



Doctoral Thesis

Biotechnological production of antimicrobial 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol using free and immobilised *Lactobacillus reuteri* cells and its reactive extraction

Author(s):

Rütti, David Paul

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006133732> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 18785

**BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL 3-
HYDROXYPROPIONALDEHYDE FROM GLYCEROL USING FREE AND
IMMOBILISED *LACTOBACILLUS REUTERI* CELLS AND ITS REACTIVE
EXTRACTION**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

DAVID PAUL RÜTTI

Dipl. LM-Ing. ETH

Born July 24, 1980

Citizen of Ersigen BE

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Dr. Sabine Vollenweider, co-examiner

Dr.-Ing. Jenny Weißbrodt, co-examiner

Zurich, 2010

Summary

The efficient production of the antimicrobial agent 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA or reuterin), an interesting compound for the food and chemical industry, and for medical applications, still represents a major challenge especially at large scale. Thus 3-HPA is commercially not available. The most promising approach to its availability is the production from the renewable raw material glycerol using intact and live *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 cells in a two-step process. However, the conversion process requires various factors from coenzyme B₁₂ to activating cations, reactivation proteins and energy as ATP, and high cell density. The conversion is limited by inhibitory and toxic effects of 3-HPA on the biocatalyst; in fact cells are required alive for bioconversion. Based on these requirements, three hypotheses were formulated for this study. First, 3-HPA production is increased by addition of cofactors of the glycerol dehydratase, glucose, and oxidative cell protectors to the bioconversion step and variation of pH. Secondly, cells immobilisation leads to high and efficient 3-HPA production because of high cell density and cell protection. Thirdly, *in situ* product removal decreases the toxicity of 3-HPA towards producing *L. reuteri* cells by instant removal of the accumulated 3-HPA leading to an increased production and eases purification of 3-HPA.

During this study, 3-HPA accumulation could not be enhanced by adding cofactors of the involved glycerol dehydratase, oxidative cell protector glutathione, or glucose to the bioconversion step. Addition of the tripeptide glutathione and glucose showed no influence on *L. reuteri* survival during bioconversion. Addition of glucose, however, increased significantly the production of by-products such as 1,3-propanediol and lactic acid and decreased overall glycerol bioconversion. pH fluctuation showed no effects on *L. reuteri* survival, but the phosphate-citrate buffer for pH control caused a significant two-fold decrease of 3-HPA accumulation. Unbuffered, unadjusted, and unsupplemented 400 mM glycerol solution was therefore shown to be best for highest 3-HPA production. On the other hand, 3-HPA accumulation was successfully enhanced by providing glucose/glutathione during washing step before bioconversion, while the by-product 1,3-propanediol increased only marginally.

3-HPA accumulation using immobilised *L. reuteri* cells was successfully achieved and showed more than 3.2-fold increased specific productivity (3-HPA production per cell) and 2.7-fold increased specific production per consumed MRS medium during biomass production step compared to free cell bioconversion. Furthermore, any centrifugation steps could be avoided to separate cells after conversion and reuse them in a second bioconversion step. Main drawbacks were observed in the 4.8-fold lower mean conversion rate of $99\pm 16 \text{ mM h}^{-1}$ and 1.4-fold lower maximum 3-HPA concentration of $182\pm 14 \text{ mM}$ compared to free cells. To test recycling of immobilised cells, beads were incubated in MRS medium for 16 h after glycerol bioconversion. *L. reuteri* cells were damaged during conversion under starvation even after short bioconversion time to 45 min, and no growth occurred during reactivation step.

Further efforts were done to develop a novel purification method suitable for *in situ* production removal. After testing 8 different strategies, the anion exchange resin IRA-400 in hydrogensulfite form was selected. 3-HPA was bound to the resin (hydrogensulfite form), released as 3-HPA adduct by elution with saturated NaCl solution, and extracted from eluent after water removal (lyophilisation) and ethanol extraction. This method is suitable for up-scaling but further studies are required. The overall yield of the purification ranged between 14.5 mol % and 45.3 mol %. Furthermore, we showed the potential of the system to be used for an *in situ* production removal process. However, the bioconversion was completely inhibited when the anion exchange resin in hydrogensulfite form was added in the reaction mixture and future work is therefore needed to overcome this limitation.

For the quantification of hydrogensulfite and 3-HPA in presence of hydrogensulfite, two methods were established based on photometrical methods previously published by Ellman (Ellman test, hydrogensulfite) and Dickinson (purpald assay, 3-HPA), respectively.

This research work demonstrated that unbuffered, unadjusted, and unsupplemented glycerol solution was best for highest 3-HPA production. Immobilised culture was successfully applied for 3-HPA accumulation and showed superior specific productivity without centrifugation steps. Finally, a novel purification method for 3-HPA was developed with a high potential to be successfully applied in an *in situ* product removal process at large scale.

Zusammenfassung

Die effiziente Produktion des antibiotisch wirksamen 3-Hydroxypropionaldehyds (3-HPA oder Reuterin) stellt noch immer eine grosse Herausforderung dar, erst recht im Grossmassstab. Die Eigenschaften von 3-HPA eröffnen unzählige potentielle Einsatzgebiete im Lebensmittelsektor, in der chemischen Industrie wie auch im Gesundheitswesen. 3-HPA ist allerdings bis heute nicht kommerziell erhältlich. Die biotechnologische Synthese aus dem erneuerbaren Rohstoff Glycerin mittels lebender *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 Zellen in einem Zwei-Stufen-Prozess ist ausserordentlich erfolgsversprechend. Dieser Zwei-Stufen-Prozess sieht eine Trennung zwischen Zellwachstum und Biokonversion vor. Die biotechnologische Synthese benötigt allerdings eine Reihe von Faktoren wie Koenzym B₁₂, Kationen, Aktivatorproteinen und Energie als ATP. Dessen Produktion hängt direkt von der Zelldichte ab und wird limitiert durch die Produkt-Toxizität, welche bis zum Absterben des Biokatalysators führen kann.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende drei Hypothesen getestet. Erstens, die 3-HPA Produktion wird durch pH-Variation und dem Zufügen von Kofaktoren des beteiligten Enzyms Glycerindehydratase, Glukose und Zellantioxidant Glutathion erhöht. Zweitens führt die Zellimmobilisierung von *L. reuteri* in Polysaccharid-Beads zu einer effizienten 3-HPA Produktion aufgrund hoher Zelldichten und Schutzwirkung für den Katalysator. Drittens verringert ein *in situ* Produkt Entfernungprozess die Anreicherung von toxischem 3-HPA, was zu einer erhöhten Produktion und erhöhten Viabilität von *L. reuteri* führt.

Während dieser Arbeit wurde die These gefestigt, dass native 400 mM Glycerinlösung am geeignetsten für maximale 3-HPA-Produktion ist. Denn die 3-HPA-Produktion wurde weder durch die Zugabe von Enzymkofaktoren und Glukose, noch durch das Zellantioxidant Glutathion signifikant verbessert. Im Gegenteil: Die Zugabe von Glukose verminderte die 3-HPA Endkonzentration und erhöhte unerwünschte Nebenprodukte wie 1,3-Propandiol und Laktat. Die Viabilität von *L. reuteri* nach der Biokonversion wurde durch das Tripeptid Glutathion und Glukose nicht beeinflusst. Änderungen des pH-Wertes zwischen 4 und 7 zeigte keinen

Einfluss auf 3-HPA-Konzentration nach 2 h, aber durch den zugesetzten Phosphat-Citrat-Puffer wurde die maximale 3-HPA-Konzentration um fast die Hälfte reduziert. Hingegen konnte die Akkumulierung von 3-HPA durch Zugabe von Glukose und Glutathion während des Waschens vor der Biokonversion gesteigert werden, ohne signifikante Beeinflussung des Beiprodukts 1,3-Propanediol.

Die Produktion von 3-HPA mittels immobilisierter *L. reuteri* Zellen wurde erfolgreich etabliert und zeigte Vorteile gegenüber der bekannten Produktion mittels freier Zellen in einer 3.2-fach erhöhten spezifischen Produktivität (3-HPA Produktion pro Zelle) und einer 2.7-fach erhöhten spezifischen Produktivität pro verbrauchtes Volumen an MRS Medium. Zusätzlich konnten Zentrifugierungsschritte vermieden werden. Nachteile sind einzig in der dreifach geringeren Umwandlungsgeschwindigkeit von $99 \pm 16 \text{ mM h}^{-1}$ und 1.4-fach geringeren Endkonzentration von $182 \pm 14 \text{ mM}$ zu finden. In einem weiteren Schritt wurde die Möglichkeit zur Rezyklierung immobilisierter Zellen in MRS Medium nach der Biokonversion untersucht. Allerdings wurden die Zellen schon durch die Hungerperiode während Biokonversion so geschädigt, dass in frischen MRS Medium nach 16 Stunden kein Wachstum festgestellt werden konnte. Auch eine Verringerung der Hungerperiode von 3 h auf 45 min brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Die Lösung dieser Einschränkung wurde in einer *in situ* Produktentfernung (ISPR) von 3-HPA gesucht. Das Testen von acht verschiedenen Reinigungsstrategien von 3-HPA identifizierte das Anionentauscherharz IRA-400 in der Hydrogensulfitform, 3-HPA selektiv zu binden und wieder abzugeben. Der daraus entwickelte Reinigungsprozess von 3-HPA besteht aus dessen Bindung an IRA-400 in der Hydrogensulfitform, dessen Eluierung als Sulfitaddukt mittels gesättigter Kochsalzlösung und dessen Ethanol-Extrahierung aus dem trockenen Salz nach der Lyophilisation. Die Ausbeute reinem 3-HPA war je nach 3-HPA-Anfangskonzentration zwischen 14.5 mol % und 45.3 mol %. Das Reinigungsverfahren zeigte grosses Potential für den Einsatz in einem ISPR Prozess. Dabei wurde 3-HPA wie erwartet aus der Glyzerinlösung entzogen. Allerdings wurde die Biokonversion komplett gehemmt, dass weitere Untersuchungen zur Lösung dieses Inhibitionsproblems nötig sind.

Zwei neue photometrische Methoden wurden zur Quantifizierung von Hydrogensulfit und 3-HPA in Verbindung mit Hydrogensulfite entwickelt, die auf den Ellman Test und respektive dem Purpald Test aufgebaut sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht supplementierte und ungepufferte Glyzerinlösung am geeignetsten für maximierte 3-HPA-Produktion ist. Immobilisierte *L. reuteri*-Kultur wurde erfolgreich für die 3-HPA Produktion eingesetzt und zeigte eine verbesserte spezifische Produktivität ohne Zentrifugierungsschritte gegenüber freien Zellkulturen. Zuletzt wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode zur Reinigung von 3-HPA entwickelt und dessen hochpotentiellen Möglichkeiten im Einsatz in einer ISPR demonstriert. Die vorliegende Arbeit bietet also eine solide Basis für die erfolgreiche Entwicklung einer ISPR von 3-HPA aus der Glyzerinlösung im Grossmassstab.