



CARRERA DE ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL FCEyN-INTI

Materia de Articulación CEBI-E5

BIOCATÁLISIS APLICADA

Docente a cargo: Dra. Cristina dos Santos Ferreira

crisdossantosf@gmail.com

**CEBI- E5-1 : Biocatálisis-Introducción/ Características de los
Biocatalizadores**

Bibliografía

Biotransformations in Organic Chemistry, a Textbook. K. Faber, Springer-Verlag, Berlin, 5th Edition, **2004**

Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals. B. Saha, D. C. Demirjian, ACS, Washington, **2000**

Biocatalysts and Enzyme Technology, K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

Biocatalysis. A. S. Bommarius, B. R. Riebel, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**

The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reaction. R. B. Silverman, Academic Press, San Diego, **2000**

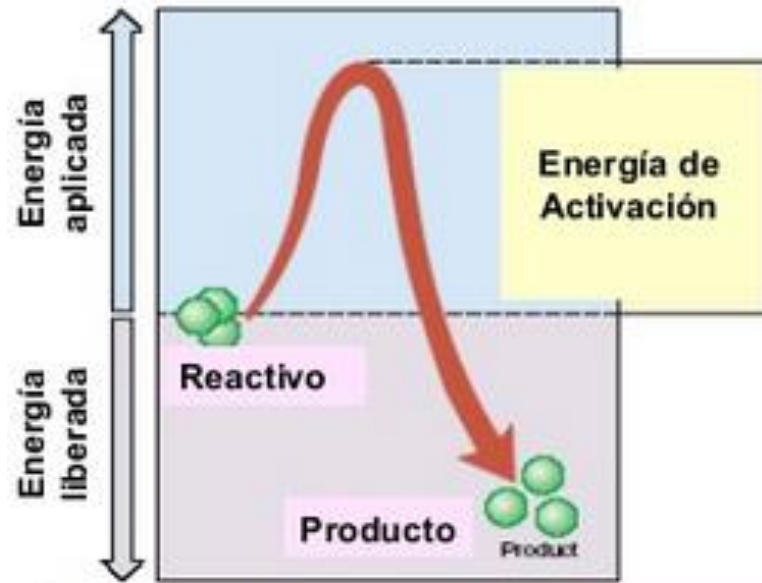
Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers. S. Kobayashi, H. Ritter, D. Kaplan., Springer-Verlag, Berlin, **2006**

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Fundamentals, advances and practices for a greener future. Priyadarshini A. and Pandey P. Apple Academy Press. **2019**



CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

CATÁLISIS



$\Delta G < 0$ → condición termodinámica.
Reacción espontánea en el sentido
en que está escrita

(Ea) energía necesaria para formar
el complejo activado.

Catalizador: sustancia capaz de acelerar
una reacción sin alterar el balance
energético de la misma

Disminuye la Ea al buscar una ruta
alternativa → acelera la velocidad de
reacción

CATÁLISIS

HOMOGÉNEA

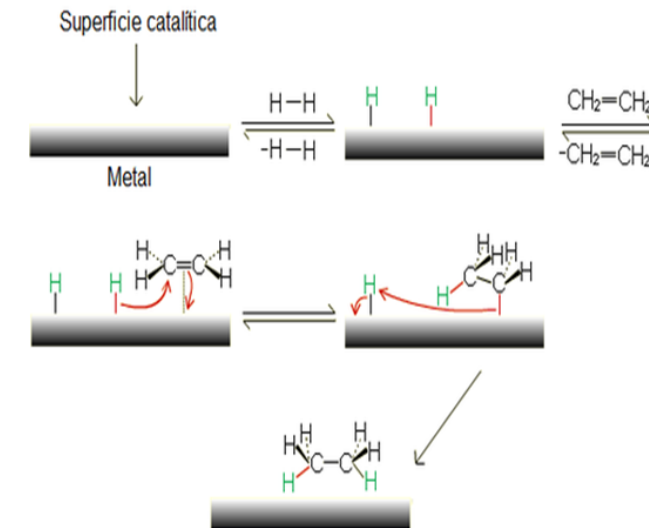
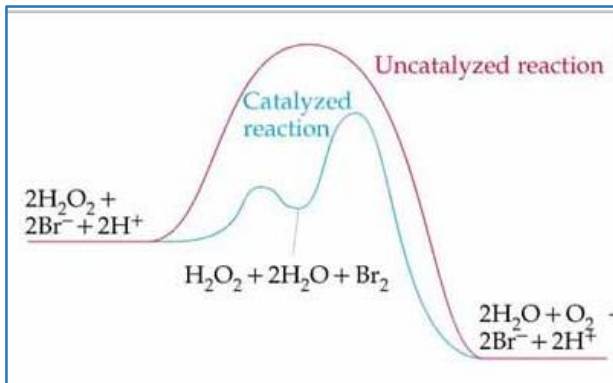
Altos rendimientos
Reacciones selectivas

Producción
ácido acético
Alquilación de
olefinas

HETEROGÉNEA

Separación simple
y completa del
catalizador

Alquilación de
isobutano
Polimerización de
etileno



CATALIZADORES

QUÍMICOS

Compuestos químicos

- Inespecíficos
- Sustancias simples
- No saturables
- Medianamente eficaces
- Actividad no regulable
- Menor sensibilidad a cambios pH o temperatura

BIOLÓGICOS

Enzimas-Células-Microorganismos

- Específicos para una o varias sustancias o reacciones.
- Proteínas o ARN-Ribozimas
- Saturables
- Altamente eficaces
- Actividad regulable
- Su actividad es más sensible a cambios pH o temperatura

Introducción

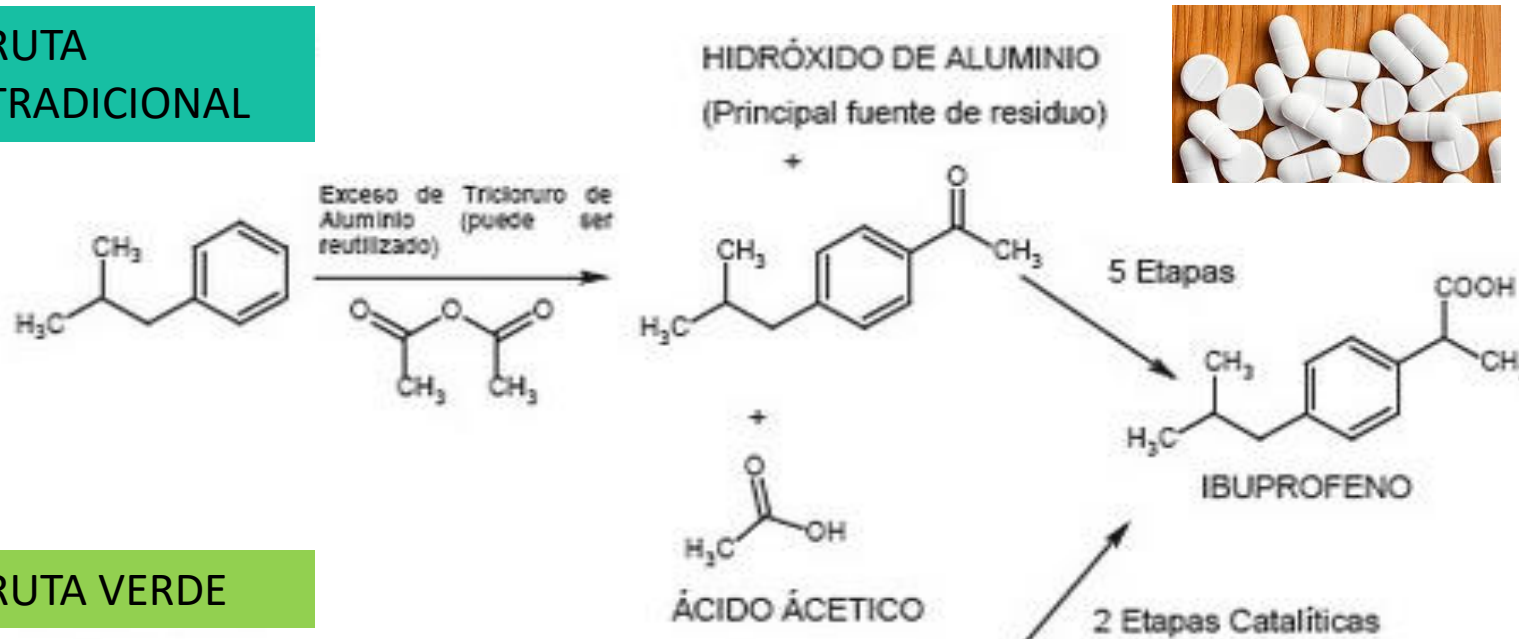
CATÁLISIS QUÍMICA

Producción industrial de IBUPROFENO



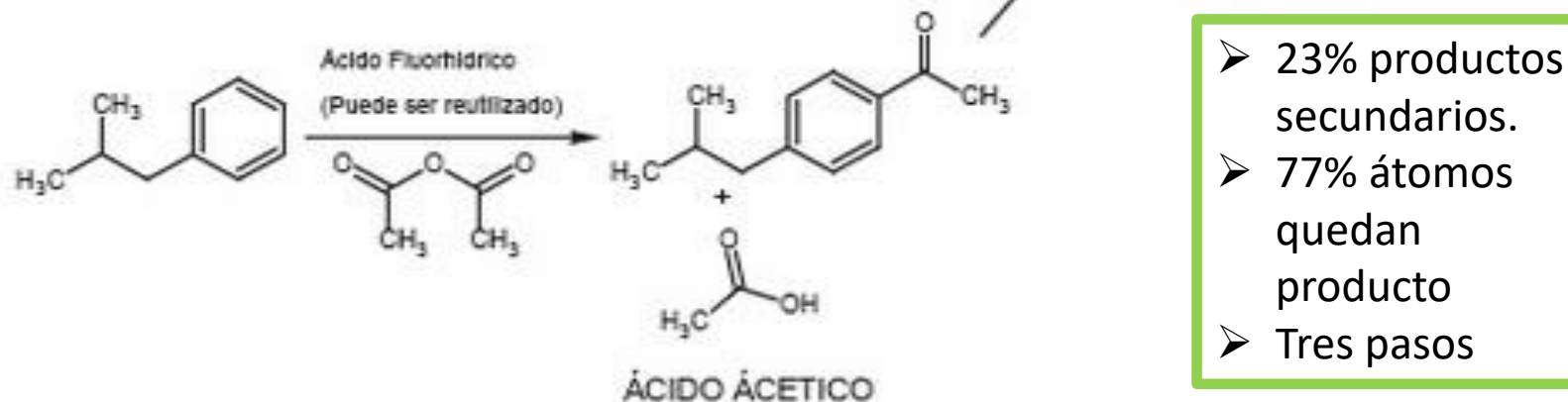
CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

RUTA TRADICIONAL



- 60% productos secundarios.
- 40% átomos quedan producto
- Seis pasos

RUTA VERDE



- 23% productos secundarios.
- 77% átomos quedan producto
- Tres pasos



Introducción

CATÁLISIS BIOLÓGICA



GRUPO DE ESPECIALIZACIÓN EN
TECNOLOGÍA INDUSTRIAL



Girasol



Soja



Colza



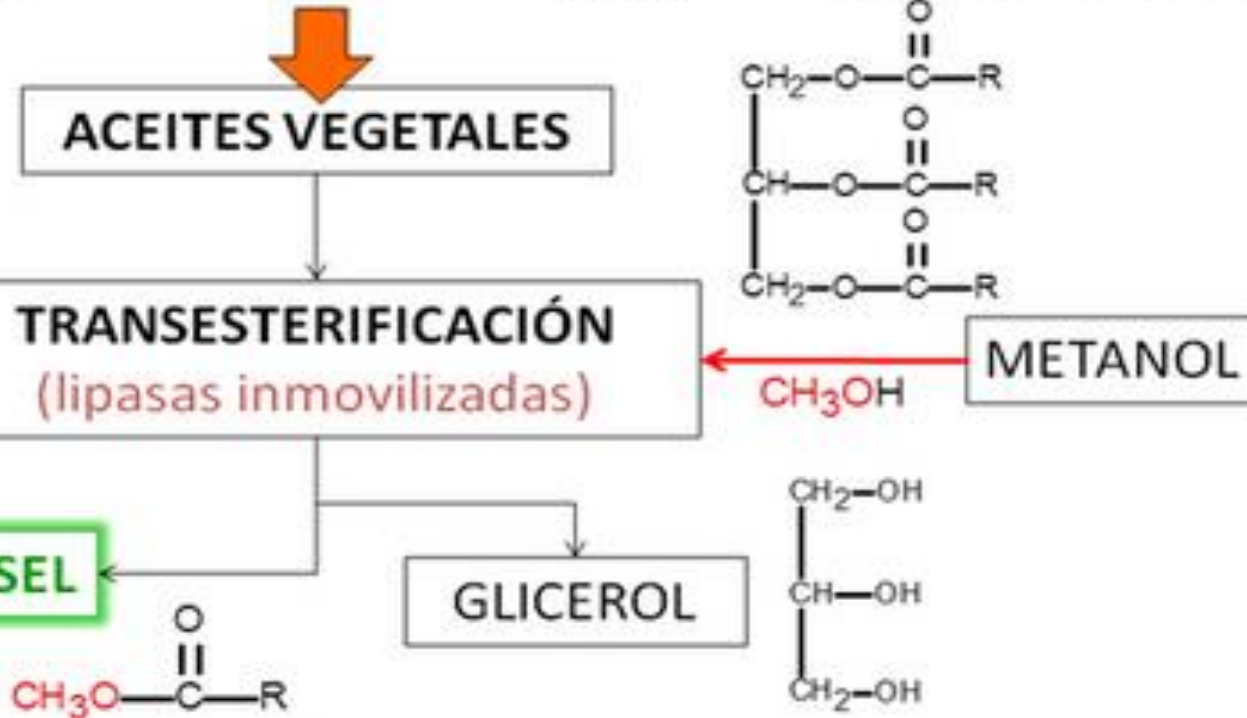
Palma



Aceite de cocina usado



BIODIESEL



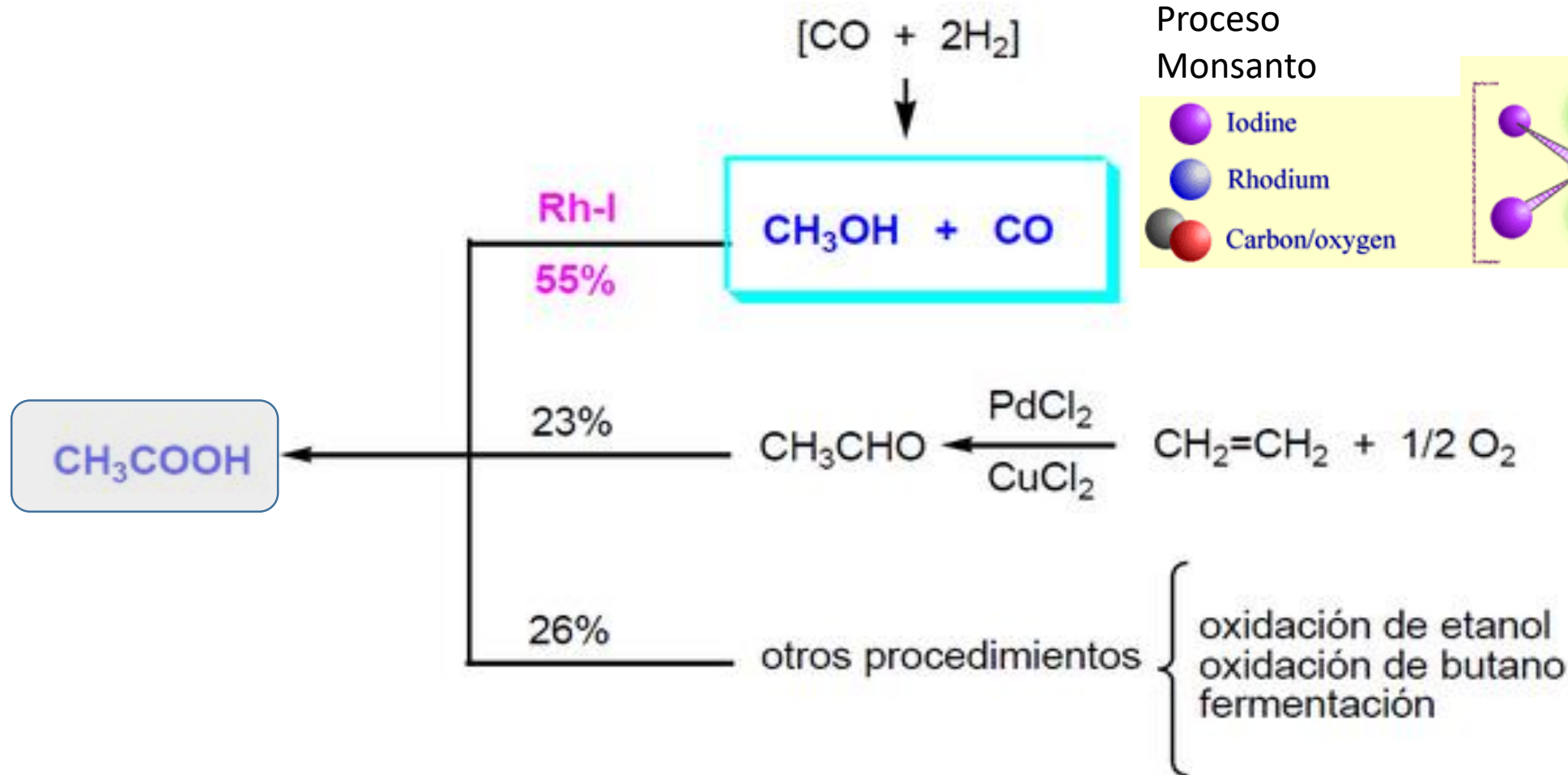
Introducción

Ejemplo: Producción industrial de ácido acético

Diferentes tipos de catálisis

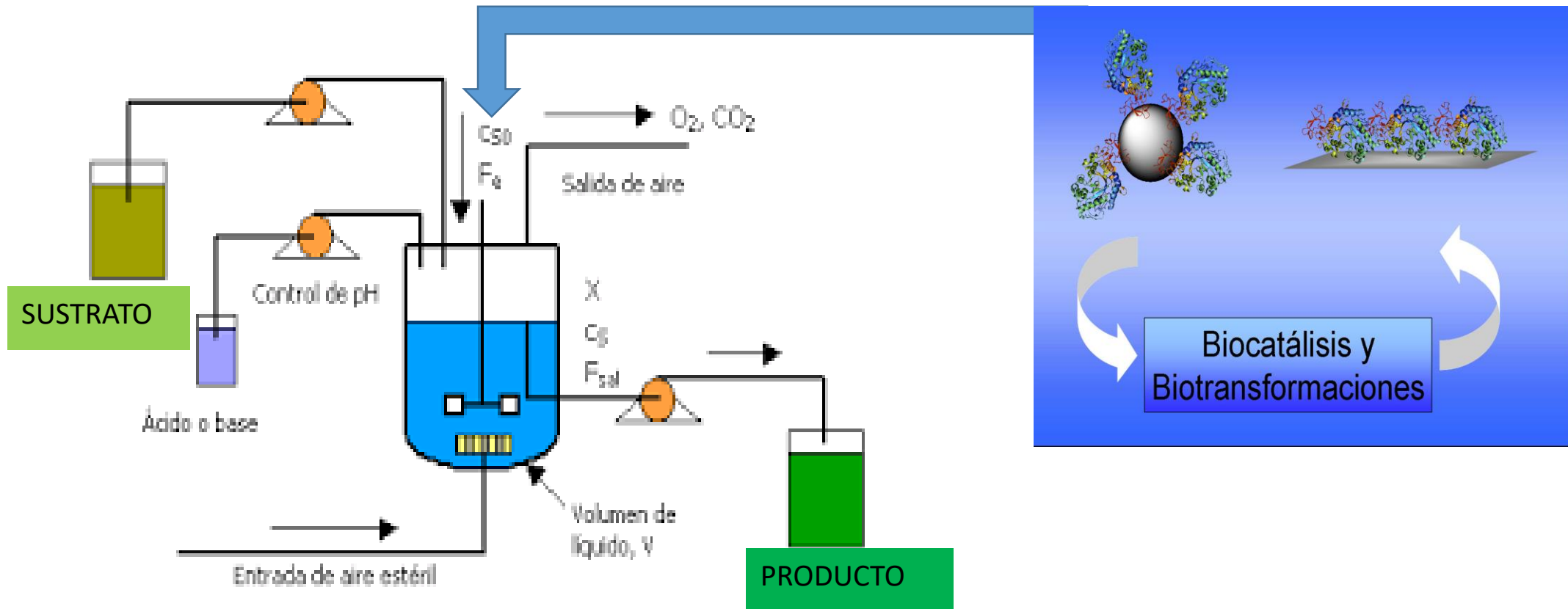


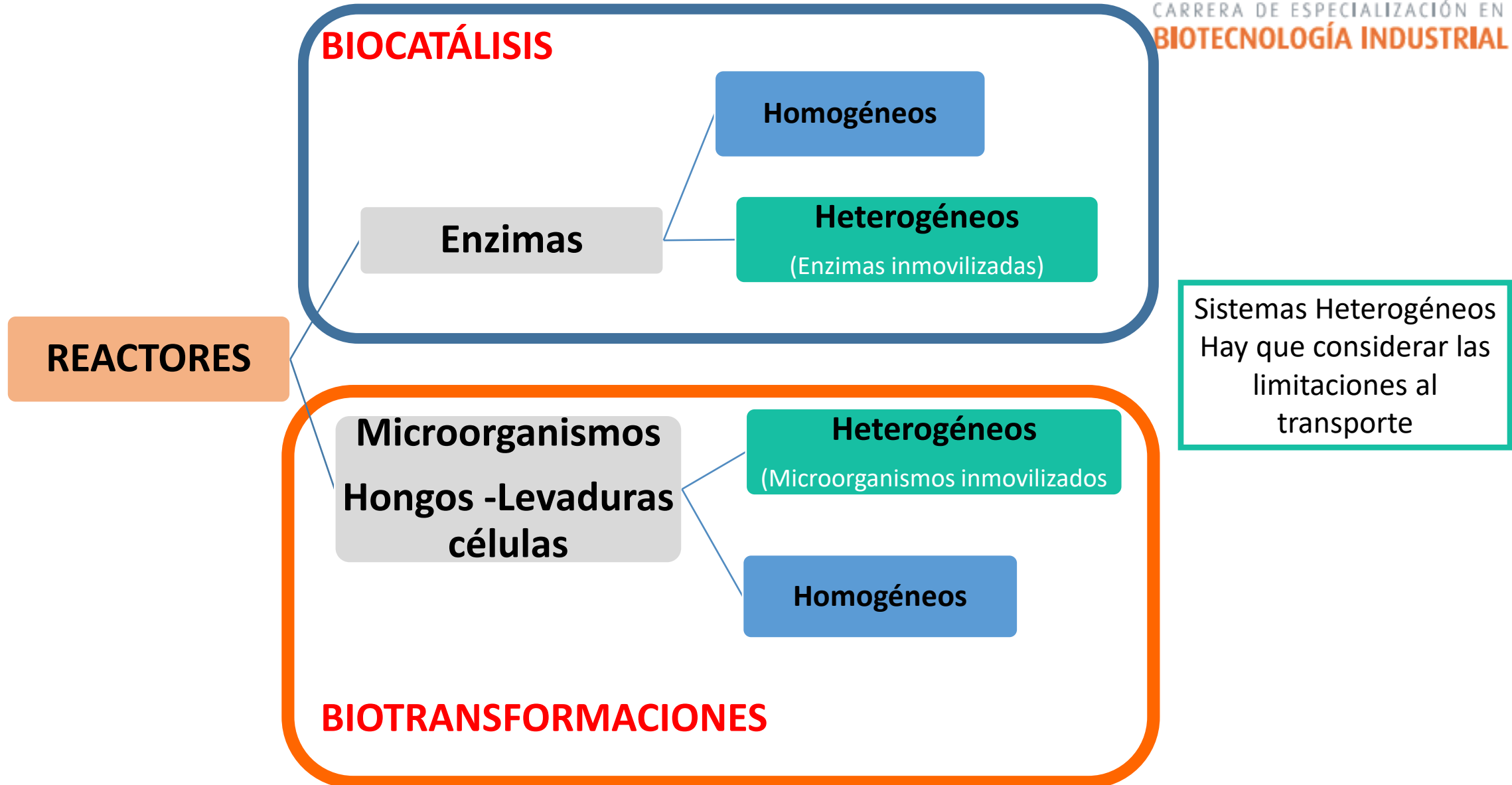
CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



BIOCATÁLISIS APLICADA

La biocatálisis aplicada es la transformación de sustratos a productos deseados utilizando enzimas o células en procesos controlados.





Sistemas Heterogéneos
Hay que considerar las limitaciones al transporte

BIOCATÁLISIS APLICADA: Desarrollo histórico



2000 aC

- Los sumerios y egipcios producían alimentos fermentados como vino, cerveza, pan, yogur, quesos.
- Homero (400aC) menciona el uso de estómagos de animales para fabricar quesos.



Siglo XIX

- Payen y Person investigan la acción de extractos de cebada en la hidrólisis del almidón.
- Berzelius (1835) define la reacción catalítica para las diastasas (cerveza, pan).
- Aislamiento de pepsina a partir de paredes estomacales de varios animales.



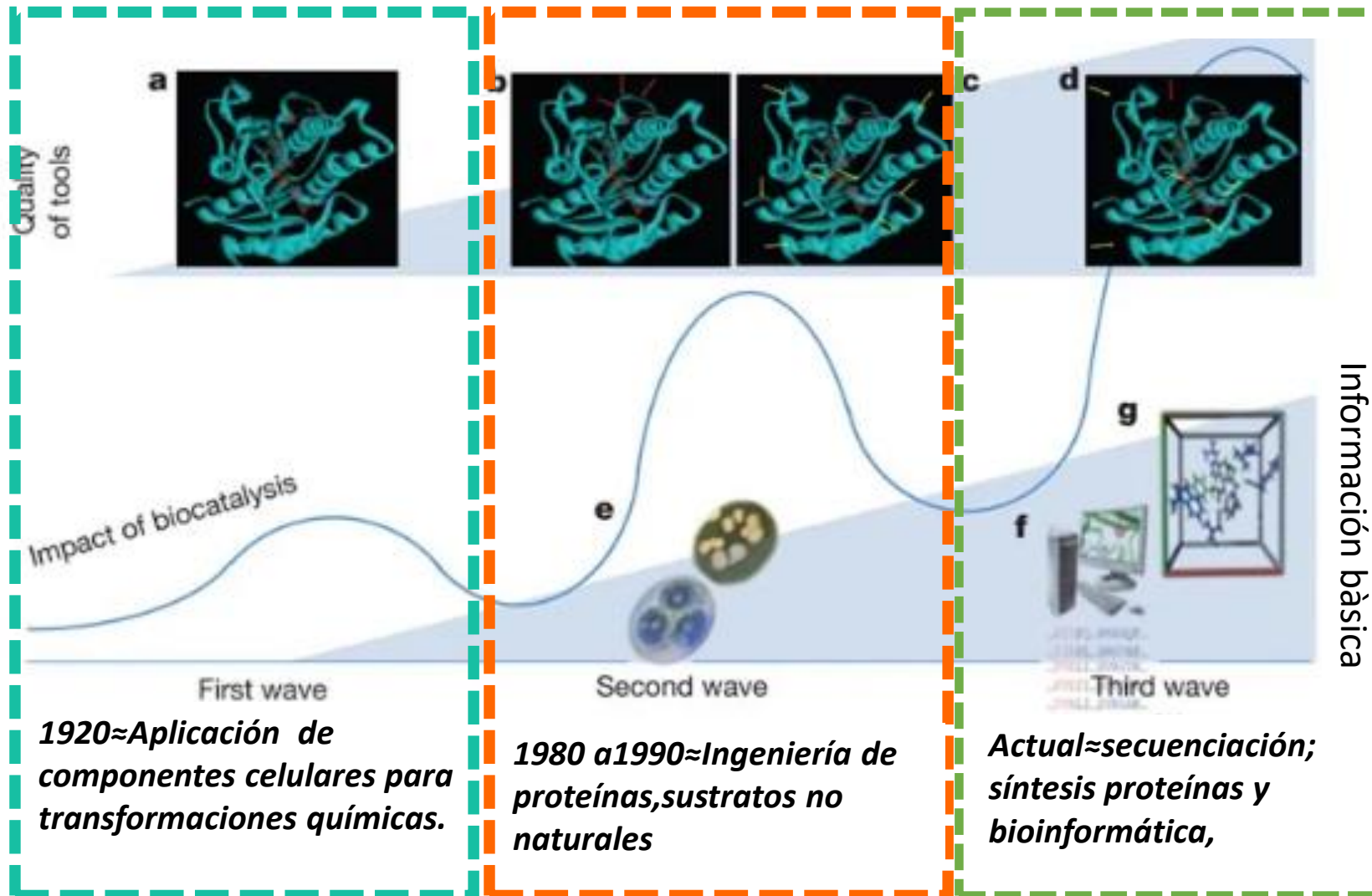
Siglo XX

- En los 80' se incorporan preparados enzimáticos a la industria alimenticia aplicaciones → alimentos → diastasas y pepsina.
- Luego otras aplicaciones detergentes biológicos → proteasas y lipasas.
- Incorporación de producción de medicamentos con tecnología OMG.
- Estructura de proteínas.



Evolución de la Biocatálisis.

(Evolución descubrimiento de estrategias de ingeniería genética e identificación de enzimas).

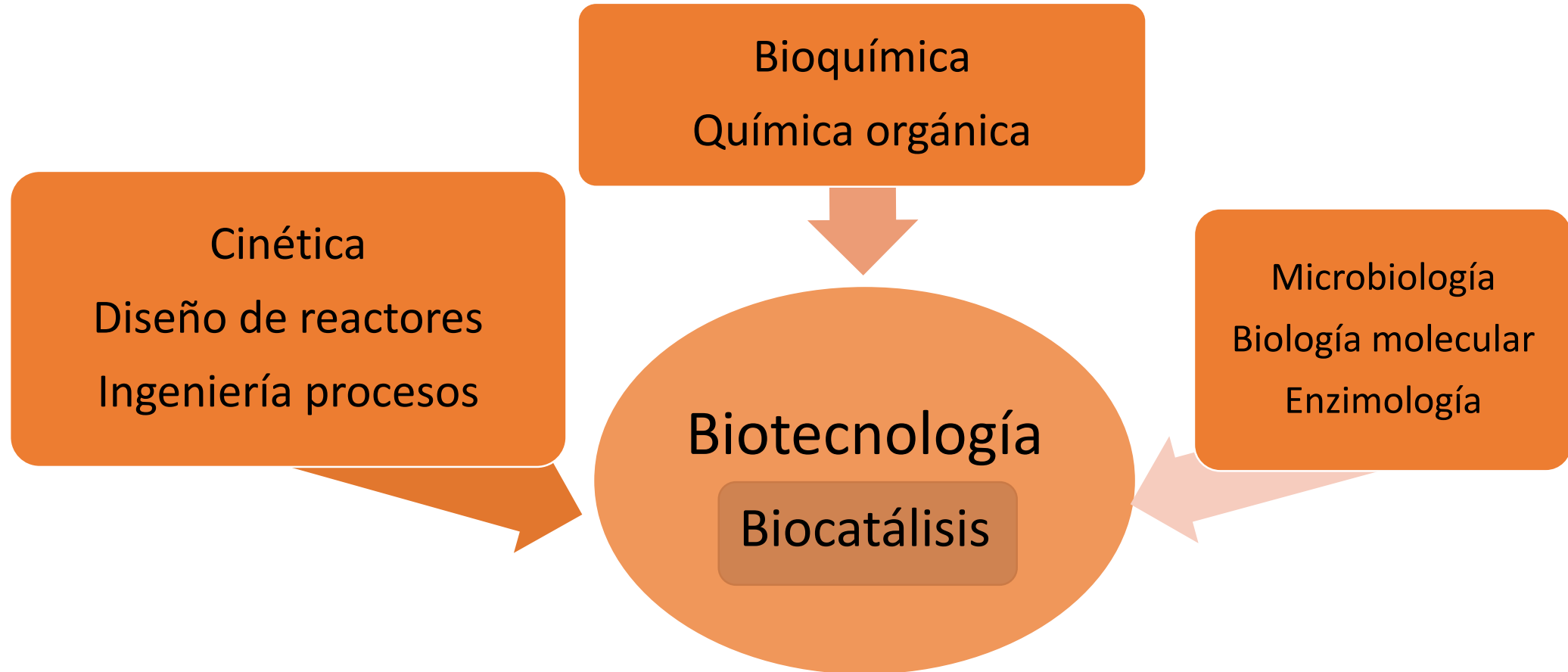


- (a) Identificación de enzimas
- (b) Mutagenesis de enzimas
- (c) Selección y diseño de experimentos para alterar enzimas
- (d) Bibliotecas y bases de datos de proteínas
- (e) Selección de enzimas en cultivos enriquecidos
- (f) Modificación biotecnológica de proteínas
- (g) Diseño de enzimas, computacionalmente.

Inicialmente el proceso biocatálisis se diseñaba en función de la enzima. Actual se diseña la enzima o el microorganismo en función proceso.

BIOCATÁLISIS y BIOTRANSFORMACIONES

Contribuciones interdisciplinarias



La biocatálisis ha surgido como un área de gran interés dentro de la química, y esta orientada al estudio de procesos enzimáticos catalizados por una amplia variedad de enzimas y microorganismos.

BIOCATÁLISIS y BIOTRANSFORMACIONES

Rol actual

- 85% Hidrolasas
- 15% Oxidorreductasas + Isomerasas



MEDIOAMBIENTE

Biorremediación
Plásticos biodegradables
Biocombustibles

SECTOR SANITARIO- FARMACÉUTICO

Enzimas para diagnóstico y usos
terapéutico
Síntesis compuestos especialmente
quirales
Biosensores

SECTOR AGROALIMENTARIO

Aromas, edulcorantes, aditivos,
aminoácidos, vitaminas.
Enzimas quesos, lácteos dietéticos,
carnes
Alimentos y suplementos ganado
Insecticidas, herbicidas

PROCESOS INDUSTRIALES

Tratamiento de efluentes
Polímeros
Detergentes
Textiles y papel
Síntesis de compuestos orgánicos

Proteasas
alcalinas.
La actividad a
alta a 60-
65°C y pH ≈
6-9,5

ALIMENTOS

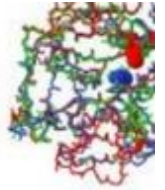
65 %
producción
de enzimas

Panificación, farináceos
(amilasa, proteasa)

Cerveza (amilasa,
amiloglucosidasa, proteasa)

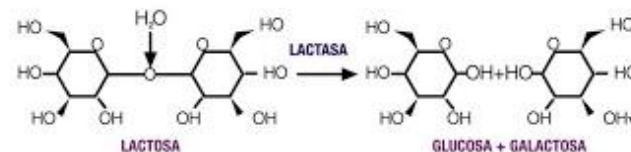
Lácteos
(renina, galactosidasa)

Proteasas
Ablandan la carne



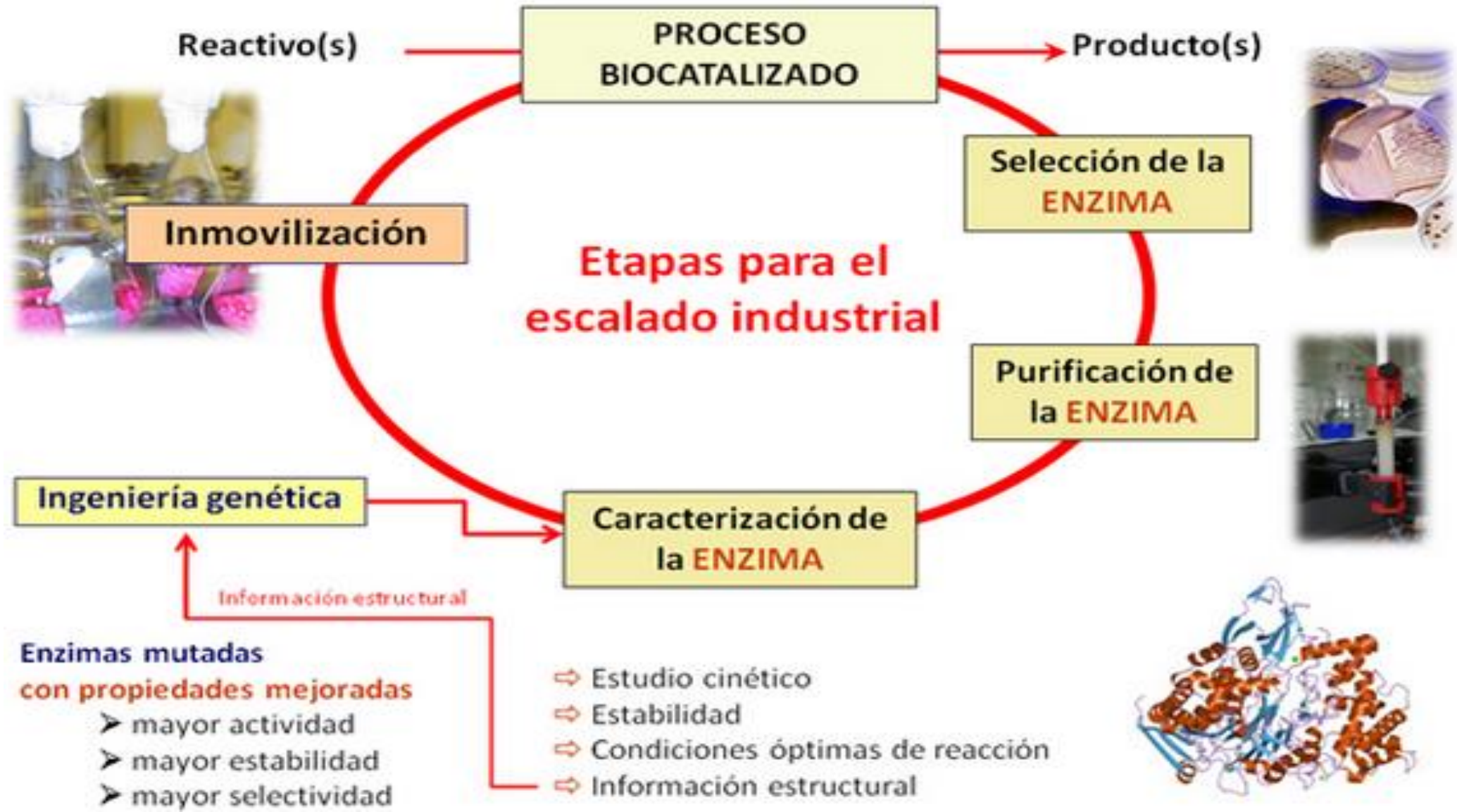
En gral. el uso más importante → hidrólisis de carbohidratos y proteínas

Intolerancia a la Lactosa



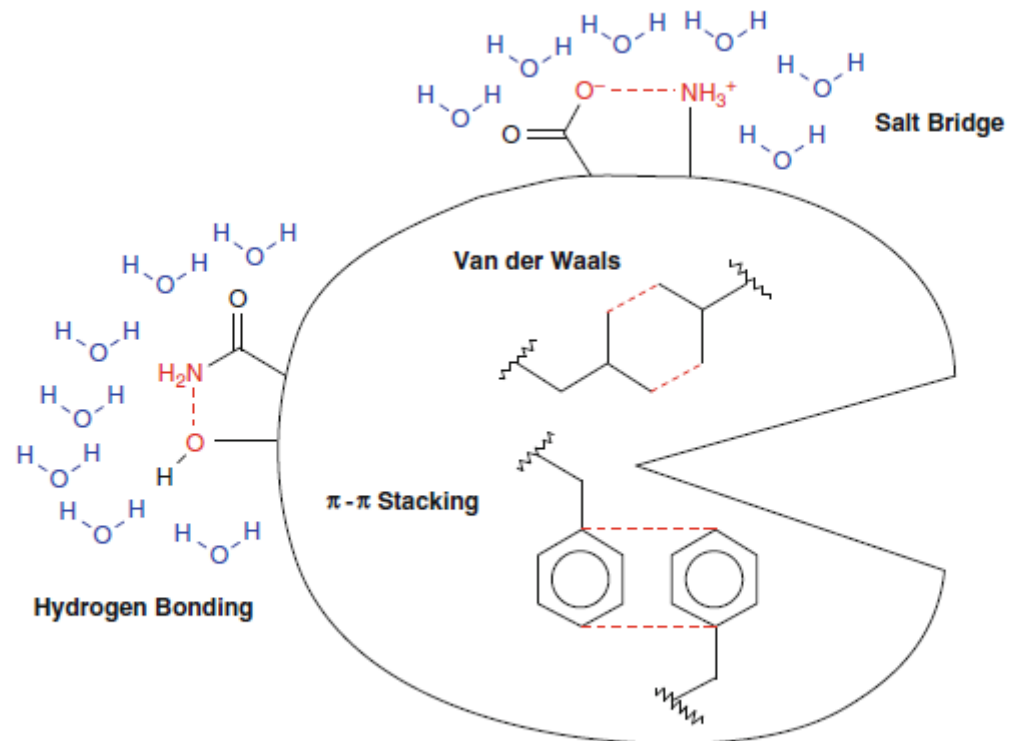
Amilasas
-panificación
-producción jarabes
-cervezas
-textiles

CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE LA BIOCATÁLISIS

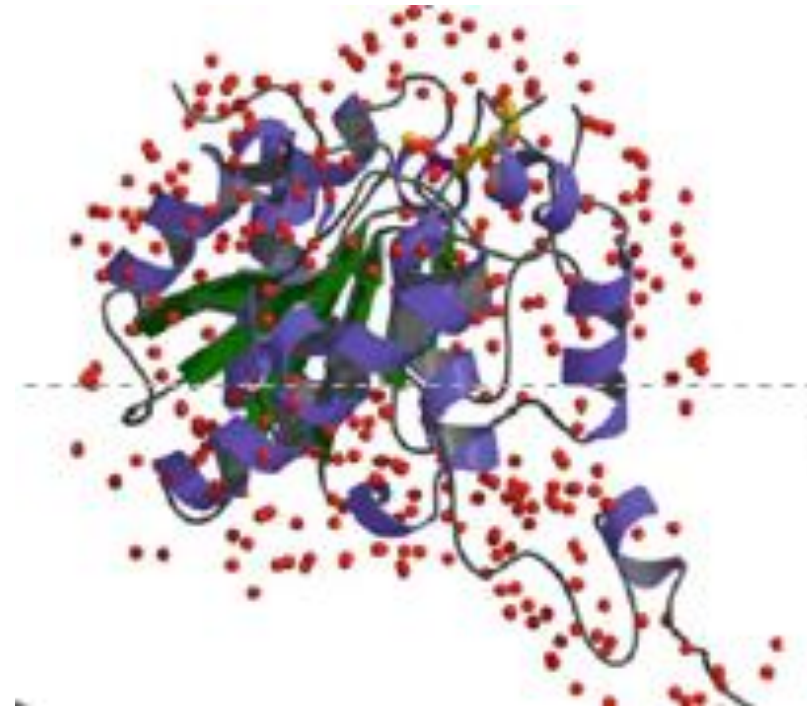


ENZIMAS

Estructura y interacciones



Scheme 1.2 Schematic representation of binding forces within a protein structure



Lipasa de *Candida antarctica*

ENZIMAS

Clasificación por su función



CATEGORIA	CARACTERISTICAS
Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxido-reducción. En este grupo se encuentran las deshidrogenasas, oxidasas, reductasas, entre otras.
Tranferasas	Hay una transferencia de grupos de una molécula a otra. Entre los más comunes están los grupos carbonilo, amino y el carboxilo.
Hidrolasas	Se produce la ruptura de un enlace por la adición de agua.
Liasas	Se eliminan grupos para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace.
Isomerasas	Catalizan varios tipos de reordenamiento intermoleculares.
Ligasas	Catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. Aporta siempre la hidrólisis de ATP

NOMENCLATURA DE ENZIMAS



Código Numérico

Encabezado por las letras EC (Enzyme Commission), seguidas de cuatro números.

Nombre Sistemático

Donador-aceptor-grupotransferido.asa

EC 1.x \Rightarrow Oxidorreductasas

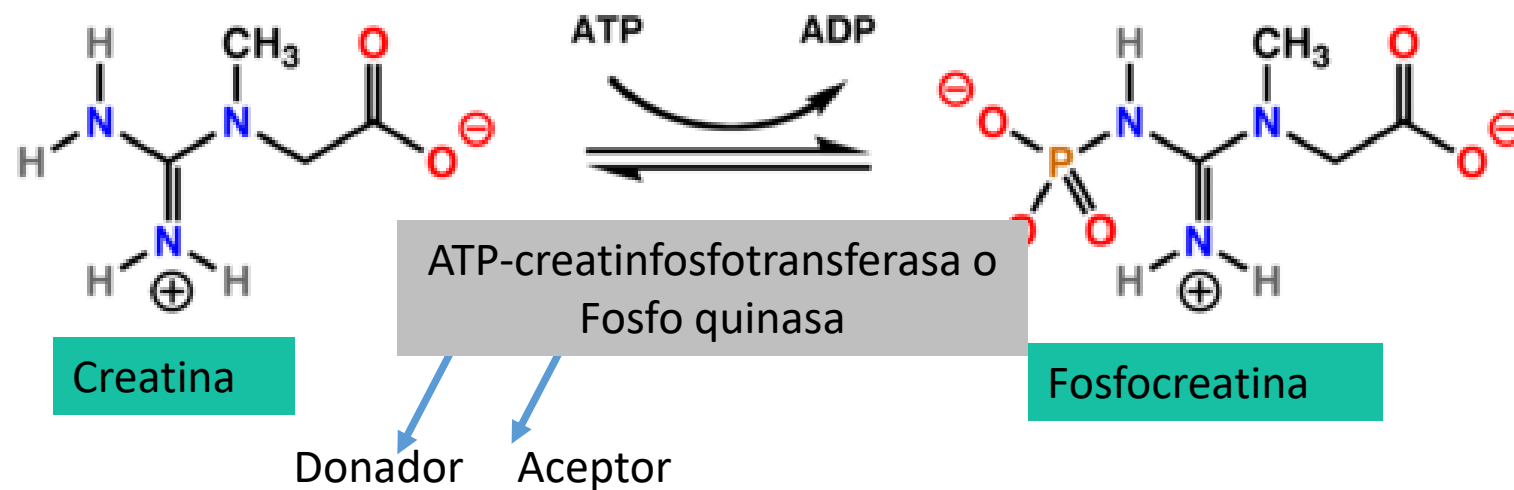
EC 2.x \Rightarrow Transferasas

EC 3.x \Rightarrow Hidrolasas

EC 4.x \Rightarrow Liasas

EC 5.x \Rightarrow Isomerasas

EC 6.x \Rightarrow Ligasas



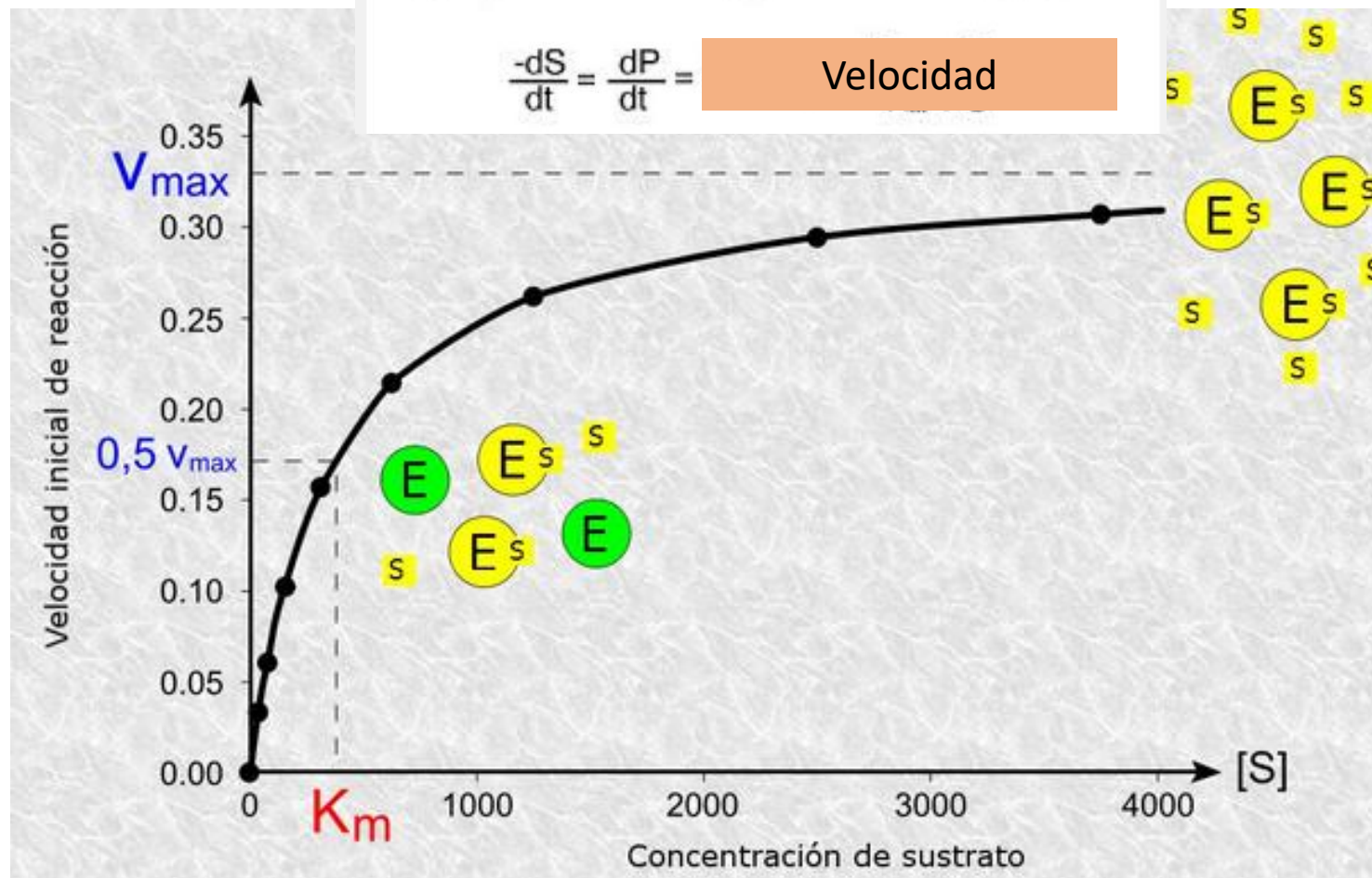
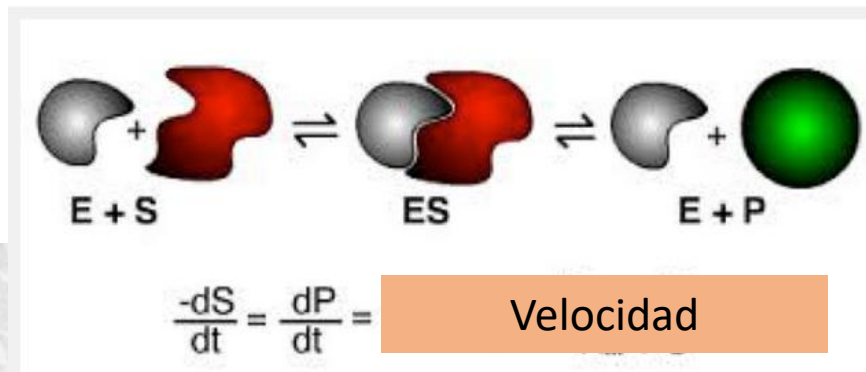
EC 2.7.3.2

Grupo 2. Transferasas
Subgrupo 7 (transfiere fosfato)
Sub-subgrupo 3 (enlace que se rompe o se forma)
Orden listado:2

CINÉTICA ENZIMÁTICA



CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



Leonor Michaelis (1875-1949)



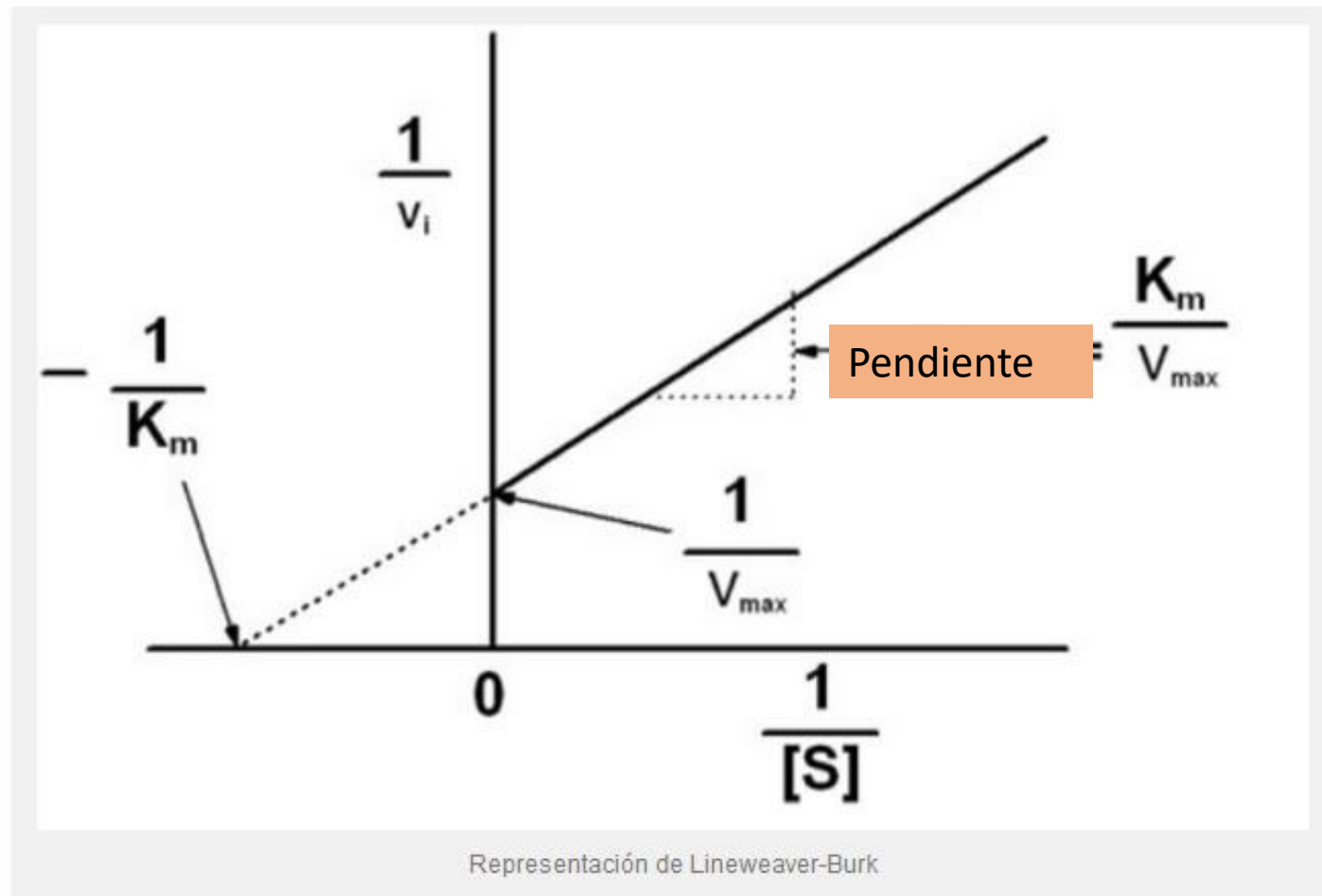
Maud Menten (1879-1960)



Ecuación de Michaelis-Menten (M-M)

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$



Ecuación de Lineweaver-Burk

Consiste en representar la recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = m x + b$$

Donde:

$$y = 1/v_0$$

$$x = 1/[S]$$

$$m = K_m/V_{\max}$$

$$b = 1/V_{\max}$$

Resultado: línea recta

Pendiente: K_m/V_{\max}

Corte en ordenada: $1/V_{\max}$

Corte en Abscisa (extrapolado): $-1/K_m$

Un biocatalizador puede ser caracterizado por:

- 1. Actividad:** productividad
- 2. Estabilidad:** condiciones de operación, vida útil
- 3. Selectividad:** frente a reacciones no deseadas

CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. ACTIVIDAD

La actividad de un catalizador es una medida de su productividad

➤ **Productividad** del biocatalizador

Unidades Internacionales UI= U= cantidad enzima que convierte 1 μmol de sustrato por min

➤ **Actividad específica** = cantidad enzima que convierte $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg proteína}) = \text{U}/\text{mg proteína-biocatalizador}$

➤ **Katal** = cantidad enzima que degrada 1 mol sustrato en 1 segundo

Capacidad catalítica Número de *turn over* o frecuencia (TOF)= $\text{N}^\circ \text{moléc. de Sustrato convertidas} / (\text{moléc. de Enzima} \cdot \text{unidad tiempo})$



La actividad de dos enzimas es comparable si se encuentran en iguales condiciones operacionales,

TOF enzimas=100-1000 s^{-1}
TOF químicos=1-100 s^{-1}

CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

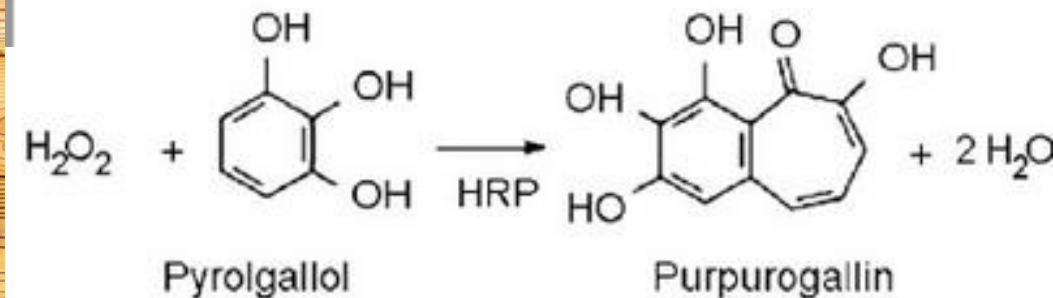
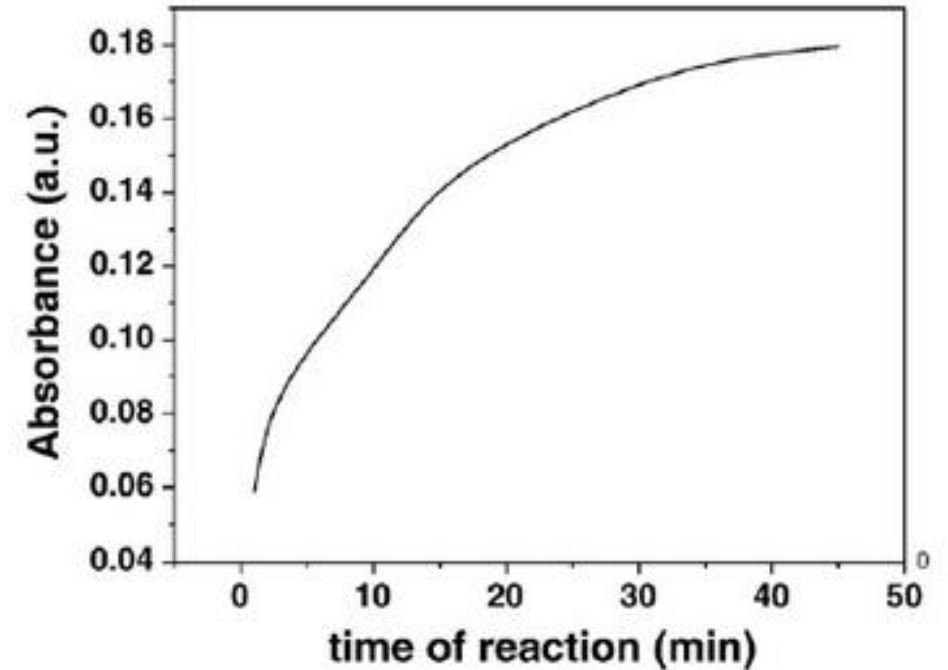
Actividad 330 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ sustrato



P6782 **Peroxidase horseradish**
Type VI-A ~1000 units/mg solid (using ABTS) 250-
330 units/mg solid (using pyrogallol) essentially salt-free,
lyophilized powder

Synonyms	Horseradish peroxidase
	Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase
CAS Number	9003-99-0
Enzyme Commission	1.11.1.7
EG/EC Number	2326686
MDL number	MFC00071339

Description



CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. MEDICIÓN ACTIVIDAD

- **UV/Vis., Fluorescencia:** Liberación o consumo de un cromóforo o fluoróforo
- **Volumetría:** liberación de gases o productos con propiedades ácido-base
- **Calorimetría:** mide el calor de una reacción química
- **Cromatografía**

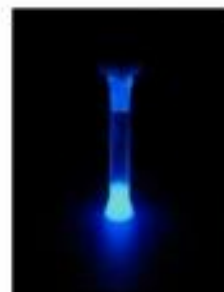
CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. MEDICIÓN ACTIVIDAD. Ejemplos



Quimioluminiscencia

- Medición de la luz emitida por una reacción enzimática.



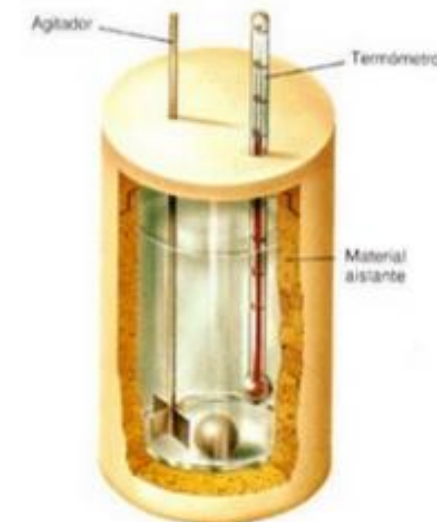
Emisión de luz confirma la actividad de la enzima que cataliza la reacción

Luciferasa y ATP + Luciferina = Emisión de Luz

Método calorimétrico

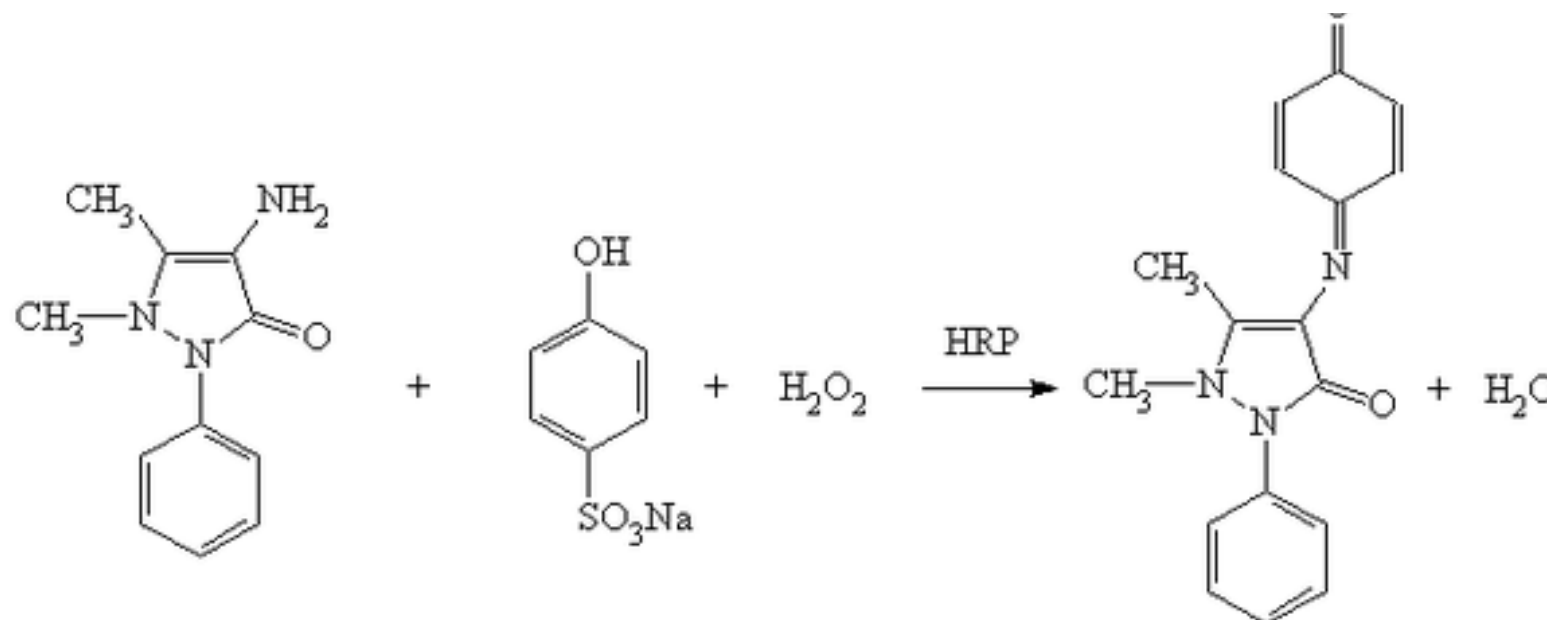
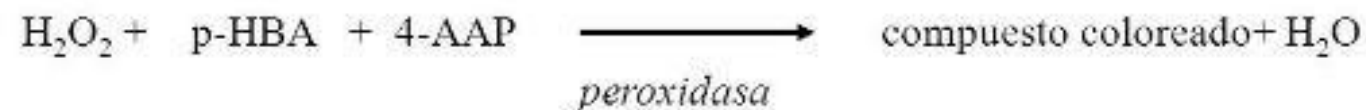
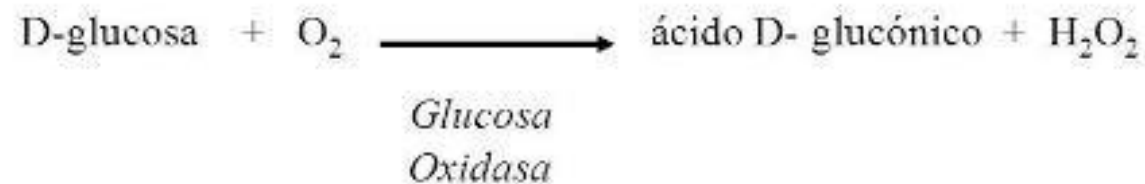
Medición del calor liberado o absorbido por las reacciones químicas.

El calorímetro requiere de poca (E) y (S)



CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. MEDICIÓN ACTIVIDAD. Ejemplos *kit* comercial de glucosa



Detección por
absorbancia a
505 nm

CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. ACTIVIDAD.



Los datos de actividad no tienen sentido sin una especificación de las condiciones de medición

- Concentración de sustrato
- pH
- Temperatura
- Tipo de solventes
- Metodología de medición
- Concentración del biocatalizador

CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

1. ACTIVIDAD



P6782 **Peroxidase horseradish**
Type VI-A ~1000 units/mg solid (using ABTS) 250-330 units/mg solid (using pyrogallol) essentially salt-free, lyophilized powder

Synonyms	Horseradish peroxidase
	Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase
CAS Number	9003-99-0
Enzyme Commission	1.11.1.7
EG/EC Number	2326686
MDL number	MFC00071339

Description

Analysis Note This product is assayed using ABTS for easy comparison to other suppliers' unit: approx. 1,000 units per mg solid

Linkage Similar to P8375

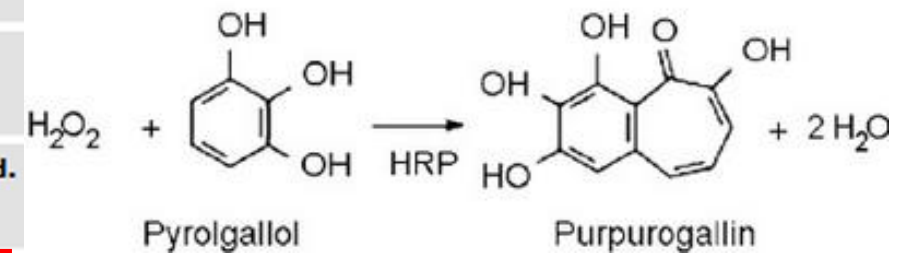
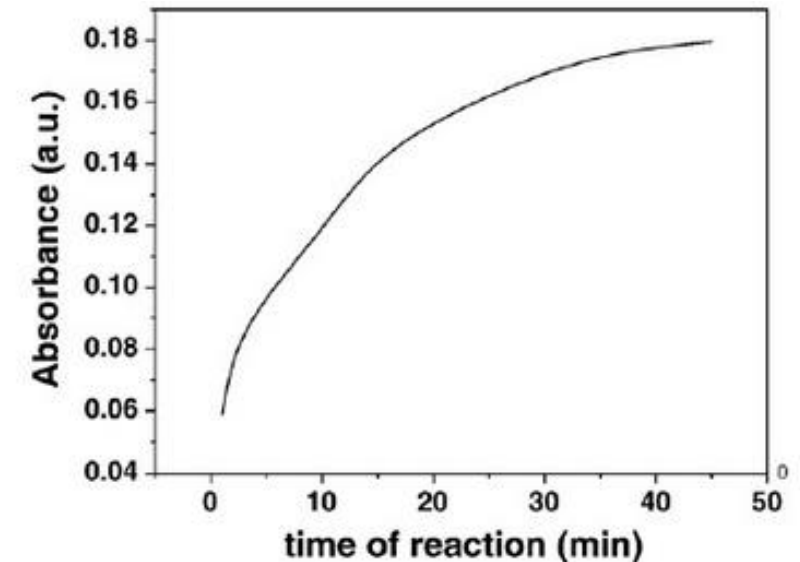
Packaging Packaged in mg solid

Unit Definition One ABTS unit will oxidize 1 μ mole of ABTS per minute at 25°C at pH 5.0

Analysis Note Using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) tablets (Prod. No. A 9941) as substrate, approx. four times the activity is observed.

Analysis Note The RZ (Reinheitzzahl) is the absorbance ratio A_{303}/A_{275} determined at 0.5-1.0 mg/ml in deionized water. It is a measure of hemin content, not enzymatic activity. ~~Even preparations with high RZ may have low enzymatic activity.~~

Unit Definition One unit will form 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol in 20 sec at pH 6.0 at 20°C, unless otherwise indicated in the listing. This purpurogallin (20 sec) unit is equivalent to approx. 18 μ M units per min at 25°C.



La **ESTABILIDAD** de un catalizador depende de las condiciones:

Entorno del biocatalizador y de operación

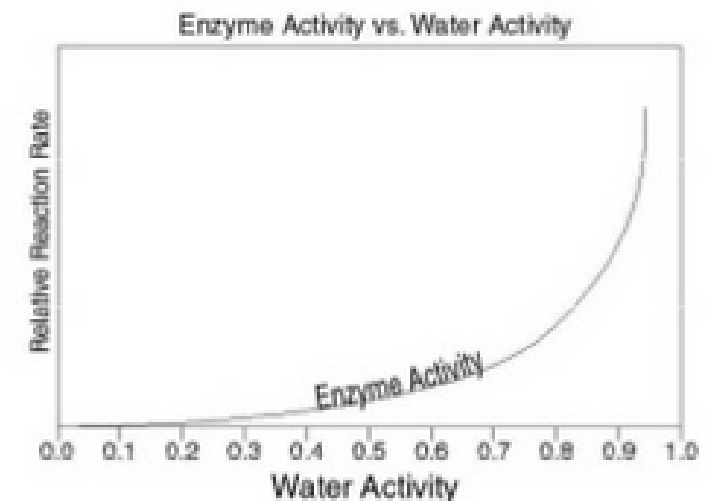
- Temperatura, pH
- concentración de sustratos y otros solutos
- Presencia de inhibidores

- Velocidad agitación, reciclo
- Tipo de soporte, flujo (enzimas inmovilizadas)
- Solventes

Propias de la enzima

- Origen
- Actividad de agua
- Almacenamiento, aislamiento y purificación

La inmovilización o la encapsulación de enzimas puede aumentar la estabilidad

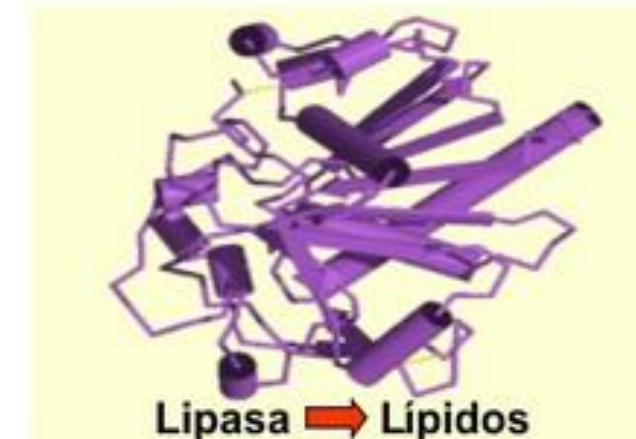
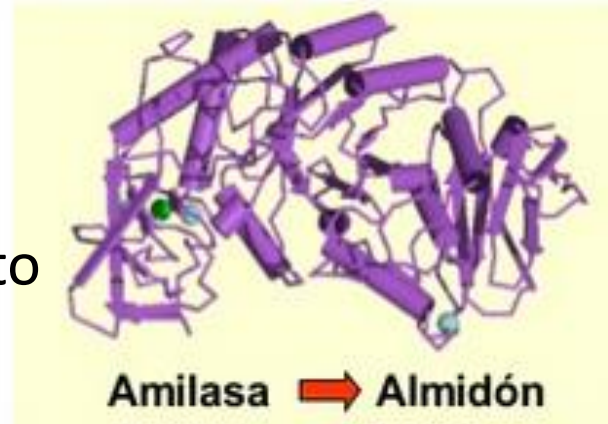


CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

3. SELECTIVIDAD

Las enzimas son selectivas y así determinan los procesos que cataliza.

Forma tridimensional única dándole especificidad y un mecanismo de reconocimiento de sustrato en el centro activo

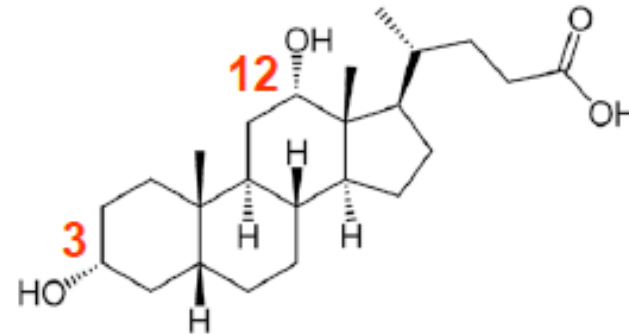


Tipos de selectividad

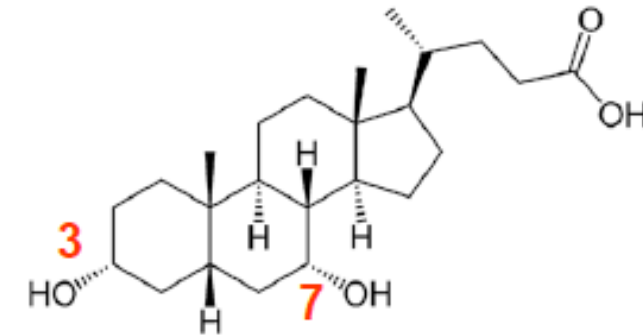
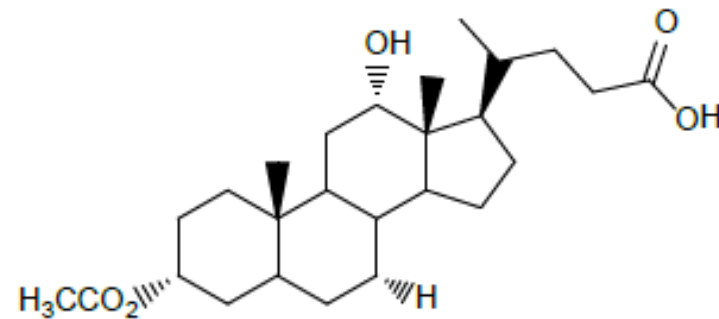
- Quimioselectividad: selectividad para grupos funcionales.
- Regioselectividad: discriminar grupos funcionales idénticos en distintas posiciones del sustrato.
- Estereoselectividad: Capacidad de discriminar grupos funcionales por su configuración espacial (resolución racémica) o crear un nuevo centro asimétrico.



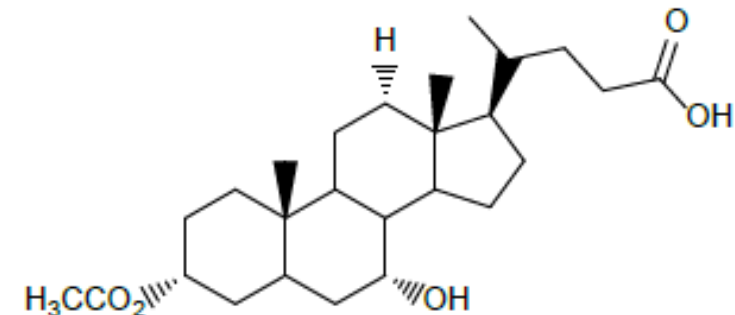
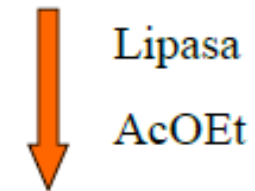
Regioselectividad



Ácido desoxicólico

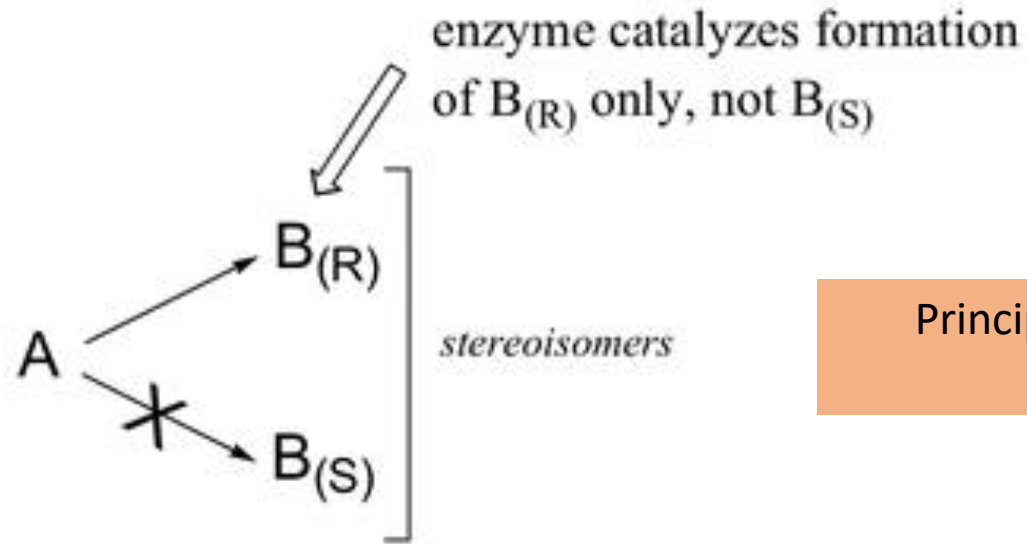


Ácido quenodesoxicólico

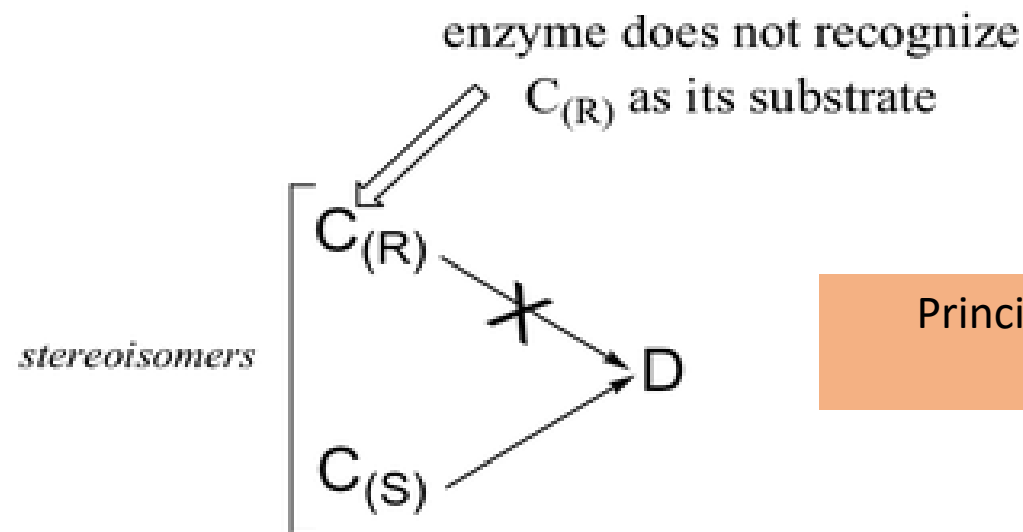


Acetilación
enzimática de los
ácidos
quenodesoxicólico
y desoxicólico

Estereoselectividad

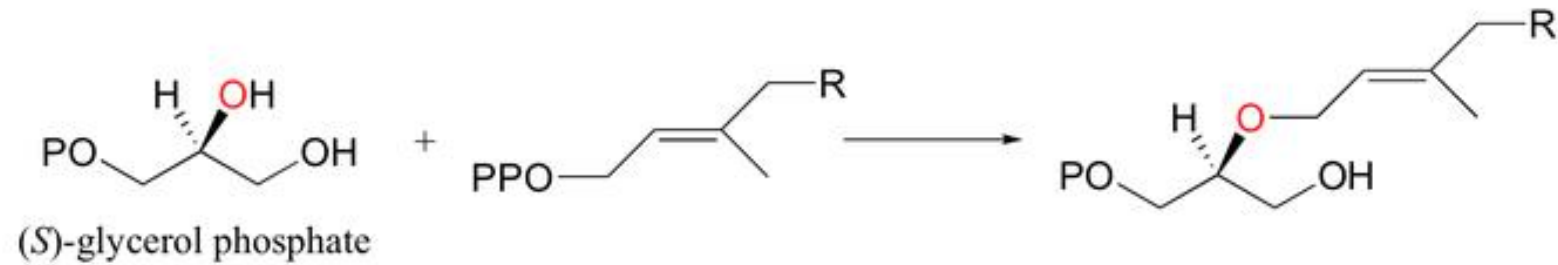


Principal diferencia con las reacciones
químicas

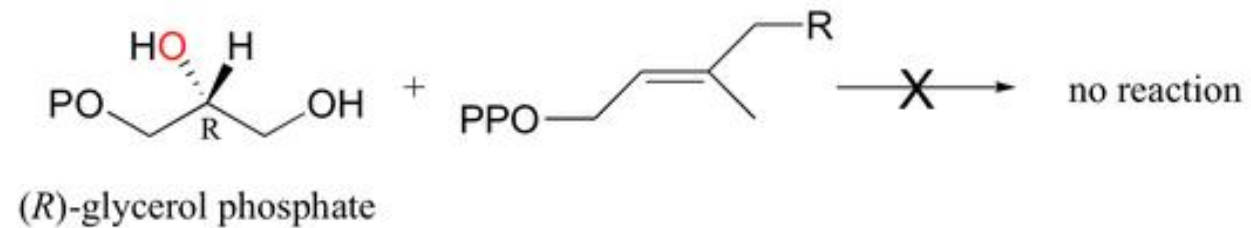


Principal diferencia con las reacciones
químicas

Estereoselectividad

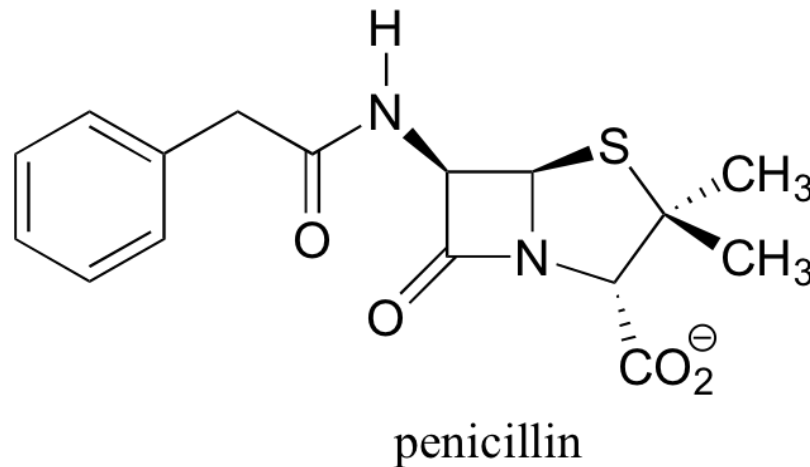


Alquilación del
Glicerol fosfato



Estereoselectividad

Penicilina tiene 3 centros quirales y 8 posibles estereoisómeros, la síntesis con el Hongo *Penicillium sp.*, da por resultado un solo isómero.



VENTAJAS

- Transformaciones altamente selectivas y específicas.
- Condiciones suaves y más seguras
- Menor número de pasos de reacción
- Reciclado del biocatalizador
- Ahorro energético
- Amigables con el medio ambiente
- Productos con alto valor agregado
- Poder denominar al producto obtenido “de origen natural”

DESVENTAJAS

- No aplicables a todos los sustratos
- Requieren condiciones controladas
- Purificaciones más costosas
- Biocatalizadores específicos son más costosos
- Trabajar con material biológico



Biocatalizadores y química orgánica

- En los últimos años los biocatalizadores (células o enzimas) se ha incrementado su utilización en QUÍMICA ORGÁNICA por
 - Amigables con el medio ambiente
 - Condiciones de trabajo a presión y temperatura ambientes.
- Enzimas no tóxicas
Fuentes renovables
Selectividad alta
- Poder denominar al producto obtenido “de origen natural”

Enzimas

Para procesos de síntesis simples, que requieran uno o dos pasos de reacción. Utilizadas comúnmente en reacciones hidrolíticas, isomerizaciones o en procesos redox que no requieran cofactores

VENTAJAS

- ✓ No requieren un instrumental complejo
- ✓ Condiciones de estabilidad mayores: pH, T, estables en solventes orgánicos
- ✓ Mayor productividad
- ✓ Mayor selectividad

DESVENTAJAS

- ✓ Mayores costos
- ✓ No aplicables en transformaciones complejas
- ✓ Inhibidas
- ✓ Regeneración de cofactores

Células

Para fermentaciones

- Múltiples pasos
- Complejos enzimáticos
- Condiciones de crecimiento no presentan requerimientos complejos y la velocidad es rápida

VENTAJAS

- ✓ Transformación compleja, alto valor agregado
- ✓ Crecimiento: un organismo procrea otros organismos
- ✓ No aislamiento del catalizador (enzima)
- ✓ Transformaciones: el organismo utiliza sus propios cofactores y rutas metabólicas para su regeneración

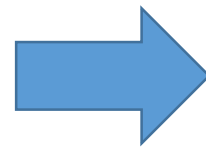
DESVENTAJAS

- ✓ Múltiples enzimas: más delicado controlar selectividad • T, pH, estado de crecimiento, nutrientes, compuestos citotóxicos
- ✓ Organismo vivo: poco estable
- ✓ Toxicidad por alta concentración de sustratos o ciertos medios de reacción
- ✓ Posible presencia de varios metabolitos: purificación más trabajosa
- ✓ Usualmente relación biomasa/producto grande
- ✓ Procesos de transporte desde y hacia el citosol. El producto puede no ser transportado fuera de la célula
- ✓ Volúmenes de reacción relativamente grandes

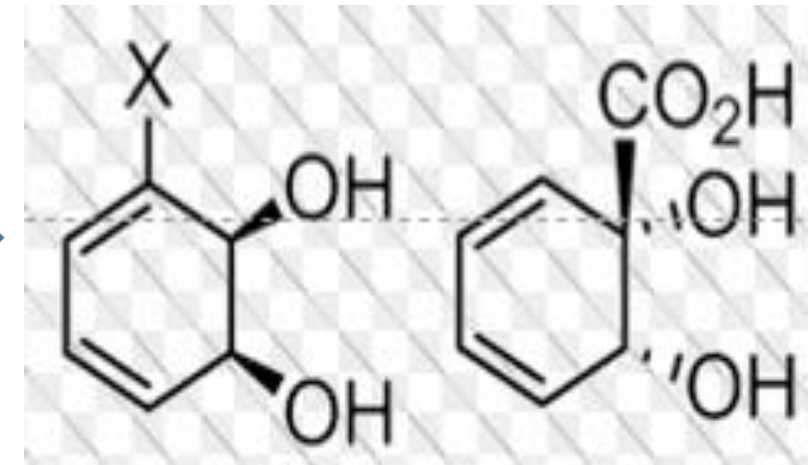
Cultivos celulares para producir ciclohexanodiolos



Crecimiento en cultivos de alta densidad en bioreactores.



Expresión de genes que codifican para dioxigenasas en *E.coli*.



Producción de *cis*-ciclohexadienodiolos a escala preparativa.