

PLA DE RECERCA / PLAN DE INVESTIGACIÓN

Candidat o candidata a doctor / Doctorando o doctoranda Naiara Hernández Ibáñez	
DNI, Passaport, NIE / DNI, Pasaporte, NIE 15424184-Q	Correu electrònic / Correo electrónico Naiara.hernandez@ua.es
Programa de doctorat / Programa de doctorado Electroquímica. Ciencia y Tecnología	
Línea de recerca / Línea de investigación Bioelectrocatalísis	
Títol de la tesi / Título de la tesis Inmovilización de enzimas sobre nanomateriales de carbono y su aplicación en biosensores electroquímicos y procesos bioelectrocatalíticos.	

MEMÒRIA DEL PLA DE RECERCA MEMORIA DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN

1. Antecedents i estat actual del tema / Antecedentes y estado actual del tema

Los procesos de biotransformación consisten en reacciones químicas catalizadas por enzimas, ya sean aisladas o a partir de enzimas en microorganismos. Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteínica que regulan la velocidad a la cual se realizan los procesos fisiológicos, producidos por los organismos vivos. Son catalizadores muy eficaces ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además, son altamente específicos y selectivos.

Sin embargo en la actualidad la biocatálisis presenta ciertos retos como son la reducción del elevado coste de la expresión y purificación de las enzimas, el aumento de la estabilidad de la enzima y la resistencia de esta bajo duras condiciones de reacción como pHs extremos, altas temperaturas, contaminantes o impurezas. La inmovilización enzimática sobre, por ejemplo, el sustrato del electrodo es una solución eficiente para estos problemas [1, 2]. De esta manera, la enzima queda confinada o localizada en una región del espacio bien definida de modo que es posible mantener su actividad catalítica y volver a reutilizarla numerosas veces. La inmovilización también simplifica la manipulación del proceso biocatalítico, mejora la estabilidad de la enzima y permite su fácil separación del producto para así evitar su contaminación. Durante años se han empleado diferentes estrategias de inmovilización enzimática basadas en el tipo de enzima, la matriz del sustrato y el modo de anclar la enzima a la matriz. Algunos autores optan por el empleo de técnicas como el atrapamiento en membranas poliméricas [3], el *entrecruzamiento* empleando por ejemplo glutaraldehído [4] o por enlace químico [5]. La selección correcta del método de inmovilización junto con la elección adecuada de la matriz empleada es la clave para la mejora de la estabilidad y resistencia de la proteína.

Los nanomateriales de carbono como los nanotubos de carbono, nanofibras, grafenos, etc..., son una buena elección como materiales para su empleo en inmovilización enzimática. El descubrimiento de materiales mesoporosos ha abierto nuevas oportunidades en distintas áreas [6, 7]. Estos materiales proporcionan un sistema de poro uniforme, con una alta área superficial específica y funcionalizable, a parte de una gran estabilidad química y térmica al igual que una buena resistencia mecánica, lo que los convierte en unos excelentes materiales para la inmovilización enzimática [8] y su empleo en diferentes sectores como el industrial o clínico.

El empleo de enzimas ha supuesto una revolución importante en el campo de la química analítica con la fabricación de

biosensores. Aunque actualmente se dispone de un gran número de técnicas analíticas convencionales, éstas presentan ciertos inconvenientes relativos al tiempo que requieren debido a la necesidad de pretratamientos de la muestra o la complejidad instrumental. Además las técnicas convencionales no permiten el análisis de muestras que requieren su medida a tiempo real y/o in situ. El desarrollo de biosensores electroquímicos ha permitido abordar esta serie de inconvenientes de una manera barata y rápida. Un biosensor electroquímico consiste en un dispositivo formado por una parte biológica (bioreceptor) que mediante mecanismos o principios biológicos reconoce a especies particulares. El bioreceptor se encuentra retenido o inmovilizado sobre un transductor cuya función es convertir la respuesta biológica en, por ejemplo, una señal eléctrica. Esta señal eléctrica finalmente será amplificada, procesada y convertida a la forma deseada. Dependiendo del bioreceptor que se emplee detectaremos un tipo de analito u otro, como por ejemplo la enzima glucosa oxidasa en el caso de un biosensor para la detección de glucosa [12, 13] o la enzima lactato oxidasa para la determinación de lactato [14, 15]. Durante las últimas décadas han ido creciendo las investigaciones sobre el desarrollo de biosensores electroquímicos centrándose en la inmovilización de enzimas sobre diferentes materiales electrónicos, la mejora de la transferencia electrónica, el tipo de mediadores y coenzimas, la mejora de la estabilidad y la miniaturización del biosensor [16].

La biocatálisis ha logrado nuevos avances en el campo medioambiental. El hecho de que las emisiones de CO₂ atmosférico se incrementen considerablemente cada año, junto a la escasez de recursos fósiles, ha llevado a los investigadores a realizar estudios sobre el empleo del CO₂ para la obtención de distintos tipos de combustible mediante metodologías basadas en la reducción electroquímica. Este proceso es complejo debido a que requiere la activación del CO₂ necesitándose para ello potenciales muy negativos. Existen un gran número de estudios acerca de este proceso centrándose en la búsqueda de nuevos materiales catalíticos como nanopartículas para conseguir disminuir el potencial de trabajo y a su vez mejorar la selectividad y rendimiento de la reacción. Un gran número de metales (Sc, In, Cd, Pb, etc) han sido examinados como electrodos para la reducción electroquímica del CO₂ a formiato [17]. Recientemente se sabe que la catálisis de estos metales depende de su forma y tamaño, siendo los materiales nanoparticulados los que presentan una mayor actividad catalítica frente al metal masivo. En la actualidad y a pesar de haber conseguido la disminución del potencial de trabajo, este proceso sigue siendo ineficiente energéticamente o inespecífico y produce mezcla de productos de reacción. El empleo de enzimas para la reducción de CO₂ es una alternativa interesante debido a la gran selectividad de las enzimas por el sustrato. Existen distintos estudios para la reducción bioelectroquímica de CO₂ a ácido fórmico, ya que este puede emplearse como combustible en pilas de combustible o para el almacenamiento de hidrógeno [18]. Algunas de las enzimas que se emplean para catalizar esta reacción son la formiato deshidrogenasa de la levadura *Candida boidinii* [19], de *Rhodobacter capsulatus* [20], la obtenida a partir de la *Escherichia coli* [21] y de *Syntrophobacter fumaroxidans* [20].

Debido a la importancia y ventajas que ofrece la biocatálisis, así como la necesidad de una correcta inmovilización para solucionar los principales retos que siguen existiendo actualmente, se propone en proyecto de tesis estudiar distintos nanomateriales de carbono (nanotubos, nanofibras, grafenos, carbones mesoporosos, etc) para llevar a cabo la correcta y optimizada inmovilización de enzimas para explotar sus aplicaciones como biosensores electroquímicos y bioelectrosíntesis.

2. Bibliografía més rellevant / Bibliografía más relevante

- [1] Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(2):205-20.
- [2] Zucca P, Sanjust E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules.* 2014;19(9):14139-94.
- [3] Klotzbach TL, Watt M, Ansari Y, Minteer SD. Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. *J Membr Sci.* 2008;311(1-2):81-8.
- [4] Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(6):1583-7.
- [5] Yilmaz E, Can K, Sezgin M, Yilmaz M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresour Technol.* 2011;102(2):499-506.
- [6] Taguchi A, Schüth F. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Microporous Mesoporous Mater.* 2005;77(1):1-45.
- [7] Moller K, Bein T. Inclusion Chemistry in Periodic Mesoporous Hosts. *Chem Mater.* 1998;10(10):2950-63.
- [8] Jun S, Sang Hoon J, Ryoo R, Jaroniec M, Liu Z, et al. Synthesis of new, nanoporous carbon with hexagonally ordered mesostructure [5]. *J Am Chem Soc.* 2000;122(43):10712-3.
- [9] Buckland BC, Robinson DK, Chartrain M. Biocatalysis for Pharmaceuticals—Status and Prospects for a Key Technology. *Metabolic Engineering.* 2000;2(1):42-8.
- [10] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology.* 2007;25(2):66-73.
- [11] Xie X, Tang Y. Efficient synthesis of simvastatin by use of whole-cell biocatalysis. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(7):2054-60.
- [12] Çolak Ö, Yaşar A, Çete S, Arslan F. Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly(vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and*

Biotechnology. 2012;40(5):354-61.

[13] Al Mamun KA, Tulip FS, MacArthur K, McFarlane N, Islam SK, Hensley D. Vertically aligned carbon nanofiber based biosensor platform for glucose sensor. *Int J High Speed Electron Syst.* 2014;23(1-2).

[14] Azzouzi S, Rotariu L, Benito AM, Maser WK, Ben Ali M, Bala C. A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker. *Biosensors and Bioelectronics.* 2015;69:280-6.

[15] Gamero M, Sosna M, Pariente F, Lorenzo E, Bartlett PN, Alonso C. Influence of macroporous gold support and its functionalization on lactate oxidase-based biosensors response. *Talanta.* 2012;94:328-34.

[16] Rassaei L, Olthuis W, Tsujimura S, Sudhölter EJR, Van Den Berg A. Lactate biosensors: Current status and outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2013;406(1):123-37.

[17] Jones JP, Prakash GKS, Olah GA. Electrochemical CO₂ reduction: Recent advances and current trends. *Isr J Chem.* 2014;54(10):1451-66.

[18] Kothandaraman J, Czaun M, Goeppert A, Haiges R, Jones JP, May RB, et al. Amine-free reversible hydrogen storage in formate salts catalyzed by ruthenium pincer complex without pH control or solvent change. *ChemSusChem.* 2015;8(8):1442-51.

[19] Kim S, Kim MK, Lee SH, Yoon S, Jung KD. Conversion of CO₂ to formate in an electroenzymatic cell using *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2014;102:9-15.

[20] Hartmann T, Leimkühler S. The oxygen-tolerant and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is able to catalyze the reduction of CO₂ to formate. *FEBS J.* 2013;280(23):6083-96.

[21] Bassegoda A, Madden C, Wakerley DW, Reisner E, Hirst J. Reversible interconversion of CO₂ and formate by a molybdenum-containing formate dehydrogenase. *J Am Chem Soc.* 2014;136(44):15473-6.

3. Objectius de la investigació / Objetivos de la investigación

El objetivo principal de la Tesis Doctoral es el estudio de distintos materiales carbonosos para su empleo en la inmovilización de enzimas con la finalidad de conseguir una mejora en la estabilidad y resistencia de las enzimas tanto para fines analíticos como para procesos bioelectrocatalíticos. Para ello se emplearán una serie de enzimas como la lactato oxidasa y la glucosa oxidasa para la fabricación de biosensores con el objeto determinar lactato y glucosa presentes en medios de cultivo embrionario o la formiato deshidrogenasa para la reducción de CO₂.

Asimismo, se estudiará tanto la influencia que para la inmovilización tiene el tamaño de poro de los distintos materiales así como el empleo de otros materiales (nanopartículas, mediadores...) para la mejora de la respuesta electroquímica y optimización de los sistemas.

4. Metodologia, hipòtesi i planificació temporal / Metodología, hipótesis y planificación temporal

Esta Tesis Doctoral está planteada para ser realizada en dos grandes bloques:

Bloque 1

Inmovilización de enzimas para la fabricación de biosensores de lactato y glucosa presentes en medios de cultivo embrionario.

Los cambios metabólicos en medios de cultivo celular durante el desarrollo embrionario reflejan la calidad y viabilidad del embrión para ser transferido. El lactato y la glucosa son algunos de los metabolitos vitales durante los primeros días del desarrollo embrionario resultando ser excelentes biomarcadores de una proliferación celular adecuada. Asimismo, la monitorización de estos biomarcadores a tiempo real y/o *in situ* permite al embriólogo tener una aproximación acerca de la selección del embrión. Por ello en este primer bloque nos centraremos en la fabricación de distintos biosensores capaces de detectar ciertos metabolitos presentes en medios de cultivo embrionario.

se comenzará con la fabricación de un biosensor de lactato. Para ello se estudiará distintos tipos de inmovilización para la enzima lactato oxidasa. Se emplearán una serie de nanomateriales de carbono para la mejora de la estabilidad y sensibilidad del biosensor.

Si es necesario, se emplearán distintos mediadores redox con la finalidad de eliminar la interferencia de posibles analitos presentes en los medios de cultivo celular.

Se buscará la miniaturización del biosensor empleando como soporte plataformas serigrafiadas con electrodos de trabajo grafiticos.

Una vez optimizados los parámetros como el pH, temperatura, concentración, fuerza iónica, etc. se realizará la detección

y cuantificación de lactato en medios de cultivo embrionario contrastándose dichos resultados con otros métodos analíticos.

Para la preparación de un biosensor de glucosa para la determinación de glucosa en medios de cultivo, se empleará la enzima glucosa oxidasa. Se procederá a la inmovilización de la enzima siguiendo los diferentes protocolos empleados para el biosensor de lactato así como la optimización y validación del biosensor.

Bloque 2

Bioelectroreducción de CO₂ a ácido fórmico/formiato.

El segundo bloque se centrará principalmente en el estudio de la reducción de CO₂ empleando diferentes enzimas. La primera enzima que se empleará será la formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* (CbsFDH). Esta enzima, de adquisición comercial, reduce el dióxido de carbono a ácido fórmico mediante el empleo del cofactor NADH. Debido a los problemas existentes concernientes a la regeneración de dicho cofactor se estudiará el empleo de distintos mediadores.

A continuación se describe la metodología a emplear:

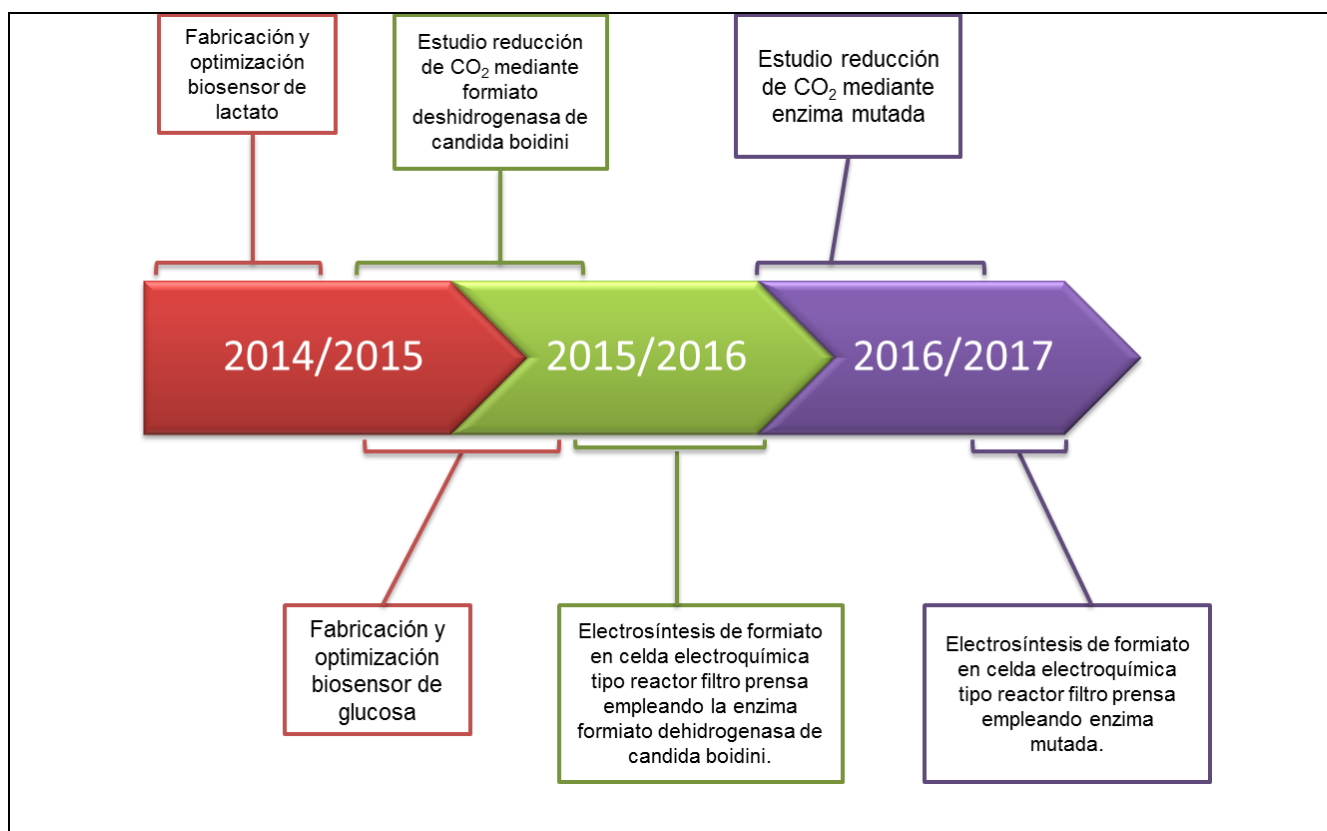
- Adsorción sobre distintos materiales carbonosos: Estudio de la porosidad y de la química superficial sobre la inmovilización de la enzima FDH. Se abordará también el uso de materiales híbridos metal/carbono para la inmovilización de la enzima.
- Estabilidad: Estudiaremos los procesos de desorción de la enzima y actividad enzimática.
- Optimización del sistema enzimático: Cantidad de enzima inmovilizada, empleo de cofactores, mediadores, pH, fuerza iónica de la disolución, temperatura, densidad de corriente o potencial controlado, flujo de CO₂, tolerancia al oxígeno,
- Electrosíntesis de formiato en una celda electroquímica tipo reactor filtro prensa.

Una vez optimizado el sistema se estudiará el proceso empleando una enzima mutada no dependiente de cofactor. Este apartado estará sujeto a una colaboración con la universidad que nos proporcionará dicha proteína. Se llevará a cabo la siguiente metodología:

- Expresión u obtención de otras enzimas proporcionadas por otros grupos de investigación.
- Inmovilización de enzimas empleando los diferentes protocolos seguidos por la enzima CbsFDH
- Estabilidad. Estudiaremos los procesos de desorción de la enzima y actividad enzimática.
- Optimización del sistema enzimático: Cantidad de enzima inmovilizada, empleo de cofactores, mediadores, pH, fuerza iónica de la disolución, temperatura, densidad de corriente o potencial controlado, flujo de CO₂, tolerancia al oxígeno,
- Electrosíntesis de formiato en celda electroquímica tipo reactor filtro prensa.

Planificación temporal:

Pese a la dificultad de distribuir de antemano los distintos cometidos a realizar, a continuación presentamos una aproximación de la planificación temporal de las diferentes tareas y objetivos planteados en esta Tesis Doctoral distribuidas a lo largo de los tres años en los cuales se pretende completar la Tesis.



5. Impacte esperat/ Impacto esperado

El impacto esperado gracias al trabajo realizado en el primer bloque se basará en la posibilidad de monitorizar diversos biomarcadores a tiempo real y/o *in situ* permitiendo al embriólogo tener una mayor aproximación acerca de la selección del embrión.

Nuestra motivación reside en la consecución de una correcta y óptima inmovilización de las distintas enzimas para lograr una mayor estabilidad y sensibilidad del biosensor con respecto a lo ya presentado en la literatura y cuya fabricación sea sencilla, viable económicamente y rápida.

Con respecto al segundo bloque se pretende fabricar nuevos materiales carbonosos adecuados para una correcta inmovilización de las proteínas empleadas así como alcanzar muy buenos rendimientos para la electrosíntesis de formiato empleando dichos materiales. Se desea diseñar y construir nuevos biocátodos para la bioelectrosíntesis de formiato que se utilicen en reactores electroquímicos basados en la tecnología de una pila de combustible. Este reactor se podrá implantar en plantas de tratamiento de residuos para realizar la valorización del CO₂.

6. Implicacions ètiques o de bioseguretat/ Implicaciones éticas o de bioseguridad.

Indique si la memòria contempla algun dels següents aspectes que puguin tenir implicacions ètiques o relatives a la bioseguretat:

Indique si la memoria contempla alguno de los siguientes aspectos que puedan tener implicaciones éticas o relativas a la bioseguridad:

- A. Recerca en humans o utilització de mostres biològiques d'origen humà
Investigación en humanos o utilización de muestras biológicas de origen humano
Si ☐ No ☒
- B. Utilització de cèl·lules troncales embrionàries humanes, o línies derivades d'elles
Utilización de células troncales embrionarias humanas, o líneas derivadas de ellas
Si ☐ No ☒
- C. Assaigs clínics
Ensayos clínicos
Si ☐ No ☒
- D. Ús de dades personals, informació genètica, uns altres
Uso de datos personales, información genética, otros
Si ☐ No ☒
- E. Experimentació animal
Experimentación animal
Si ☐ No ☒
- F. Utilització d'agents biològics de risc per a la salut humana, animal o per al medi ambient
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o para el medioambiente
Si ☐ No ☒
- G. Ús confinat d'organismes modificats genèticament (OMG)
Uso confinado de organismos modificados genéticamente (OMG)
Si ☐ No ☒
- H. Alliberament d'OMG
Liberación de OMG
Si ☐ No ☒

Si ha contestat afirmativament en alguna de les qüestions anteriors, explique els aspectes ètics referits a la recerca que es proposa, les consideracions, procediments o protocols a aplicar en compliment de la normativa vigent. En tot cas, la recerca en aquestes àrees requerirà de l'autorització del comitè d'ètica de la UA i/o dels organismes preceptius. Aquesta autorització, que ha de ser prèvia a l'inici dels treballs experimentals, serà exigible per al dipòsit de la tesi.

Si ha contestado afirmativamente en alguna de las cuestiones anteriores, explique los aspectos éticos referidos a la investigación que se propone, las consideraciones, procedimientos o protocolos a aplicar en cumplimiento de la normativa vigente. En todo caso, la investigación en estas áreas requerirá de la autorización del comité de ética de la UA y/o de los organismos preceptivos. Esta autorización, que tiene que ser previa al inicio de los trabajos experimentales, será exigible para el depósito de la tesis.

5. Signatures / Firmas



Sgt. / Fdo.: Noiaza Hernandez Ibañez

El candidat o la candidata al doctorat

El doctorando o la doctoranda

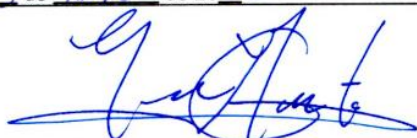
ALICANTE, 15 de MAYO de 2015



Sgt. / Fdo.: VICENTE LEGUEY

Tutor o tutora

ALICANTE, 15 de MAYO de 2015



Sgt. / Fdo.: JESUS INIESTA

Director o directora de la tesis

Director o directora de la tesi

ALICANTE, 15 de MAYO de 2015