

## OBTENCIÓN DE UN CATALIZADOR BIOLÓGICO PARA LA CONVERSIÓN DE CO<sub>2</sub> A FORMATO A PARTIR DE CUPRIAVIDUS NECATOR

Hintermeister, Emilia

Departamento de Física – FBCB-UNL

Director: Dr. Pablo J. González

Co-directora: Dra. María G. Rivas

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

El uso creciente de combustibles fósiles, combinado con la deforestación masiva ha provocado un incremento de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera terrestre, el cual no sólo causa la suba de las temperaturas globales, sino también la acidificación de los océanos. Las consecuencias de esto ya son evidentes en la actualidad, ya que afectan a factores ambientales y sociales (Sabine y col., 2004). Por ello, surge la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de producción sustentable de combustibles, que sean capaces de soportar las actividades de la población mundial, y en paralelo desarrollar procesos que permitan capturar el CO<sub>2</sub> atmosférico y, si es posible, transformarlo en productos de valor agregado. Una de las técnicas más investigadas en la actualidad es la conversión electroquímica de CO<sub>2</sub> en compuestos de carbono (C) con menor estado de oxidación (Ayers, 1994). Esto ha sido estudiado durante más de 100 años y el principal obstáculo es que no se puede controlar totalmente el producto obtenido. La electro-reducción del CO<sub>2</sub> puede llevarse a cabo tanto en soluciones acuosas como no acuosas y, dependiendo del catalizador, pH y potencial aplicado, este gas puede ser convertido en diferentes compuestos tales como el oxalato, ácido fórmico, monóxido de carbono, formaldehído, metanol o metano (Oloman y col., 2008). De esta lista, solo pueden ser utilizados directamente como combustibles alternativos metanol, metano y ácido fórmico. Este último posee una toxicidad mucho menor que la del metanol, es menos volátil y no es inflamable a concentraciones menores a 85%, aspectos que facilitarían su transporte sobre combustibles convencionales y alternativos (i.e. H<sub>2(g)</sub>), reduciendo los costos de manipulación y transporte (Reutemann y col., 2002)

Los organismos vivos han desarrollado a través de millones de años de evolución proteínas complejas que catalizan la captura y la transformación de CO<sub>2</sub> en compuestos de C reducidos. El proceso más conocido es probablemente la fotosíntesis, realizada por cianobacterias, algas y plantas. Existen al menos otras cinco vías metabólicas a través de las cuales los organismos vivos convierten CO<sub>2</sub> en compuestos de C reducidos. Sin embargo, estas vías dependen de enzimas muy complejas que generan compuestos de C que no pueden ser usados directamente como combustibles.

Este trabajo de investigación apunta a la obtención de una enzima capaz de convertir CO<sub>2(g)</sub> directamente en ácido fórmico (HCOOH), específicamente, una formato deshidrogenasa (FDH). Si bien las FDH son usadas por los organismos para obtener equivalentes de reducción catalizando la reacción de conversión de formato (HCOO<sup>-</sup>) a CO<sub>2</sub>, también son capaces de catalizar la reacción inversa cuando son sometidas a sobrepotenciales reductores. En este sentido, se está buscando aislar la FDH soluble y tolerante a O<sub>2(g)</sub> de *Cupriavidus necator* H16 (*C.n.*), una betaproteobacteria Gram-negativa capaz de crecer tanto en condiciones auto- como hetero-tróficas (Friedrich y col., 1979). Cuando *C.n.* es

Título del proyecto: Electro-reducción de dióxido de carbono a ácido fórmico: desarrollo de un catalizador electro-enzimático para la producción de combustibles alternativos.

Instrumento: PIP369

Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Dr. Pablo Javier González

cultivada aeróbicamente en condiciones quimio-organo-autotróficas usando formato como única fuente de carbono y energía produce la FDH buscada, que es un heterotetramero (FdsABCD) capaz de reducir  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCOO}^-$  cuando se usa NADH como agente reductor.

## OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto donde se enmarca este trabajo es desarrollar un catalizador electro-enzimático capaz de transformar  $\text{CO}_2$  en ácido fórmico. Para ello, lo que se busca es modificar la superficie de un electrodo hecho de un material inerte (e.g. grafito) inmovilizando la FDH en cuestión, para así generar un cátodo específico.

En base a lo mencionado arriba, los objetivos específicos de este trabajo son:

- Optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la expresión de FdsABCD.
- Evaluar la presencia de la enzima mediante ensayos de actividad cinética de conversión de  $\text{HCOOH} \rightarrow \text{CO}_2$  usando métodos de estado-estacionario.

## METODOLOGÍAS

Se evaluó la expresión de FDH en células de *C.n.* (aka. *Ralstonia eutropha* H16) wild-type y fenotipo  $\Delta\text{phaC1}$  (i.e. knockout de gen responsable de acumulación de bioplástico PHB).

Ambas cepas de *C.n.* fueron cultivadas en medio mineral salino (Friedebold y col., 1993) usando fructosa o formato de sodio como fuentes de C. La composición del medio de cultivo fue modificada basado en estudios de otros autores (Grunwald y col., 2015) para maximizar el rendimiento en biomasa al mismo tiempo que se produzca FdsABCD.

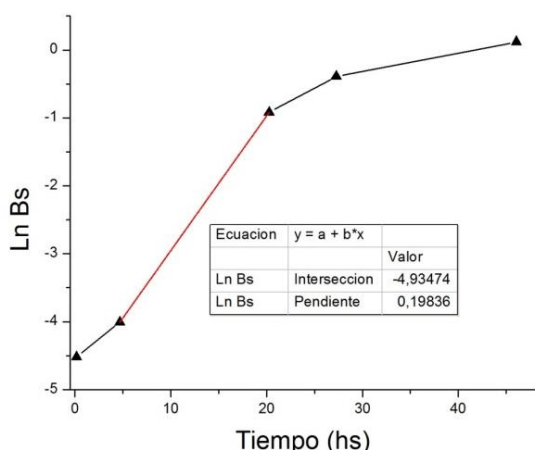
Para producir biomasa se realizaron cultivos en biorreactores tipo tanque agitado (2 y 10 L) donde se controlaron de forma continua temperatura ( $30^\circ\text{C}$ ), pH (7.4) y oxígeno disuelto. Para ello, se usó un método *fed-batch* donde la concentración de formato y el pH se mantuvieron constantes, alimentando el reactor con ácido fórmico al 20%. Los cultivos se dejaron evolucionar hasta alcanzar la fase exponencial o, en algunos casos, de estacionamiento. Luego fueron centrifugados (15 min, 5000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) para separar el medio de cultivo de la biomasa. El pellet fue resuspendido en solución de lisis y la disrupción celular se realizó por ultrasonido utilizando un sonicador de punta. El extracto bruto obtenido se centrifugó (90 min, 13000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) para separar los restos celulares (pellet) de la fracción soluble (sobrenadante). Esta última contendría la enzima buscada FdsABCD.

Se realizaron geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para analizar la presencia de la proteína de interés buscando el peso molecular correspondiente para cada subunidad.

La presencia de FDH se evaluó mediante ensayos de actividad cinética utilizando la capacidad de la misma de reducir el  $\text{NAD}^+$  en presencia de formato y monitoreando espectrofotométricamente a 340 nm la aparición de NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Para el ensayo se utilizaron 50 mM buffer fosfato-K pH 7.2, 2 mM  $\text{NAD}^+$ , y 5  $\mu\text{L}$  del extracto soluble obtenido. La reacción se analizó tras el agregado de 5 mM formato de sodio.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

En una primera fase, se trabajó con *C.n.* H16  $\Delta\text{phaC1}$ . Se buscó establecer las condiciones de cultivo óptimas para esta cepa, con el objeto de minimizar la fase *lag* y tiempo de duplicación, y maximizar rendimiento de biomasa por litro de cultivo. Para esto, se realizaron cultivos a pequeña escala en frascos Erlenmeyer variando la concentración de oligoelementos y formato de sodio usando la composición de medio mencionada anteriormente. Esto se realizó porque: i) la enzima que se pretende aislar depende de Mo y Fe para funcionar y, ii) el ácido fórmico en determinadas concentraciones es bactericida. Con las condiciones optimizadas se realizaron cultivos en fermentador de 2L y posteriormente 10L.



**Figura 1:** Evolución de la concentración de biomasa en peso seco (escala logarítmica) en función del tiempo.

El cultivo en biorreactor de 2L fue realizado en el Lab. de Fermentaciones de la FBCB-UNL (Biostat A Plus, Sartorius Stedim, Alemania). El crecimiento celular fue monitoreado tomando muestras a distintos tiempos y midiendo la OD<sub>600</sub>. Luego, la concentración de biomasa en peso seco (gBs.L<sup>-1</sup>) fue calculada utilizando el factor Bs/OD<sub>600</sub> = 0.363 g.L<sup>-1</sup>.UDO<sup>-1</sup> (Grunwald y col., 2015) (**Figura 1**). La OD<sub>600</sub> final fue de 3.1 UDO en un volumen de cultivo de 1,11 L. El cultivo se detuvo a las 46 horas y se obtuvieron 6,9 g de biomasa en peso húmedo por litro. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación ( $\Delta t$ ) obtenidos fueron 0,198 y 3,5 hs, respectivamente. En la **Tabla 1** se puede observar que los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en este trabajo son similares a los publicados por otros autores.

**Tabla 1:** Tabla comparativa de resultados obtenidos por otros autores.

Cepa	Fenotipo	Sustrato	$\Delta t$ (hs)	Bs (g.L <sup>-1</sup> )	Tipo de cultivo	Referencia
<i>C. necátor</i> H16	PHB <sup>-</sup>	Formato	3,5	1,13 <sup>*2</sup>	Fed-batch	Este trabajo
<i>R. eutropha</i> H16	Salvaje	Formato	4	1,2	Fed-batch	Friedrich y col., 1979
<i>R. eutropha</i> Re2061	PHB <sup>-</sup>	Formato	3,85 <sup>*1</sup>	5,4	Fed-batch	Grunwald y col., 2015

\*<sup>1</sup> Valor calculado a partir de  $\mu=0,18h^{-1}$  (Grunwald y col., 2015).  
\*<sup>2</sup> Valor calculado utilizando el factor Bs/OD<sub>600</sub> (Grunwald y col., 2015).

Los resultados obtenidos mostraron que *C.n.* H16  $\Delta phaC1$  crece bien con la formulación del medio usada y bajo las condiciones de suministro del sustrato limitante. Además, se logró demostrar la ventaja de realizar un cultivo *fed-batch* cuando la fuente de energía/carbono, se suministra de forma gradual para no provocar inhibición del crecimiento.

El paso siguiente fue realizar el escalado a biorreactor de 10L. Para ello, se usaron las condiciones de cultivo de la experiencia realizada con el biorreactor de 2L. Sin embargo, en el reactor de 10 L no se pudieron controlar variables como presión y caudal de O<sub>2(g)</sub>, por lo que se suministró aire con caudal constante. Se realizaron dos cultivos:

**Cultivo A:** Se detuvo a las 38 hs y se alcanzó una OD<sub>600</sub> = 1,467 UDO en un volumen de 8,24 L. Se obtuvieron 2,4 g de biomasa en peso húmedo por litro. Los parámetros de crecimiento fueron  $\mu = 0,1746$  y  $\Delta t = 3,96$  hs.

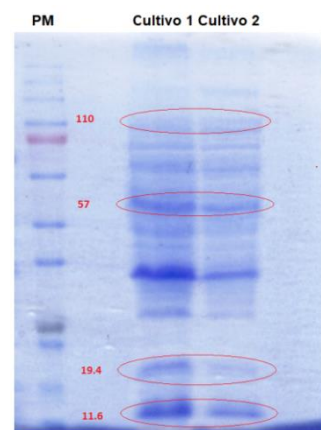
**Cultivo B:** Se detuvo a las 67 hs y se alcanzó una OD<sub>600</sub> = 2,088 UDO en un volumen de 8,46 L. Se obtuvieron 4,1 g de biomasa en peso húmedo por litro. Los parámetros de crecimiento fueron  $\mu = 0,1124$  y  $\Delta t=6,16$  hs.

Claramente, se pudo observar que los rendimientos de biomasa húmeda por litro de cultivo son ca. 3 veces menores que los obtenidos en el biorreactor de 2L. Teniendo en cuenta las limitaciones instrumentales del fermentador de 10L, resulta evidente la importancia de controlar finamente la pO<sub>2(g)</sub>, pH y la administración de formato.

La biomasa obtenida en cada uno de los biorreactores fue tratada de acuerdo a lo descrito en la sección Metodologías para obtener los extractos solubles. Se realizaron los respectivos análisis de actividad enzimática y se observó que, si bien los extractos muestran actividad catalítica, reduciendo el NAD<sup>+</sup> a NADH, dicha actividad no estaría asociada a la

oxidación del formato catalizada por la FdsABCD, ya que las mismas velocidades iniciales de reducción del  $\text{NAD}^+$  fueron obtenidas cuando se ensayaron blancos de reacción sin formato. Esto indica que la reducción del  $\text{NAD}^+$  se produjo debido al poder reductor presentes en los extractos solubles. Estos equivalentes de reducción se deben a la presencia de flavoproteínas, citocromos y ferredoxinas que pueden reaccionar con el  $\text{NAD}^+$ . Este resultado indicó principalmente dos cosas: i) que la FdsABCD no fue expresada durante los cultivos de la cepa *CnH16 ΔphaC1* y, ii) que esta cepa usó otra enzima/vía metabólica de la esperada para usar formato como fuente de energía. Esto último, aunque es muy interesante, no es el objetivo de este trabajo y por ello no se continuó investigando. En paralelo, se realizaron geles SDS-PAGE, sin poder corroborar la presencia de los tamaños correspondientes a las subunidades de FdsABCD que posee cuatro subunidades con masas moleculares  $\alpha=110\text{KDa}$ ,  $\beta=57\text{KDa}$ ,  $\gamma=19,4\text{KDa}$  y  $\delta=11,6\text{KDa}$ .

En vista de estos resultados se continuó el trabajo con la cepa de *C.n. H16 wild type*. Para lo cual se realizaron cultivos en frascos Erlenmeyer. La experiencia se repitió dos veces. El volumen total de cultivo para cada experiencia fue de 2L. El control de pH y adición de ácido fórmico se realizó de forma manual. Los cultivos se detuvieron entre las 34 y 44 hs con  $\text{OD}_{600}$  entre 0.5 y 0.7 UDO. El rendimiento fue de 1,5 g de biomasa en peso húmedo por litro. A diferencia de la cepa *ΔphaC1*, los extractos solubles mostraron actividad FDH, confirmando la presencia e FdsABCD. Además, en el gel SDS-PAGE se observaron bandas correspondientes a las masas moleculares esperadas (**Figura 2**). El trabajo futuro implica realizar cultivos en biorreactores con parámetros controlados para aumentar rendimiento y expresión de FdsABCD, y purificar la enzima a grado electroforético para mejor caracterización y estudios electroquímicos.



**Figura 2:** SDS-PAGE. Extracto soluble *C. necátor* H16 w.t.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Ayers, W. M.**, 1994. An overview of electrochemical carbon dioxide reduction. In Carbon Dioxide Chemistry (pp. 365-374).
- Friedrich C. G., Bowien B., Friedrich B.**, 1979. Formate and oxalate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology*, 115(1), 185-192.
- Friedebold J. O. R. G., Bowien B.**, 1993. Physiological and biochemical characterization of the soluble formate dehydrogenase, a molybdoenzyme from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology*, 175(15), 4719-4728.
- Grunwald S., Mottet A., Grousseau E., Plassmeier J. K., Popović M. K., Uribe Larrea J. L., Sinskey, A.**, 2015. Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures. *Microbial biotechnology*, 8(1), 155-163.
- Oloman, C., & Li, H.**, 2008. Electrochemical processing of carbon dioxide. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 1(5), 385-391.
- Sabine C. L., Feely R. A., Gruber N., Key R. M., Lee K., Bullister J. L., Millero F. J.**, 2004. The oceanic sink for anthropogenic  $\text{CO}_2$ . *science*, 305(5682), 367-371.
- Reutemann W., Kieczka H.**, 2002. Formic acid. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* Wiley-VCH, Weinheim.