, 18 (7), 345–357. <https://doi.org/10.1093/protein/gzi035>.
- (57) Demir, A. S.; Ayhan, P.; Betül Sopaci, S. Thiamine Pyrophosphate Dependent Enzyme Catalyzed Reactions: Stereoselective C-C Bond Formations in Water. *Clean - Soil, Air, Water* **2007**, 35 (5), 406–412. <https://doi.org/10.1002/clen.200720003>.
- (58) Bao, W.; Shen, W.; Peng, Q.; Du, J.; Yang, S. Metabolic Engineering of *Zymomonas Mobilis* for Acetoin Production by Carbon Redistribution and Cofactor Balance. *Fermentation* **2023**, 9 (2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020113>.
- (59) Buddrus, L.; Andrews, E. S. V.; Leak, D. J.; Danson, M. J.; Arcus, V. L.; Crennell, S. J. Crystal Structure of an Inferred Ancestral Bacterial Pyruvate Decarboxylase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2018**, 74 (3), 179–186. <https://doi.org/10.1107/S2053230X18002819>.
- (60) Alcover, N.; Carceller, A.; Álvaro, G.; Guillén, M. Zymobacter Palmae Pyruvate Decarboxylase Production Process Development: Cloning in *Escherichia Coli*, Fed-Batch Culture and Purification. *Eng. Life Sci.* **2019**, 19 (7), 502–512. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900010>.
- (61) Gocke, D.; Graf, T.; Brosi, H.; Frindi-Wosch, I.; Walter, L.; Müller, M.; Pohl, M. Comparative Characterisation of Thiamin Diphosphate-Dependent Decarboxylases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, 61 (1–2), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.03.019>.
- (62) Siegert, P.; McLeish, M. J.; Baumann, M.; Iding, H.; Kneen, M. M.; Kenyon, G. L.; Pohl, M. Exchanging the Substrate Specificities of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas Mobilis* and Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas Putida*. *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, 18 (7), 345–357. <https://doi.org/10.1093/protein/gzi035>.
- (63) Bosch, M. (Technical C.; Ponte, X. (Administrative C.; Reuver, M. (Communication & P.; Sarsfield, S. (Communication & P. *BIOCON-CO2 (BIOTEchnological processes based on microbial platforms for the CONversion of CO2 from the iron and steel industry into commodities for chemicals and plastics)*. <https://biocon-co2.eu/> (accessed 2023-12-01).
- (64) Research, A. I. *Market volume of lactic acid worldwide from 2015 to 2022*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/1310495/lactic-acid-market-volume-worldwide/> (accessed 2023-12-17).
- (65) Azimonti, G.; Bampidis, V.; Bastos, M. de L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Fašmon Durjava, M.; Kouba, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, F.; Mayo, B.; Pechová, A.; Petkova, M.; Ramos, F.; Sanz, Y.; Villa, R. E.; Woutersen, R.; Maradona, M. P.; Anguita, M.; Galobart, J.; Pettenati, E.; Tarrés-Call, J. Safety and Efficacy of a Feed Additive Consisting of Lactic Acid Produced by *Weizmannia Coagulans* (Synonym *Bacillus Coagulans*) DSM 32789 for All Animal Species except for Fish (Jungbunzlauer SA). *EFSA J.* **2022**, 20 (4).

10. Bibliografia

- <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7268>.
- (66) Abdel-Rahman, M. A.; Sonomoto, K. Opportunities to Overcome the Current Limitations and Challenges for Efficient Microbial Production of Optically Pure Lactic Acid. *Journal of Biotechnology*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.008>.
- (67) Patel, M.; Manuela, K.; Dornburg, V.; Hermann, B.; Roes, L.; Hüsing, B.; Overbeek, L.; Terragni, F. Medium and Long-Term Opportunities and Risks of the Biotechnological Production of Bulk Chemicals from Renewable Resources - The Potential of White Biotechnology. **2006**, No. September 2006.
- (68) Leskovac, V.; Trivić, S.; Peričin, D. The Three Zinc-Containing Alcohol Dehydrogenases from Baker's Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2002**, 2 (4), 481–494. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00157-5).
- (69) Raj, K. C.; Talarico, L. A.; Ingram, L. O.; Maupin-Furlow, J. A. Cloning and Characterization of the *Zymobacter Palmæ* Pyruvate Decarboxylase Gene (PDC) and Comparison to Bacterial Homologues. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68 (6), 2869–2876. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2869-2876.2002>.
- (70) Arjunan, P.; Umland, T.; Dyda, F.; Swaminathan, S.; Furey, W.; Sax, M.; Farrenkopf, B.; Gao, Y.; Zhang, D.; Jordan, F. Crystal Structure of the Thiamin Diphosphate-Dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1996**, 256 (3), 590–600. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0111>.
- (71) Ostendorp, R.; Auerbach, G.; Jaenicke, R. Extremely Thermostable L(+)-Lactate Dehydrogenase from *Thermotoga Maritima*: Cloning, Characterization, and Crystallization of the Recombinant Enzyme in Its Tetrameric and Octameric State. *Protein Sci.* **1996**, 5 (5), 862–873. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050508>.
- (72) Rudrappa, T.; Biedrzycki, M. L.; Kunjeti, S. G.; Donofrio, N. M.; Czymmek, K. J.; Paré, P. W.; Bais, H. P. The Rhizobacterial Elicitor Acetoin Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis Thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* **2010**, 3 (2). <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10584>.
- (73) Ryu, C. M.; Faragt, M. A.; Hu, C. H.; Reddy, M. S.; Wei, H. X.; Paré, P. W.; Kloepper, J. W. Bacterial Volatiles Promote Growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (8), 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.
- (74) Werpy, T.; Petersen, G. *Top Value-Added Chemicals from Biomass: Vol. I. Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*; Golden, CO (United States), 2004.
- (75) Xiao, Z.; Lu, J. R. Generation of Acetoin and Its Derivatives in Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (28), 6487–6497. <https://doi.org/10.1021/jf5013902>.
- (76) Meng, W.; Ma, C.; Xu, P.; Gao, C. Biotechnological Production of Chiral Acetoin. *Trends Biotechnol.* **2022**, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.01.008>.
- (77) Vigon. *Acetoin Natural (Acetyl Methyl Carbinol)*. <https://www.vigon.com/product/acetoin-natural-acetyl-methyl-carbinol/> (accessed 2023-12-31).
- (78) Trading Economics. *Ethanol*. <https://tradingeconomics.com/commodity/ethanol> (accessed 2023-12-31).
- (79) Melendez, J. R.; Mátyás, B.; Hena, S.; Lowy, D. A.; El Salous, A. Perspectives in the Production of Bioethanol: A Review of Sustainable Methods, Technologies, and

10. Bibliografia

- Bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112260>.
- (80) Gao, H.; Tiwari, M. K.; Kang, Y. C.; Lee, J. K. Characterization of H₂O-Forming NADH Oxidase from *Streptococcus Pyogenes* and Its Application in L-Rare Sugar Production. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (5), 1931–1935. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.049>.
- (81) Benito, M.; Román, R.; Ortiz, G.; Casablancas, A.; Álvaro, G.; Caminal, G.; González, G.; Guillén, M. Cloning, Expression, and One - Step Purification / Immobilization of Two Carbohydrate - Binding Module - Tagged Alcohol Dehydrogenases. *J. Biol. Eng.* **2022**, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00295-8>.
- (82) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (83) Valencia, D.; Guillén, M.; Fürst, M. J. L. J.; López-Santín, J.; Álvaro, G. An Immobilized and Highly Stabilized Self-Sufficient Monooxygenase as Biocatalyst for Oxidative Biotransformations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, 93 (4). <https://doi.org/10.1002/jctb.5450>.
- (84) Pasini, M.; Fernández-Castané, A.; Jaramillo, A.; de Mas, C.; Caminal, G.; Ferrer, P. Using Promoter Libraries to Reduce Metabolic Burden Due to Plasmid-Encoded Proteins in Recombinant *Escherichia Coli*. *N. Biotechnol.* **2016**, 33 (1), 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.08.003>.
- (85) Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- (86) Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C. M.; Rodriguez, V.; Santana, C.; Soler, G.; Bastida, A.; Guisán, J. M. Preparation of Activated Supports Containing Low PK Amino Groups. A New Tool for Protein Immobilization via the Carboxyl Coupling Method. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15 (7), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90016-U](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90016-U).
- (87) Benito, M. Cloning, Expression and Purification/Immobilisation of CBM-Tagged Enzymes Involved in Multienzymatic Production of Lactic Acid, Universitat Autònoma de Barcelona, 2022.
- (88) Gupta, V.; Eshwari, A. N. S.; Panda, A. K.; Agarwal, G. P. Optimization of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography for Single-Step Purification of Recombinant Ovine Growth Hormone Expressed in *Escherichia Coli*. *J. Chromatogr. A* **2003**, 998 (1–2), 93–101. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00650-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00650-2).
- (89) Roy, I.; Gupta, M. N. Freeze-Drying of Proteins: Some Emerging Concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**, 39 (2), 165. <https://doi.org/10.1042/ba20030133>.
- (90) International Energy Agency. *Iron and Steel Technology Roadmap*; IEA Publications: France, 2020. <https://doi.org/10.1787/3dcc2a1b-en>.
- (91) Tong, X.; El-Zahab, B.; Zhao, X.; Liu, Y.; Wang, P. Enzymatic Synthesis of L-Lactic Acid from Carbon Dioxide and Ethanol with an Inherent Cofactor Regeneration Cycle. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108 (2), 465–469. <https://doi.org/10.1002/bit.22938>.
- (92) Martin, J.; Eisoldt, L.; Skerra, A. Fixation of Gaseous CO₂ by Reversing a Decarboxylase for the Biocatalytic Synthesis of the Essential Amino Acid L-Methionine. *Nat. Catal.* **2018**.

10. Bibliografia

- <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0107-4>.
- (93) Kim, C.; Kim, J.; Joo, S.; Bu, Y.; Liu, M.; Cho, J.; Kim, G. Efficient CO₂ Utilization via a Hybrid Na-CO₂ System Based on CO₂ Dissolution. *iScience* **2018**, *9*.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.027>.
- (94) Wrba, A.; Jaenicke, R.; Huber, R.; Stetter, K. O. Lactate Dehydrogenase from the Extreme Thermophile *Thermotoga Maritima*. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188* (1).
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15388.x>.
- (95) Kurkal, V.; Daniel, R. M.; Finney, J. L.; Tehei, M.; Dunn, R. V.; Smith, J. C. Enzyme Activity and Flexibility at Very Low Hydration. *Biophys. J.* **2005**, *89* (2), 1282–1287.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058677>.
- (96) Dickinson, F. M.; Monger, G. P. A Study of the Kinetics and Mechanism of Yeast Alcohol Dehydrogenase with a Variety of Substrates. *Biochem. J.* **1973**, *131* (2).
<https://doi.org/10.1042/bj1310261>.
- (97) Fernández-Lucas, J. New Insights on Enzyme Stabilization for Industrial Biocatalysis. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 2021.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06785>.
- (98) van Schie, M. M. C. H.; Spöring, J. D.; Bocola, M.; Domínguez de María, P.; Rother, D. Applied Biocatalysis beyond Just Buffers - From Aqueous to Unconventional Media. Options and Guidelines. *Green Chemistry*. 2021. <https://doi.org/10.1039/d1gc00561h>.
- (99) Staudt, S.; Bornscheuer, U. T.; Menyes, U.; Hummel, W.; Gröger, H. Direct Biocatalytic One-Pot-Transformation of Cyclohexanol with Molecular Oxygen into ϵ -Caprolactone. *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53* (4). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.011>.
- (100) Isik, S.; Kockar, F.; Arslan, O.; Guler, O. O.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the β -Class Enzyme from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* with Anions. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (24).
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.10.100>.
- (101) Beber, M. E.; Gollub, M. G.; Mozaffari, D.; Shebek, K. M.; Flamholz, A. I.; Milo, R.; Noor, E. EQuilibrator 3.0: A Database Solution for Thermodynamic Constant Estimation. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (D1), D603–D609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1106>.
- (102) Beer, B.; Pick, A.; Sieber, V. In Vitro Metabolic Engineering for the Production of α -Ketoglutarate. *Metab. Eng.* **2017**, *40* (December 2016), 5–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.02.011>.
- (103) Liu, Z.; Zhang, Y.; Jia, X.; Hu, M.; Deng, Z.; Xu, Y.; Liu, T. In Vitro Reconstitution and Optimization of the Entire Pathway to Convert Glucose into Fatty Acid. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (4). <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00348>.
- (104) Wightman, E. L. I.; Kroukamp, H.; Pretorius, I. S.; Paulsen, I. T.; Nevalainen, H. K. M. Rapid Optimisation of Cellulolytic Enzymes Ratios in *Saccharomyces Cerevisiae* Using in Vitro SCRaMbLE. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13* (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01823-8>.
- (105) Siedentop, R.; Claaßen, C.; Rother, D.; Lütz, S.; Rosenthal, K. Getting the Most out of Enzyme Cascades: Strategies to Optimize in Vitro Multi-enzymatic Reactions. *Catalysts* **2021**, *11* (10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/catal11101183>.
- (106) Häring, M.; Pérez-Madrigal, M. M.; Kühbeck, D.; Pettignano, A.; Quignard, F.; Díaz, D. D.

10. Bibliografia

- DNA-Catalyzed Henry Reaction in Pure Water and the Striking Influence of Organic Buffer Systems. *Molecules* **2015**, *20* (3), 4136–4147. <https://doi.org/10.3390/molecules20034136>.
- (107) Stevenson, B. J.; Liu, J. W.; Ollis, D. L. Directed Evolution of Yeast Pyruvate Decarboxylase 1 for Attenuated Regulation and Increased Stability. *Biochemistry* **2008**, *47* (9), 3013–3025. <https://doi.org/10.1021/bi701858u>.
- (108) Carceller, A; Guillén, M; Álvaro, G. Lactic Acid Synthesis from CO₂: A Carbon Capture and Utilization Strategy Based on a Biocatalytic Approach. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, *Under revi.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c05455>.
- (109) *Safety Assessment of Acetoin as a Food Ingredient*; University of California, San Francisco, 2002.
- (110) Rizzi, G. P. Formation of Pyrazines from Acyloin Precursors under Mild Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36* (2). <https://doi.org/10.1021/jf00080a026>.
- (111) Negishi, T.; Okano, T.; Yamamoto, T.; Kawamoto, S. Fly Attractant and Trap for Catching Fly. 2001–233709, 2001.
- (112) Chen, R. zhao; Li, yu. A Novel Plant Volatile Attractant Scheme to Protect Corn in China from the White-Spotted Flower Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *J. Pest Sci. (2004)*. **2011**, *84* (3). <https://doi.org/10.1007/s10340-011-0353-6>.
- (113) Frattini, A.; Machado, R.; Santiago, M. L.; Pellegrini, N.; Stachiotti, M. G.; Bolmaro, R.; De Sanctis, O. Effects of the Chelating Agent on the Fabrication of SBT Thin Films: Part II. Microstructural Properties. In *Ferroelectrics*; 2006; Vol. 335, pp 35–43. <https://doi.org/10.1080/00150190600689209>.
- (114) Machado, R.; Santiago, M. L.; Stachiotti, M. G.; Frattini, A.; Pellegrini, N.; Bolmaro, R.; De Sanctis, O. Effects of Acetoin as Chelating Agent on the Preparation of SrBi 2Ta2O₉ Thin Films from Non-Hydrolyzing Precursors. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2008**, *48* (3). <https://doi.org/10.1007/s10971-008-1812-2>.
- (115) Chen, H.; Du, Y.; Ma, Q.; Wei, Z.; Xiao, Z.; Xu, P.; Zeng, Y.; Zhang, Z. A Preparation Method of Butadione by Gas-Phase Oxidating 3-Hydroxy-Butanone. EP1826194, 2007.
- (116) Xiao, Z.; Ma, C.; Xu, P.; Lu, J. R. Acetoin Catabolism and Acetylbutanediol Formation by *Bacillus Pumilus* in a Chemically Defined Medium. *PLoS One* **2009**, *4* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005627>.
- (117) Ping, L.; Boland, W. Signals from the Underground: Bacterial Volatiles Promote Growth in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.008>.
- (118) Zhang, L.; Singh, R.; Sivakumar, D.; Guo, Z.; Li, J.; Chen, F.; He, Y.; Guan, X.; Kang, Y. C.; Lee, J. K. An Artificial Synthetic Pathway for Acetoin, 2,3-Butanediol, and 2-Butanol Production from Ethanol Using Cell Free Multi-Enzyme Catalysis. *Green Chem.* **2018**, *20* (1), 230–242. <https://doi.org/10.1039/c7gc02898a>.
- (119) Guo, S.; Tan, X.; Wang, Y.; Li, K.; Lü, C.; Ma, C.; Gao, C. Enhanced in Vitro Cascade Catalysis of Glycerol into Pyruvate and Acetoin by Integration with Dihydroxy Acid Dehydratase from *Paracaligenes Ureilyticus*. *Catalysts* **2021**, *11* (11). <https://doi.org/10.3390/catal11111282>.

10. Bibliografia

- (120) Tan, X.; Guo, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Lü, C.; Wang, Q.; Xu, P.; Ma, C.; Gao, C. Multi-Enzyme Cascade Excluding Costly Cofactors for Pyruvate Production from Glucose. *Chem. Eng. J.* **2023**, *463*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142473>.