

**III Jornadas Españolas de
Biocatálisis 2021**

Murcia, 25-27 noviembre 2021

**III JORNADAS ESPAÑOLAS
DE BIOCATALISIS
PROGRAMA Y LIBRO DE
ABSTRACTS**

Murcia, 25-27 noviembre 2021

SIMPOSIUM OFICIAL ORGANIZADO POR



Bienvenidos a JEB 2021

Desde el Grupo de Biocatálisis Aplicada de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT), tenemos el placer de daros la bienvenida a las III Jornadas Españolas de Biocatálisis (JEB 2021) que tienen lugar en Murcia, en el Salón de Actos Hermenegildo Lumeras de Castro de la Facultad de Química, entre el jueves 25 y el sábado 27 de noviembre de 2021.

Este congreso es organizado por la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) y la Universidad de Murcia, dando continuidad a las ediciones celebradas en Madrid en 2015, y en Oviedo en 2018.

JEB 2021 persevera en el objetivo de consolidar el potencial que la Biocatálisis ofrece a los avances científicos, a los desarrollos industriales y a la sociedad en su conjunto, mediante el empleo de enzimas en distintas aplicaciones químicas. Esta iniciativa surgida desde la Sección de Biocatálisis Aplicada de la Sociedad Española de Biotecnología pretende:

- Impulsar la participación de estudiantes de doctorado a través de comunicaciones tanto orales como posters, fomentando su interacción científica y personal.
- Dar difusión a la investigación realizada por grupos de investigación españoles y favoreciendo las colaboraciones entre los mismos en forma de trabajos de investigación o tesis en co-tutela.
- Conocer el recorrido realizado por estudiantes post-doctorales residentes en el extranjero que defendieron su Tesis Doctoral en España para así ayudarles en su reincorporación al sistema nacional.
- Presentar nuevas tendencias referente al empleo, manejo y mejora de la actividad y estabilidad de biocatalizadores.
- Acercar a industrias químicas al empleo de enzimas con múltiples aplicaciones.

Aunque el congreso está abierto a cualquier trabajo relacionado con las diferentes facetas de la Biocatálisis, la organización de las jornadas está enfocada principalmente a las siguientes temáticas:

- Biocatálisis Aplicada
- Sostenibilidad
- Bioprocessos. Aplicaciones industriales de procesos enzimáticos
- Estrategias para la mejora de la actividad y estabilidad enzimática
- Descubrimiento de nuevas enzimas: Metagenómica y evolución
- Enzimología mecanística y estructura de proteínas
- Química computacional y modelización molécula

ORGANIZACIÓN JEB 2021

Comité organizador JEB 2021

- **Pedro Lozano Rodríguez** (Co-Presidente, Universidad de Murcia)
- **Fuensanta Máximo Martín** (Co-Presidente, Universidad de Murcia)
- **Josefa Bastida Rodríguez** (Universidad de Murcia)
- **María Gómez Gómez** (Universidad de Murcia)
- **María Dolores Murcia Almagro** (Universidad de Murcia)
- **Susana Nieto Cerón** (Universidad de Murcia)
- **Salvadora Ortega Requena** (Universidad de Murcia)
- **Rocío Villa Aroca** (Universidad de Murcia)

Comité científico JEB 2021

- **Pedro Lozano Rodríguez** (Coordinador SEBIOT - Sección Biocatálisis Aplicada, Universidad de Murcia)
- **Francisco José Plou Gasca** (Coordinador SEBIOT - Sección Biocatálisis Aplicada, CSIC, Madrid)
- **Eduardo García-Junceda Redondo** (CSIC, Madrid)
- **Vicente Gotor Fernández** (Universidad de Oviedo)
- **María José Hernáiz Gómez-Dégano** (Universidad Complutense de Madrid)
- **Fernando López Gallego** (CIC biomaGUNE)
- **Francisco Valero Barranco** (Universidad Autónoma de Barcelona)

Secretaría Técnica JEB 2021

- **Manuel Celdrán Gallego** (Congresos Vértice Sur)

<https://jeb2021murcia.es/>

PROGRAMA CIENTÍFICO

Jueves 25 de noviembre 2021

16:30-17:00 Recepción y Entrega de Documentación

17:00-18:00 Asamblea SEBIOT

18:00-19:00 Conferencia Inaugural



Protein engineering and novel synthetic applications of oxidoreductases

Francesco Mutti.

Born in Bergamo, obtained a Master's degree with summa cum laude in industrial chemistry in 2004 at the University of Milan (Italy). After a long trail, he is currently associate professor of biocatalysis and head of the Head of the Biocatalysis group (HIMS-Biocat) at the University of Amsterdam.

19:00-20:00 Cóctel de bienvenida

Viernes 26 de noviembre 2021

Salón de Actos Hermenegildo Lumeras de Castro (Facultad de Química, UMU)

Moderador: Fuensanta Máximo Martín (Universidad de Murcia)

9:00	CO1	Heparanasa. Una enzima clave para el desarrollo de sistemas inteligentes para la liberación controlada de fármacos antitumorales Maria Luisa del Pozo, Sara Martín, Dianelis T. Monterrey, Agatha Bastida, Alfonso Fernández-Mayoralas, Eduardo García-Junceda y Julia Revuelta
9:20	CO2	Constitutive expression in <i>Komagataella phaffii</i> of mature <i>Rhizopus oryzae</i> lipase jointly with its truncated prosequence improves production and the biocatalyst operational stability Josu López-Fernández, María Dolores Benaiges and Francisco Valero
9:40	CO3	Selective co-immobilization of his-tagged enzymes on yttrium-stabilized zirconia membranes for continuous asymmetric bioreductions Daniel Andrés-Sanz, Eleftheria Diamanti, Desiré Di Silvo, Jonas Gurauskis y Fernando López-Gallego
10:00	CO4	Sustainable non-conventional biocatalysis Susana Nieto, Rocío Villa, Antonio Donaire, Pedro Lozano
10:20	CO5	Procesos sostenibles en la obtención de nuevos ésteres altamente ramificados Miguel Asensi, Silvia Gimeno-Martos, José Pascual, Claudia Montiel, Fuensanta Máximo y Josefa Bastida
10:40	CO6	Primera lignina peroxidasa descrita en hongos agaricales: estudios de relación estructura-función y capacidad ligninolítica María Isabel Sánchez Ruiz, Iván Ayuso Fernández, Jorge Rencoret, Andrés Manuel González-Ramírez, Dolores Linde, Irene Davó-Siguero, Antonio Romero, Ana Gutiérrez, Ángel T. Martínez y Francisco Javier Ruiz-Dueñas

11:00-11:30 Café

Moderador: Pedro Lozano Rodríguez (Universidad de Murcia)

11:30	CO7	EVOKIT: a new panel of evolved peroxygenases for screening human drug metabolites and other fine chemicals Ivan Mateljak, Patricia Gómez de Santos, Javier Viña-González, Bernardo Gómez Fernández, Miguel Ángel Nieto Taype, Miguel Alcalde
11:50	CO8	Desarrollo de metodologías para la intensificación de la hidrólisis enzimática de celulosa Celia Álvarez-González, Juan M Bolívar, Mauricio Zurita y Miguel Ladero
12:10	CO9	Continuous high fructose syrup (HFS) production using packed bed reactor with <i>Caldicoprobacter algeriensis</i> glucose isomerase Fadia V. Cervantes, Sawssan Neifar, Amel Bouanane-Darenfed, Hajer BenHlima, Antonio O. Ballesteros, Samir Bejar, Francisco J. Plou

12:30-13:10 Presentación Póster Flash (presentaciones de 5 min)

13:10-13:30 Visita Paneles Póster (Hall Facultad de Química)

13:30-15:30 Comida (Comedor de la Facultad de Económicas)

Viernes 26 de noviembre 2021

Salón de Actos Hermenegildo Lumeras de Castro (Facultad de Química, UMU)

Moderador: Francisco José Plou Gasca (CSIC, Madrid)

15:30	CO10	Lipasas: biocatalizadores para la síntesis e hidrólisis del ácido poliláctico Carlos Murguiondo, Eva Calviño, María Jesús Martínez, Jorge Barriuso y Alicia Prieto
15:50	CO11	Desarrollo de procesos multicatalíticos empleando enzimas Vicente Gotor-Fernández, Jesús Albarrán-Velo, Lorena Escot, Sergio González-Granda, Marina López-Agudo, Laura Rodríguez-Fernández e Iván Lavandera
16:10	CO12	Oro(I) y alcohol deshidrogenasas: diseño de procesos en cascada concurrente altamente selectivos Sergio González-Granda, Lorena Escot, Iván Lavandera y Vicente Gotor-Fernández
16:30	CO13	Improving alcalase features through immobilization and step-by-step chemical modification Roberto Morellón-Sterling, Fouzia Hussain, Sara Arana-Peña, Sabrina Ait Braham, Jakub F. Kornecki, and Roberto Fernández-Lafuente
16:50	CO14	An integrated enzymatic approach to produce sugar esters C. García-Oliva, A. Merchán, A. Perona, P. Hoyos, M. J. Hernáiz
17:10	CO15	Multienzymatic cascade systems for sustainable chemistry: a case of study for synthesis of fagomine Oscar Romero, Marina Guillén, Gregorio Álvaro
17:30-18:00 Café		
18:00-18:40 Presentación Póster Flash (presentaciones de 5 min)		
18:40-19:00 Visita Paneles Póster (Hall Facultad de Química)		
19:00 Clausura		
21:00 Cena en Murcia (Restaurante Mibarra)		

Sábado 27 de noviembre 2021

Salón de Actos Hermenegildo Lumeras de Castro (Facultad de Química, UMU)

Coordinador: Fernando López Gallego (CIC biomaGUNE)

9:30-11:30 **Reunión de la Red de Biocatálisis. Facultad de Química**

PÓSTER FLASH SELECCIONADOS

SESIÓN MAÑANA

Moderador: M^a José Hernáiz Gómez-Dégano (Univ. Complutense de Madrid)

PF1	Enzymatic Synthesis of Phloretin α-Glucosides Using a Sucrose Phosphorylase Mutant and its Effect on Solubility, Antioxidant Properties and Skin Absorption José L. González-Alfonso, Zorica Ubiparip, Elena Jiménez-Ortega, Ana Poveda, Cristina Alonso, Luisa Coderch, Jesús Jiménez-Barbero, Julia Sanz-Aparicio, Antonio O. Ballesteros, Tom Desmet and Francisco J. Plou
PF2	Layer-by-layer strategy to coimmobilize different lipases in an ordering way Diego Carballares, Sara Arana-Peña, Nathalia S. Rios, Luciana R.B. Gonçalves y Roberto Fernández-Lafuente
PF3	Modulating the properties of the lipases by their immobilization on hydrophobic supports under different conditions. Diego Carballares, Sara Arana, Nathalia Rios, Yuliya Lokhaa, Carmen Méndez-Sánchez, Luciana R.B. Gonçalves, Fernando López-Gallego y Roberto Fernández-Lafuente
PF4	Chemo-enzymatic synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate from CO ₂ and glycidol by using Ionic Liquids Rocio Villa, Marina García-Castellanos, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo García-Verdugo y Pedro Lozano
PF5	Identificación del origen de la actividad peroxidasa en una peroxygenasa fúngica evolucionada de <i>Agrocybe aegerita</i> Alejandro Beltrán Nogal, Patricia Molina Espeja, María Alejandra Alfuzzi, Víctor Guallar y Miguel Alcalde
PF6	Laboratory evolution and chimeragenesis of iron-sulfur enzymes for the production of isoprenoids. Mikel Dolz, Eva García-Ruiz, Jesús Laborda, Merve Keser, Greg Bokinsky y Miguel Alcalde
PF7	Síntesis de heterobiaryl alcoholes quirales empleando ADHs Gonzalo de Gonzalo, Patricia Rodríguez Salamanca, Valentín Hornillos, Rosario Fernández, José María Lassaletta

PÓSTER FLASH SELECCIONADOS

SESIÓN TARDE

Moderador: Eduardo García-Junceda Redondo (CSIC, Madrid)

PF8	Síntesis de β,β -difluoroaminas catalizada por transaminasas y aminasas reductivas Marina García-Ramos, Daniel González-Martínez, Aníbal Cuetos, Mahima Sharma, Gideon Grogan, Vicente Gotor-Fernández, e Iván Lavandera
PF9	Modulating Fatty Acid Epoxidation vs. Hydroxylation in a Fungal Peroxygenase Juan Carro, Alejandro González-Benjumea, Víctor Guallar, Ana Gutiérrez y Ángel T. Martínez
PF10	Estudio cinético de la acción de lacasa sobre catecolaminas y compuestos relacionados Jesús Manzano-Nicolás, Amaury Taboada-Rodríguez, José-Antonio Teruel-Puche, Fulgencio Marín-Iniesta, José Tudela-Serrano, Pablo García-Molina, y José-Luis Muñoz-Muñoz
PF11	Desarrollo y optimización de un proceso de extracción enzimática de pectina de residuos de piel de naranja (OPW) Jorge García-Montalvo, Alberto García-Martín, Félix García-Ochoa, Juan Manuel Bolívar, Victoria E. Santos y Miguel Ladero
PF12	Effect of enzyme loading in the efficiency of immobilized ficin-glyoxyl as biocatalyst for the milk clotting Roberto Morellón-Sterling, El-Hocine Siar and Roberto Fernández-Lafuente
PF13	Búsqueda y caracterización de nuevas lipasas de <i>Streptomyces exfoliatus</i> DSMZ 41693 con potencial aplicación en la síntesis biotecnológica de glicoestructuras Juan Toledo-Marcos, Guillermo Rodríguez-Alonso, Lara Serrano-Aguirre, Cecilia García-Oliva, Ana Saborido, Pilar Hoyos, María José Hernáiz, Miguel Arroyo, Isabel de la Mata
PF14	Overexpression and molecular characterization of novel chitinolytic enzymes from <i>Mestchnikowia pulcherrima</i> Marina Minguet Lobato, Francisco J. Plou Gasca, María Fernández Lobato

COMUNICACIONES ORALES

Heparanasa. Una enzima clave para el desarrollo de sistemas inteligentes para la liberación controlada de fármacos antitumorales

Maria Luisa del Pozo,^a Sara Martín,^a Dianelis T. Monterrey,^{a,b} Agatha Bastida,^a Alfonso Fernández-Mayoralas,^a Eduardo García-Junceda,^{a,*} y Julia Revuelta^{a,*}

^a BioGlycoChem Group, Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid

^b Current address: Institute of Catalysis, CSIC, 28049-Madrid

E-mail: mluisa.delpozo@csic.es

La enzima heparanasa es una endo-D-glucuronidasa que rompe los enlaces entre C-1 del ácido glucurónico y O-4 de la glucosamina a lo largo de la cadena de heparán sulfato.

La expresión de esta enzima en tejidos normales es relativamente baja, mientras que se ha observado que se sobreexpresa en procesos tumorales [1]. Por ello, esta enzima se ha convertido en un atractivo objetivo para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en la terapia del cáncer. En otra aproximación, la heparanasa puede emplearse para el diseño de nuevos materiales sensibles a enzimas para la liberación controlada de fármacos antitumorales (Figura). En esta comunicación presentamos los primeros estudios sobre el diseño y preparación de un nuevo hidrogel susceptible de ser degradado por heparanas. Estos podrían proporcionar sistemas de liberación de fármacos antitumorales, específicos de células cancerosas que se caracterizan por la sobreexpresión de heparanasa, mientras que muestran poca toxicidad hacia células y/o tejidos normales. En estos estudios *in vitro*, empleamos la heparanasa de *Burkholderia Pseudomallei* [2], recientemente clonada y sobreexpresada en nuestro laboratorio que muestra un 24% de homología de secuencia con la enzima humana, por lo que los datos obtenidos de este estudio *in vitro* pueden ser extrapolables al comportamiento de estos materiales *in vivo*.

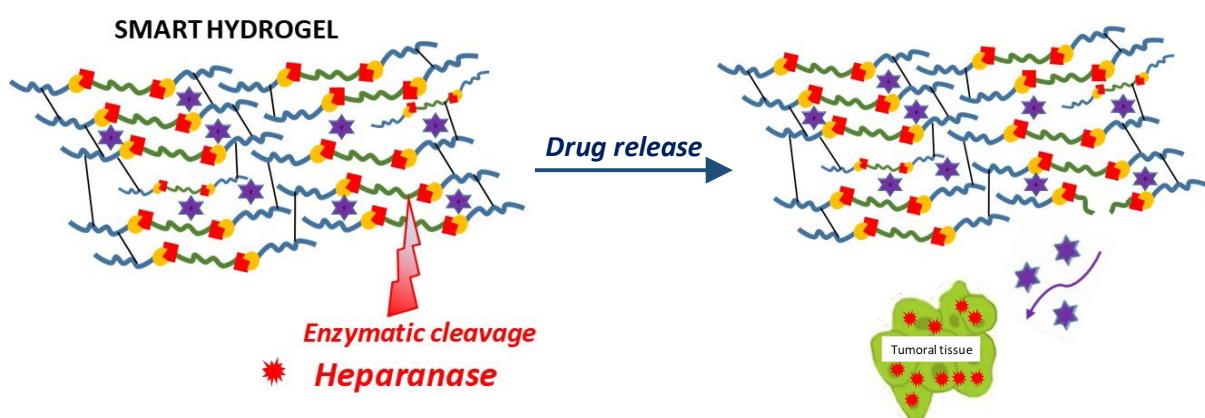


Figura. Materiales sensibles a heparanasa para la administración de fármacos antitumorales.

[1] T. Sato et al., *J. Surg. Oncol.* **2004**, 87, 174-181.

[2] L. Bohlmann et al., *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 955-957.

Constitutive expression in *Komagataella phaffii* of mature *Rhizopus oryzae* lipase jointly with its truncated prosequence improves production and the biocatalyst operational stability

Josu López-Fernández, Maria Dolors Benaiges and Francisco Valero

Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, School of Engineering,
Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

E-mail: [\(93-5811809\)](mailto:francisco.valero@ub.cat)

Rhizopus oryzae lipase (ROL) containing 28 C-terminal amino acids of the prosequence fused to the N-terminal mature sequence in ROL (proROL) was successfully expressed in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) under the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (P_{GAP}).

Although the sequence encoding the mature lipase (rROL) was also transformed, no clones were obtained after three transformation cycles, which highlights the importance of the truncated prosequence to obtain viable transformed clones.

Batch cultures of the *K. phaffii* strain constitutively expressing proROL scarcely influenced growth rate and exhibited a final activity and volumetric productivity more than 6 times higher than those obtained with proROL from *K. phaffii* under the methanol-inducible alcohol oxidase 1 promoter (P_{AOX1}). The previous differences were less marked in fed-batch cultures. N-terminal analysis confirmed the presence of the 28 amino acids in proROL.

Besides, immobilized proROL exhibited increased tolerance of organic solvents and an operational stability 0.25 and 3 times higher than that of immobilized rROL in biodiesel and ethyl butyrate production, respectively. Therefore, the truncated prosequence enables constitutive proROL production, boosts bioprocess performance and provides a more stable biocatalyst in two reactions in which lipases are mostly used at industrial level, esterification (ethyl butyrate) and transesterification (biodiesel).

Funding: This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project PID2019-104666GB-100).

Acknowledgments: JLF was supported by a Basque Government scholarship for the training of pre-doctoral researchers (PRE_2017_1_0110).

Selective Co-immobilization of His-tagged Enzymes on Yttrium-Stabilized Zirconia for Continuous Asymmetric Bioreductions

Daniel Andrés-Sanz,^a Eleftheria Diamanti,^a Desirè Di Silvo,^b Jonas Gurauskis,^b y Fernando López-Gallego^{a,c}

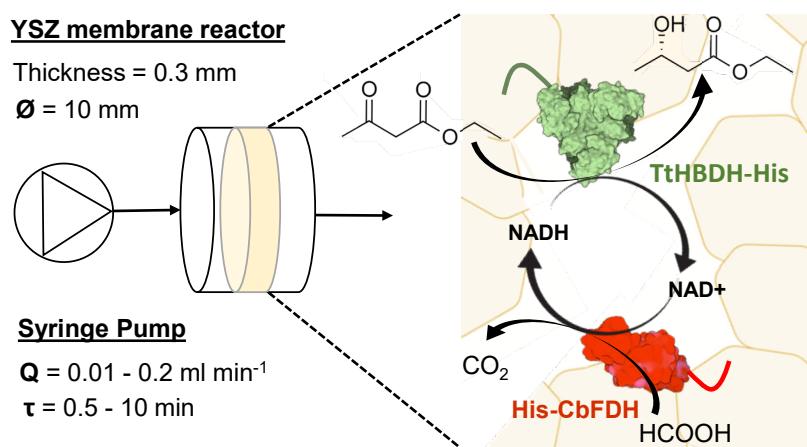
^a Heterogeneous Biocatalysis Laboratory, Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Paseo de Miramón 182, Donostia San Sebastián, Spain

^b ARAID Foundation, Aragón Nanoscience and Materials Institute (CSIC-Unizar), Zaragoza, E-50009, Spain

^c KERBASQUE, Basque Foundation for Science, María Díaz de Haro 3, 48013 Bilbao, Spain
E-mail: dandres@cicbiomagune.es

Scalability, process control or modularity are some of the advantages which are converting flow biocatalysis into a reference in green chemistry. Rigid porous solid membranes hold the promise to expand the toolbox of flow-biocatalysis due to their chemical stability and inertness. Yttrium-stabilized zirconia (YSZ) fulfils these properties. Here, we discovered an unprecedented interaction between YSZ materials and His-tagged enzyme that enables the fabrication of multi-functional biocatalytic membranes for bioredox cascades. X-photon electron spectroscopy shows that such interaction is driven by coordination interactions between the imidazole groups of His-tags and both Zr and Y atoms.

As model enzymes, we co-immobilized in-flow a thermophilic Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (TtHBDH-His) and a Formate dehydrogenase (His-CbFDH) for the continuous asymmetric reduction of ethyl acetoacetate with *in situ* redox cofactor recycling. [1] Fluorescence confocal microscopy deciphered the spatial organization of the two co-immobilized enzymes. Finally, the co-immobilized system succeeds to *in situ* recycle the redox cofactor and operated at a excellent specific productivity of $350 \text{ mg}_{\text{product}} \times \text{mg}_{\text{TtHBDH}}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ using only 0.05 mM NADH, and accumulating a total turnover number of TtHBDH-His of 4000 in 24 h. This work presents YSZ materials as ready-to-use materials for the site-directed enzyme in-flow immobilization and the application of the resulting heterogeneous biocatalysts in continuous biomanufacturing.



Scheme 1. Scheme of the continuous flow reactor setup and the coupled reaction of TtHBDH-His and His-CbFDH with in-situ cofactor recycling.

[1] Orrego, A. H.;...; López-Gallego, F., *Catal. Sci. Tech.* **2021**, 11 (9), 3217-3230.

Sustainable non-conventional biocatalysis

Susana Nieto,^a Rocío Villa,^a Antonio Donaire,^b y Pedro Lozano^a

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-B e Inmunología. Facultad de Química, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia

^b Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Química, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia
E-mail: susanani@um.es

From the begining of this century biocatalysis has emerged as the most powerful tool for chemical transformations affording an improved use of raw materials and energy input together with a reduction in wastes generation.

The excellent synergies resulting when combining biocatalysts with neoteric solvents (ionic liquids, supercritical fluids, deep eutectic solvents, etc.) have opened a plethora of oportunities for developing green chemical processes. Headed by the enhanced stabilization of enzymes, ionic liquids (ILs) have arisen as excellent non-aqueous reaction media for biocatalytic synthetic processes (i.e. biodiesel, kinetic resolutions, etc.). [1] In addition, the biphasic systems that result when

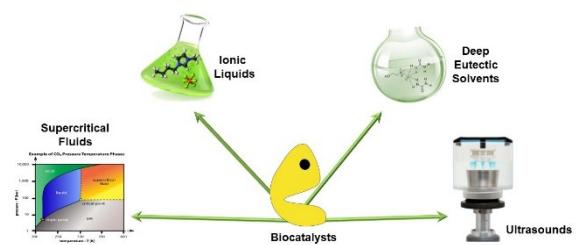


Figure 1. Combinations of biocatalysts with sustainable neoteric media or mass transfer technologies to enable the design of clean and straightforward biosynthetic strategies.

combining ILs with supercritical CO₂, allow the design of continuous synthetic platforms to directly provide pure products. [1] Because of the unique properties of the hydrophobic ILs that behave as sponge-like systems, straightforward and clean biocatalytic processes have been developed that directly release pure products and afford the full recycling of the reaction system. [2]

However, the abolition of solvent requirements constitutes the ideal condition for sustainable synthesis. As examples of biocatalysis in solvent free systems there are DESs made of the reaction substrates [3] or the interaction of solid immiscible substrates promoted by ultrasound irradiation. [4]

Acknowledgements

This work was partially supported by RTI2018-098233-B-C21 (MICINN-FEDER), and 20790/PI/18 (Fundación SENECA-CARM).

- [1] P. Lozano, J.M. Bernal, S. Nieto, C. Gómez, E. García-Verdugo, S. V. Luis, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17361-17374.
- [2] P. Lozano, C. Gómez, S. Nieto, G. Sánchez-Gómez, E. García-Verdugo; S.V. Luis, *Green Chem.* **2017**, *19*(2), 390-396
- [3] P. Lozano, E. Alvarez, S. Nieto, R. Villa, J.M. Bernal, A. Donaire, *Green Chem.* **2019**, *21*, 3353-3361.
- [4] S. Nieto, R. Villa, A. Donaire, E. García-Verdugo, S.V. Luis, P. Lozano, *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *75*, 105606-105613

Procesos sostenibles en la obtención de nuevos ésteres altamente ramificados

Miguel Asensi, Silvia Gimeno-Martos, José Pascual, Claudia Montiel, Fuensanta Máximo y Josefa Bastida

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia. España.

E-mail: miguel.asensil@um.es

En este trabajo se describe por primera vez la síntesis biocatalítica del 2-metilhexanoato de 2-etilhexilo. Se trata de un éster de alto peso molecular y estructura doblemente ramificada, cuyas numerosas aplicaciones están relacionadas con su potencial uso a bajas temperaturas. La lipasa inmovilizada Novozym® 435 ha mostrado su capacidad para catalizar la síntesis del éster a partir de 2-etilhexanol y ácido 2-metilhexanoico en un medio sin disolventes. El tiempo de reacción, la temperatura y la volatilidad del 2 etilhexanol, provocan una pérdida de alcohol por evaporación, que debe compensarse con un exceso de este sustrato si se quieren alcanzar conversiones cercanas al 100%. Tras los ensayos previos de optimización se proponen dos estrategias (70 °C con 10% de exceso de alcohol y 80 °C con 20% de exceso de alcohol). La elección de una de ellas se apoya en criterios de sostenibilidad, económicos y de productividad.

En las siguientes tablas se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los criterios utilizados en la elección. En la primera podemos observar los costes de producción del éster cuando el catalizador se reutiliza 6 veces. Vemos que es más económica la producción a 70 °C y que puede obtenerse el producto por un poco más de 20 €/kg.

	70 °C, 10% EH excess (Biocat. six uses)	80 °C, 20% EH excess (Biocat. six uses)
Start-up time (min)	60	84
Reaction time (min)	2700	2340
Biocatalyst (€ × kg EHMH ⁻¹)	7.85	8.10
Substrates (€ × kg EHMH ⁻¹)	1.88	1.90
Energy (€ × kg EHMH ⁻¹)	11.42	17.03
Total cost (€ × kg EHMH⁻¹)	21.16	27.03

La segunda tabla incluye algunos parámetros de sostenibilidad que refuerzan la selección 70 °C y un 10% de exceso de alcohol como la mejor opción para producir el éster deseado.

Green metrics		70 °C	80 °C
		10% EH excess	20% EH excess
Atom economy (AE) (%)	$AE = \frac{\text{molecular weight of desired product}}{\sum \text{molecular weight of all products}} \times 100$	93.09	93.09
E-factor	$E - \text{factor} = \frac{\text{kg of waste}}{\text{kg of desired product}}$	0.16	0.19
Carbon mass efficiency (CME) (%)	$CME = \frac{\text{kg carbonated product}}{\text{kg carbonated reactants}} \times 100$	86.10	83.85

Agradecimientos: Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. S. Gimeno-Martos es beneficiaria de un contrato postdoctoral “Programa Regional de Talento Investigador y su Empleabilidad de la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia y del Fondo Social Europeo“. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por suministrar generosamente las lipasas utilizadas.

Primera Lignina Peroxidasa descrita en hongos Agaricales: estudios de relación estructura-función y capacidad ligninolítica

María Isabel Sánchez Ruiz,^a Iván Ayuso Fernández,^a Jorge Rencoret,^b Andrés Manuel González-Ramírez,^a Dolores Linde,^a Irene Davó-Siguero,^a Antonio Romero,^a Ana Gutiérrez,^b Ángel T. Martínez ^{a,*} y Francisco Javier Ruiz-Dueñas ^{a,*}

^a Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC): 28040 Madrid, España, Centro de Investigaciones Biológicas "Margarita Salas" (CIB)

^b Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC): 41012 Sevilla, España, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS)

E-mail: marisasmr@cib.csic.es

Las lignina peroxidasas (LiPs) han recibido especial atención en el contexto de las biorrefinerías de lignocelulosa por su capacidad para oxidar directamente la lignina [1,2]. Hasta ahora, estas enzimas solo se habían identificado en basidiomicetos del orden Polyporales, que incluye la mayoría de las especies degradadoras de madera [3,4]. Tras la secuenciación del genoma de *Agrocybe pediades* [5] identificamos la primera enzima ligninolítica de esta familia en un hongo del orden Agaricales (ApeLiP) degradador de hojarasca. Su estructura cristalográfica reveló que contiene un grupo hemo como centro activo y un triptófano catalítico posicionado en su superficie (Trp166). La caracterización bioquímica de la enzima nativa y de una variante carente de dicho triptófano confirmó que este residuo está involucrado en la oxidación directa de sustratos aromáticos no-fenólicos de alto potencial redox y de compuestos fenólicos, incluyendo monómeros y dímeros modelos de lignina y distintos colorantes. Además, mediante espectroscopía de flujo detenido y 2D-NMR se confirmó que este residuo es responsable de la oxidación directa de lignina real, tanto de angiospermas como de gimnospermas, con una eficiencia igual o superior al de otras peroxidasas ligninolíticas conocidas. La caracterización fue complementada con el estudio de los potenciales de reducción de los intermediarios del ciclo catalítico y con estudios de estabilidad. Así, se observó una activación por peróxido similar a la de otras peroxidasas, pero un menor potencial redox en el paso limitante de la reacción comparado con otras LiPs, así como una alta estabilidad a pH básico. Todos estos estudios demuestran que en hongos Agaricales también existen enzimas relevantes para el reciclado del carbono en la naturaleza que además pueden aprovecharse para su aplicación biotecnológica.

[1] A.T. Martínez, S. Camarero, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, *Lignin Valorization: Emerging Approaches*; Beckham, G.T., Ed.; RSC: Cambridge, UK, **2018**, 199–225.

[2] K. Wagemann, N. Tippkötter, N. *Biorefineries*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, **2019**

[3] T.K. Kirk, R.L. Farrell, *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, 41, 465–505

[4] K.-E.L. Eriksson, R.A. Blanchette, P. Ander, *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Components*; Springer: Berlin, Germany, **1990**

[5] F.J. Ruiz-Dueñas, J.M. Barrasa, M. Sánchez-García, S. Camarero, S. Miyauchi, A. Serrano, D. Linde, R. Babiker, E. Drula, I. Ayuso-Fernández, et al, *Mol. Biol. Evol.* **2021**, 38, 1428–1446.

EVOkit: A new panel of evolved peroxygenases for screening human drug metabolites and other fine chemicals

Ivan Mateljak,^a Patricia Gomez de Santos,^a Javier Viña-Gonzalez,^a Bernardo Gomez Fernandez,^a Miguel Angel Nieto Taype,^a Miguel Alcalde^b

^a *EvoEnzyme S.L, Parque Científico de Madrid, C/Faraday, 7, Madrid*

^b *C/Marie Curie 2, Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis, CSIC, Madrid*

E-mail: imateljak@evoenzyme.com

A screening kit of evolved fungal unspecific peroxygenase (UPO) enzymes is developed for detection and scalable production of human drug metabolites and fine chemicals. The catalytic repertoire of UPOs in the EVOkit include alkyl and aromatic hydroxylations, aliphatic and aromatic epoxidations, O-dealkylations (including ester and ether cleavage), N-dealkylations, N-oxidations, S-oxidations and brominations [1]. UPO reactions only require H₂O₂ as a co-substrate, making laboratory manipulations very simple, reliable and cost-effective. Coming from different fungal species, the evolved UPO variants in EVOkit are recombinantly expressed in *Pichia pastoris* with capability of producing them in large quantities.

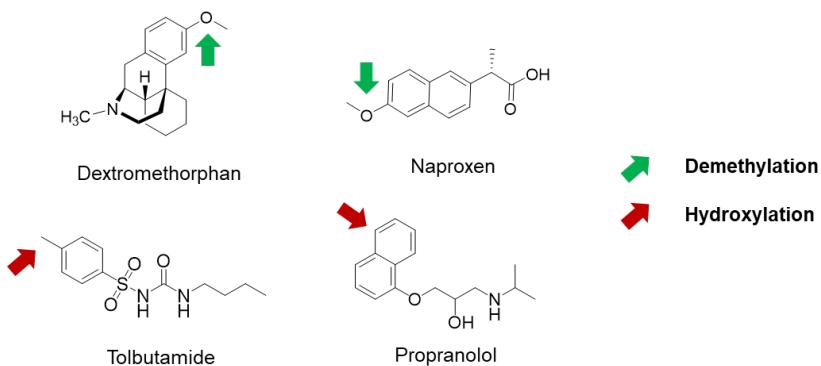


Figure 1. UPO activities on selected pharmaceutical compounds.

We have assayed several engineered UPO variants from the EVOkit for their ability to produce authentic human drug metabolites from four pharmaceutical drugs: dextromethorphan, naproxen, propranolol and tolbutamide, Figure 1 [2,3]. Dextromethorphan and naproxen were converted to corresponding human metabolites via demethylation by all tested variants to the varying degree of conversion. On the other hand enzymes hydroxylated propranolol and tolbutamide generating human metabolites 5-hydroxypropranolol and 4-hydroxytolbutamide, respectively. Along with identification of metabolites and after the hit verification, reactions can be scaled up to produce larger quantities of desired metabolite for further analysis.

[1] M. Hofrichter et al., In: Nevalainen H. (eds) Grand Challenges in Fungal Biotechnology, **2020**, Springer

[2] P. Gomez de Santos et al., Tetrahedron, **2019**, 75: 1827- 1831

[3] P. Gomez de Santos et al., ACS Catal., **2018**, 8, 6, 4789–4799

Desarrollo de metodologías para la intensificación de la hidrólisis enzimática de celulosa

Celia Álvarez-González,^{a,b} Juan M Bolívar,^a Mauricio Zurita,^b y Miguel Ladero^a

^a Universidad Complutense de Madrid: 28040 Madrid, España, Departamento de Ingeniería Química y de Materiales

^b Universidad Loyola Andalucía: 41704 Sevilla, España, Departamento de Ingeniería

E-mail: calvarez@uloyola.es

La biomasa lignocelulósica surge como una potente alternativa a combustibles fósiles y producción de compuestos de alto valor añadido, debido a que es abundante, renovable y barata. Está compuesta principalmente por celulosa (40-50 %), hemicelulosa (20-30 %) y lignina (10-25 %). La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y las enzimas que participan en la degradación enzimática y la despolimerización de la celulosa son las celulasas y existen tres tipos: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Para mejorar los procesos de hidrólisis de celulosa es fundamental disponer de buenos catalizadores y de un buen conocimiento de la cinética del proceso y de los fenómenos de transferencia de materia que ocurren en la superficie del sólido. Estos dependen fuertemente del tamaño de la enzima, del tamaño de poro y de las capacidades de adsorción, que limitan la velocidad de reacción. Por otro lado, el diseño de reactores eficientes y de métodos de inmovilización y modelos cinéticos es crítico para poder llevar a cabo su implementación a nivel industrial, de forma que permita alcanzar una alta productividad y estabilidad operacional.

En esta comunicación se mostrará en primer lugar el análisis integral de la última de etapa de degradación de celulosa: la hidrólisis de celobiosa. Para ello se mostrarán resultados relativos a elección del soporte y la química de inmovilización empleada, las características del catalizador, la carga del catalizador, el tiempo de residencia, la cinética del proceso y la hidrodinámica del reactor. También es importante el desarrollo de metodologías que permitan estudiar los fenómenos de transferencia que ocurren en el reactor, junto con el régimen flujo. Estos biocatalizadores se implementaron en la hidrólisis de celobiosa mediante experimentos en discontinuo/continuo, donde se estudió la cinética de la reacción.

Finalmente, se presentarán metodologías para describir el transporte de materia en el interior de sólidos porosos y a través de lechos fijos. Esto permitirá en el futuro estudios de optimización de procesos de degradación de biomasas incorporando enzimas cuyos dominios de unión han sido diseñados para mejorar la accesibilidad al sustrato y las propiedades de adsorción/desorción enzima/sustrato. La caracterización experimental de estas enzimas, así como su análisis en base a cinéticas con constantes de difusión y adsorción/desorción modificadas, permitirá explorar la mejora de procesos de hidrólisis mediante el diseño racional de enzimas bajo consideraciones de transporte y accesibilidad.

Continuous High Fructose Syrup (HFS) production using packed bed reactor with *Caldicoprobacter algeriensis* glucose isomerase

Fadia V. Cervantes,^a Sawssan Neifar^{b,*} Amel Bouanane-Darenfed^c, Hajar BenHlima^d, Antonio O. Ballesteros^a, Samir Bejar^b, Francisco J. Plou^a,

^a Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC, Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain

^b Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, , Sfax 3018, Tunisia

^c Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), University of Sciences and Technology of Houari Boumediene (USTHB), Bab Ezzouar 16111, Algeria

^d Unit of Algae Biotechnology, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia

E-mail: fadiacervantes@icp.csic.es

High Fructose Syrup (HFS) is a mixture of glucose and fructose that is generally recognized as safe (GRAS) and has aroused great attention in the world's sweetener market due to its better technical and functional properties over sucrose, such as flavor enhancer, good humectant, no crystal formation and good stability in acidic foods. These outstanding functional properties allow its application as an important food ingredient in many foodstuffs, including yogurt, ice cream, chocolate milk and beverages.

Recently, several studies have inclined toward the use of raw materials such as cheese whey for the production of this syrup. Crucial step in the HFS production process is the isomerization reaction, which is widely performed by glucose isomerase (GICA).¹

A novel thermostable and efficient glucose isomerase GICA from *Caldicoprobacter algeriensis*, results in a very interesting candidate for HFS production because of its excellent thermostability and very good yield of isomerization (54.7% of D-fructose).²

In this work, GICA from *Caldicoprobacter algeriensis* was immobilized by ionic adsorption on polymethacrylate carriers (Sepabeads EC-EA and EC-HA). Sepabeads EC-HA yielded the highest recovery of activity (89%).³ Adsorbed enzyme showed more storage stability compared to the free form and an excellent operational stability, preserving 83% of its initial activity after 19 successive 3 h reaction cycles at 85 °C.

Continuous process for High Fructose Syrup (HFS) production was established with the adsorbed GICA using a packed bed reactor during eleven days at 70 °C. HPAEC-PAD analysis showed a maximum bioconversion rate of 49% after 48 h of operation and this rate remained approximately constant during the eleven days of operation. Consequently, the productivity of the PBR was 45 g L⁻¹ h⁻¹.

[1] Dehkordi, A. M., Tehrany, M. S., & Safari, I., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2009, 48(7), 3271–3278.

[2] Neifar, S., Hlima, H. B., Mhiri, S., Mezghani, M., Bouacem, K., Ibrahim, A. H., Bejar, S., *Int J Biol Macromol*, 2019, 129, 31–40.

[3] S. Neifar, F.V. Cervantes, H. BenHlima, A. Bouanane-Darenfed, A.O. Ballesteros, F.J. Plou, S. Bejar. *Food Chemistry* 2020, 309, 125710.

Lipasas: biocatalizadores para la síntesis e hidrólisis de ácido poliláctico

Carlos Murguiondo, Eva Calviño, María Jesús Martínez, Jorge Barriuso y Alicia Prieto*

c/ Ramiro de Maeztu, 9; 28040-Madrid, España, Centro de Investigaciones Biológicas
Margarita Salas (CSIC)
aliprieto@cib.csic.es

La creciente preocupación por el impacto medioambiental de los plásticos no biodegradables y el carácter no renovable de muchos de los materiales plásticos existentes han impulsado la búsqueda de nuevos materiales biodegradables y/o biobasados, comúnmente conocidos como bioplásticos. Entre ellos, los poliésteres alifáticos y en especial el ácido poliláctico (PLA) son de especial interés debido a su biocompatibilidad, termoplásticidad y biodegradabilidad en condiciones controladas [1]. El uso del PLA se extiende a campos tan diversos como la industria médica, la industria textil, la del embalaje, la del transporte, la agricultura y la impresión 3D.

El PLA puede ser sintetizado mediante dos rutas distintas: la policondensación directa del ácido láctico (LA) o la polimerización por apertura del anillo (ROP) de su dímero cíclico, la lactida. Ambos procesos pueden emplear catalizadores químicos o enzimáticos, aunque la biocatálisis tiene como ventajas añadidas su alta enantio- y regioselectividad y su desarrollo en condiciones de reacción más suaves. En cuanto a la degradación del PLA, dado que los microorganismos degradadores de PLA no están muy extendidos y su descomposición en suelos es lenta [2], su despolimerización total es un paso crucial para la regeneración y el reciclado del polímero, e importante para reducir el impacto medioambiental asociado a su uso.

Las lipasas son enzimas ampliamente estudiadas en este campo, ya que catalizan tanto la hidrólisis (en medios acuosos) como la síntesis (generalmente en solventes orgánicos) de los poliésteres alifáticos. No obstante, las severas condiciones en las que se desarrollan estas reacciones hacen interesante la inmovilización de las enzimas para mejorar su estabilidad y posibilitar su reutilización. En este trabajo, se han utilizado varias lipasas comerciales: la de *Candida rugosa* (CRL, tipo VII de Sigma), y dos más suministradas por Novozymes, Eversa, y la lipasa A de *Candida antarctica*. Las enzimas se inmovilizaron como mCLEAs (*magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates*), ensayando su actividad en hidrólisis y síntesis, y comparándolas con las de su forma soluble. La cantidad de LA liberado en la hidrólisis se determinó mediante GC/MS, y la polimerización de la lactida se siguió mediante MALDI-TOF y RMN. La actividad específica de las enzimas inmovilizadas osciló entre 140 y 190 mU/mg soporte. En mayor o menor medida, todos los biocatalizadores probados catalizan ambos tipos de reacciones, y cabe destacar que los resultados preliminares obtenidos con las enzimas inmovilizadas parecen superar los de sus homólogas libres y que la actividad de las mCLEAs en hidrólisis se mantiene durante al menos 6 días. Estos datos indican que las lipasas mejoran su actividad y estabilidad en estas reacciones tras su inmovilización como mCLEAs.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen la financiación recibida por los proyectos RTI2018-093683-B-I00 y S2018/EMT-445 y el apoyo de la plataforma SusPlast-CSIC.

Dorgan, J.R.; Lehermeier, H.; Mang, M. *J. Polym. Environ.* **2000**, 8, 1–9.
Brodhagen, M.; Peyron, M.; Miles, C.; Inglis, D.A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 1039–1056.

Desarrollo de procesos multicatalíticos empleando enzimas

Vicente Gotor-Fernández,* Jesús Albarrán-Velo, Lorena Escot, Sergio González-Granda, Marina López-Agudo, Laura Rodríguez-Fernández e Iván Lavandera*

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica. Universidad de Oviedo. Avenida Julián Clavería s/n. Oviedo 33006 (Asturias)

E-mail: vicgotfer@uniovi.es

El empleo de enzimas en síntesis orgánica se considera hoy en día como una metodología ya consolidada tanto a nivel académico como industrial, especialmente a la hora de obtener productos de alto valor y en forma ópticamente activa.[1] A lo largo de las últimas décadas, se han descrito numerosos procesos biocatalizados tanto en medios acuosos como orgánicos, lo que ha facilitado que diversas clases de enzimas hayan aportado soluciones para reacciones individuales y específicas dentro de complejas rutas quimioenzimáticas.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en ampliar el potencial de las enzimas mediante su combinación, idealmente en un solo recipiente, con otros agentes catalíticos como puedan ser varios biocatalizadores, especies metálicas, o más recientemente el empleo de procesos fotocatalizados. Por ello, en esta comunicación, se describirán diversos planteamientos para acceder a compuestos quirales, principalmente a alcoholes[2] y aminas,[3] prestando especial atención al empleo de catalizadores metálicos y enzimas en procesos desarrollados en cascada. Uno de los aspectos más críticos de estos procesos reside en encontrar combinaciones adecuadas para los distintos tipos de catalizadores involucrados, por lo que se hará hincapié en el desarrollo de aproximaciones secuenciales o cascadas concurrentes.

[1] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88–119.

[2] (a) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5800–5807; (b) S. González-Granda, I. Lavandera, D. Méndez-Sánchez, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 520–527; (c) J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Mol. Catal.* **2020**, *493*, 111087; (d) S. González-Granda, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945–13951; (e) M. López-Agudo N. Ríos-Lombardía, J. González-Sabín, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemSusChem* doi.org/10.1002/cssc.202101313.

[3] (a) J. Albarrán-Velo, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 200–211; (b) J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 4096–4108.

Oro(I) y alcohol deshidrogenasas: Diseño de procesos en cascada concurrente altamente selectivos

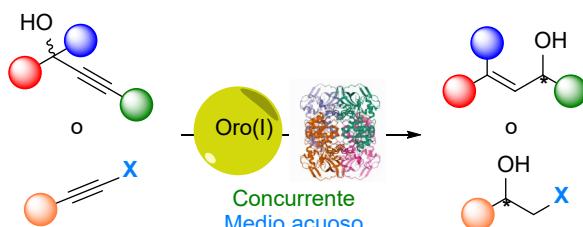
Sergio González-Granda, Lorena Escot, Iván Lavandera* y **Vicente Gotor-Fenández***

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica. Universidad de Oviedo. Avenida Julián Clavería 8. 33006 Oviedo (Asturias, España)

E-mail: uo227155@uniovi.es

La posibilidad de combinar catalizadores metálicos y enzimas es una herramienta útil en síntesis orgánica.¹ Así, en las últimas dos décadas, los catalizadores de oro(I) se han consolidado como activadores altamente eficientes de enlaces múltiples C-C bajo condiciones suaves de reacción tanto en medios orgánicos como acuosos.² Sin embargo, pese a las grandes oportunidades que presenta la combinación de especies de oro(I) y enzimas, el desarrollo de procesos en cascada apenas ha sido descrito,³ realizándose estos de manera secuencial debido a la incompatibilidad entre ambos tipos de catalizadores en condiciones de reacción óptimas para ambos.

En este trabajo se describen dos cascadas concurrentes, empleando en ambas un catalizador de oro(I) de tipo N-carbeno heterocíclico y una alcohol deshidrogenasa (ADH). Por un lado, se describe un proceso que combina la isomerización de distintos alcoholes propargílicos racémicos, mediante un reagrupamiento de Meyer-Schuster, seguida de una segunda etapa de biorreducción asimétrica, obteniéndose de esta manera ambos enantiómeros de los alcoholes alílicos deseados dependiendo de la selectividad de la ADH empleada (Esquema 1, arriba).⁴



Esquema 1. Aproximaciones en cascada empleando catalizadores de Au(I) y ADHs.

Por otro lado, se muestra la obtención estereoselectiva de distintas halohidrinas a partir de haloalquinos (Esquema 1, abajo), donde el catalizador de oro(I) cataliza en este caso la hidratación regioselectiva del haloalquino de partida, para dar la correspondiente α -halocetona que es reducida en one-pot por una ADH, pudiendo acceder con ADH estereocomplementarias, a ambos enantiómeros de las halohidrinas con elevados rendimientos y estereoselectividades.

- [1]. F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nature Catal.* **2018**, *1*, 12-22.
- [2]. R. Doreal, A. M. Echavarren, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9028-9072.
- [3]. Por ejemplo: (a) Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nature Chem.* **2013**, *5*, 100-103; (b) M. Odachowski, M. F. Greaney, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10032-10035; (c) S. Mathew, A. Sagadevan, D. Renn, M. Rueping, *ACS Catal.* **2021**, *11*, 12565-12569.
- [4]. S. González-Granda, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945-13951.

Improving Alcalase features through immobilization and step-by-step chemical modification

Roberto Morellon-Sterling ^a, **Fouzia Hussain** ^{a,b}, **Sara Arana-Peña** ^a, **Sabrina Ait Braham** ^{a,d}, **Jakub F. Kornecki** ^a, and **Roberto Fernandez-Lafuente** ^{a*}

E-mail: r.m.sterling@csic.es

^a Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

^b Department of Biochemistry, Government College University, Faisalabad, Pakistan

^c Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia 06000, Algeria

^d Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria

Proteases have a great interest in many industrial processes like reduction of allergenicity, fine chemistry, production of bioactive products or even in the detergent industry. Alcalase is a protease produced by a strain of *Bacillus licheniformis* with subtilisin as the main enzymatic component.

The present work studies the use of different methods of immobilization and further chemical modification to improve the features of Alcalase. Immobilization on glyoxyl agarose beads produced a significant stabilization, maintaining over 50% activity. On the other hand, the enzyme was hardly immobilized on aminated supports (due to its high IP) or in glutaraldehyde activated supports at high ionic strength, but it was immobilized on glutaraldehyde-activated supports at low ionic strength [1]. Thus, we can assume that there is a synergy between the ionic exchange and the covalent attachment. The biocatalyst showed 50% of the initial activity against Boc-L-alanine-4-nitrophenyl ester while the activity against casein was doubled after immobilization.

Then, the glyoxyl-ficin biocatalyst was chemically modified to further improve the enzyme stability. However, neither the chemical amination of the immobilized enzyme nor the treatment of the enzyme with glutaraldehyde produced any significant further stabilization of Alcalase. Nevertheless, the glutaraldehyde modification of previously aminated enzyme produced a great increasement in the enzyme stability [2]. The hydrolysis of casein using this biocatalyst was 30% slower than using the not-modified Alcalase immobilized on glyoxyl agarose at 50 °C, however at 69 °C it was 10% more active.

[1] S.A. Braham, F. Houssain, R. Morellon-Sterling, S. Kamal, J.F. Kornecki, O. Barbosa, D.E. Kati, R. Fernandez-Lafuente. Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: Enzyme stabilization and improved proteolytic activity. *Biotechnol. Prog.* **2019**, 35 (2), 1-8.

[2] F. Houssain, S. Arana-Peña, R. Morellon-Sterling, O. Barbosa, S.A. Braham, S. Kamal, R. Fernandez-Lafuente. Further stabilization of alcalase immobilized on glyoxyl supports: Amination plus modification with glutaraldehyde. *Molecules*. **2018**, 23, 3188.

An Integrated Enzymatic Approach to Produce Sugar Esters

C. García-Oliva, A. Merchán, A. Perona, P. Hoyos, M. J. Hernáiz*

Biotransformation Group. Department of Chemistry in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid (Spain)

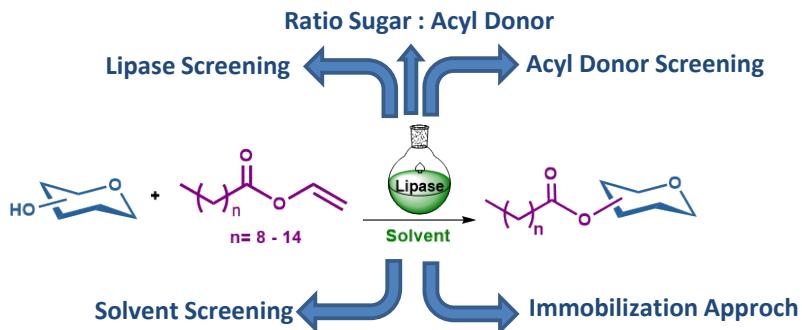
E-mail: mjhernai@ucm.es

Sugar fatty acid esters are an environmentally friendly alternative to other conventional surfactants, which can be successfully prepared by the use of lipases under mild reaction conditions. However, as it is well known, the commercial use of lipases is often hampered by their low-stability, non-reusability and high cost. Thus, although some lipases have shown to mediate the synthesis of sugar esters, those disadvantages make difficult the performance of the processes at an industrial scale and there is a rising demand for new biocatalytic strategies for the synthesis of these biosurfactants.

Immobilization of enzymes is a common strategy which allows to overcome those drawbacks, and recycling of the biocatalyst. Different immobilization techniques have been described to enhance enzyme properties and to facilitate downstream processing.

In this work we have carried out a screening of commercial lipases as biocatalysts of the synthesis of novel sugar-based surfactants. Lipases from *Pseudomonas sp.*, *Ps. fluorescens*, *Ps. cepacia*, *Ps. stutzeri* and *Candida antarctica B* were included in the study. Lipase from *Ps. stutzeri* (PSL) catalysed transesterification of rhamnose was chosen as standard reaction to optimize different parameters (temperature, reaction medium, the length of the vinyl ester chain) achieving maximum conversions in short times when employing vinyl laurate. Best conditions were then applied in the transesterification of a battery of sugar substrates for the synthesis of different biosurfactants. Molecular modelling studies were carried out to explain the binding mode of different sugars to PSL. The 3D structure of the protein is described through homology modelling, and molecular dynamics simulation to obtain a stable model. The modelled structure was used to perform docking experiments with different sugars showing that all sugars could access the active site of lipase, but not all of them has the right orientation for esterification reaction.

PSL was also immobilized using different techniques: entrapment, adsorption or covalent binding. The best immobilized biocatalyst was characterized and the reaction conditions have been studied, including the employ of more sustainable solvents. Afterwards, the most promising conditions have been applied in successive cycles by the recycling of the biocatalyst.



Scheme 1. Biocatalyzed Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters.

Multienzymatic cascade systems for sustainable chemistry: a case of study for synthesis of fagomine

Oscar Romero*, Marina Guillén, Gregorio Alvaro

^a Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain
E-mail: oscarenrique.romero@uab.cat

Multienzymatic cascade systems are gaining significant attention, especially for the production of fine chemicals in the pharmaceutical and cosmetic industry, due to their low environmental impact and sustainability [1]. The multienzymatic systems offer attractive advantages such as: time, chemicals and cost may be reduced, reversible reactions can be driven and the concentration of inhibitory or unstable intermediary compounds can be minimized.

This work presents the development of a new multi-enzymatic cascade process for the synthesis of carbohydrate-based drugs from cheap materials such as glycerol. This multienzyme system was applied to study the synthesis of Fagomine, an iminocyclitol with enormous nutraceutical potential. A scheme of the multienzymatic system is shown in the Figure 1.

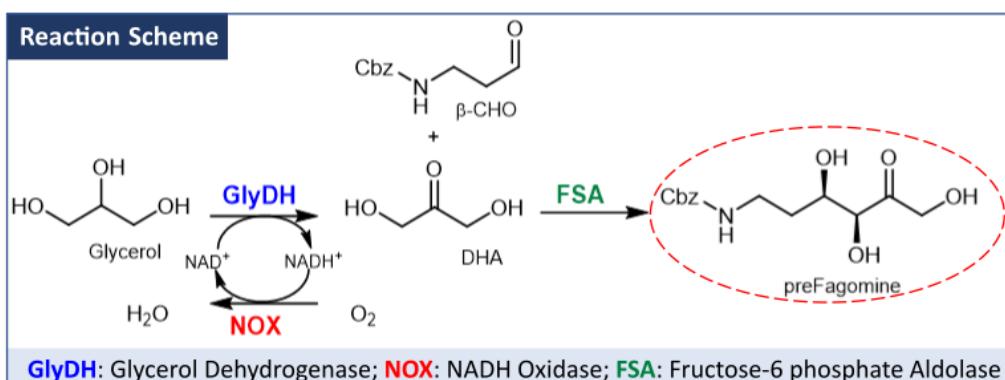


Figure 1. Scheme of the multienzymatic system.

The influence of the concentration of the substrates and enzymes on the final yield of preFagomine was evaluated. All the reactions were performed at 30 °C and pH 7.5, a compromise conditions for the three enzymes. The results show a strong influence on the final yield at high concentration of the acceptor aldehyde (β -CHO), probably due to the enzyme inactivation induced by this substrate [2]. However, at moderate concentration of this substrate high yield of product was obtained (85%).

In conclusion, we report a new and interesting strategy for multienzymatic synthesis of iminocyclitols, with the potential to become an attractive platform to produce different carbohydrate drugs by using different aldehydes and/or aldolases.

[1] Sheldon *et al.* *Chem. Rev.* **2018**, 118, 801-838

[2] Ohs *et al.* *Biotechnol. Progr.* **2018**, 34, 1081-1092

PÓSTERS

Enzymatic Synthesis of Phloretin α -Glucosides Using a Sucrose Phosphorylase Mutant and its Effect on Solubility, Antioxidant Properties and Skin Absorption

Jose L. Gonzalez-Alfonso^{a,b}, Zorica Ubiparip^b, Elena Jimenez-Ortega^c, Ana Poveda^d, Cristina Alonso^e, Luisa Coderch^e, Jesus Jimenez-Barbero^d, Julia Sanz-Aparicio^c, Antonio O. Ballesteros^a, Tom Desmet^b and Francisco J. Plou^a.

^a Institute of Catalysis and Petrochemistry (ICP-CSIC), 28049 Madrid, Spain

Centre for Synthetic Biology (CSB), Department of Biotechnology, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium

^c Institute of Physical-Chemistry Rocasolano, CSIC, 28006 Madrid, Spain

Center for Cooperative Research in Biosciences, CIC bioGUNE, Basque Research & Technology Alliance (BRTA), 48160 Derio, Biscay, Spain

^e Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), 08034 Barcelona, Spain.

^f Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Plaza Euskadi 5, 48009 Bilbao, Spain

E-mail: jose.l.g@csic.es

Glycosylation of polyphenols may increase their aqueous solubility, stability, bioavailability or pharmacological activity. Herein, we used a mutant of sucrose phosphorylase from *thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* engineered to accept large polyphenols (variant TtSPP_R134A) to produce phloretin glucosides [1]. The reaction was performed using 10% (v/v) acetone as cosolvent. The selective formation of a monoglucoside or a diglucoside (53% and 73% maximum conversion percentage, respectively) can be kinetically controlled. MS and 2D-NMR determined that the monoglucoside was phloretin 4'-O- α -D-glucopyranoside and the diglucoside [phloretin-4'-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-glucopyranoside], a novel compound. The molecular features that determine the specificity of this enzyme for 4'-OH phenolic group were analysed by induced-fit docking analysis of each putative derivative, using the crystal structure of TtSPP and changing the mutated residue. The mono- and diglucoside were, respectively, 71- and 200-fold more soluble in water than phloretin at room temperature. The α -glucosylation decreased the antioxidant capacity of phloretin, measured by DPPH and ABTS assays; however, this loss was moderate and the activity could be recovered upon deglycosylation *in vivo*. Since phloretin attracted great interest in dermocosmetic applications, we analyzed the percutaneous absorption of glucosides and the aglycon employing a pig skin model. Although the three compounds were detected in all skin layers (except the fluid receptor), the diglucoside was present mainly in superficial layers.

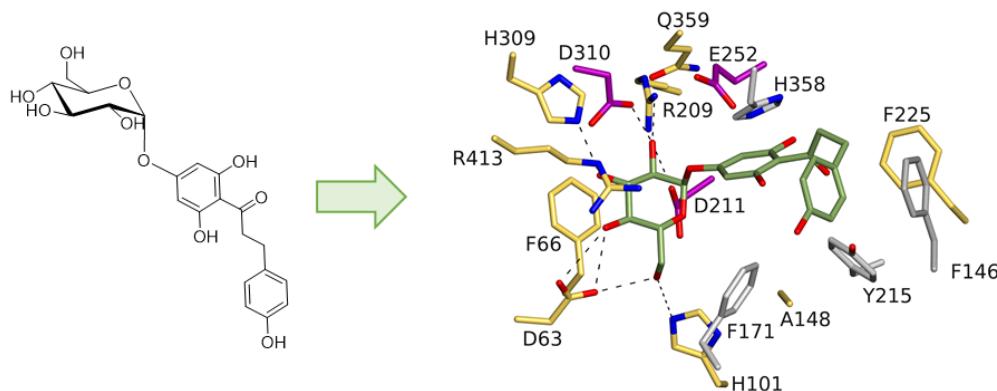


Figure 1. Docking simulation of phloretin monoglucoside into TtSPP_R134A mutant with AutoDock Vina.

[1] J.L. González-Alfonso, Z. Ubiparip, E. Jiménez-Ortega, A. Poveda, C. Alonso, L. Coderch, J. Jimenez-Barbero, J. Sanz-Aparicio, A. Ballesteros, T. Desmet and F.J. Plou, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, 363, 3079-3089.

Layer-by-layer strategy to coimmobilize different lipases in an ordering way

Diego Carballares^a, Sara Arana-Peña^a, Nathalia S. Rios^{a,b}, Luciana R.B. Gonçalves^b and Roberto Fernandez-Lafuente^a

^a Departament of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

^b Departament of Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail: rfl@icp.csic.es

Coimmobilization of lipases may be interesting when they are going to be utilized in the full modification of heterogeneous substrates, like oils or fats, or in cascade reactions (e.g., sequential regioselective modification of multifunctional compounds). Furthermore, to get the spatial ordering of the immobilized lipases may be also interesting, as this may be a key to take full advantage of the enzyme coimmobilization.

The strategy utilized in this work has permitted obtaining combilipases formed by a sandwich-structure with four of the most used lipases and a phospholipase. The enzymes used were the lipases A and B from *Candida antarctica* (CALA and CALB), the lipases from *Rhizomocur miehei* (RML) and *Themomycetes lanuginosus* (TLL) together with the phospholipase Lecitase Ultra (LEU). The used strategy was a layer-by-layer coimmobilization; first one lipase was immobilized on octyl-agarose via interfacial activation, next, it was coated with polyethylenimine (PEI). Then, the second enzyme was immobilized over the first layer and crosslinked with glutaraldehyde to prevent enzyme release, and it has been coated with PEI again. Each new enzyme layer was visualized by SDS-PAGE and the activity of each layer was measured by inactivating the previous enzymes using diethyl p-nitrophenylphosphate. The activity of all layers was measured with different substrates (*p*NPB, triacetin, and methyl-mandelate), results depending on the order of the lipase layers in the combilipase, substrate and measurement conditions, showing the impact of the substrate diffusion limitations and tortuosity path in the results.

- [1] S. Arana-Peña; N.S. Rios; C. Mendez-Sanchez; Y. Lokha; D. Carballares; L.R.B. Gonçalves; R. Fernandez-Lafuente. Coimmobilization of different lipases: Simple layer by layer enzyme spatial ordering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *145*, 856–864.

Modulating the properties of the lipases by their immobilization on hydrophobic supports under different conditions.

Diego Carballares^a, Sara Arana^a, Nathalia Rios^{a,b}, Yuliya Lokha^a, Carmen Mendez-Sanchez^a, Luciana R.B. Gonçalves^b, Fernando Lopez-Gallego^c and Roberto Fernandez-Lafuente^a

^a Departament of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

^b Departament of Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brazil.

^c Heterogeneous Biocatalysis Laboratory, Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH-CSIC), University of Zaragoza, 50009, Zaragoza, Spain.

E-mail: rfl@icp.csic.es

Lipases are used because of their stability in diverse conditions and media, ability to recognize many different substrates and to catalyze diverse reactions while exhibiting a high regio or enantioselectivity and/or specificity. Lipases have a specific mechanism of action called interfacial activation. It may be used to get their specific immobilization on hydrophobic supports. We presented here how this immobilization strategy may be used to tune lipase activity and/or stability, by stabilizing different enzyme conformations.

In this work, we have been studied six of the most used lipases, the lipases A and B from *Candida antarctica* (CALA and CALB) and the lipases from *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Themomyces lanuginosus* (TLL), *Candida rugosa* (CRL) and *Rhizomucor miehei* (RML). All of them were immobilized on octyl agarose beads using sixteen different immobilization conditions that differ in pH and in medium composition (phosphate anions, Ca²⁺ cations, NaCl and glycerol), using different loadings of enzymes on the support to favor (or not) the enzyme-enzyme interactions. Then, the properties of the different biocatalysts have been evaluated: activity versus *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB), triacetin and *R* or *S* methyl-mandelate and their thermal stability.

The different immobilization conditions produced biocatalysts with very different features, altering stability and activity, except for CRL and CALB, where almost identical biocatalysts were obtained. For RML, TLL and PFL, the immobilization conditions must be carefully controlled because each immobilization condition produces unique biocatalysts with different properties. This was confirmed by fluorescence studies using TLL. This way, the preparation of biocatalysts using this support may be a powerful tool to tune enzyme features.

- [1] Y. Lokha; S. Arana-Peña; N.S. Rios; C. Mendez-Sánchez; L.R.B. Gonçalves; F. Lopez-Gallego; R. Fernandez-Lafuente. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. *Enzyme Microb Tech.* **2020**, 133, 109461.
- [2] S. Arana-Peña; N.S. Rios; D. Carballares; Y. Lokha; L.R.B. Gonçalves; R. Fernandez-Lafuente. Effects of enzyme loading and immobilization conditions on the catalytic features of lipase from *pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl-agarose beads. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00036>.

Chemo-enzymatic synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate from CO₂ and glycidol by using Ionic Liquids

Rocio Villa,^a Marina Garcia-Castellanos,^a Susana Nieto,^a Antonio Donaire,^b Eduardo Garcia-Verdugo^c and Pedro Lozano^a

^a University of Murcia, Murcia, Spain. Dep. of Biochemistry.

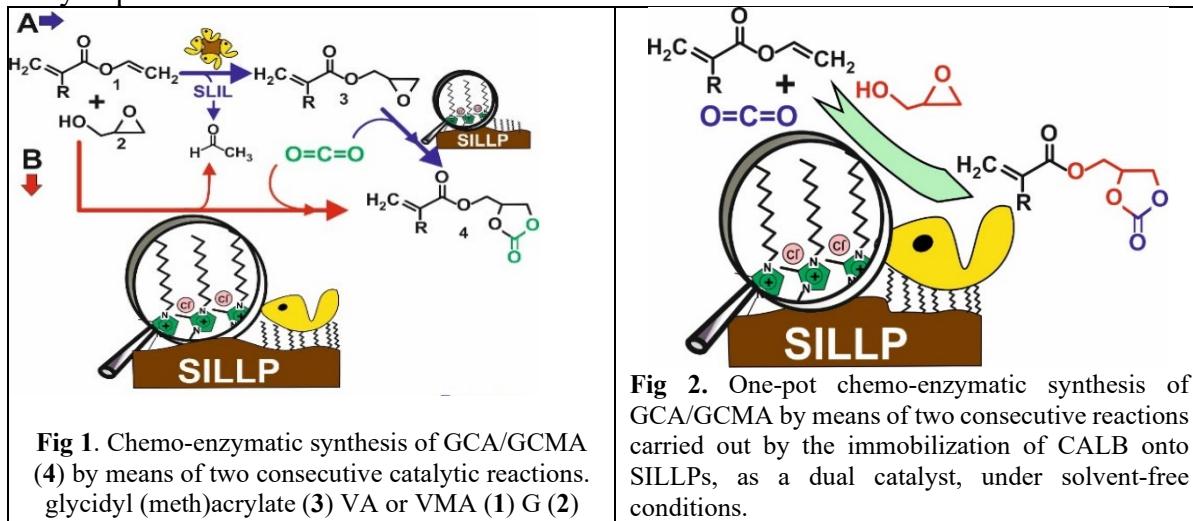
^b University of Murcia, Murcia, Spain. Dep. of Inorganic Chemistry.

^c University Jaume I, Castellón, Spain. Dep. of Organic and Inorganic Chemistry.

E-mail: rocio.villa@um.es

Glycerol carbonate (meth)acrylate (GCA and GCMA) are very useful monomers in the polymer industry as degradable pressure-sensitive adhesives and bio-based non-isocyanate polyurethanes (NIPUs) with a wide range of mechanical properties. [1] However, these compounds are usually obtained by conventional chemical processes, using metal catalysts, volatile organic solvents as reaction media and high pressure and temperature conditions. [2]

Alternatively, in this work, a sustainable chemo-enzymatic process has been carried out for the first time to obtain GCA and GCMA through the use of lipase and ionic liquids (ILs) technologies. [3] The process is based on two consecutive catalytic reactions, which can be carried out by sequential experimental steps (**Fig 1**) or in a one-pot system (**Fig 2**). The first reaction is the lypase catalyzed transesterification of vinyl (meth)acrylate (VMA or VA) with glycidol (G) in *Sponge Like Ionic Liquids* (SLILs) as a reaction medium at 60 °C, and subsequent separation of the glycidyl ester. Then, the cycloaddition of CO₂ to glycidyl (meth)acrylate catalyzed by a *Supported Ionic Liquids Like Phase* (SILLP) in solvent free system at 60 °C and 1 MPa. In the case of the one-pot system, the adsorption of CALB onto SILLP generate a chemo-enzymatic material that is able to perform the two catalytic steps for the synthesis of GCMA from vinyl methacrylate, glycidol and CO₂, leading to up to 100% yield after 6 h. Furthermore, it is important to highlight that all compounds of the reaction (biocatalyst, SILLP, SLIL) can be fully recovered and reused for at least 6 operation cycles with unchanged catalytic performance.



[1] H. Y. Chen, P. Chauhan and N. Yan, *Green Chem.*, **2020**, 22, 6874–6888..

[2] A. Zanoni, G. Gardoni, M. Sponchioni and D. Moscatelli, *J. CO₂ Util.*, **2020**, 40, 101192.

[3] R. Villa, R. Porcar, S. Nieto, A. Donaire, E. Garcia-Verdugo, S.V. Luis, P. Lozano. *Green Chem.*, **2021**, 23, 4191-4200.

Acknowledgements: RTI2018-098233-B-C21 and RTI2018-098233-B-C22 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades), 20790/PI/18 (Fundacion SENECA CARM), and UJI-B2019-40 (Pla de Promoció de la Investigació de la Universitat Jaume I) grants.

Identificación del origen de la actividad peroxidasa en una peroxygenasa fúngica evolucionada de *Agrocybe aegerita*

Alejandro Beltrán Nogal,^a Patricia Molina Espeja,^a María Alejandra Alfuzzi,^a Víctor Guallar^{b, c} y Miguel Alcalde^{a,*}

^a C. de Marie Curie 2, 28049 Madrid, España, Instituto de Catálisis y Petroquímica - CSIC.

^b Plaça d'Eusebi Güell 1-3, 08034 Barcelona, España, Barcelona Supercomputing Centre.

^c Passeig de Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, España, ICREA

E-mail: malcalde@icp.csic.es

Las **peroxigenasas inespecíficas (UPOs)** son enzimas fúngicas con propiedades híbridas, ya que combinan la actividad **peroxigenasa** (oxifuncionalización selectiva en enlaces carbono-hidrógeno no activados) con la actividad **peroxidasa** (oxidaciones de un electrón) [1]. Muchas peroxydoras ligninolíticas llevan a cabo estas oxidaciones mediante residuos aromáticos de la superficie que conectan con el grupo hemo del centro activo mediante **rutas de transferencia de electrones de largo recorrido (LRET)** [2]. Indistintamente, la actividad peroxydasa en estas enzimas también puede iniciarse en el canal de acceso al grupo hemo.

En este estudio hemos indagado en el origen de la actividad peroxydasa en UPOs usando como modelo la variante **PaDa-I**, un mutante de secreción de la UPO de *Agrocybe aegerita* generado mediante evolución dirigida [3]. Tras identificar residuos superficiales potencialmente oxidables mediante simulaciones de QM/MM, se generaron librerías independientes mediante mutagénesis saturada para cada una de estas posiciones (Figura 1). Las librerías resultaron ser en su mayor parte inactivas, con unos pocos clones funcionales sin diferencias marcadas entre las actividades peroxydasa y peroxygenasa.

Por el contrario, cuando los residuos que forman un bucle flexible en la entrada al canal del grupo hemo (Gly314-Gly318) fueron sometidos a una mutagénesis saturada combinatorial y estudios computacionales, se pudieron identificar mutantes con actividad mejorada y cambios en el pH óptimo para sustratos peroxydasa, a la vez que conservaban los parámetros cinéticos para sustratos de la actividad peroxygenasa. Nuestro estudio demuestra que el origen de la actividad peroxydasa en UPOs, a diferencia de otras peroxydoras ligninolíticas descritas hasta la fecha, parece localizarse exclusivamente en el canal de acceso al grupo hemo [4].

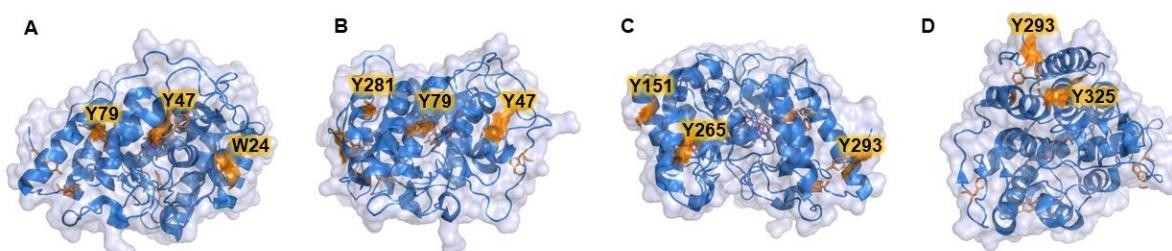


Figura 1. Tyr y Trp expuestos en la superficie de PaDa-I. (A) Trp24, Tyr47, Tyr79. (B) Tyr47, Tyr79, Tyr281. (C) Tyr151, Tyr265, Tyr293. (D) Tyr293, Tyr325.

[1] M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 116-125.

[2] F. J. Ruiz-Dueñas, M. Morales, E. García, Y. Miki, M. J. Martínez, A. T. Martínez, *J. Exp. Bot.* **2008**, *60*, 441-442.

[3] P. Molina-Espeja, E. García-Ruiz, D. González-Pérez, R. Ullrich, M. Hofrichter, M. Alcalde, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3496-3507.

[4] P. Molina-Espeja, A. Beltran-Nogal, A. Alfuzzi, V. Guallar, M. Alcalde, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 741282.

Laboratory evolution and chimeragenesis of iron-sulfur enzymes for the production of isoprenoids.

Mikel Dolz,^a Eva García-Ruiz,^{a,*} Jesús Laborda,^a Merve Keser,^a Greg Bokinsky,^b y Miguel Alcalde^{a,*}

^a Department of Biocatalysis. Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC. Cantoblanco, Madrid, Spain.

^b Department of Bionanoscience, Kavli Institute of Nanoscience, Delft University of Technology. Delft, the Netherlands.

*corresponding authors: malcalde@icp.csic.es; eva.garcia.ruiz@csic.es

IspG is an iron-sulfur (FeS) cluster enzyme involved in isoprenoid-precursors' biosynthesis, particularly in the methylerythritol phosphate (MEP) pathway (Figure 1). Nonetheless, its dependence on external cofactors and complex maturation pathways constrains its activity, hindering its functional expression in foreign hosts and, ultimately, preventing its implementation in industrial biotechnology [1,2].

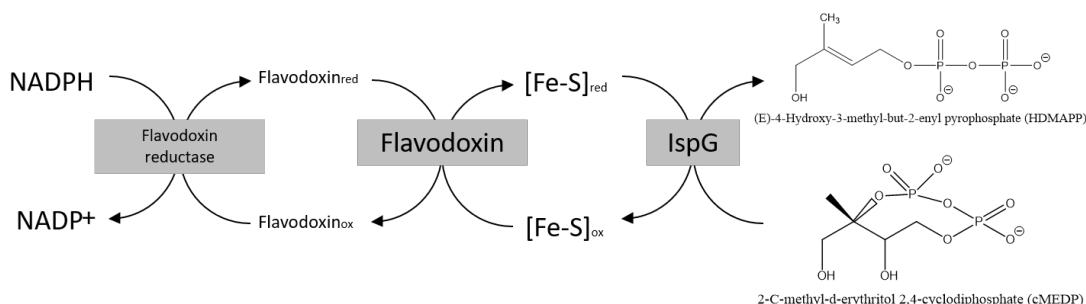


Figure 1. Reaction mechanism of the conversion of 2-C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (cMEDP) to 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HDMAPP) carried out by IspG enzyme, a rate-limiting step for MEP pathway.

In this study, we focus on IspG from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, aiming to elucidate the key components for the catalytic activity, functionality and heterologous expression of IspG. Coupling directed evolution to a biological selection system we were able to spot several mutants of *E. coli*IspG with a higher catalytic activity. The potentially beneficial substitutions introduced could be more precisely assessed by the use of an impaired *E. coli*IspG variant.

On the other hand, chimeras between *E. coli*IspG and *B. subtilis*IspG were designed and their functional expression was estimated. Since the functionality of IspG is essential for bacterial growth; evaluating bacterial growth over time, we were able to detect several chimeric mutants functionally expressed. Overall, our novel results will certainly contribute to elucidate the key components for the catalytic activity and heterologous expression of IspG as well as of other FeS enzymes and, eventually, overcome the main bottlenecks for the biotechnological implementation of MEP pathway in isoprenoids production.

Funding: Spanish Government project PCI2018-092899 under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program grant 722361 EraCoBiotech-IronPlug&Play. M.D. was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC (grant number JAEINT20_EX0335).

[1] A. Biz, R. Mahadevan; Trends in Biotechnology, **2021**, *39*, 665-677.

[2] R. Zou, K. Zhou, G. Stephanopoulos, Too H.P. PLoS One, **2013**, *8(11)*, e79557.

Síntesis de heterobiaril alcoholes quirales empleando ADHs

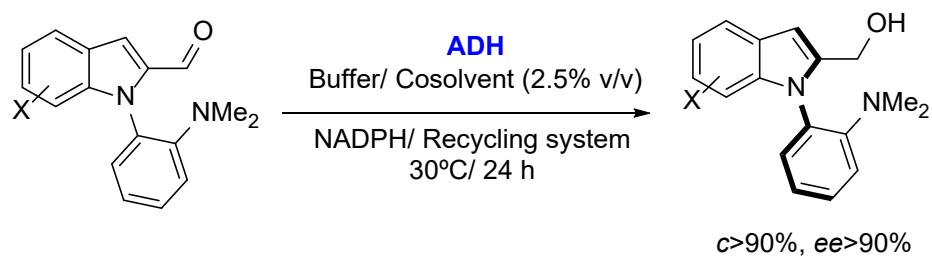
Gonzalo de Gonzalo,^{a,*} Patricia Rodríguez Salamanca,^b Valentín Hornillos,^b Rosario Fernández^a y José María Lassaleta^b

^a Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, c/ Profesor García González 1, 41012, Sevilla, Spain

^b Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-US) and Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), c/ Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain

E-mail: gdegonzalo@us.es

Los compuestos heterobiarílicos presentando quiralidad axial (atropoisómeros) presentan un elevado interés por su aplicación en campos como la catálisis, la ciencia de materiales o la química farmacéutica. Por ello, se deben desarrollar métodos eficientes para la síntesis de estos atropoisómeros con elevadas conversiones y excesos enantioméricos [1]. Entre todos los sistemas heterobiarílicos, aquellos que presentan enlaces C-N son objetivos sintéticos de interés. Las estructuras *N*-heterobiarílicas están presentes en numerosos fármacos y compuestos biológicamente activos [2], empleándose diferentes metodologías para su preparación, incluyendo el *cross-coupling*, el acoplamiento oxidativo, la transferencia de quiralidad central a axial o la transformación atroposelectiva de compuestos heterobiarílicos. En este último tipo se engloba la síntesis biocatalítica desarrollada por Turner y col. para la preparación de heterobiaril *N*-óxidos través de la biorreducción de heterobiaril aldehídos empleando ADHs [3]. En la presente investigación se ha desarrollado la preparación de una serie de *N*-heterobiaril aldehídos de 5 y 6 miembros, para llevar a cabo su reducción selectiva catalizada por una serie de ADHs comerciales, con el objetivo de obtener los heterobiaril alcoholes quirales. Las diferentes condiciones de reacción y el efecto de la estructura de los sustratos han sido analizados con el objetivo de conseguir los alcoholes con las mayores conversiones y purezas ópticas.



X: F, Cl, OMe, CF₃

Esquema 1. Ejemplo de resolución cinética dinámica para la obtención de heterobiarylalcoholes quirales empleando ADHs.

[1] J. K. Cheng, S.-H. Xiang, S. Li, L. Ye, B. Tan, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 4805-4902.

[2] D.-J. Cheng, Y.-D. Shao, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 3081-3099.

[3] S. Staniland, R. W. Adams, J. J. W. McDouall, I. Maffuci, A. Contini, D. M. Grainger, N. J. Turner, J. Clayden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10755-10759

Síntesis de β,β -difluoroaminas catalizada por transaminasas y aminas reductivas

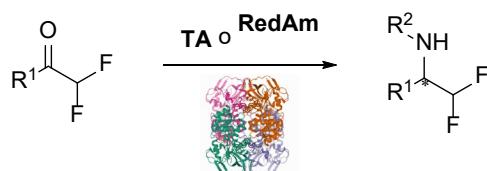
Marina García-Ramos,^a Daniel González-Martínez,^a Aníbal Cuetos,^b Mahima Sharma,^c Gideon Grogan,^c Vicente Gotor-Fenández,^a e Iván Lavandera^a

^a Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, Oviedo (España); ^b ENANTIA, Barcelona (España); ^c Laboratorio de Biología Estructural, Departamento de Química, Universidad de York, York (Reino Unido)

E-mail: lavanderaivan@uniovi.es

La inserción de fragmentos difluorados geminales para la síntesis de nuevas moléculas es un campo aplicado mayoritariamente a la preparación de fármacos ya que se ha demostrado que la inserción de unidades CF₂ ofrece en muchos casos propiedades beneficiosas a la hora de diseñar nuevos compuestos biológicamente activos.¹ En concreto, las aminas β,β -difluoradas han mostrado perfiles biológicos muy interesantes como agentes inhibitorios de enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP).²

En este trabajo se describen distintos métodos biocatalíticos para obtener 2,2-difluoroetan-1-aminas en forma enantiopura, en particular mediante el desarrollo de procesos de asimetrización sobre 2,2-difluorocetonas catalizados bien por aminas reductivas (RedAms),³ o bien mediante el empleo de transaminasas (TAs,⁴ Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de β,β -difluoroaminas enantioenriquecidas utilizando RedAms o TAs.

Así, ha sido posible obtener una serie de 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas de manera enantiopura que difieren en el tipo de sustitución y su posición en el anillo aromático, empleándose transaminasas de estereopreferencia complementaria. Estas transformaciones requieren solo de un pequeño exceso molar del donador de amina debido a que se encuentran termodinámicamente favorecidas. Por otro lado, se han empleado distintas RedAms para la síntesis selectiva de aminas difluoradas primarias y secundarias utilizando distintos donadores de amina, observándose una actividad inesperada de las mismas ya que proporcionan también cantidades apreciables del alcohol difluorado debido a la biorreducción directa del grupo carbonilo de la cetona halogenada.⁵

- [1] N. Levi, D. Amir, E. Gershonov, Y. Zafrani, *Synthesis* **2019**, *51*, 4549-4567.
- [2] D. Schirlin, S. Baltzer, J.-G. Heydt, M. J. Jung, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *1*, 243-258.
- [3] (a) M. Sharma, J. Mangas-Sánchez, N. J. Turner, G. Grogan, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2011-2025; (b) L. Ducrot, M. Bennett, G. Grogan, C. Vergne-Vaxelaire, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 328-351.
- [4] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254.
- [5] D. González-Martínez, A. Cuetos, M. Sharma, M. García-Ramos, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, G. Grogan, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2421-2425.

Modulating Fatty Acid Epoxidation vs. Hydroxylation in a Fungal Peroxygenase

Juan Carro,^a Alejandro González-Benjumea,^b Víctor Guallar,^c Ana Gutiérrez,^b y Ángel T. Martínez^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

^b Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla

E-mail: jcarro@cib.csic.es

Unspecific peroxygenases (UPOs) are fungal secreted counterparts of the cytochrome P450 monooxygenases present in most living cells. Both enzyme types share the ability to perform selective oxygenation reactions. Moreover, the *Marasmium rotula* UPO (MroUPO) catalyzes reactions of interest compared with the previously described UPOs, including formation of reactive epoxy fatty acids. To investigate substrate epoxidation, the most frequent positions of oleic acid at the MroUPO heme channel were predicted using binding and molecular dynamics simulations. Then, mutations in neighbor residues were designed aiming at modulating the enzyme epoxidation vs hydroxylation ratio. Both the native (wild-type recombinant) MroUPO and the mutated variants were expressed in *Escherichia coli* as active enzymes, and their action on oleic and other fatty acids was investigated by gas chromatography–mass spectrometry in combination with kinetic analyses. Interestingly, a small modification of the channel shape in the I153T variant increased the ratio between epoxidized oleic acid and its additionally hydroxylated derivatives. A fully opposite effect was attained with the double I153F/S156F variant that completely abolished the ability of the MroUPO to epoxidize oleic acid (while no activity was detected for the I153V variant). The rationale for these results was revealed by the substrate positioning in the above computational simulations, which predict a shorter distance between the oleic acid double bond and the oxygen atom of the peroxide-activated heme (compound I) in the I153T variant than in the native enzyme, promoting epoxidation. In contrast, the I153F/S156F double mutation fully prevents the approach of oleic acid in the bent conformation required for double-bond epoxidation, although its (sub)terminal hydroxylation was predicted and experimentally confirmed. The I153T mutation also increased the UPO selectivity on polyunsaturated fatty acid epoxidation, strongly reducing the ratio between simple epoxides and their hydroxylated derivatives, with respect to the native UPO.

Estudio cinético de la acción de lacasa sobre catecolaminas y compuestos relacionados

Jesús Manzano-Nicolás,^{a,*} Amaury Taboada-Rodríguez,^a Jose-Antonio Teruel-Puche,^b Fulgencio Marín-Iniesta,^a Jose Tudela-Serrano,^c Pablo García-Molina,^c y Jose-Luis Muñoz-Muñoz^d.

^a*E-30100 Campus de Espinardo, Murcia, España, Grupo de Investigación de Biotecnología de alimentos-BTA, Departamento de Tecnología de alimentos, nutrición y bromatología, Universidad de Murcia.*

^b*E-30100 Campus de Espinardo, Murcia, España, Grupo de Investigación de Interacciones moleculares en membranas, Departamento de Bioquímica y biología molecular-A, Universidad de Murcia.*

^c*E-30100 Campus de Espinardo, Murcia, España, GENZ-Grupo de Investigación de Enzimología, Departamento de Bioquímica y biología molecular-A, Universidad de Murcia.*

^d*UponTyne NE1 8ST, Tyne & Wear, Newcastle, Reino Unido, Department of Applied Sciences, Northumbria University.*

E-mail: jesus.manzano1@um.es

Lacasa (EC.1.10.3.2) es una cupoproteína^[1] que presenta diferentes aplicaciones en la industria alimentaria como son: la clarificación de zumos de frutas a través de la reducción de la formación de los complejos fenol-proteína, biorremediación de vertidos fenólicos agroalimentarios, la mejora de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de aditivos e ingredientes alimentarios, y el control de la melanización y la esclerotización de la cutícula de insectos^[2,3]. En este trabajo se han caracterizado cinéticamente la acción de lacasa de *Trametes versicolor* sobre catecolaminas y compuestos relacionados tales como: dopamina, L-dopa, L-adrenalina, L-noradrenalina, DL-isoprenalina, L-isoprenalina, DL- α -metildopa, L- α -metildopa y L-dopa metil ester. Los resultados mostraron que lacasa tuvo sobre dopamina la mayor potencia catalítica ($41.07 \pm 0.29 \text{ h}^{-1}$) respecto los demás sustratos bajo estudio ($3.75\text{-}9.87 \text{ h}^{-1}$). Por otra parte, estudios de *docking* realizados de estas moléculas con lacasa mostraron que la interacción de puente de hidrógeno entre el oxígeno del hidroxilo en C-4 con la His-458 y con el grupo ácido de Asp-206 haría posible la transferencia del electrón al centro de cobre T1 Cu(II) de la enzima. Además Phe-265 facilitaría la adaptación del sustrato a la enzima mediante interacciones $\Pi\text{-}\Pi$. Por otra parte, la presencia en sustratos de un grupo isopropilo unido al nitrógeno (isoprenalina) dificultaría la rapidez de catálisis. La formación del ester (L-dopa methyl ester) prácticamente no afectaría a los parámetros cinéticos. La adición de un metilo (α -methyl dopa), facilitaría la rapidez pero dificultaría la afinidad de catálisis. Por último, L-adrenalina y L-noradrenalina presentaron afinidades de catálisis semejantes a isoprenalina. Estas relaciones estructura-actividad, permitirán optimizar futuras aplicaciones biotecnológicas de lacasas.

[1] G. Janusz, A. Pawlik, U. Świderska-Burek, J. Polak, J. Sulej, A. Jarosz-Wilkoczka, A. Paszczyński, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 966.

[2] A. Kushwaha, S. Maurya, R. K. Pathak, S. Agarwal, P. K. Chaurasia, M. P. Singh, *Res. Adv. Pharm. Nutr. Ind. Enzymol.*, **2018**, *Chapter 11*, 253-277.

[3] T. Asano, Y. Seto, K. Hashimoto, H. Kurushima, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **2019**, *108*, 61–70.

Desarrollo y optimización de un proceso de extracción enzimática de pectina de residuos de piel de naranja (OPW)

Jorge García-Montalvo,^a Alberto García-Martín,^a Félix García-Ochoa,^a Juan Manuel Bolívar,^a Victoria E Santos^a y Miguel Ladero^a.

^a Universidad Complutense de Madrid: 28040 Madrid, España, Departamento de Ingeniería Química y de Materiales.

E-mail: jorgar10@ucm.es

Teléfono de contacto: 666656870

Los residuos agroalimentarios son una fuente importante de polisacáridos de interés como la celulosa, hemicelulosa y pectina; así como de ligninas, monosacáridos, compuestos antioxidantes y aceites esenciales, constituyendo una fuente renovable y abundante de sustratos enzimáticos de un gran interés industrial [1]. El aprovechamiento de estos residuos es fundamental para el establecimiento de sistemas de economía circular mediante la valorización de los mismos. Para ello, se está tratando de implementar un proceso de extracción enzimático de pectina dentro de un proceso biorrefinerio de aprovechamiento de residuo procedente de cáscara de naranja. El primer paso fue el aprovechamiento de las fracciones solubles obteniéndose altas concentraciones de azúcares (35 g/l de glucosa en la extracción del *orange peel waste*, OPW). Después, se realizó un cribado con los diferentes disolventes para la obtención de polisacáridos estructurales, resultando el más idóneo los residuos de piel de naranja extraídos con acetona. Por lo tanto, fue esta la materia prima seleccionada para la puesta a punto de la extracción enzimática de pectina. Para ello, se realizó una optimización que se involucró dos diseños experimentales sucesivos. Primero, un estudio de cribado mediante la metodología Plackett-Burman con los factores principales que pueden afectar al proceso como las variables clásicas de las reacciones enzimáticas (pH, temperatura, tiempo y % sólido seco), así como el uso de varios cócteles enzimáticos comerciales lignocelulolíticos. Tras el cual se seleccionaron aquellos que presentaron una mayor influencia. A continuación, se llevó a cabo un diseño estadístico de experimentos mediante la metodología de Box-Behnken para obtener las condiciones idóneas del proceso. Tras el análisis de los datos obtenidos tras este diseño experimental, se obtuvo un elevado rendimiento (34 % (p/p) en base seca) cuando se usó un preparado enzimático comercial β-glucosidase-1000 de la empresa ASA Spezialenzyme GmbH.

- [1] I. De Torre, V. Martin-Dominguez, M. G. Acedos, J. Esteban, V. E. Santos, and M. Ladero, “Utilisation / upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, pp. 5975–5991, 2019.

Effect of enzyme loading in the efficiency of immobilized ficin-glyoxyl as biocatalyst for the milk clotting

Roberto Morellon-Sterling^a, El-Hocine Siar^{a,b}, and Roberto Fernandez-Lafuente^{a*}

^a Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

^b Equipe TEPA, Laboratoire LNTA, INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

E-mail: r.m.sterling@cisc.es

Among the multiple uses of proteases in the biotechnological and alimentary industries, we can find the coagulation of the milk for the cheese obtention. Traditionally, this process has been performed using free calf rennet obtained from the four stomachs of suckling calves. However, due to the high demand, it is necessary to find non-animal sources of proteases. One alternative are the vegetable proteases like ficin, an enzyme extract obtained from the sap of the fig (*Ficus carica*). Our group has previously reported the advantages of immobilizing ficin on agarose supports [1].

To study the effect that the enzyme loading on the support might have on the casein hydrolysis, biocatalysts with different ficin loadings (3, 10, 30 and 85 mg of enzyme per gram of support) were prepared. Assays of casein hydrolysis were done with the same amount of enzyme in the reaction [2]. Best results in milk clotting were obtained using the highly loaded biocatalysts, even although the caseinolytic activity of these preparations was lower. It is remarkable that using the loading of 3 mg of enzyme per gram of support, no clotting was achieved.

However, this cannot be utilized in cheese making because the clotting produce the obstruction of the agarose pores, and making not possible the separation of the derivative from the casein after clotting. To solve these problems a two-step clotting process was proposed. In the first step, the casein hydrolysis was performed at 4 °C, where milk clotting does not occur. After separating the immobilized biocatalyst derivative from the medium, the second step consisted on heating the supernatant at 40 °C for 20 minutes, producing the clotting of the hydrolyzed casein. It was also assayed with skimmed milk [2].

This work shows how it is possible to achieve milk clotting using a two-step hydrolysis, and also gives evidence on the importance of the enzyme loading on the derivative on processes as complex as the coagulant activity of immobilized enzymes, making important a further understanding if this phenomenon.

E.H. Siar, H. Zaak, J.F. Kornecki, M.N. Zidoune, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochem.* **2017**, 58, 98-104.

E.H. Siar, R. Morellon-Sterling, M.N. Zidoune, R. Fernandez-Lafuente. Use of glyoxyl-agarose immobilized ficin extract in milk coagulation: Unexpected importance of the ficin loading on the biocatalysts. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 144, 419-426.

Búsqueda y caracterización de nuevas lipasas de *Streptomyces exfoliatus DSMZ 41693* con potencial aplicación en la síntesis biotecnológica de glicoestructuras

Juan Toledo-Marcos^{a,#}, Guillermo Rodriguez-Alonso^{a,#}, Lara Serrano-Aguirre^a, Cecelia Garcia-Oliva^b, Ana Saborido^a, Pilar Hoyos^b, María José Hernáiz^b, Miguel Arroyo^a, Isabel de la Mata^{a,*}

^aJosé Antonio Nováis 12, 28040, Madrid, España. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.

^bPlaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, España. Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

[#]Estos dos autores comparten la posición de primer autor.

E-mail: idlmata@ucm.es

En la actualidad existe un gran interés en la obtención de nuevas y diversas glicoestructuras modificadas, con diferentes propiedades y funciones, para su aplicación en distintos y variados campos, además de ser compuestos biodegradables¹. Dentro de los glicoderivados, los glicolípidos se consideran una prometedora alternativa a los surfactantes químicos, con numerosas aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, de detergentes, agrícola, química fina y del cuidado personal². Si bien la síntesis enzimática de estos compuestos mediante lipasas microbianas supone una alternativa más sostenible y eficiente que la síntesis química convencional, los biocatalizadores disponibles son escasos y presentan numerosas limitaciones. En este trabajo se ha abordado la búsqueda *in silico* de lipasas en el genoma de *Streptomyces exfoliatus DSMZ 41693*, bacteria con interés biotecnológico³, identificando cuatro hipotéticos genes: *lipA*, *lipB*, *lipC* y *lipPs* que codifican para las hipotéticas lipasas extracelulares A, B, C y Ps de *S. exfoliatus*, con homología de secuencia con otras lipasas microbianas utilizadas en la síntesis de sucroésteres de ácidos grasos. Los genes, amplificados mediante PCR, se han clonado y expresado extracelularmente en *Rhodococcus sp* T104 KACC 21099 y determinado su actividad. Además, las lipasas A y C, tras su purificación mediante cromatografía de hidrofobicidad, han sido caracterizadas funcionalmente, determinando su condiciones óptimas de reacción y especificidad de sustrato frente a distintos ésteres de pNP, así como su actividad frente a triacilgliceroles y varios plásticos tipo poliéster como poli (succinato de butíleno), poli (succinato de butíleno) -co- (adipato de butíleno) y poli (ϵ -caprolactona). Finalmente, se ha estudiado la síntesis de diferentes sucroésteres de ácidos grasos, demostrando el interés biotecnológico de ambas enzimas.

¹ L. Su, Y. Feng, K. Wei, X. Xu, R. Liu, G. Chen. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 10950-11029

² L.V. Hoyos, L. Ramírez, L., C.J. Yarce, C. Alvarez-Vasco, N.H. Caicedo Ortega, *Catalysts* **2021**, 11, 853.

³ V. Martínez, D. Hormigo, C. del Cerro, P. Gómez de Santos, J. García-Hidalgo, M. Arroyo, A. Prieto, J.L. García, I. de la Mata. *Genome Announc.* **2014**, 2(1):e01272-13.

Overexpression and molecular characterization of novel chitinolytic enzymes from *Metschnikowia pulcherrima*

Marina Minguet-Lobato^{a,b}, Peter E. Kidibule^b, Egle Narmontaitė^b, María Martinez-Ranz^b, Paula Ramiro-Martínez^b, Raquel González^b, Helena Soto^{a,b}, Miguel Remacha^b, Francisco J. Plou^a and María Fernández-Lobato^b

^a 28049 Madrid, Spain, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC

^b Universidad Autónoma de Madrid 28049 Madrid, Spain, Centro de Biología

Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

m.minguet@cbm.csic.es

Carbohydrates are raw materials of high biotechnological value currently employees in biofuels, drugs, functional ingredients and biomaterial production. Many industrial activities generate them as waste by-products, so their transformation and use in new biotechnological applications have generated an inherent interest in the scientific community and in circular economy policies; constituting biocatalysis a sustainable alternative to chemical catalysis. Chitin is the only cationic polysaccharide in nature and the second most abundant. Chitin can be obtained from waste by-products from food industry by few purification steps. Total or partial deacetylation of chitin generates chitosan. This biopolymer has properties such as biodegradability, biocompatibility and bioactivity, which make it of industrial interest. However, its applicability is limited by its low solubility and high viscosity.

Carbohydrate active enzymes are powerful emerging biocatalysts for the generation of chitooligosaccharides (COS), chitin and chitosan hydrolysis derived products. These water soluble products have antimicrobial, antiviral, antioxidant, neuroprotective and antitumor properties, dependent of the degree of polymerization (DP), acetylation (DA) and acetylation pattern (PA). Chitosanases, chitinases, exo-glucosaminidases, exo- β -N-acetylglucosaminidases and de-N-acetylases are chitinolytic enzymes that act on these polymers^{1,2}.

Metschnikowia pulcherrima (*Saccharomycetales*, *Metschnikowiaeae*) is a ubiquitous yeast that has been used as a biological control agent against a large number of phytopathogens. Among the different mechanisms, the secretion of lytic enzymes as chitinases has aroused interest mainly in the treatment of postharvest diseases³. In this work, different chitinolytic enzymes from *M. pulcherrima* have been successfully overexpressed in *Pichia pastoris* GS115 system and biochemical and molecular characterized. This will allow to address more ambitious challenges regarding the production of COS with more controlled DP and PA and the use of promising alternatives in the control of plant diseases in GLICOENZ consortium.

- [1] N. Minguez; P. Kidibule; P. Santos-Soriano; A.O. Ballesteros; M. Fernandez-Lobato; F.J. Plou. *Appl. Sci.* **2021**, 11, 3212.
- [2] P. Kidibule; P. Santos-Moriano; E. Jiménez-Ortega; M. Ramirez-Escudero; M.C. Limón; M. Remacha; F.J. Plou; J. Sanz-Aparicio; M. Fernandez-Lobato. *Microb. Cell Factories*. **2018**, 17.
- [3] D. Saravanakumar, D. Spadardo, A. Garibaldi, M.L. Gullino. *Eur. J. Plant. Pathol.* **2009**, 123, 183-193.

Work supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [PID2019-105838RB-C31/-C32], Fundación Ramón Areces [XIX Call of Research Grants in Life and Material Sciences] and EU EMFF-Blue Economy-2018 [Fish4Fish-863697].

Síntesis enzimática del azelato de Bis(2-etilhexilo) por transesterificación en presencia de una lipasa comercial

María Dolores Murcia, María Gómez, José Luis Gómez, Elisa Gómez, Asunción M^a Hidalgo, Antonio Bódalo, Laura Carrillo

Universidad de Murcia, España, Departamento de Ingeniería Química.

E-mail: md.murcia@um.es

Resumen: Se ha obtenido el azelato de bis(2-etilhexilo) a través de una reacción de transesterificación entre el azelato de dietilo y el 2-etilhexanol, catalizada por la lipasa Novozym®435, en condiciones “solvent free” [1]. En la reacción se libera etanol que se evapora y desplaza la reacción hacia la formación del azelato de bis(2-etilhexilo). La reacción tiene lugar a través de la formación de un producto intermedio, que es un azelato mixto de etilo y 2-etilhexilo. Se ha adoptado la siguiente notación: $A = 2\text{-Etihexanol}$; $B = \text{Azelato de dietilo}$; $P = \text{Azelato mixto de etilo y 2-etilhexilo}$; $Q = \text{Azelato de Bis(2-etilhexilo)}$ y $R = \text{Etanol}$. De acuerdo con esta notación, las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

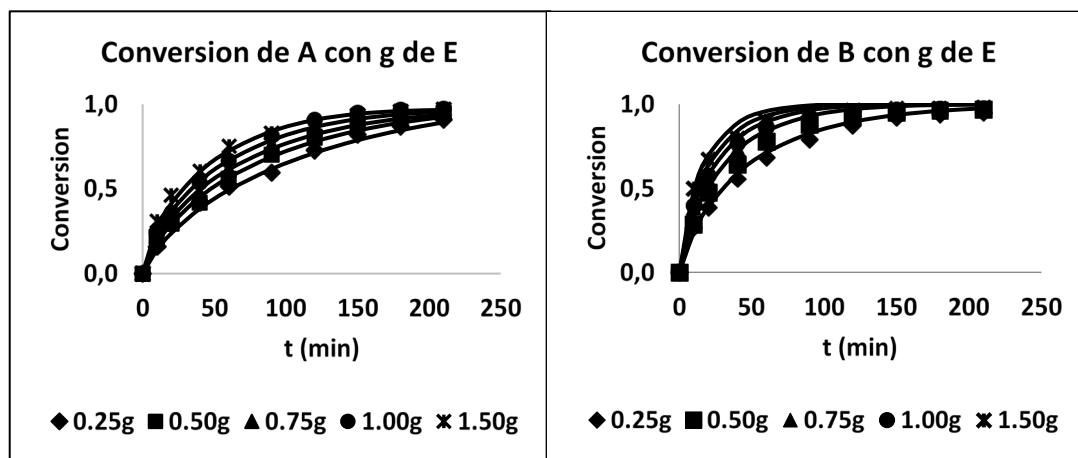


Figura 1. Variación de la conversión de A y B con la cantidad de enzima.

Ambas reacciones ocurren simultáneamente en serie, de modo que el producto P de la primera es sustrato en la segunda. En la Fig. 1 se muestra la variación con el tiempo de la conversión de A y B para cinco cantidades de enzima diferentes.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con cargo al Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por suministrar generosamente las lipasas utilizadas.

[1] M. Serrano-Arnaldos, M.F. Máximo, M.C. Montiel, S. Ortega, E. Gómez, J. Bastida, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, 39, 641–649.

Síntesis enzimática del dodecanodioato de Bis(2-etilhexilo) por transesterificación en presencia de una lipasa comercial

María Dolores Murcia, María Gómez, José Luis Gómez, Elisa Gómez, Asunción M^a Hidalgo, Antonio Bódalo, Diego Sánchez

Universidad de Murcia, España, Departamento de Ingeniería Química.

E-mail: md.murcia@um.es

Resumen: Se ha obtenido el dodecanodioato de bis(2-etilhexilo) a través de una reacción de transesterificación entre el dodecanodioato de dietilo y el 2-etilhexanol, catalizada por la lipasa Novozym435, en condiciones “solvent free” [1]. En la reacción de libera etanol que se evapora y desplaza la reacción hacia la formación del dodecanodioato de bis(2-etilhexilo). La reacción tiene lugar a través de la formación de un producto intermedio, que es un dodecanodioato mixto de etilo y 2-etilhexilo. Se ha adoptado la siguiente notación: A = 2-Etilhexanol; B = Dodecanodioato de dietilo; P = Dodecanodioato mixto de etilo y 2-etilhexilo; Q = Dodecanodioato de Bis(2-etilhexilo) y R = Etanol. De acuerdo con esta notación, las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

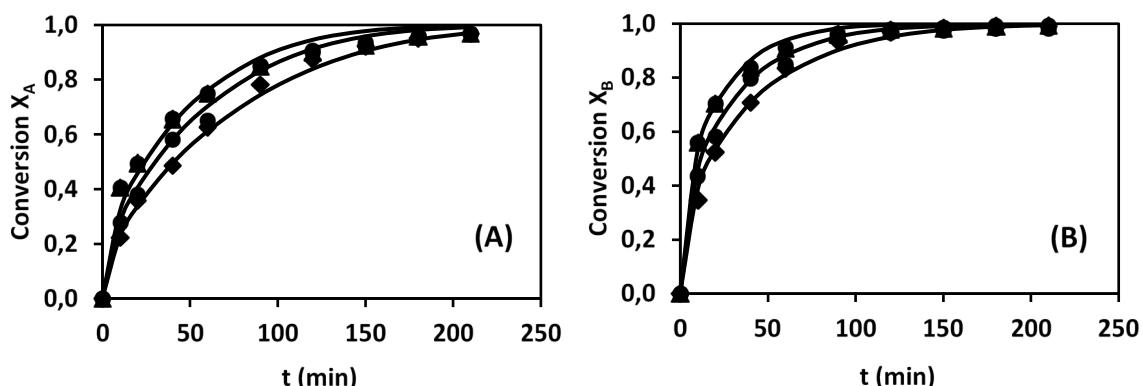


Figura 1. Variación de la conversión de A y B con la cantidad de enzima

Ambas reacciones ocurren simultáneamente en serie, de modo que el producto *P* de la primera es sustrato en la segunda. En la Fig. 1 se muestra la variación con el tiempo de la conversión de A y B para cinco cantidades de enzima diferentes.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con cargo al Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por suministrar generosamente las lipasas utilizadas.

[1] M. Serrano-Arnaldos, M.F. Máximo, M.C. Montiel, S. Ortega, E. Gómez, J. Bastida, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, 39, 641–649.

Optimización de la síntesis enzimática del éster laurato de 2-hexil-1-decanol

María Gómez, María Dolores Murcia, José Luis Gómez, Elisa Gómez, Asunción M^a Hidalgo, Antonio Bódalo, Juan Manuel Hernández

Universidad de Murcia, España, Departamento de Ingeniería Química.

E-mail: maria.gomez@um.es

Resumen: Se ha optimizado la síntesis biocatalítica del éster laurato de 2-hexil-1-decanol, de interés en distintos sectores industriales (cosmética, lubricantes y biocombustibles) mediante una reacción de esterificación entre el ácido láurico y el alcohol 2-hexil-1-decanol, empleando Novozym® 435 como catalizador y en un medio de reacción “solvent-free” lo que permite que el proceso sea ambientalmente sostenible [1].

Se han realizado distintas series experimentales con el fin de optimizar la reacción: con concentraciones diferentes de enzima (cantidad óptima de 0,5 gramos de catalizador), con distinta temperatura de reacción (temperatura óptima de 70 °C) y con variación de la relación molar de los reactivos (relación ácido:alcohol óptima de 1:1). En estas condiciones se alcanzan conversiones de prácticamente el 100%.

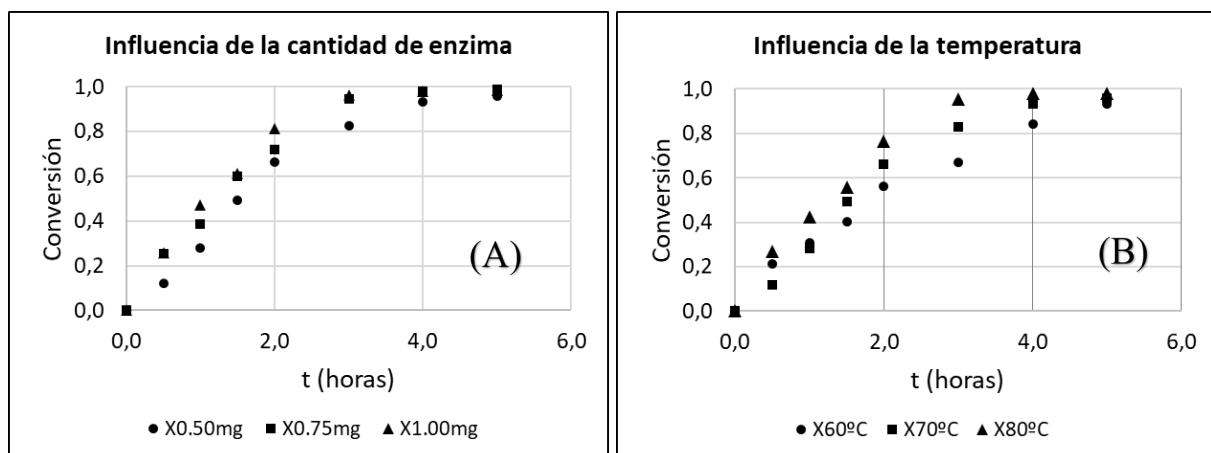


Figura 1. Variación de la conversión con la cantidad de enzima (A) y la temperatura (B)

Agradecimientos: Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por suministrar generosamente las lipasas utilizadas.

[1] M. Serrano-Arnaldos, M.F. Máximo, M.C. Montiel, S. Ortega, E. Gómez, J. Bastida, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, 39, 641–649.

Selección de la lipasa para la síntesis de ésteres de neopentil glicol en base a la sostenibilidad y la economía del proceso

Josefa Bastida, Miguel Asensi, Mar Serrano-Arnaldos, Claudia Montiel, Salvador Ortega-Requena, Silvia Gimeno-Martos, Fuensanta Máximo

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia. España.
E-mail: jbastida@um.es

Los ésteres de neopentil glicol son algunos de los compuestos más utilizados como ingredientes en formulaciones cosméticas. Entre ellos destaca el dilaurato de neopentil glicol (DLNPG) que tiene propiedades emolientes, emulsionantes y como agente acondicionador de la piel [1]. En los últimos años, la demanda de los consumidores se ha orientado hacia productos naturales y sostenibles, sintetizados mediante procesos enmarcados en la “química verde”. La síntesis biocatalítica permite atender a estos requerimientos.

En un trabajo previo [2] se ha optimizado el proceso de obtención de DLNPG utilizando dos lipasas comerciales diferentes: Novozym® 435 (CalB) y Novozym® 40086 (Rml). Operando en las condiciones óptimas de reacción de ambas enzimas se obtiene un producto con más del 98% de pureza (Figura 1). Como puede observarse, se requieren sólo 4 h a 80 °C si se usa un 0.75% (w/w) de Novozym® 435, mientras que si el biocatalizador es Novozym® 40086, es necesario añadir 1.5% de enzima y han de transcurrir 8 h de reacción a 60 °C.

La elección final del proceso biocatalítico más adecuado de cara a su posible implantación industrial, se ha basado tanto en criterios de sostenibilidad como económicos. Se han calculado los indicadores de sostenibilidad más utilizados: *Atom Economy* (AE), *E-factor* y *Carbon Mass Efficiency* (CME). Los valores obtenidos son similares e indican que los dos procesos son respetuosos con el medio ambiente.

En cuanto al estudio económico, los costes calculados del producto obtenido, a escala de laboratorio y considerando consumos eléctricos domésticos, ponen de manifiesto que, para que la biocatálisis sea competitiva en el mercado, hay que reutilizar las lipasas entre 3 y 5 ciclos de reacción sucesivos.

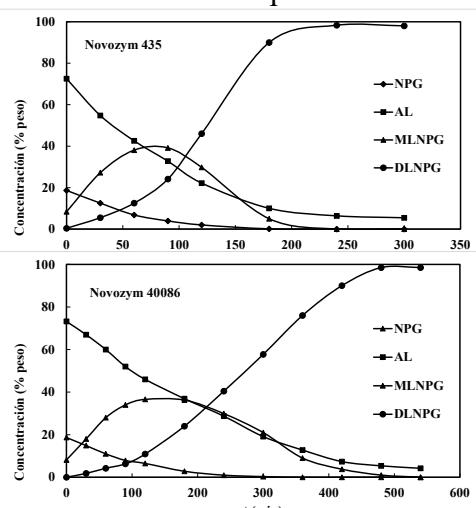


Figura 1.- Reacciones en condiciones óptimas

Los resultados obtenidos apuntan a que, a pesar de requerir un tiempo de operación más elevado y mayor cantidad de enzima, la síntesis biocatalítica de DLNPG es más ventajosa si se usa Novozym® 40086 debido a su menor precio.

Agradecimientos: Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER Una manera de hacer Europa. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por las lipasas utilizadas.

[1] W.F. Bergfeld et al. Safety assessment of monoalkylglycol dialkyl acid esters as used in cosmetics. August 18, 2017. ©Cosmetic Ingredient Review. Available in: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Monoalkylglycol%20Dialkyl%20Acid%20Esters_0.pdf

[2] F. Máximo, J. Bastida, M.C. Montiel, S. Ortega, M. Serrano, J. Martínez. Lipases comparison in solvent-free neopentyl glycol dilaurate synthesis. Biotec2019. Vigo, España.

Comparación de dos lipasas comerciales en la producción sostenible de nuevos ésteres del ácido 2-metilhexanoico

Fuensanta Máximo, Víctor Molina, Josefa Bastida, Mar Serrano-Arnaldos, Salvador Ortega-Requena, Claudia Montiel.

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia. España.
E-mail: fmaximo@um.es

Los ésteres de ácidos ramificados tienen en la actualidad un gran número de aplicaciones, ya que su diferente estructura y propiedades los hacen muy adecuados para su uso como aditivos cosméticos y en la fabricación de lubricantes y biodiesel. La obtención de ésteres por vía química conlleva el uso de altas temperaturas de reacción y la necesidad de realizar un post-tratamiento del producto antes de ser comercializado. En contraposición, la síntesis enzimática respeta los principios de la Química Verde y permite el desarrollo de procesos medioambientalmente más sostenibles.

La bibliografía consultada ha puesto de manifiesto la dificultad de obtener por vía enzimática ésteres de ácidos ramificados, así como la influencia que la cadena del alcohol puede tener sobre la actividad de la lipasa utilizada. Por tanto, en este trabajo se plantea el estudio de la obtención de ésteres ramificados del ácido 2-metil hexanoico con diferentes alcoholes, para analizar la influencia de la longitud de la cadena del alcohol, comparando los resultados obtenidos mediante dos biocatalizadores comerciales: Novozym® 435 y Novozym® 40086.

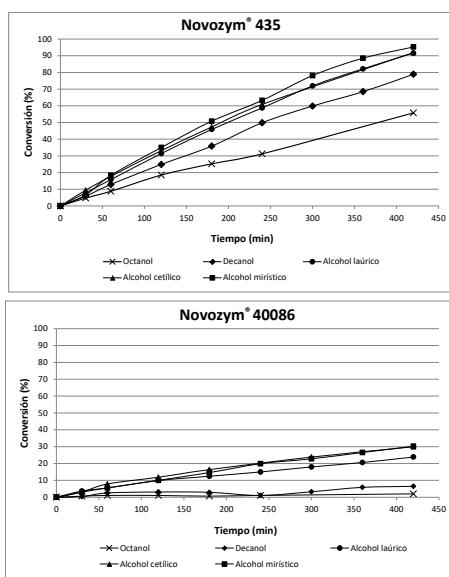


Figura 2.- Influencia de la longitud de cadena del alcohol.

Los mejores resultados se han obtenido con la Novozym® 435, por lo que se puede concluir que esta lipasa es la mejor opción para la síntesis de los compuestos estudiados.

Agradecimientos: Proyecto RTI2018-094908-B-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Nuestro reconocimiento a D. Ramiro Martínez Gutiérrez (Novozymes Spain S.A.) por suministrar generosamente las lipasas utilizadas.

BIZENTE: Enzymatic technologies in the value chain of thermoset materials

Javier Viña-Gonzalez^a, Mikel Dolz^b, Israel Sanchez-Moreno^b, Ivan Mateljak^a, and Miguel Alcalde^{b*}

^a *EvoEnzyme, SL. Parque Científico de Madrid, C/Faraday 7, Campus Cantoblanco 28049 Madrid, Spain*

^b *Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC. Campus Cantoblanco 28049, Madrid, Spain.*

E-mail: malcalde@icp.csic.es

Industrial thermoset plastics are formed by mixing a polymer matrix (usually resin) with a reinforcing component such as carbon or glass fibre. With very high mechanical and chemical resistance, these materials present a direct contribution to the problematic plastic after-use management. These processes are severely damaging natural environments, causing a main effect by landfill accumulation and incineration (currently counting landfill storage at 27.3% and incineration at 41.6%). Green technologies are emerging to resolve end-of-life issues with complex materials, being biotechnology one of the most promising approaches to reach Circular Economy goals. Along these strategic lines, BIZENTE project is developing innovative solutions based on the degradative action of oxidative enzymes. The selected biocatalyst to be developed within BIZENTE's action are ligninolytic oxidoreductases such as laccases and versatile peroxidases (VPs). These enzymes, part of the fungal ligninolytic consortium, are capable of attack lignin, a natural polymer with a very complex and recalcitrant structure [1].

Applying directed evolution, the most powerful methodology for protein engineering and enzyme optimization [2], BIZENTE will adapt selected ligninases to be part of novel biocatalytic processes (Figure 1). Degradation reactions will be developed for the most representative thermoset composites from different industrial settings. These target polymers include epoxy, polyester and vinylester resins accordingly reinforced by glass or carbon fibers. The strategical approach for the design of the directed evolution campaigns includes the study and selection of model molecules and the development of colorimetric high-throughput assays for activity detection. The main goals of BIZENTE will include the optimization of the parameters of the innovative biocatalytic reactions, the study of physico-chemical pre-treatments and the scale-up of the degradation process.

[1] M. Alcalde. *Trends Biotechnol.*, **2015**, 33(3), 155-162.

[2] J. Viña-Gonzalez, M. Alcalde. *Protein Engineering: Tools and Applications*, **2021**, Zhao, H., Lee, S.Y., Nielsen, J. Stephanopoulos, G. Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 295-311.

Explorando la expresión funcional heteróloga de peroxigenasas fúngicas inespecíficas: diseño de fusiones SUMO/Trx en *Escherichia coli*

Andrea Menés-Rubio^{a†}, Marta del Pozo-Medina^{a†}, Alejandro Beltrán-Nogal^a,
Daniel Méndez-Sánchez^a, Ivan Mateljak^a, Patricia Gómez de Santos^a, Israel
Sánchez-Moreno^{a*}, Miguel Alcalde^{a*}.

¹ C. Marie Curie 2, 28049, Madrid, España, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.

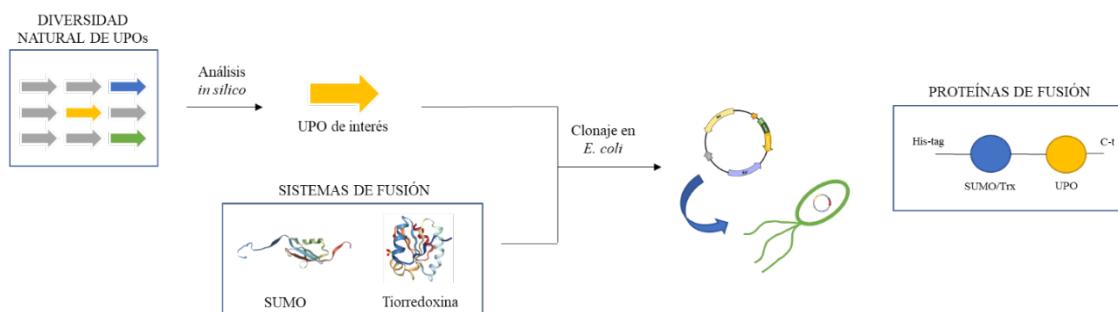
[†] Ambos autores contribuyeron por igual en este trabajo.

*Email: malcalde@icp.csic.es, israel.sanchez@csic.es

Las peroxigenasas inespecíficas (UPOs, EC 1.11.2.1) son enzimas capaces de insertar oxígenos en enlaces C-H inactivos, tan solo usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como único donador de oxígeno y acceptor de electrones. Dada su gran versatilidad, pueden llevar a cabo una amplia paleta de reacciones de oxifuncionalización selectiva, mostrando una amplia especificidad de sustrato. A pesar de que la función fisiológica natural de las UPOs sigue sin identificarse, estas enzimas son producidas y secretadas casi en su totalidad por hongos. Solo algunas de las más de 4300 secuencias putativas de UPOs han sido aisladas y caracterizadas, debido a que su expresión heteróloga es ardua [1].

Para desarrollar sistemas de expresión más eficientes, se requiere una combinación de un microorganismo hospedador, métodos de recombinación y péptidos señal adecuados. Adicionalmente, se requieren técnicas de ingeniería de proteínas para lograr niveles de expresión fiables, como la evolución dirigida [2]. Hasta la fecha, *Escherichia coli* ha sido usado como microorganismo hospedador tan solo en tres de estas enzimas: *Marasmius rotula* UPO (MroUPO), *Collariella virescens* UPO (rCvirUPO), y *Daldinia caldariorum* UPO (rDcaUPO), aunque con rendimientos de expresión limitados [3,4].

En el presente trabajo, con el objetivo de descubrir nuevas actividades de estas enzimas a partir de su diversidad natural, se han estudiado dos tecnologías de fusión diferentes para lograr una expresión heteróloga eficiente en *E. coli*, usando las proteínas de fusión SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) y Trx (tioredoxina).



[1] M. Hofrichter et al; Grand Challenges in Fungal Biotechnology, **2020**, Springer, Cham, pp. 369–403.

[2] M. Alcalde; Trends in Biotech, **2015**, 33, 155-162

[3] J. Carro et al; ACS Catal., **2019**, 9, 6234–6242.

[4] D. Linde et al; Appl. Environ. Microbiol., **2020**, 86, e02899-19.

Ultrasound-assisted biocatalytic synthesis of xylitol fatty acid esters in solvent-free reaction media

Pedro Lozano,^a Susana Nieto,^a Rocio Villa,^a Francisco J. Ruiz,^a Nuria M. Rocamora,^a and Antonio Donaire^b

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-B e Inmunología. Facultad de Química, Campus de Espinardo, E-30.100. Universidad de Murcia

^b Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Química, Campus de Espinardo, E-30.100. Universidad de Murcia

E-mail: plozanor@um.es

Sugar fatty acid esters are non-ionic amphiphilic molecules obtained from renewable resources, which show high emulsifying, stabilizing and detergency behaviour. Lipases have been widely reported as suitable catalysts for the synthesis of sugar esters in non-aqueous reaction media, whether by esterification or transesterification, although poor solubilization of the substrates is major problem.[1]

Experimental strategies based on the use of unnatural vinyl acyl esters, as activated acyl donor substrates, as well as reaction media containing polar organic solvents, have been reported as suitable approaches for the biocatalytic esterification of polyol compounds with fatty acids (*i.e.* up to 3 days reaction to reach full conversion).[2]

This work shows the excellent suitability of a commercial immobilized lipase for the synthesis of five xylityl acyl esters by means of the esterification of free fatty acids (*i.e.* caprylic, capric, lauric and myristic, respectively) with xylitol under solvent-free conditions. Ultrasound-assistance was shown to be a key tool to overcome the handicap imposed by both the mutual immiscibility of fatty acids and xylitol substrates, and the semisolid character of the initial reaction mixtures. In such semisolid systems, ultrasonic irradiation may enable the transport of substrate molecules to the enzyme catalytic-site, leading to the efficient synthesis of xylityl fatty ester (*e.g.* up to 95% yield after 90 min at 40 °C), with xylityl monoacyl ester and xylitol diacyl ester appearing as the main products (greater than 96%), assessed by HPLC and NMR analyses. The separation of products was carried out by heating and simple centrifugation of the reaction medium, which was possible due to different densities of the resulting fractions. [3]

Acknowledgements

Work partially supported by MICINN-FEDER (Ref. RTI2018-098233-B-C21) and Fundación SENECA CARM (Ref. 20790/PI/18) grants.

- [1] I. M. Banat, Q. Carboue, G. Saucedo-Castaneda, J. J. Cazares-Marinero, *Bioresour. Technol.* **2021**, 320, Art n° 124222.
- [2] L. M. Martinez-Garcia, W. Dejonghe, L. Cauwenberghs, M. Maesen, K. Vanbroekhoven, Y. Satyawali, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **2021**, 123, Art. n° 2000225.
- [3] S. Nieto, R. Villa, A. Donaire, P. Lozano, *Ultrason. Sonochem.* **2021**, 75, Art. n° 105606.

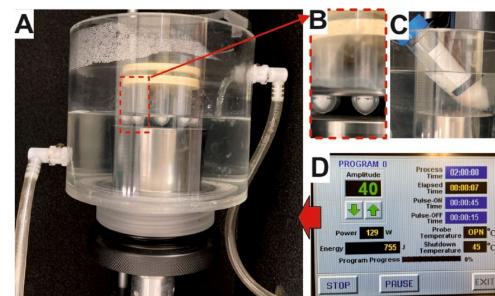


Figure 1. Experimental set-up for ultrasound-assisted biocatalytic synthesis of xylitol esters in solvent free systems using a cup horn device.

Oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada y su combinación con enzimas en procesos secuenciales

Jesús Albarrán-Velo, Vicente Gotor-Fernández e Iván Lavandera

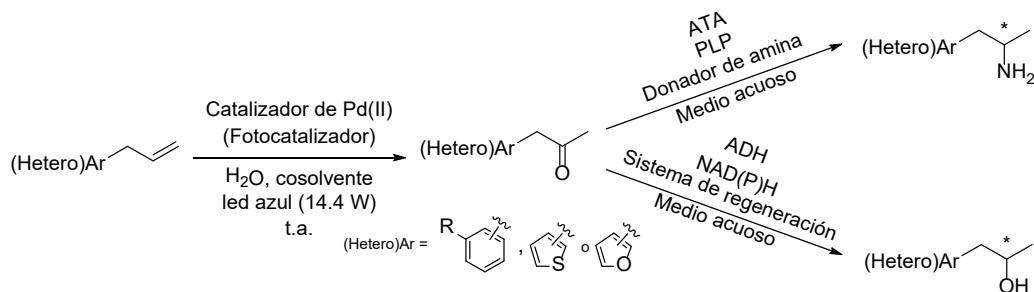
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, España

E-mail: albarranjesus@uniovi.es

Durante los últimos años el empleo de sistemas multicatalíticos está siendo considerado como una herramienta esencial en síntesis orgánica. En este contexto, las enzimas presentan una gran versatilidad ya que se pueden usar conjuntamente con otros catalizadores metálicos, organocatalíticos o en sistemas multienzimáticos, obteniéndose de esta forma productos quirales de una forma más eficiente y selectiva.[1] Además, el uso de enzimas en procesos photocatalizados ha comenzado a recibir una mayor atención, permitiendo acceder a moléculas orgánicas (ópticamente activas) en condiciones de reacción muy sostenibles.[2]

La reacción de oxidación de Wacker-Tsuji puede considerarse como una de las transformaciones orgánicas más importantes, ya que convierte alquenos en compuestos carbonílicos mediante la utilización de una sal de paladio(II) como catalizador junto con un sistema redox de regeneración.[3] Recientemente, y con el objetivo de desarrollar procesos más sostenibles, esta transformación también ha sido realizada de forma photocatalítica.[4]

Mejorando una metodología previamente descrita en nuestro grupo de investigación,[5] se ha desarrollado un proceso fotometacatalítico de oxidación de Wacker-Tsuji de una serie de alil(hetero)areos, seguido de una biotransformación estereoselectiva de las 1-(hetero)arilpropan-2-onas intermedias. De esta forma, se obtuvieron los correspondientes alcoholes o aminas con buenos rendimientos y excelentes excesos enantioméricos mediante la combinación de una sal de paladio(II), radiación lumínica azul y la correspondiente enzima.



Esquema 1. Procesos secuenciales foto-metal-biocatalíticos para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-aminas y 1-(hetero)arilpropan-2-oles enantioenriquecidos.

- [1] X. Huang, M. Cao, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 161-170.
- [2] L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchsenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 4115-4144.
- [3] R. A. Fernandes, A. K. Jha, P. Kumar, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 7448-7470.
- [4] Y. A. Ho, E. Paffenholz, H. J. Kim, B. Orgis, M. Rueping, D. C. Fabry, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1889-1892.
- [5] D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2582-2593.

Efectos del secado de residuos de piel de naranja en su sacarificación enzimática

Alberto García-Martín^{a*}, Jorge García-Montalvo^a, Vanesa Nicolás Báez^a, David Codina-Jiménez^a, Félix García-Ochoa Soria^a, Juan Manuel Bolívar^a, Pedro Yustos Cuesta^a, Victoria E. Santos^a, Miguel Ladero^{a*}.

^a Departamento de Ingeniería Química y de Materiales, Avenida Complutense s/n, 28040, Madrid, España, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid

E-mail: albega13@ucm.es/mladero@quim.ucm.es

Las biorrefinerías de segunda generación han cobrado gran importancia en los últimos años. Esto es debido a que emplean como materias primas biomasa de origen lignocelulósico, que a diferencia de las de primera generación no entra en competencia con los alimentos. Dentro de los diferentes tipos de biomasa lignocelulósica podemos diferenciar aquella que procede del tratamiento de frutas destinadas a la producción de zumos o de bebidas alcohólicas, como la sidra. En España, especialmente en la zona levantina, la producción de zumos cítricos, y particularmente de naranja, da lugar a la generación de una gran cantidad de residuo derivado de la cáscara. Este residuo presenta una humedad entre el 80-90 % así como una gran cantidad de extractivos en agua (hasta el 50 % en peso seco) de los cuales, la mayoría son monosacáridos y pectina. Estas características lo convierten en un residuo con una alta inestabilidad microbiológica.

Entre las operaciones básicas de pretratamiento de cualquier tipo de biomasa, especialmente las que contienen contenidos elevados de humedad, está el secado. La reducción del contenido en agua aporta tres ventajas principales; la primera es la reducción de los costes de transporte; la segunda el incremento de la facilidad de su manejo; y finalmente la reducción de las probabilidades de crecimiento de microorganismos y la consiguiente formación de toxinas. Sin embargo, la estructura del sólido se ve modificada al perder el agua pudiendo afectar a los procesos posteriores, como es el caso de la hidrólisis enzimática. Procesos como la hornificación o el colapso de los poros del sólido puede afectar negativamente al transporte de materia y, por ende, al rendimiento de la hidrólisis.

En el presente estudio se realizó el análisis de cómo afecta el tipo de secado (secado al sol y liofilización) al proceso posterior de hidrólisis enzimática de residuo de cáscara de naranja. Tras el modelado cinético de la liberación de diversos monosacáridos y otros monómeros durante la sacarificación con mezclas comerciales de celulasas, pectinasas y beta-glucosidases y la comparación de los parámetros cinéticos se pudo determinar la influencia del contenido en agua final del residuo y el tipo de secado.

Chemo-enzymatic production of omega-3 monoacylglycerides by coupling sponge-like ionic liquids and scCO₂ technologies

Rocío Villa,^a Antonio Donaire,^b Gemma Martínez-Pascual,^b Rebeca Salas-Vidal,^a Susana Nieto,^a Eduardo García-Verdugo,^c and Pedro Lozano^{a*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain.

^b Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain

^c Departamento Química Inorgánica y Orgánica, Universidad Jaume I, Campus del Riu Sec, E-12071 Castellón, Spain

The development of advanced processes able to directly provide pure products by integrating chemical transformations, product separation, and recovery and reuse of solvent and catalytic phases by straightforward and smart approaches is a key feature to build green chemical processes. [1] Polyunsaturated fatty acids are essential bioactive molecules in human nutrition with recognized beneficial health effects (*e.g.* cardioprotective).

A clean chemo-enzymatic synthesis of omega-3 monoacylglycerides (MAGs) was carried out in two consecutive catalytic steps, the enzymatic transesterification of raw fish or linseed oil with solketal for producing fatty acid solketal esters by coupling sponge-like ionic liquids (SLILs) and supercritical carbon dioxide (scCO₂) technologies (Figure 1). [2]

After the biocatalytic step, the simple addition of hot water (60 °C) to the reaction mixture, followed by mixing, cooling (5 °C) and centrifugation, results in the direct separation of fatty acid solketal esters (FASEs) with an extremely good purity ratio, allowing the recovery of both the SLIL and the biocatalyst. The obtained FASEs fraction was submitted to a second catalytic step with acid zeolites to carry out the opening of the solketal ring moieties, obtaining the omega-3 MAGs final product.

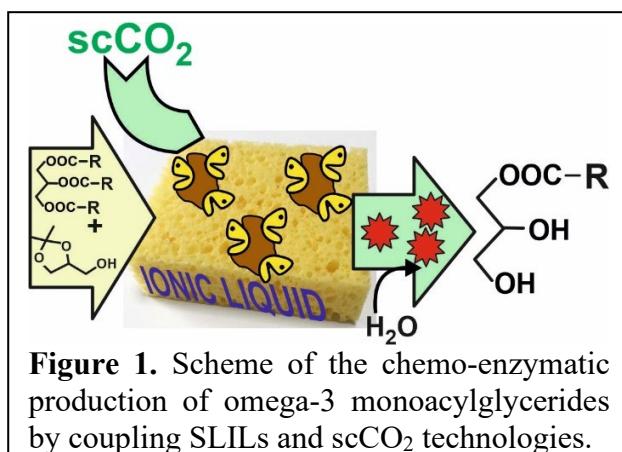


Figure 1. Scheme of the chemo-enzymatic production of omega-3 monoacylglycerides by coupling SLILs and scCO₂ technologies.

When using scCO₂ as the reaction/extraction medium, an excellent performance of both coupled catalytic steps under continuous operation was observed, being necessary the use of *t*-butanol as a co-solvent. This continuous operation approach results in 100% MAG yield for seven days without any loss in catalytic activity. For discontinuous operation, the process allows the full recovery of the enzyme/SLIL/zeolite components of the reaction system that could be reused for at least 6 cycles with unchanged catalytic performance. [3]

Acknowledgments

This work was partially supported by RTI2018-098233-B-C21 and RTI2018-098233-B-C22 (MICINN-FEDER), PROMETEO/2016/071(Generalitat Valenciana) and 20790/PI/18 (Fundación SENECA CARM) grants.

[1] P. Lozano, *Green Chemistry* **2010**, *12*, 555-569.

[2] P. Lozano, J.M. Bernal, E. García-Verdugo, G. Sánchez-Gómez, M. Vaultier, M.I. Burguete, S.V. Luis, *Green Chemistry* **2015**, *17*, 3706-3717.

[3] R. Villa, E. Alvarez, S. Nieto, A. Donaire, E. García-Verdugo, S.V. Luis, P. Lozano, *Green Chemistry* **2020**, *22*, 5701-5710.

Application of site-directed mutagenesis for structure- function relationship study of β -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis*

Eglé Narmontaitė^{a*}, Zoran Merdzo^a, Elena Jimenez-Ortega^b, José Luis González-Alfonso^c, Fadia Victoria Cervantes Domínguez^c, Sergio Izquierdo Gea^a, Marina Minguet-Lobato^a, María Fernández-Lobato^a, Julia Sanz-Aparicio^b, Francisco J. Plou^c

^a 28049 Madrid; Spain, Center of Molecular Biology Severo Ochoa, (CSIC-UAM)

^b 28006 Madrid, Spain Rocasolano Institute of Physical Chemistry, CSIC

^c 28049 Madrid Spain Institute of catalysis and petrochemistry, CSIC

egle.narmontaitė@cbm.csic.es

Invertases or β - fructofuranosidases (EC 3.2.1.26) are biotechnologically important enzymes that catalyze the release of β -fructose from the non-reducing termini of various β -D-fructofuranoside substrates. These enzymes may also catalyze the synthesis of short-chain fructooligosaccharides (FOS), in which one to three fructosyl moieties are linked to a sucrose unit. FOS are considered as functional food, that have prebiotic effect, selectively stimulating the growth and activity of health-promoting lactobacilli and bifidobacter in the gut as well as inhibiting the growth of pathogenic microorganisms. It also improves immune and cardiovascular systems, mineral absorption and even mental health [1,2].

The β -fructofuranosidase (RdINV) from the yeast *Rhodotorula dairenensis* hydrolyses sucrose and it's also capable to synthesise short-chain fructooligosaccharides (FOS). RdINV has been previously biochemically characterized [2] and heterologously expressed in *Pichia Pastoris* [3]. Enzyme produces mainly 6-kestose (⁶F-FOS), but also a varied mixture of FOS of the referenced series (¹F-FOS, ⁶G-FOS), which makes it of biotechnological interest. Even though RdINV has already been biochemically characterized, the structural determinants responsible for the selective production of FOS are not clear yet.

In this study, we investigated structure-function relationship of RdINV using site- directed mutagenesis of catalytic site residues. The specific amino acid positions to be analysed were selected based on partially crystallised RdINV structure, assembled in the center of Crystallography and structural biology (CBE, CSIC). In this work, 8 RdINV mutants were obtained and their kinetic parameters towards sucrose were valuated. In comparison to the wild type, all the variants showed a quite noticeable change in their catalytic efficiency, in some cases it drastically decreased by almost 30-fold due to reduced enzyme affinity to sucrose.

More over the mutation of key residues led to the modifications of the transfructosylation reactions to a greater or lesser extent as well as the FOS production properties. One particular substitution made the enzyme almost incapable to produce fructooligosacharides, while other altered their production profile. This study provides more insight into the enzymatic activity and particular specificity of RdINV, and will help with further structural analysis to fully understand the transfructosylation mechanism and to improve its biosynthetic potential.

[1] M. Ramírez-Escudero, M. Gimeno-Pérez, B. González, D. Linde, Z. Merdzo, M. Fernández-Lobato, J. Sanz-Aparicio, *J Biol Chem.* **2016**, *291*(13), 6843–5687.

[2] P. Gutiérrez-Alonso, L. Fernández-Arrojo, F. J. Plou, M. Fernández-Lobato, *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 768–773.

[3] M. Gimeno-Pérez, M. Z. Merdzo, E. Castillo-Rosa, C. M. Hijas, M. Fernández-Lobato, *Catalysts* **2021**, *11*, 476.

Caracterización y papel fisiológico de una actividad D-malato oxidasa en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Rafael Blasco, Ana Gómez Población, María Isabel Guijo, Rubén Sánchez y Faustino Merchán.

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria y Meat and Meat Products Research Institute (IProCar), Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

E-mail: rblasco@unex.es

La bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es capaz de asimilar cianuro y utilizarlo como fuente de nitrógeno, pero no como fuente de carbono. La mejor fuente de carbono para la asimilación de cianuro es DL-malato. El L-malato, que es el isómero natural, es un donador directo de la cadena de transporte electrónico gracias a una actividad L-Malato:Quinona oxidoreductasa¹. Por otra parte, se ha detectado en geles nativos de poliacrilamida una actividad D-malato oxidasa que utiliza aceptores artificiales de electrones.

A partir de estos datos se ha desarrollado un método espectrofotométrico que ha permitido la caracterización cinética y bioquímica de esta actividad enzimática. Estos datos permitirán incorporar la actividad a una ruta metabólica concreta y poder estudiar su posible relación con el metabolismo del cianuro, tan importante en esta cepa bacteriana.

La clonación y expresión del gen en *E. coli* ha permitido su caracterización: i) el INT, (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) es utilizado como acceptor artificial de electrones permitiendo su determinación espectrofotométrica, ii) la longitud de onda a la cual presenta la máxima absorbancia el INT reducido es de 495 nm, iii) la temperatura óptima de la actividad es de 45°C, un pH óptimo de 9 y la Km para el D-malato de 0.86 mM , iv) la actividad deja de ser estable a temperaturas por encima de los 50°C, v) la actividad aumenta en presencia de algunos metales divalentes, y vi), el peso molecular aparente de la proteína, determinado por cromatografía de exclusión molecular, es de 135 kDa.

Experimentos de fraccionamiento subcelular han permitido localizar la proteína en el periplasma y comprobar que el citocromo *c* es sustrato de la enzima. Por lo tanto, se trata de una enzima que permite una respiración extracitoplasmática.

Bibliografía:

¹ Luque-Almagro, V.M., et al., *Cyanide degradation by Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 involves a malate:quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 3): p. 739-46.

Financiación: IB16062, Junta de Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras), Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea. Ana Belén Gómez Población quiere agradecer la beca concedida por la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno.

Inmovilización de la α -glucosidasa de *Metschnikowia reukaufii* para la producción de oligosacáridos bioactivos de la miel

Martin Garcia-Gonzalez,^a Fadia Cervantes,^{b,*} Francisco J. Plou,^b Lorena Betancor,^c y María Fernández Lobato^a

^a 28049 Madrid, Spain, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC

^b 28049 Madrid, Spain, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC

^c 11600 Montevideo, Uruguay, Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay

E-mail: diegom.garcia@cbm.cisc.es

La α -glucosidasa aislada de la levadura del néctar *M. Reukaufii* (Mr- α Glu), es una glicosil hidrolasa (GH) perteneciente a la familia GH13 según la clasificación CAZy (<http://www.cazy.org>) muy activa sobre sacarosa y maltosa. Esta enzima ha sido recientemente expresada heterólogamente y caracterizada bioquímicamente, lo que permitió su aplicación en distintas reacciones biosintéticas (1). En condiciones saturantes de sacarosa (baja actividad de agua) esta enzima es capaz de sintetizar una serie oligosacáridos bioactivos presentes de forma natural en la miel, entre los que destacan la isomelezitosa, la trehalulosa, la erlosa y la theanderosa, entre otros (2). También se comprobó su potencial como productora de azúcares prebióticos como la isomaltosa y la panosa.

La versatilidad de Mr- α Glu para generar productos con distintos enlaces glicosídicos, como son los α -(1→1), α -(1→3), α -(1→4) y α -(1→6), hacen de esta enzima una potencial herramienta en la obtención de compuestos o azúcares bioactivos con aplicaciones en la industria alimentaria o farmacéutica. Por ejemplo, la isomelezitosa es un trisacárido reductor poco frecuente con potencial bifidogénico y no cariogénico (3). A su vez, la trehalulosa y la theanderosa son azúcares cuyo consumo tampoco promueve el desarrollo de caries, además de presentar un alto poder edulcorante (comparado con la sacarosa) y un bajo índice glicémico (4).

En este trabajo se han abordado distintas estrategias de inmovilización con el objetivo de obtener biocatalizadores más robustos que permitan la aplicación de Mr- α Glu en la producción continua de los citados oligosacáridos de alto valor añadido. Los biocatalizadores aquí obtenidos fueron caracterizados estructural y operacionalmente, además de sus cualidades relacionadas a su potencial aplicación en reacciones de transglicosilación.

- (1) M. Garcia-Gonzalez, M. Minguet-Lobato, F. J. Plou, M. Fernandez-Lobato, *Microb Cell Fact.* **2020**, *19*, 1-14.
- (2) M. Garcia-Gonzalez, F. J. Plou, F. V. Cervantes, M. Remacha, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, M. Fernandez-Lobato, *Microb Biotech.* **2019**, *12*, 1274–1285.
- (3) J. Görl, M. Timm, & J. Seibel, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 149–156.
- (4) L. Ruiz-Aceituno, M. L. Sanz, B. de Las Rivas, R. Muñoz, S. Kolida, M. L. Jimeno, F. J. Moreno, J. Agric. Food Chem. **2017**, *65*, 10505-10513.

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad [PID2019-105838RB-C31/-C32] y por la Fundación Ramón Areces [XIX Call of Research Grants in Life and Material Sciences]. M. G-G agradece al Ministerio de Universidades por la Beca FPU (FPU16/02925).

Generación de ATP a partir de AMP catalizada por PPK2 (Clase III) de *Pseudomonas aeruginosa*. Modulación de la selectividad ATP/ADP mediada por cationes divalentes

Leire Azcona^a, Julia Revuelta^a, Alfonso Fernández-Mayoralas^a, Danelis Toledo Monterrey^{a*} y Eduardo García-Junceda^{a*}

^a Departamento de Química Bioorgánica Instituto de Química Orgánica General, CSIC,
Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid (España)

E-mail: d.monterrey@csic.es; eduardo.junceda@csic.es

Adenosina-5'-trifosfato (ATP) es una molécula esencial en los sistemas vivos. El ATP cumple un rol muy importante en el metabolismo de generación de moléculas sulfatadas de interés, ya que es sustrato de enzimas que catalizan la formación 3'-fosfoadenosina-5'-fosfatosulfato (PAPS), como es el caso de la enzima PAPS sintasa 1 de *Homo sapiens* (EC 2.7.1.25). PAPS es el donador universal de grupos sulfato de enzimas sulfotransferasas (E.C. 2.8.2.-) y en los últimos años, debido a su elevado coste y baja disponibilidad ha tomado especial relevancia su generación empleando sistemas biocatalíticos.

La eficiencia de estos sistemas puede mejorarse empleando módulos complementarios de regeneración del ATP que se consume en la reacción. En este sentido la familia de enzimas polifosfato quinasa 2 (PPK2) (EC.2.7.4.1) cobra una especial relevancia, ya que son capaces de catalizar la síntesis de nucleótidos trifosfato o difosfato empleando como sustrato polifosfato inorgánico. Dentro de esta familia podemos diferenciar tres clases de PPK2: la clase I que se caracteriza por catalizar la síntesis de nucleótidos trifosfato a partir de nucléótidos difosfato; la clase II que cataliza la fosforilación de nucleósidos monofosfato a difosfato; y, recientemente, se ha descrito una nueva clase de enzimas, la clase III (PPK2-III), que catalizan la fosforilación tanto de nucléosidos monofosfato como de nucleósidos difosfato[1].

La familia de enzimas PPK2-III tiene un gran potencial de aplicación en el ámbito de la biocatálisis, no solamente en cascadas biocatalíticas para la síntesis de moléculas sulfatadas, sino también para la generación de moléculas de alto valor añadido mediada por enzimas dependientes de ATP.

En esta comunicación se presenta el clonaje y sobreexpresión de la enzima PPK2-III de *P.aeruginosa*. Así mismo, se presentan los resultados preliminares de la caracterización de su actividad que demuestran que la enzima es capaz de catalizar la generación de ATP a partir de AMP y polifosfato con un rendimiento de la reacción muy elevado. Se ha observado, además, que la especificidad de sustrato depende del catión divalente que se emplea como cofactor. Cuando se emplea Mg^{2+} como cofactor la enzima cataliza la doble fosforilación de AMP dando lugar a ATP tras la formación de ADP. Sin embargo, cuando se emplea Mn^{2+} no se observa fosforilación de ADP ni, por tanto, generación de ATP.

[1] Motomura, K., Hirota, R., Okada, M., Ikeda, T., Ishida, T., & Kuroda, A., *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80(8), 2602–2608.

Análisis cinético de bio-oxidaciones catalizadas por enzimas inmovilizadas para intensificación de procesos

Alvaro Lorente-Arevalo*, Celia Álvarez-González, Miguel Ladero, Juan M. Bolívar*,

*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid,
España, Departamento de Ingeniería Química y de Materiales*

E-mail: juanmbol@ucm.es

La intensificación de procesos y la transición a operación en continuo son dos pilares fundamentales de la tecnología (bio)química moderna. En particular, las oxidaciones enzimáticas dependientes de O₂ representan una gran oportunidad para el desarrollo de procesos sostenibles con una alta eficacia catalítica y selectividad de las reacciones¹. Sin embargo, la aplicación de procesos enzimáticos oxidativos requiere tanto la disponibilidad de catalizadores activos y estables, como el diseño de sistemas de reacción eficientes^{1,2}. La necesidad de suministro de O₂ establece limitaciones tanto a nivel termodinámico como cinético, determinando todos los parámetros de la reacción: concentración de producto, productividad total, y productividad específica del catalizador². Estas limitaciones no sólo afectan a fases avanzadas de desarrollo de proceso sino también a la caracterización temprana de reacciones y catalizadores, ya que afectan al conocimiento básico de la cinética.

La aplicación de tecnologías facilitadoras, el avance de la ciencia de diseño de catalizadores, y la ingeniería de la reacción química proporcionan soluciones emergentes^{2,3} que se desarrollan en esta presentación. En primer lugar, se discutirán y cuantificarán las limitaciones de aplicación, que delimitan las ventanas de proceso, en relación con la cinética intrínseca, usando como casos de estudio glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y polifenol oxidadas (lacasa y tirosinasa)⁴. Se mostrará una metodología de desarrollo de modelos cinéticos. En segundo lugar, se presentarán estrategias de intensificación de catalizadores basadas en la sinergia de inmovilización de enzimas, simulación y modelado de la reacción, e ingeniería de materiales². Finalmente se mostrarán ejemplos del desarrollo de reactores con el objetivo de intensificar la transferencia de oxígeno y aumentar la productividad catalítica y volumétrica^{2,3}.

-
- [1] A. Lorente-Arevalo, A., M. Ladero, J.M. Bolívar, *Chim. Oggi – Chem. Today*, **2021**, 39, 4
 - [2] A. Lorente-Arevalo, A., M. Ladero, J.M. Bolívar, . *Curr. Opin. Green Sustain. Chem*, **2021** , 32, 100544
 - [3] A. Lorente-Arevalo, A., M. Ladero, J.M. Bolívar. *React. Chem. Eng.*, **2021** In Press doi:10.1039/D1RE00237F.
 - [4] M.P. Cardoso Marques, A. Lorente-Arevalo, J.M. Bolívar, *Biocatalysis in Continuous-Flow Microfluidic Reactors*. in 1–36 (Springer Berlin Heidelberg, **2021**). doi:10.1007/10_2020_160.

*J.M.B. y A.LA. reciben financiación de la Comunidad de Madrid (2018-T1/BIO-10200)

NOTAS

NOTAS

III Jornadas Españolas de Biotecnología 2021

Murcia, 25-27 noviembre 2021

ORGANIZA



PATROCINA



f SéNeCa⁽⁺⁾

Agencia de Ciencia y Tecnología
Región de Murcia



Cátedra
Estrella de Levante