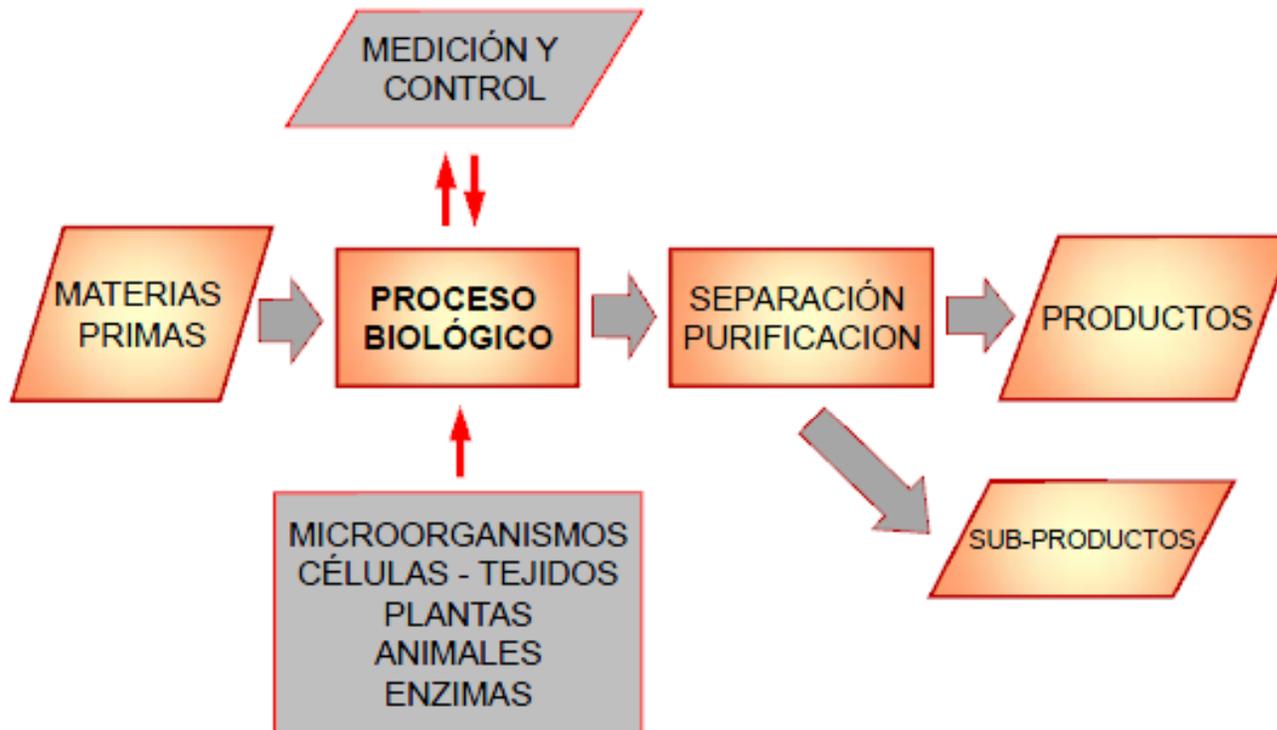


CONCEPTOS Y TECNICAS DE BIOTECNOLOGÍA I

Etapas en un bioproceso típico



Cambio de escala

Microorganismos utilizados en biotecnología

Aislamiento de microorganismos



Procedimientos de *screening*



Mejoramiento de cepas-Optimización de condiciones



Producción a pequeña escala



Producción a gran escala. Fermentadores

Características ventajosas de los microorganismos usados en bioprocesos

- . Degradación de polímeros heterogéneos hasta azúcares simples**
- . Fermentación simultánea de una mezcla de azúcares**
- . Tolerancia a los inhibidores producidos durante la hidrólisis**
- . Tolerancia a la concentración creciente del producto final y a las condiciones del proceso de fermentación**

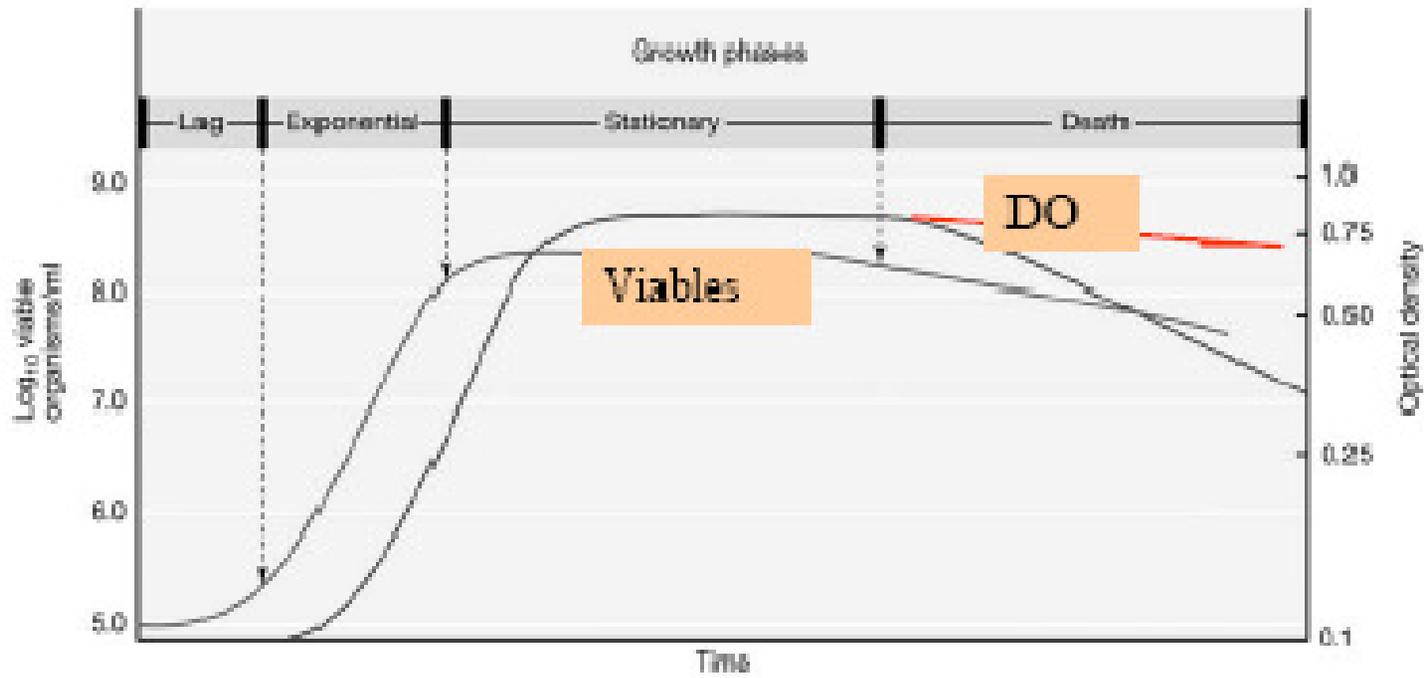
Algunos Procesos Microbianos Industriales	
Producto	Microorganismo(s) utilizado(s)
Productos industriales	
Etanol (de glucosa)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Etanol (de lactosa)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Acetona y butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2-3 butanediol	<i>Enterobacter, Serratia</i>
enzimas	<i>Bacillus, Aspergillus, Mucor, Trichoderma</i>
Aditivos de alimentos	
Aminoácidos (ej: lisina)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Ácidos orgánicos (ej: citrato)	<i>Aspergillus niger</i>
nucleótidos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
vitaminas	<i>Ashbya, Eremothecium</i>
Polisacáridos (ej: xantano)	<i>Xanthomonas</i>
Productos medicinales	
antibióticos	<i>Penicilium, Streptomyces, Bacillus</i>
alcaloides	<i>Claviceps purpurea</i>
Transformaciones de esteroides	<i>Rhizopus, Arthrobacter</i>
Insulina, hormona de crecimiento, interferon	<i>E. coli, Saccharomyces</i> y otros (recombinantes)
Combustibles	
Hidrógeno	Bacterias fotosintéticas
metano	<i>Methanobacterium</i>
Etanol	<i>Zymomonas, Thermoanaerobacter</i>
Bioplásticos	
polihidroxicanoatos	<i>Ralstonia eutropha, E.coli</i> recombinante

Del libro
Microbiology
 de Prescott,
 Harley y Klein

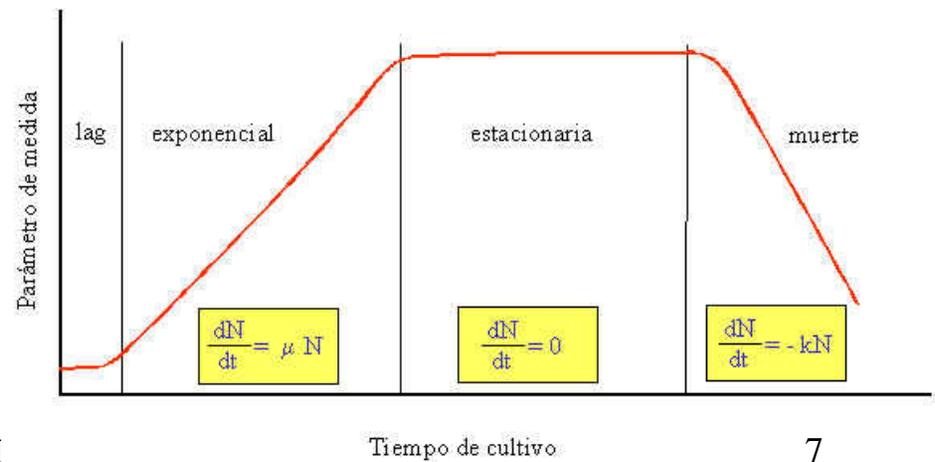
BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Tres categorías de productos microbianos de importancia industrial

- Metabolitos primarios
- Metabolitos secundarios
- Enzimas



Crecimiento bacteriano



Metabolitos primarios

Producidos durante el crecimiento normal del microorganismo, parte del metabolismo. Pueden ser intermediarios o productos finales de vías metabólicas esenciales para el crecimiento.

Ej: aa, nucleótidos, azúcares, productos de fermentación, exoenzimas.

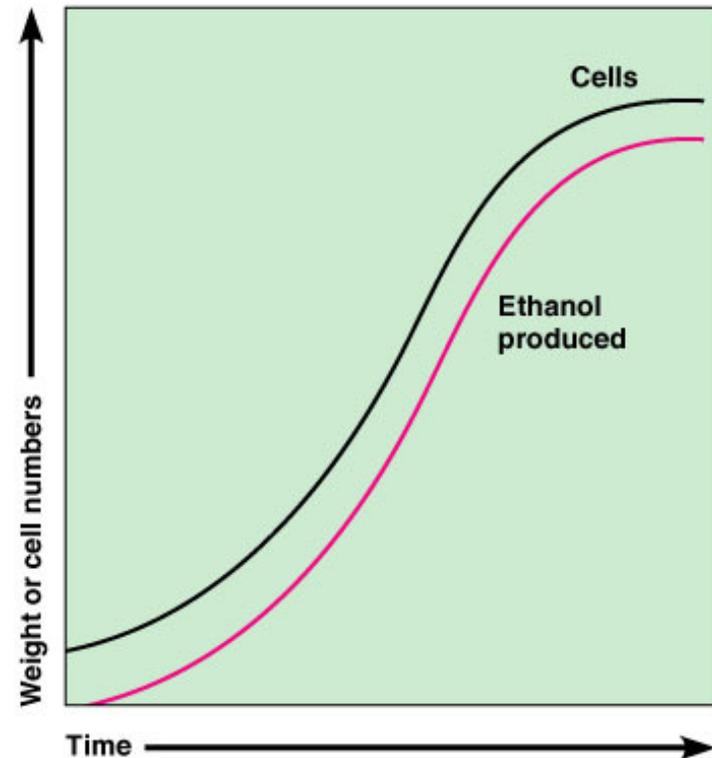
Normalmente se producen en gran abundancia en la fase logarítmica.

Etanol

Acetobacter
Gluconobacter



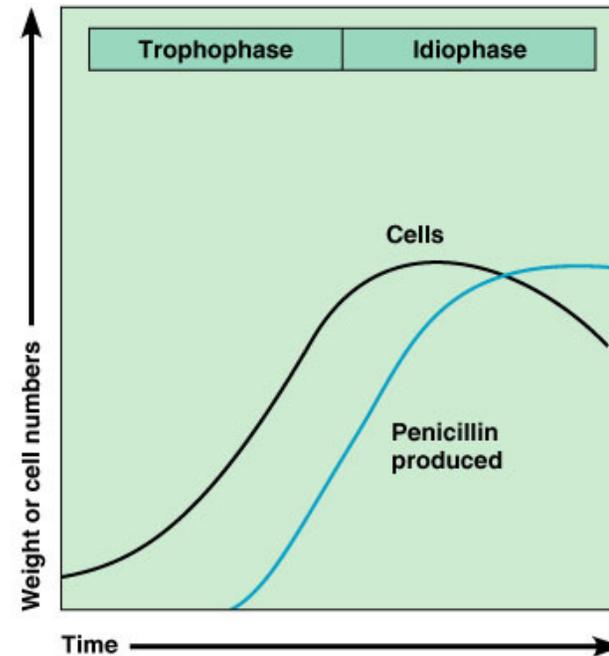
Acido acético



Metabolitos secundarios

Producidos luego del crecimiento normal del microorganismo, se acumulan cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento (fase estacionaria). Compuestos no esenciales para el crecimiento y su rol en muchos casos es desconocido.

Ej: antibióticos



Metabolitos primarios

Ácidos y solventes

Etanol

Ácido cítrico

Principales ácidos orgánicos y solventes producidos por microorganismos

1. Acido cítrico
2. Acido acético
3. Acido láctico
4. Acido succínico
5. Acido propiónico y butírico
6. Etanol
7. Butanol
8. Acetona
9. 1,2 y 1,3 propanodiol
10. 2,3 butanodiol

Metabolitos primarios-ácidos y solventes

Etanol

**Conocido como producto derivado de microorganismos
Levaduras desde azúcares Pasteur 1822-1895**

Investigaciones en los últimos 20 años bacterias capaces de producción desde distintos sustratos con alto rendimiento.

**Enzimas claves: Piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa
Etanol or etil alcohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, mol. wt. 46.07) incoloro, inflamable.**

Usos

Bebidas

Medicinal o Químico

Combustible

Bioetanol

**Al 95% puede ser usado como combustible
Etanol anhidro si se mezcla con gasolina**

Producción de etanol

Fermentación

Química etileno

Incremento del precio del petróleo
Agotamiento de las reservas

Fermentación



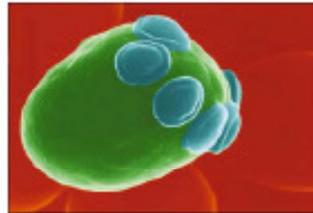
Programas gubernamentales de búsqueda de nuevas fuentes de energía

1975

En Brasil: 30 años de experiencia
Más de 15 mil millones de L/año (41 millones litros/día)



Azúcar de Caña + Levaduras → Etanol



Saccharomyces



1980

En EUA: 20 años de experiencia
2006: Más de 41 millones litros/día (más que Brasil)



Almidón de Maíz + Amilasas → Glucosa
Glucosa + Levaduras → Etanol



Primera generación de bioetanol

Desarrollo de la producción de alcohol

Saccharomyces spp.

Nuevas cepas

{ tolerar etanol
fermentar azúcares rápidamente
capaces de flocular

Estrategias

Fermentaciones continuas con reciclado de levadura

Ídem con vacío para evaporar etanol

Levaduras inmovilizadas

Uso de bacterias *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis

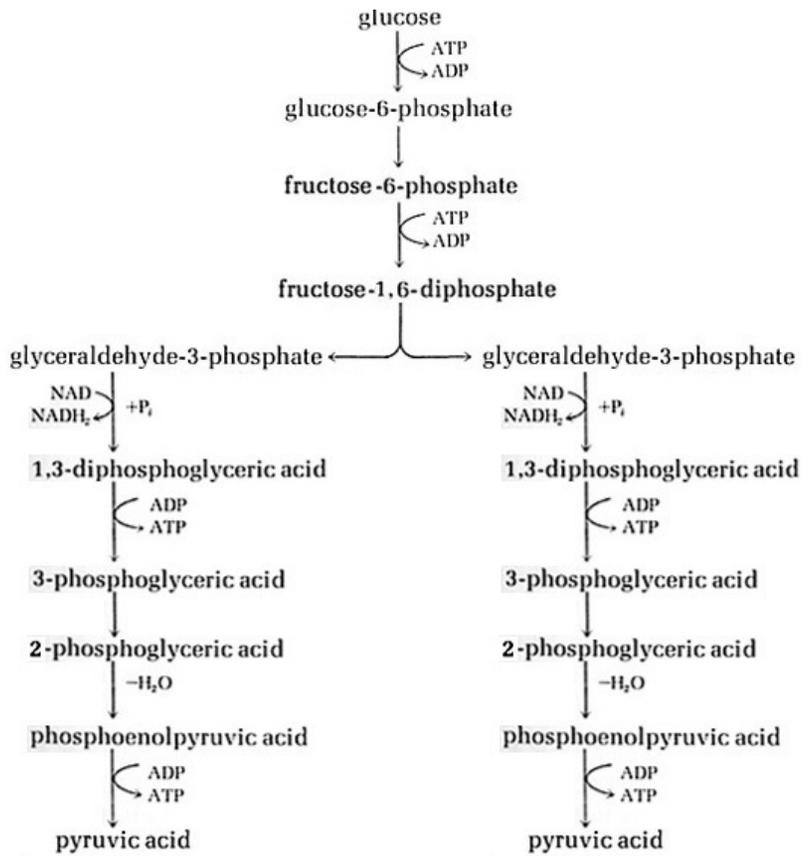
- **Bacilo gram negativo aerobio facultativo (algunos obligadamente anaerobios otros toleran O₂)**
- **α-Proteobacteria**
- **Metabolismo fermentativo obligado con producción de etanol. Algunos fermentan sacarosa (2 moles de etanol y 2 de CO₂ por mol de glucosa).**
- **Etanol 10-12%**
- **Genoma completo 2005-2,06 Mb**
- **Vive sobre plantas incluido el cactus Maguey que fermentado da bebida mexicana pulque**
- **Desde 1970 1400 trabajos publicados**



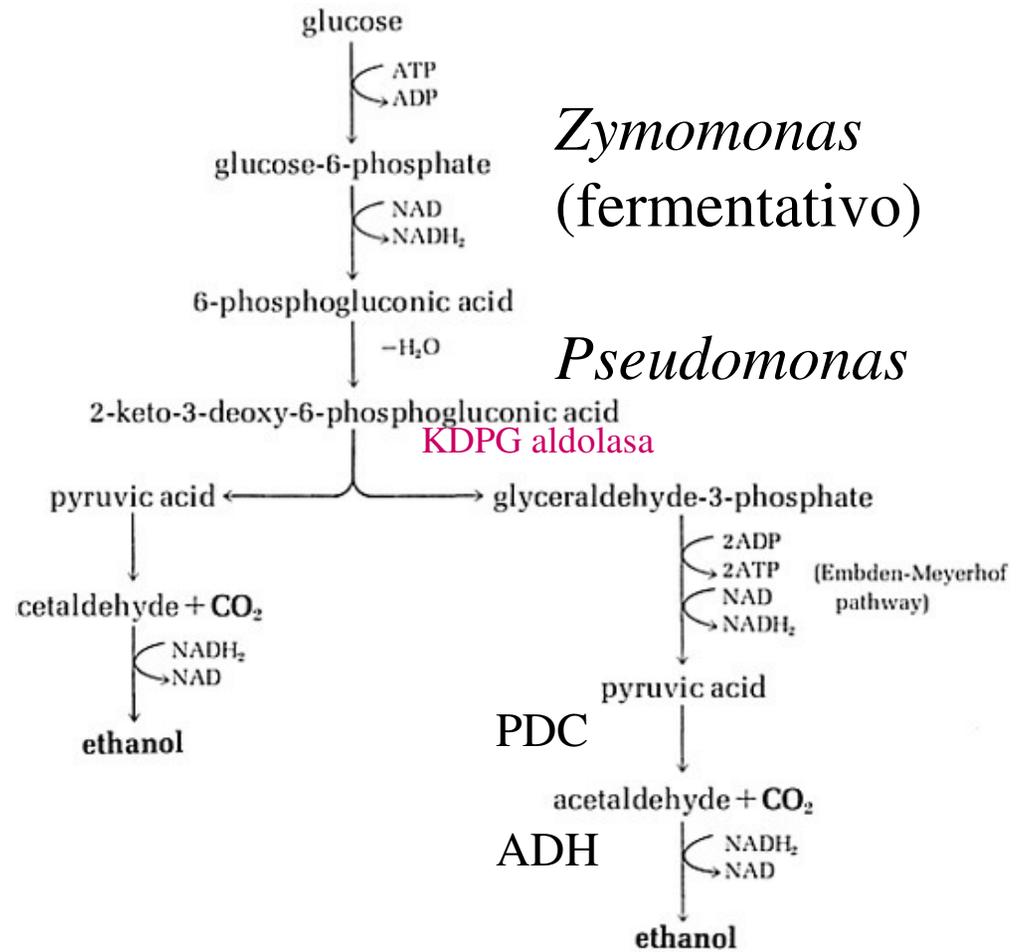
EXTRACTING THE FASQUETUSQUE—THE CURB OF THE FIRM.



Emden-Meyerhof



Entner-Doudoroff



Zymomonas
(fermentativo)

Pseudomonas

Productos de fermentación *Zymomonas* vs. Levaduras

Pathway	ETANOL	Lactic Acid	CO ₂	ATP
Embden-Meyerhof <i>Saccharomyces</i>	2	0	2	2
Entner-Doudoroff <i>Zymomonas</i>	2	0	2	1

Requerimientos para un buen fermentador industrial

- 1-Amplio rango de sustratos
- 2-Tolerancia al etanol
- 3-Alta producción de etanol
- 4-Bajos niveles de subproductos
- 5-Osmotolerancia
- 6-Termotolerancia
- 7-Facilidad para la floculación y Reciclado

S.cerevisiae

- Limitado
Regular 12%
Buena (46-48.5%)
Buena
Regular
Regular (35°)
Buena

Zymomonas

- Limitado
Mayor 16%
Parecida
Peor
Mayor 40%
Mayor (38-40°C)
¿?

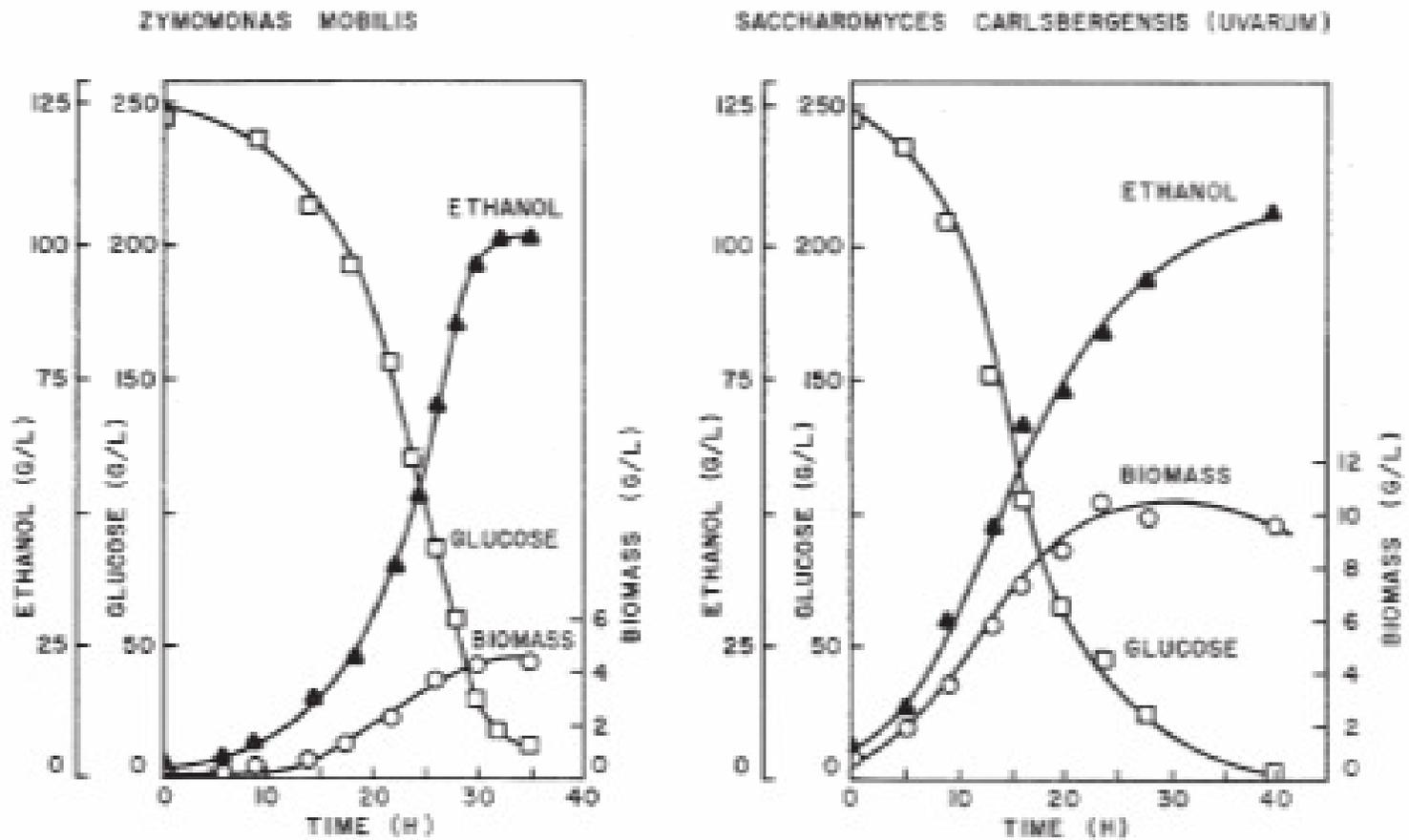
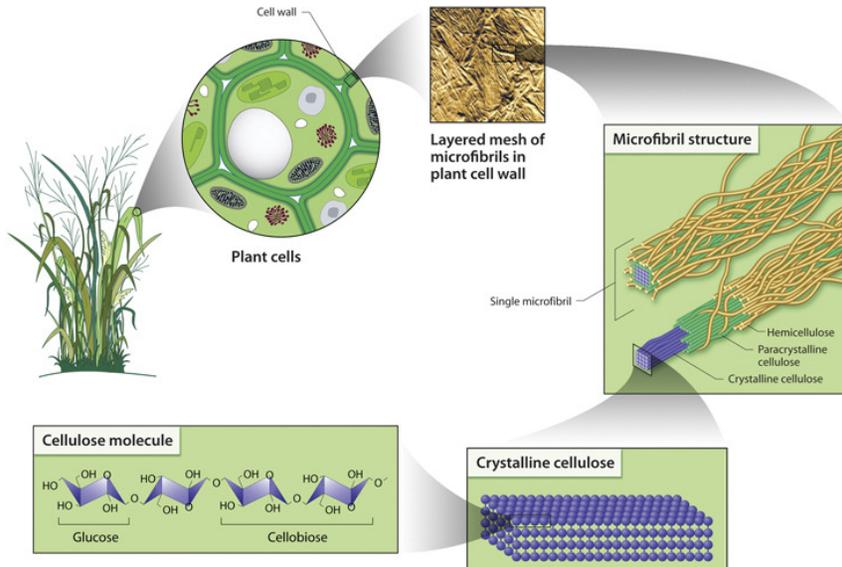


Fig. 30.5 Alcohol Production by Yeast and *Zymomonas mobilis*

BIOETANOL



Estrategias: cambio de materias primas

Segunda generación de bioetanol

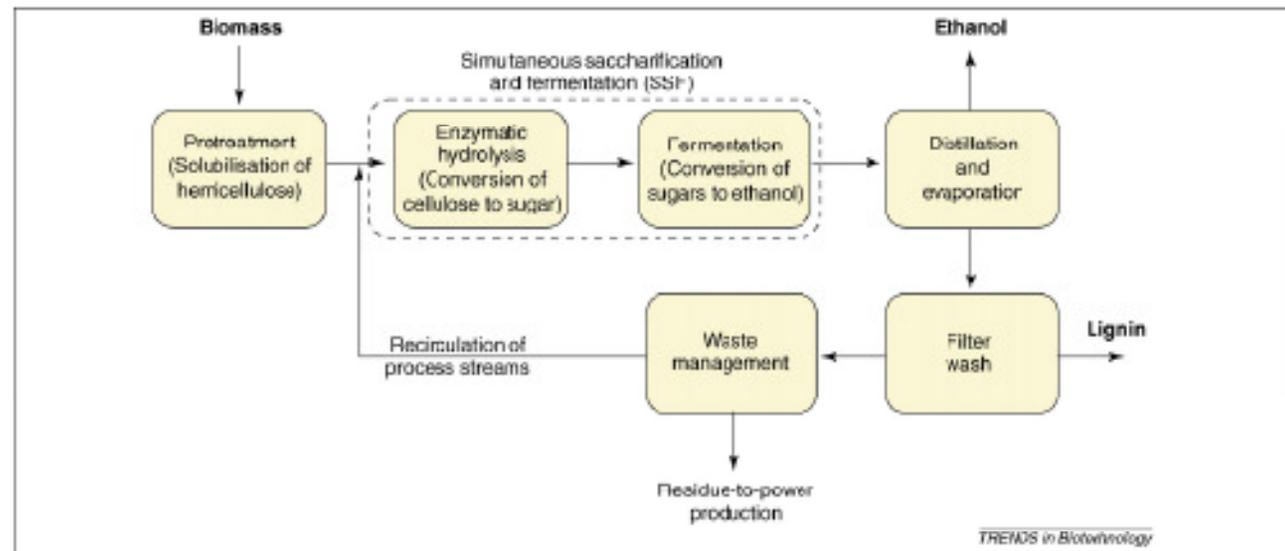
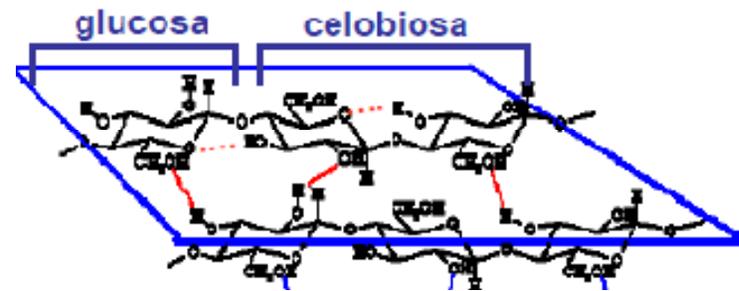
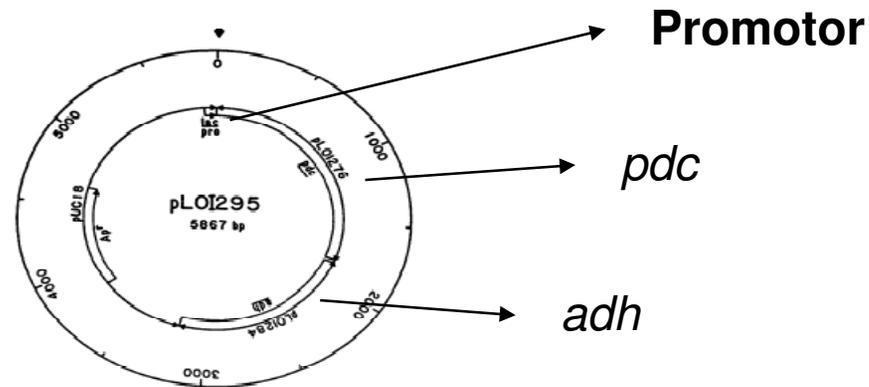


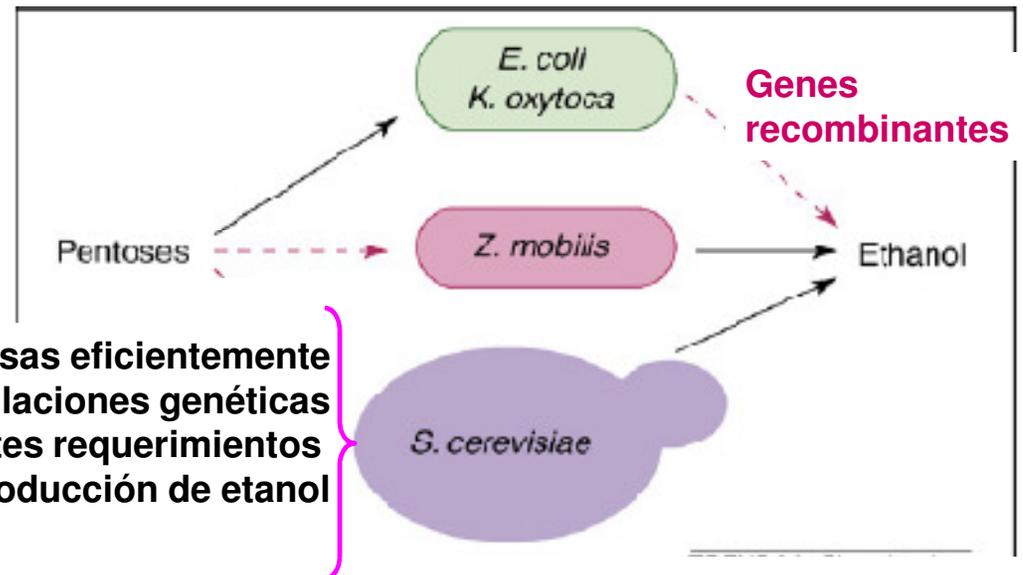
Figure 1. Schematic flowchart for the conversion of biomass to ethanol.

MANIPULACIONES GENÉTICAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Plásmidos



Cromosoma

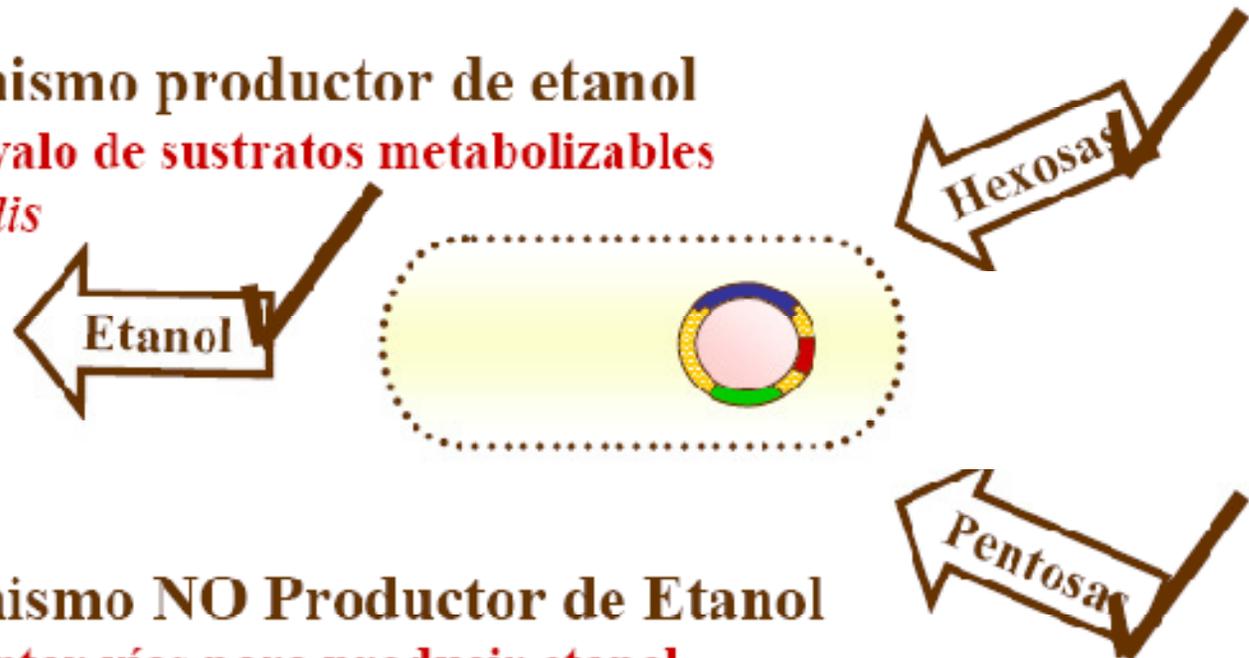
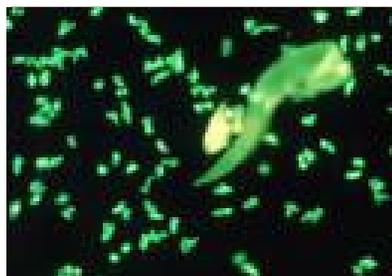


No pueden usar pentosas eficientemente
Menos susceptible a manipulaciones genéticas
Diferentes requerimientos de O₂ durante crecimiento y producción de etanol

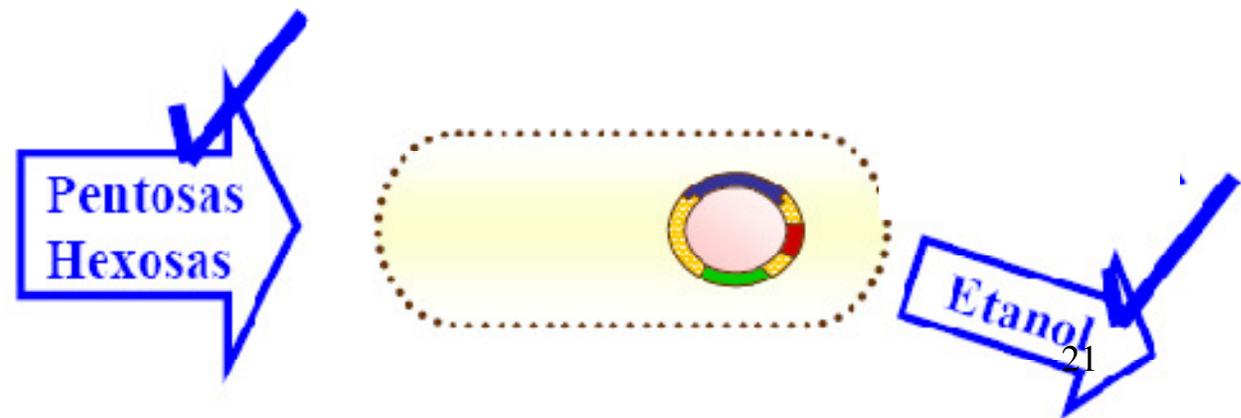
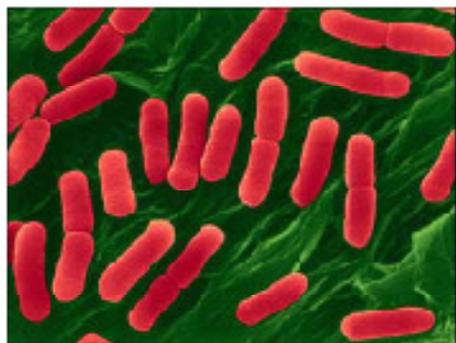
Dos estrategias: Pentosas → Etanol

Ingeniería de Vías Metabólicas

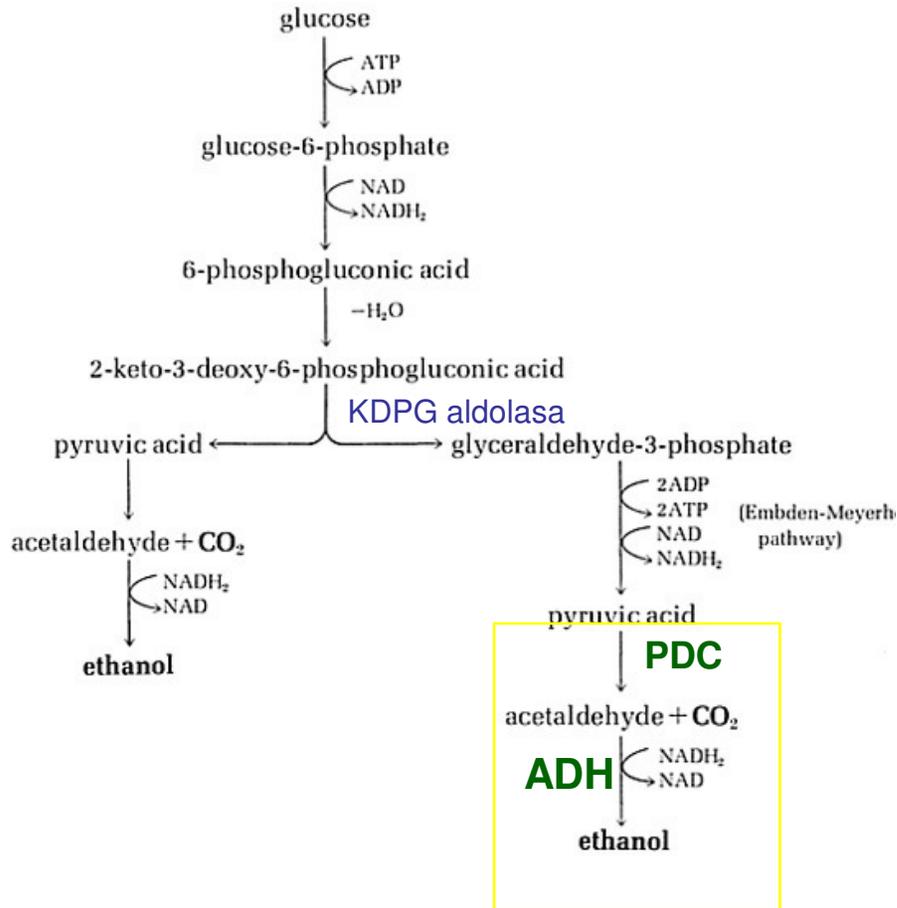
A: Microorganismo productor de etanol
Extender el intervalo de sustratos metabolizables
Zymomonas mobilis



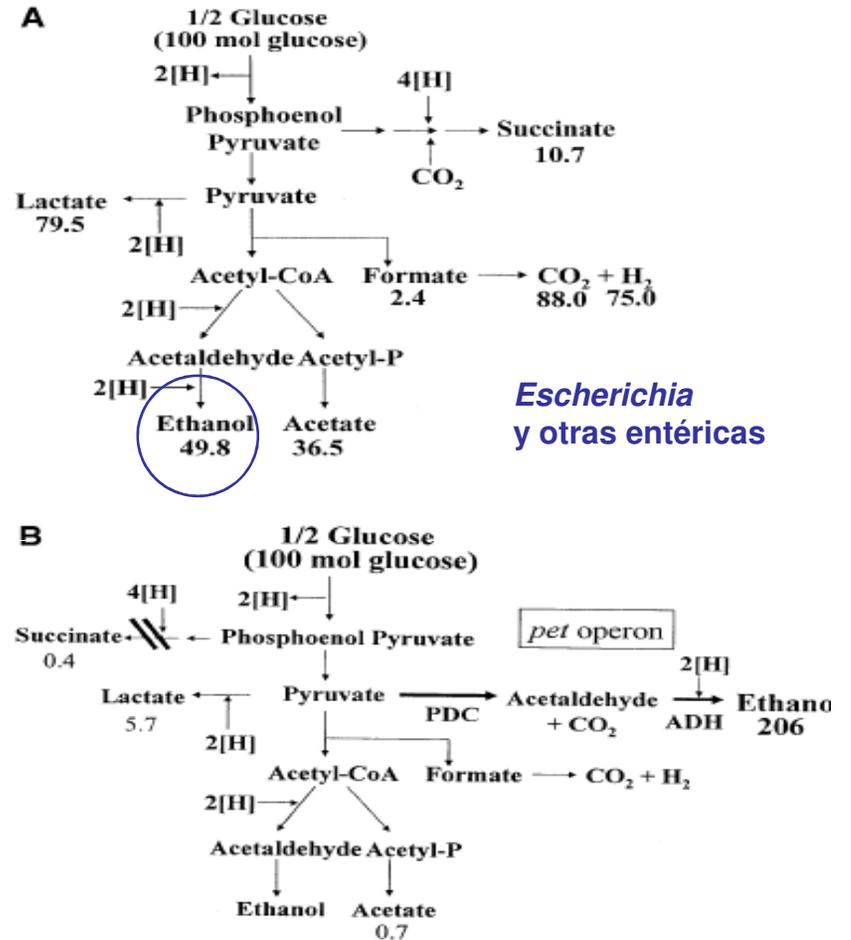
B: Microorganismo NO Productor de Etanol
Complementar vías para producir etanol
Escherichia coli



Entner-Doudoroff



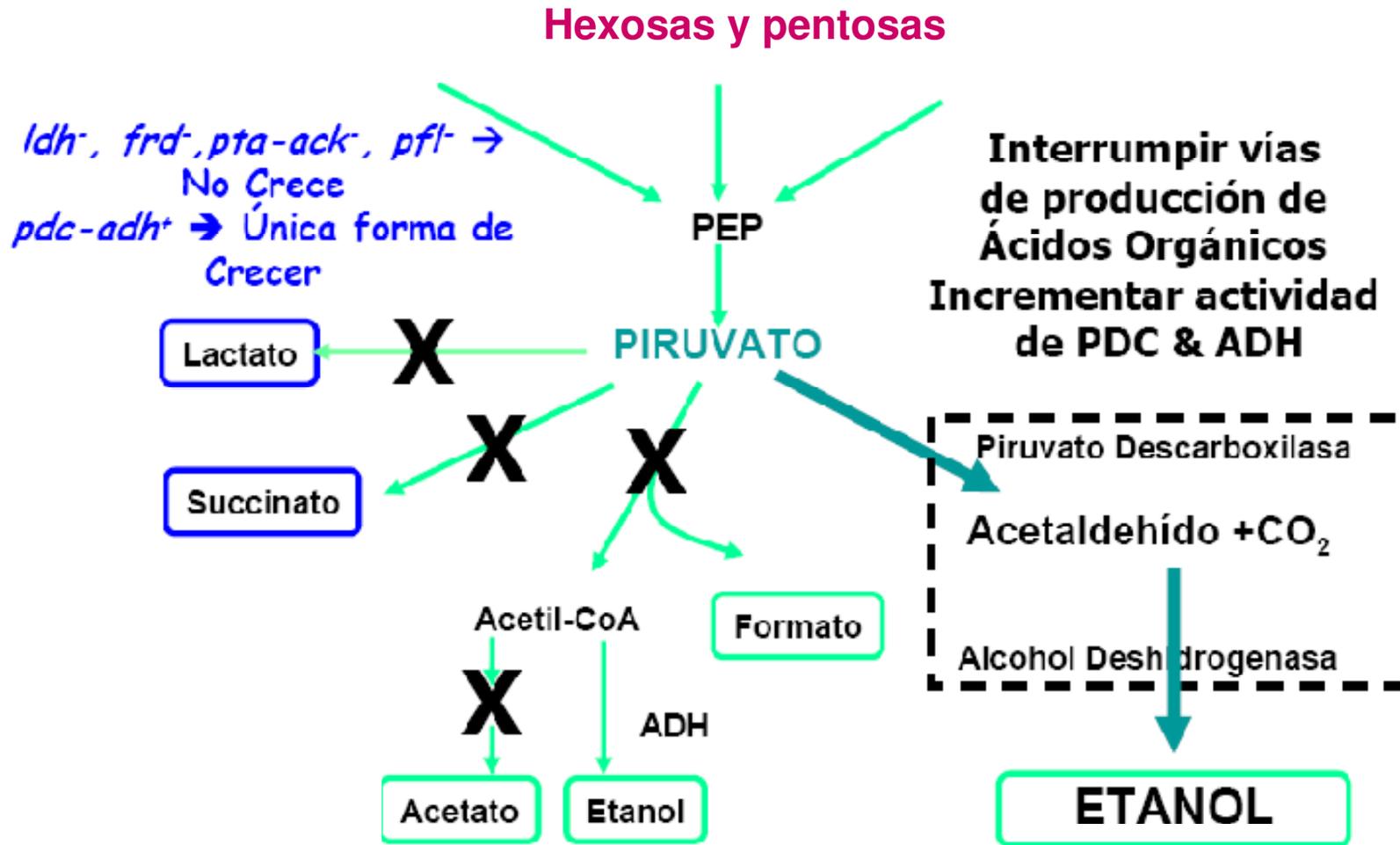
pet operon



Escherichia
y otras entéricas

Recombinantes *E. coli* con operon para producción de etanol de *Zymomonas*

E. coli etanológica



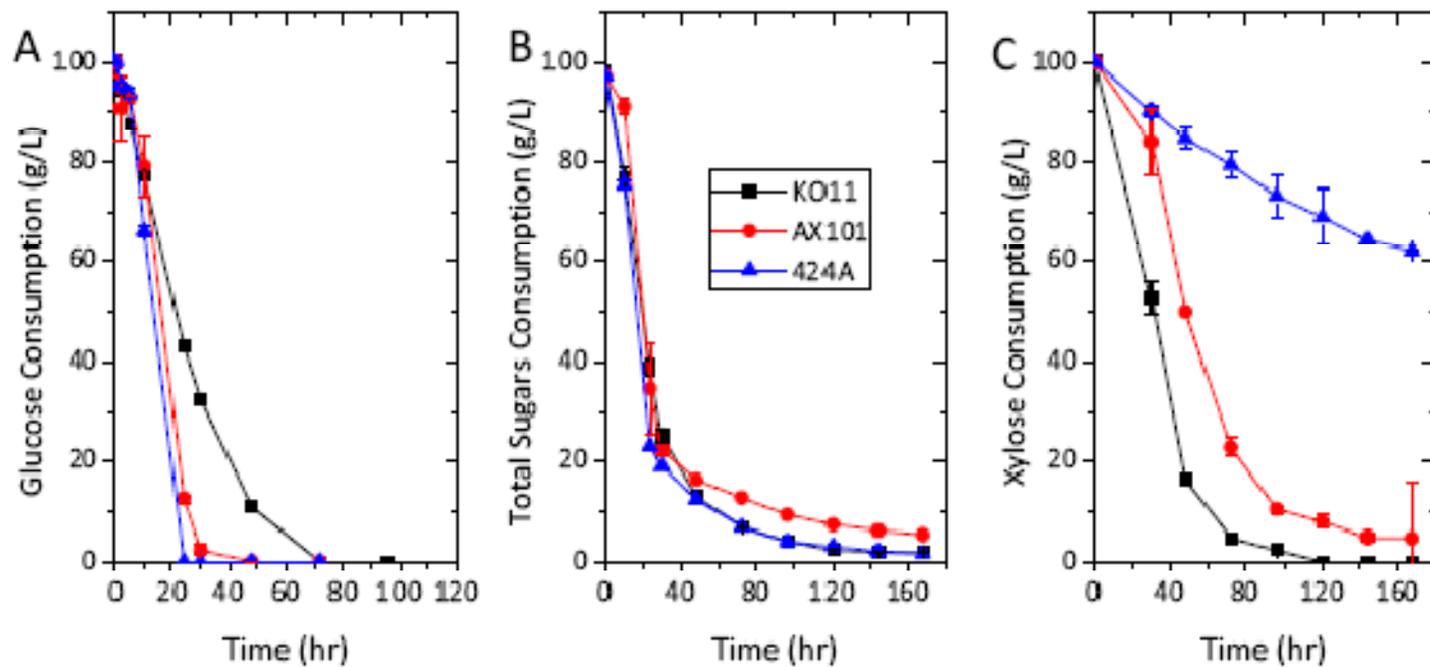


Figure 1 Fermentation using *Escherichia coli* KO11, *Zymomonas mobilis mobilis* AX101 and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) in 2% w/v corn steep liquor with (A) glucose as sole carbon source, (B) glucose and xylose mixture ratio 7:3 and (C) xylose as sole carbon source. Fermentation was conducted in the fleaker fermentor under largely anaerobic condition and initiated cell density equivalent to 0.5 units OD600 nm. Temperature and pH were controlled at 37°C, 6.8 for KO11 and 30°C, 5.5 for AX101 and 424A(LNH-ST).

Lau et al. *Biotechnology for Biofuels* 2010, 3:11

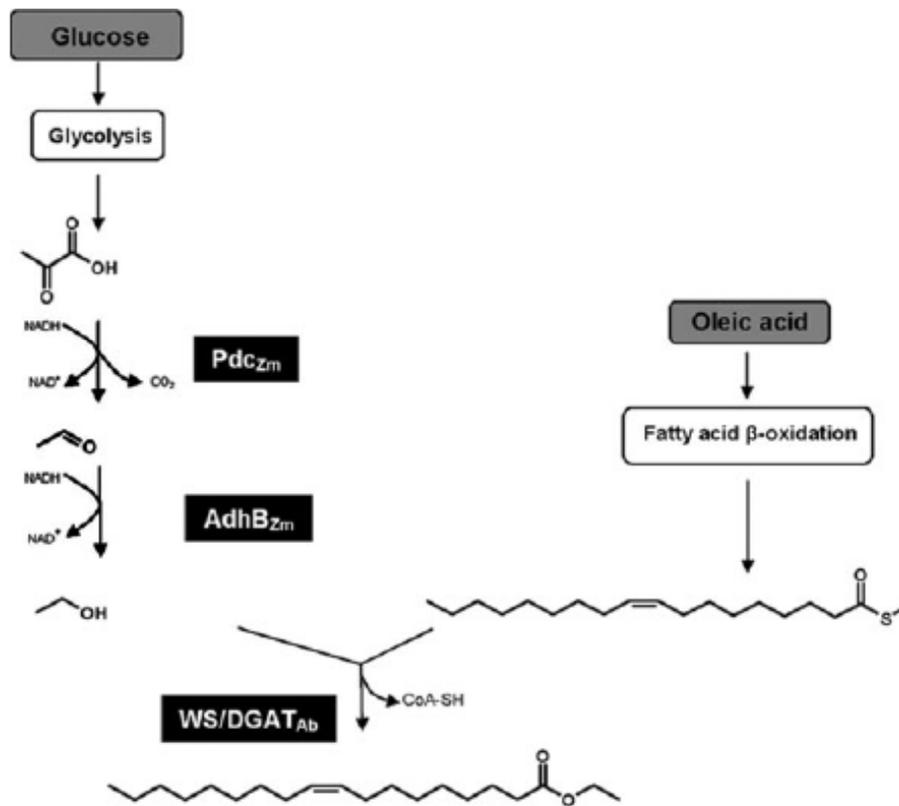
TOLERANCIA AL ETANOL DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS

- . Efecto citotóxico es la razón por la cual se puede usar como desinfectante y preservante. Desventaja en procesos fermentativos
- . Citotoxicidad desde efectos reversibles a muerte celular
- . Efectos: alteraciones en metabolismo de fosfolípidos y de ácidos grasos. Membrana principal blanco
- . Costo en el proceso de fermentación: disminución de tasa de producción a medida que el producto se acumula
- . *E.coli* K011. Puede utilizar compuestos ligno-celulósicos pero no tiene alta tolerancia al etanol.
- . Selección de mutantes. Cambios en ácidos grasos de membrana para tolerar.
- . *Z. mobilis* mas tolerante. Aumento de la expresión de las proteínas de heat shock
- . Bacterias lácticas también tolerantes pero los mecanismos son menos conocidos.
- . Sobreexpresión de proteínas de heat shock GroEL, GroES, DnaK y DnaJ

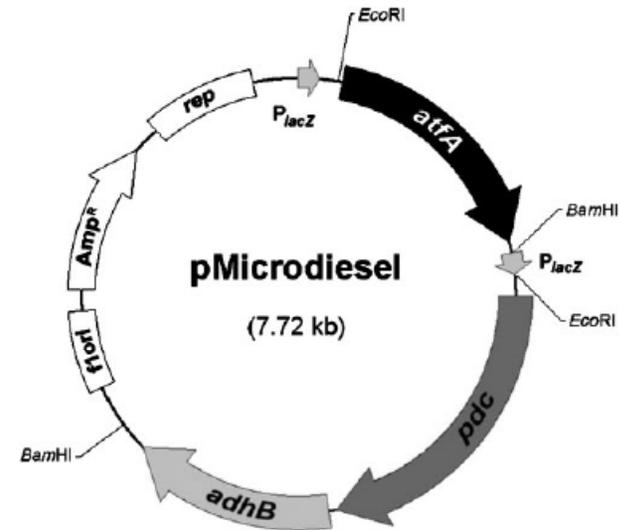


Biodiesel

Microdiesel: *Escherichia coli* *Combinación de formación de etanol y posterior esterificación de etanol con ácidos grasos para dar etil oleate o etil palmitate y etil palmitoleato.*

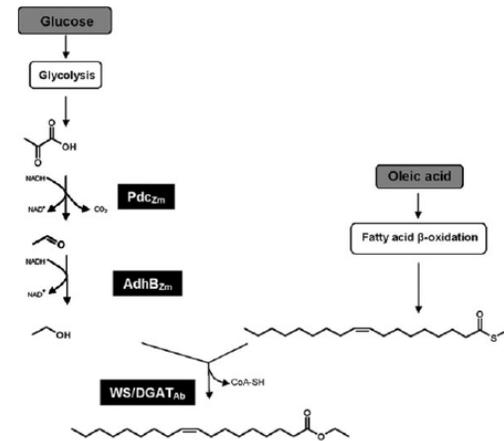


Compuestos equivalentes al biodiesel

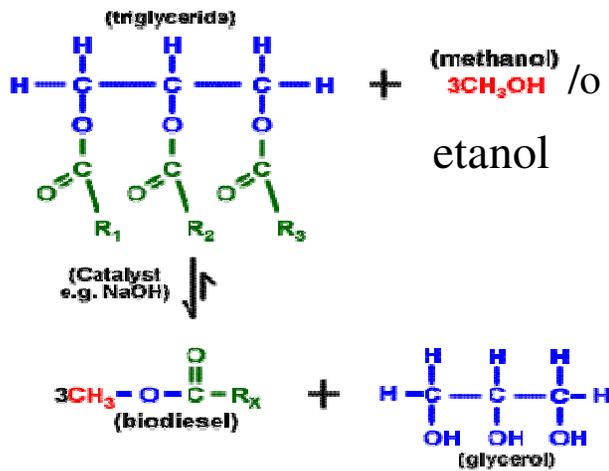


Expresión in *E. coli* of the *Zymomonas mobilis* piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa y aciltransferase de *Acinetobacter baylyi* strain ADP1.

Kalscheuer et al. Microbiology (2006), 152, 2529–2536



Microdiesel



Biodiesel

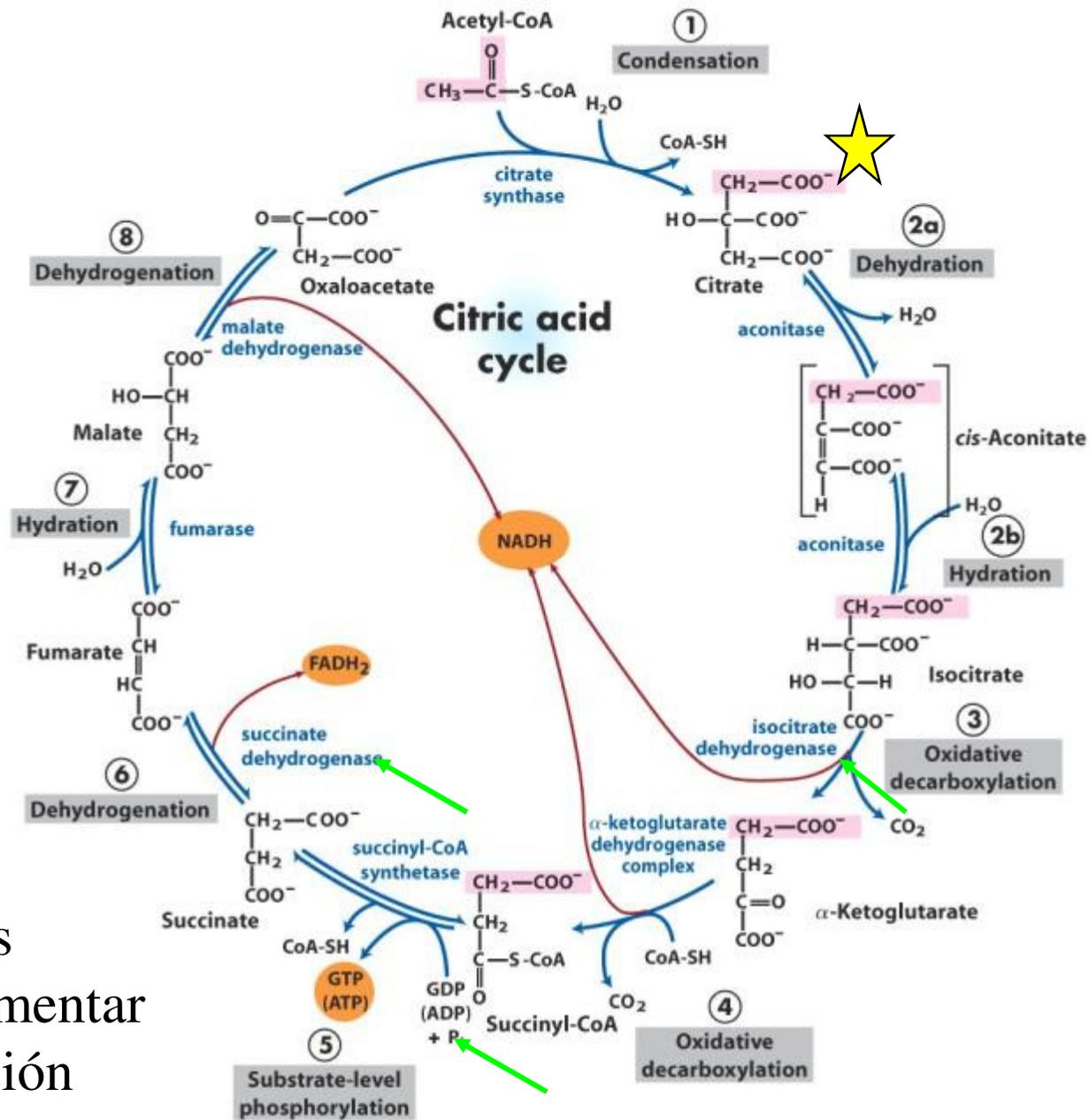


Metabolitos primarios- Ácidos y solventes

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Acido Cítrico

- Buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado. Saborizante, gusto ácido frutal. Plastificante: disminuye la espuma en fabricación de resinas. Cosmética como astringente. A pH neutro o ácido forma complejos. En producción de detergentes
- *Aspergillus niger* es el mejor productor en presencia de Fe^{+3} .
- Ciclo de Krebs. Ingeniería metabólica.
- Quelante de Al^{3+} . Plantas que expresan niveles elevados de citrato sintasa bacteriana.

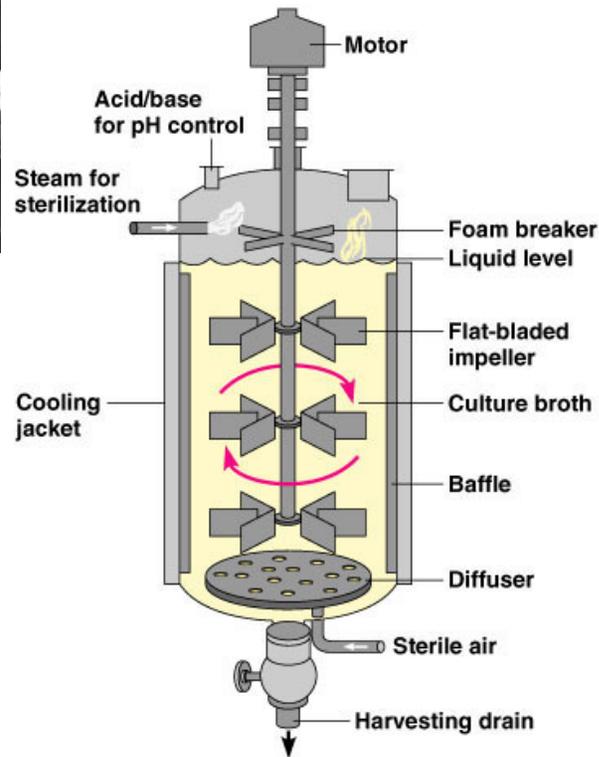


Inhibidores
 Ferrocianuro
 Fluorocitrato
 Malonato

Estrategias
 para incrementar
 la producción



• *Aspergillus niger* es el mejor productor.
Producción industrial 1917.
Pfizer.



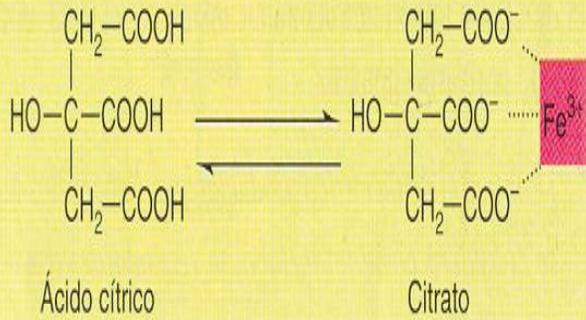
(a) Section of a continuously stirred bioreactor



(b) A bioreactor tank is at the left.

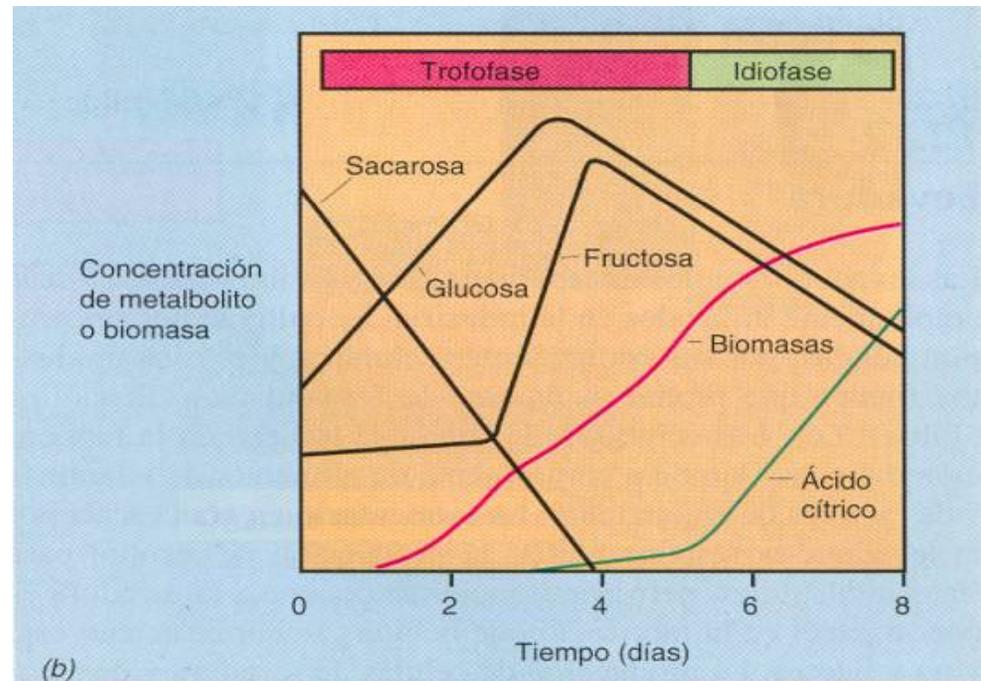
Melaza como fuente de azúcar

ACIDO CÍTRICO Y SU FORMA IONICA QUELADA CON Fe(III)



(a)

CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN DEL ACIDO CÍTRICO



(b)



Otras aplicaciones del ácido cítrico

Trópicos

Suelos ácidos solubilización de aluminio

- Quelante de Al^{3+} .
- Plantas que expresan niveles elevados de citrato sintasa bacteriana.



BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Tres categorías de productos microbianos de importancia industrial

- Metabolitos primarios

- Metabolitos secundarios



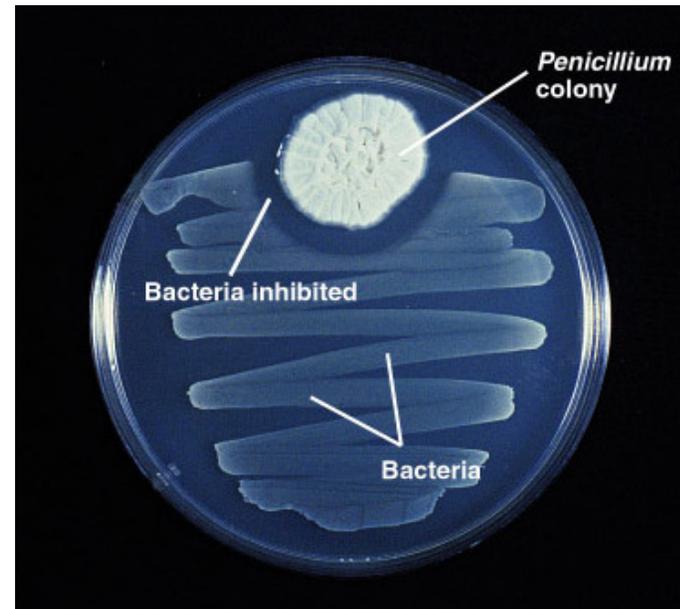
- Enzimas

Metabolitos secundarios

Compuestos microbianos de uso medicinal

- En 1928 Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico.
- Observó que el hongo *Penicillium* producía un antibiótico que mataba a *S. aureus*.

Condiciones para la producción de metabolitos 2^{rios} deben ser controladas



Antibióticos clásicos

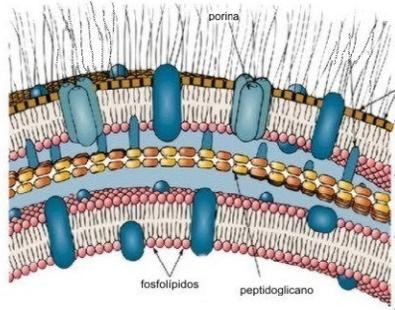
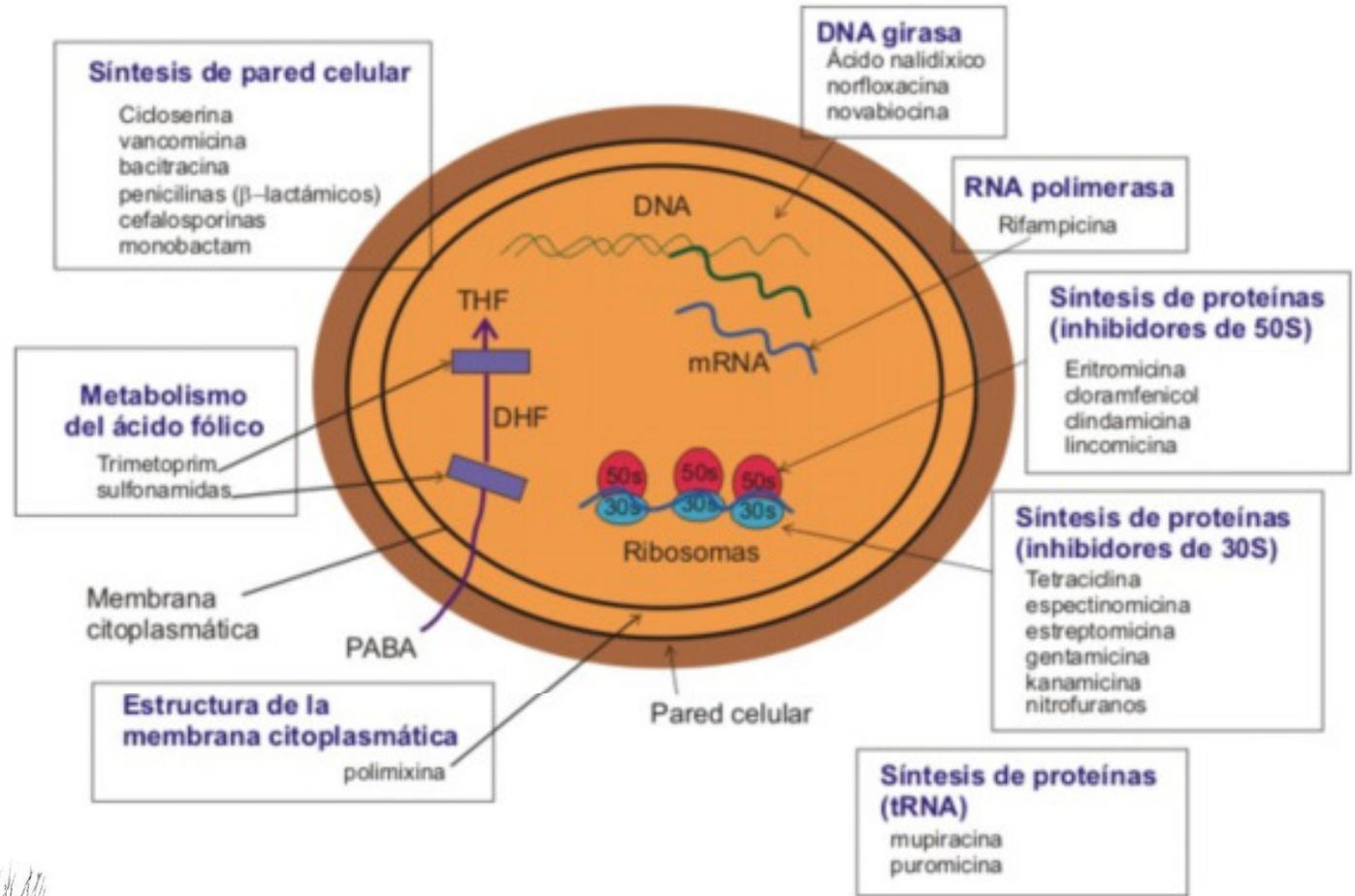
Sustancias químicas producidas por microorganismos que matan o inhiben el desarrollo de otros microorganismos. Interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado.

TABLE 1.3 Some Commercially Produced Antibiotics

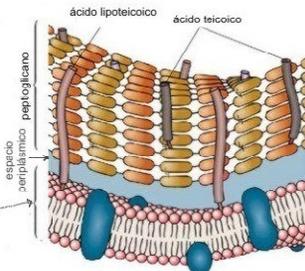
Antibiotic	Producing Microorganism	Class
<i>Produced by Fungi</i>		
Cephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Broad spectrum
Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Fungi
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gram-positive bacteria
<i>Produced by Gram-Positive, Spore-Forming Bacteria</i>		
Bacitracin	<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positive bacteria
Polymyxin B	<i>Bacillus polymyxa</i>	Gram-negative bacteria
<i>Produced by Gram-Positive Bacterium, Actinomycete</i>		
Amphotericin B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Fungi
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i> (now chemical synthesis)	Broad spectrum
Cycloheximide	<i>Streptomyces griseus</i>	Pathogenic yeasts
Cycloserine	<i>Streptomyces orchidaceus</i>	Broad spectrum
Erythromycin	<i>Streptomyces erythreus</i>	Mostly Gram-positive bacteria
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Gram-positive bacteria
Lincomycin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Gram-positive bacteria
Neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Broad spectrum
Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	Fungi
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Gram-negative bacteria (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
Tetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	Broad spectrum

Antibióticos producidos por fermentación a gran escala

Antibióticos Clásicos



pared de Gram positivos



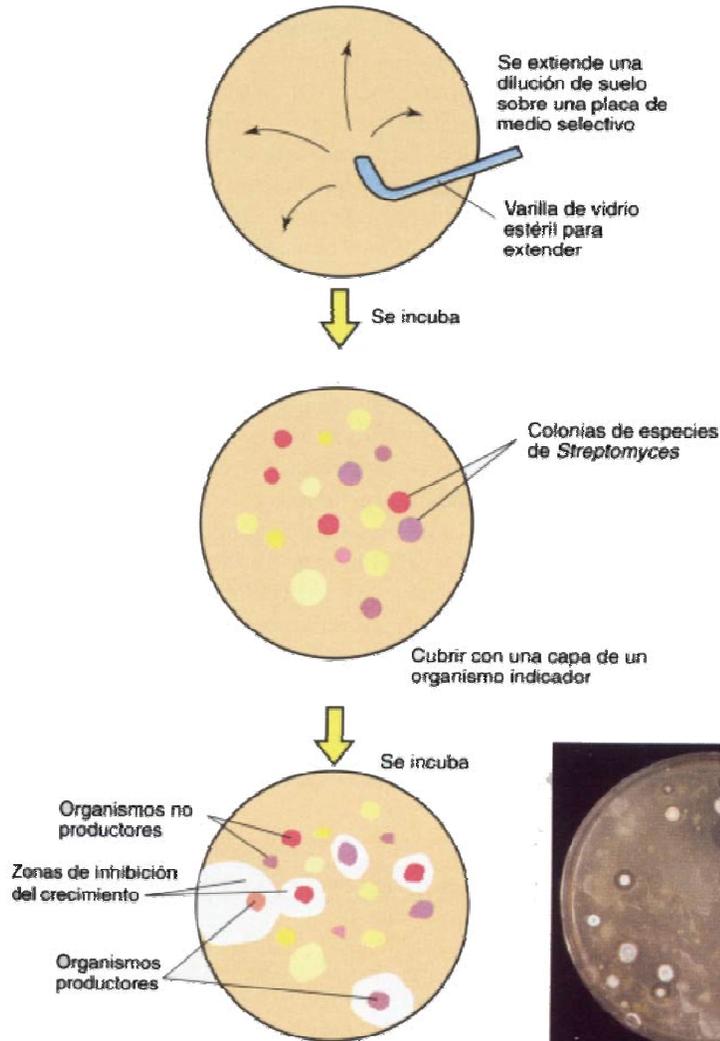
pared de Gram negativos

Carmen Sánchez Rivas



Búsqueda de antibióticos

Rastreo de nuevas cepas productoras de antibióticos

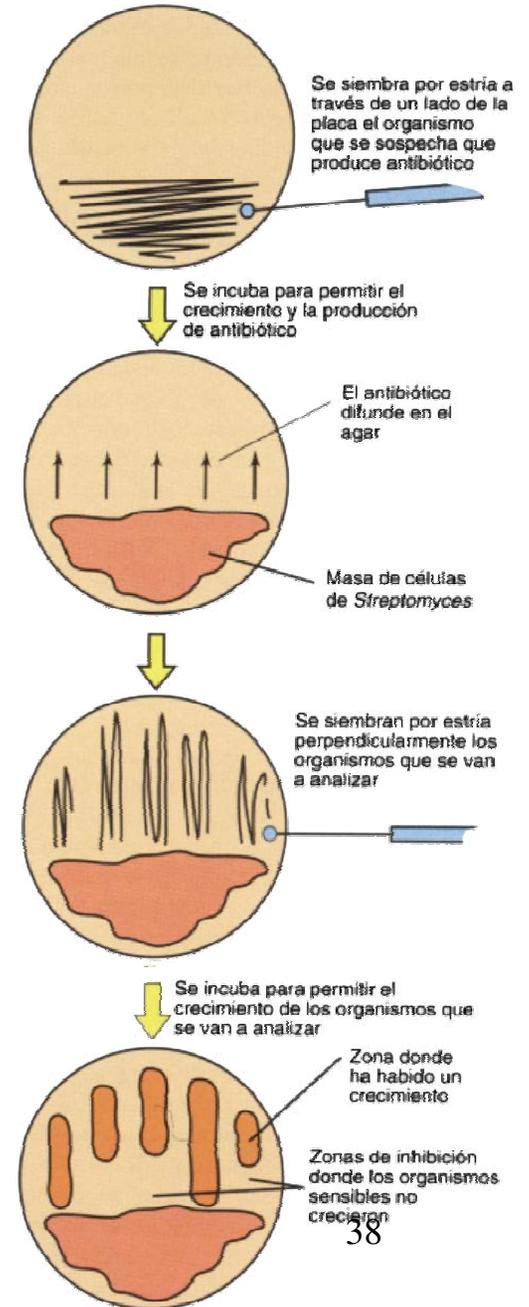


(a)

Ensayo en placa

Producción y análisis de su estructura

Análisis *in vivo*



Estrategias

. **Biotecnología moderna (Nueva Biotecnología)**
Obtención de cepas con alto rendimiento

Manipulaciones genéticas

Mutagenesis

Sobreexpresión

Modificaciones a nivel regulatorio

**Dificultades: vía metabólica compleja necesidad
de identificar gen clave: ciencia básica**

. **Búsqueda de nuevos compuestos**
BIOTECNOLOGÍA AZUL (MARINA)

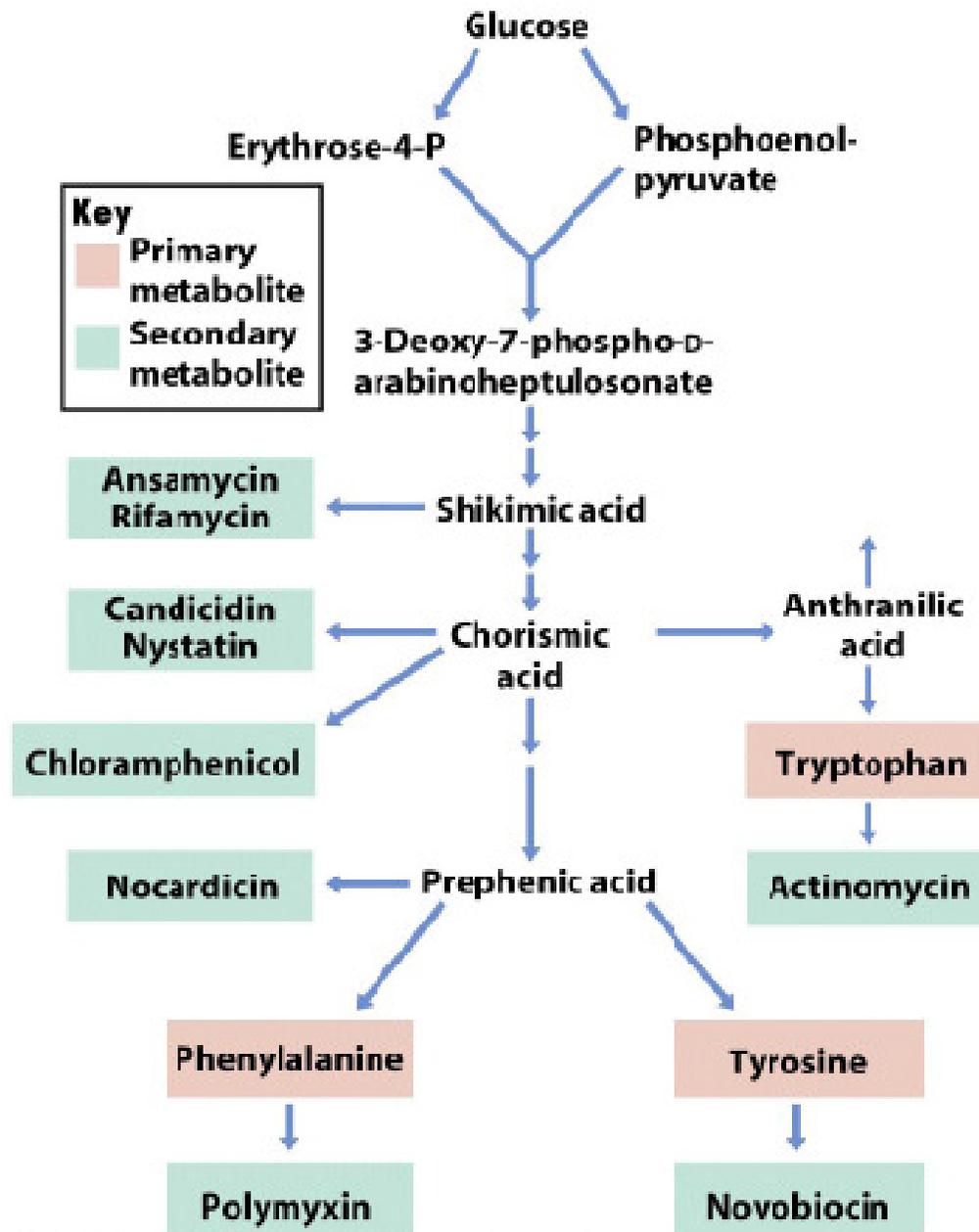
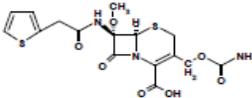
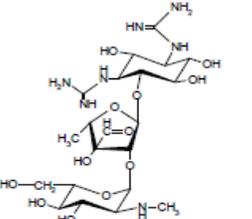
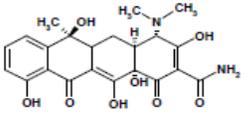
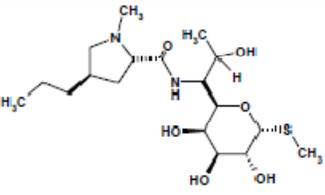
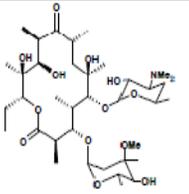
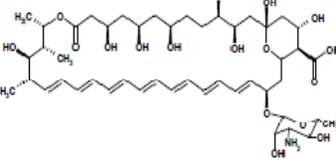
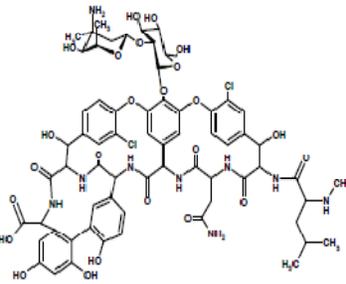
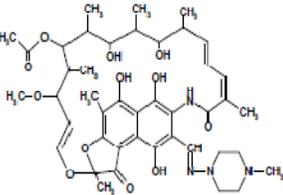
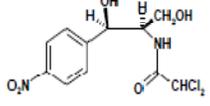


Figure 30-3 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Tabla 1. Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinomicetos de acuerdo a su estructura química.

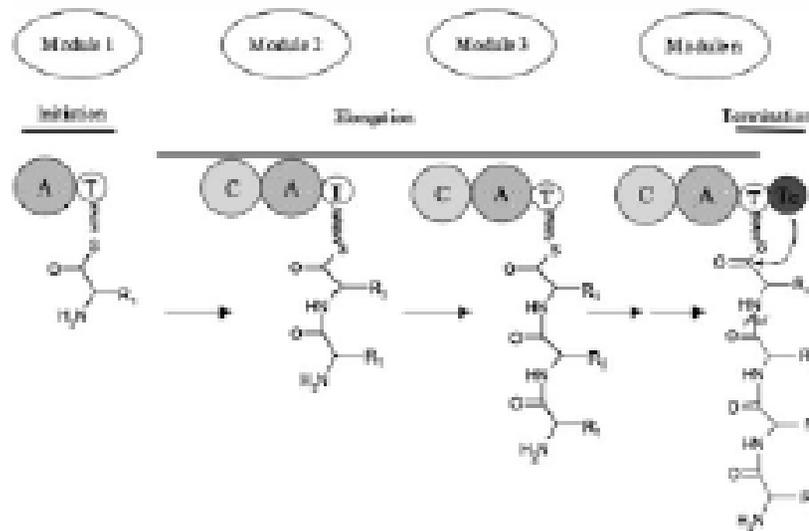
CLASIFICACION	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
β-Lactámicos	Cefoxitina. (Cefamicina semisintética). Inhibe síntesis de pared celular.	
Aminoglucósidos	Estreptomina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Tetraciclinas	Tetraciclina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Azúcares complejos	Lincomicina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.	

Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios se diseñaron empleando el programa MDL ISIS DRAW versión 2.5 (http://www.mdl.com/products/framework/isis_draw/index.jsp).

Macrólidos	Eritromicina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S.	
Polienos	Amfotericina B. Alteración de permeabilidad en la membrana.	
Glicopéptidos	Vancomicina. Inhibe síntesis de pared celular.	
Rifamicinas	Rifampicina. Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa.	
Fenicoles	Cloranfenicol. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S	

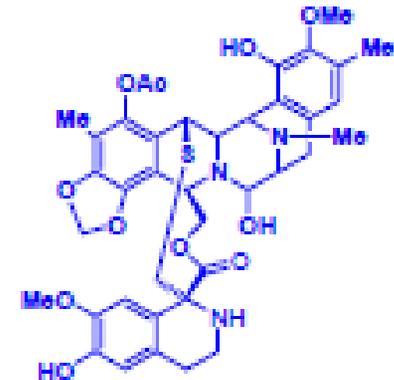
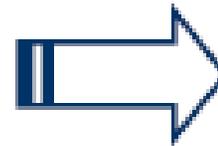
Como se sintetizan estos compuestos?

Péptidos no ribosomales y policetidos



Non Ribosomal Peptide Synthetases

NRPS



PEPTIDES

Adenilación (A): activación de los aminoácidos

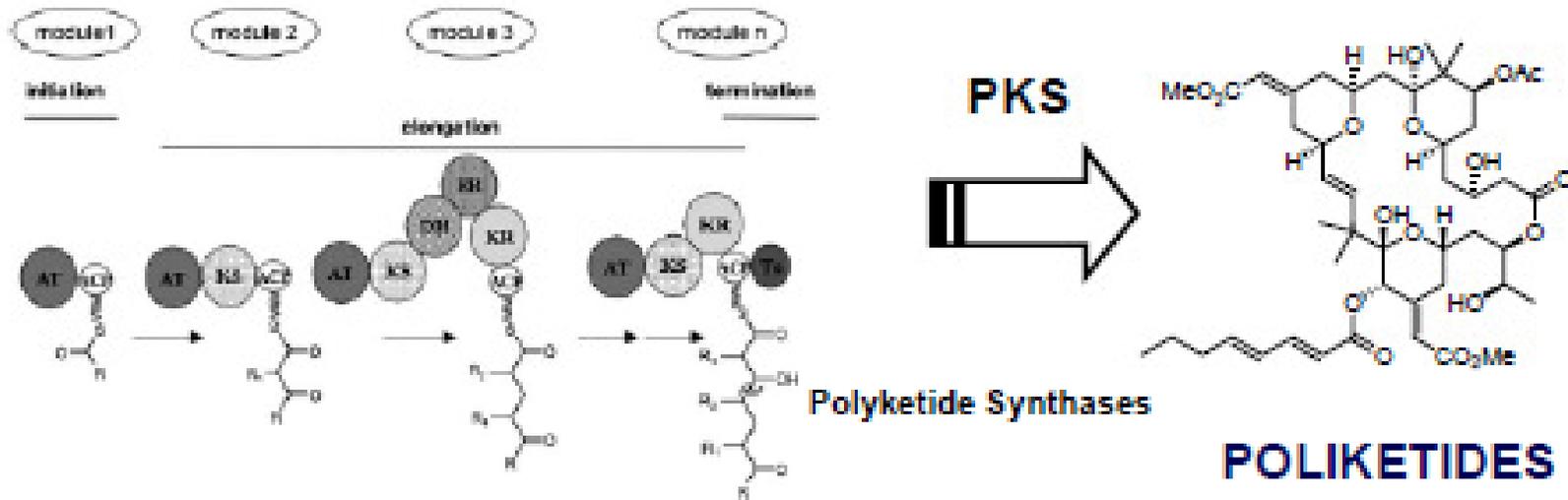
Tiolación (T, o alternativamente PCP): tioesterificación de un aminoácido activado

Condensación (C) enlace peptídico entre dos sustratos vecinos para la elongación de la cadena peptídica.

Se genera un péptido lineal o cíclico que se escinde por un dominio tioéster (TE).

Epimerización (E), responsable de la conversión de una configuración D o L.

Como se sintetizan estos compuestos? Péptidos no ribosomales y policetidos



Nat. Prod. Rep., 2007, Donadio et al., 24, 1073-1109

Otros compuestos bioactivos

Metabolitos secundarios

BIOTECNOLOGÍA AZUL: MARINA

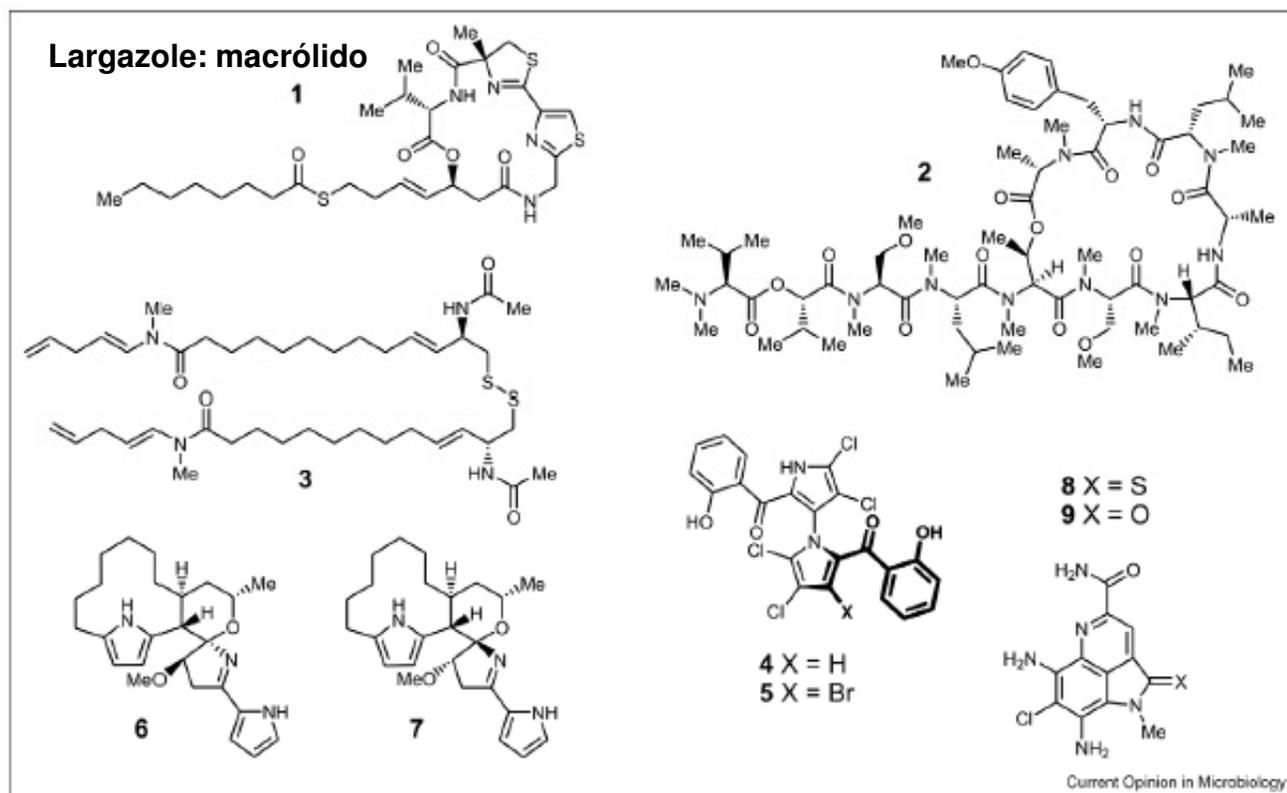
Descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de bacterias marinas



Cianobacterias



Figure 1



Highly bioactive natural products recently isolated from marine cyanobacteria and actinomycetes: largazole (**1**) from *Symploca* sp., colbamide (**2**) from *Leptolyngbya* sp., somocystinamide A (**3**) from a *Lyngbya majuscula*/*Schizothrix* mixed assemblage, as well as marinopyroles A (**4**) and B (**5**), marinosins A (**6**) and B (**7**), and ammosamides A (**8**) and B (**9**), all isolated from *Streptomyces* spp.

Agentes antitumorales

BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

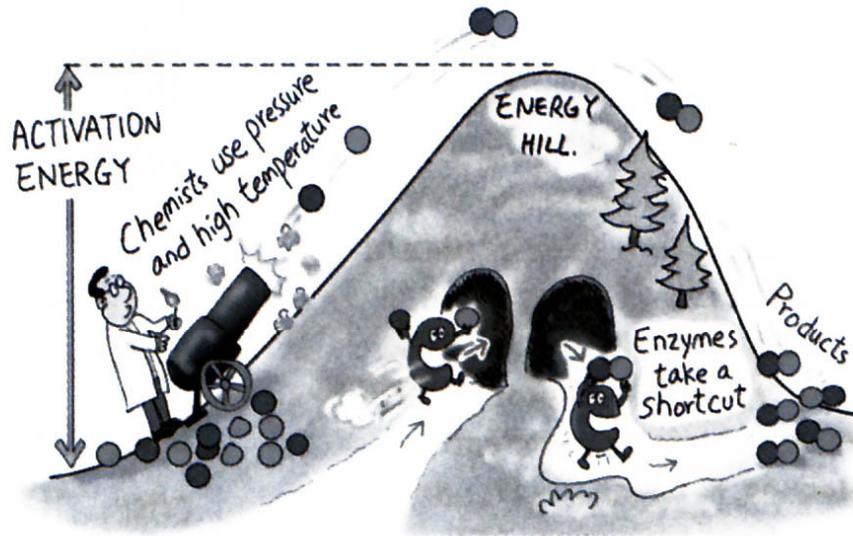
Tres categorías de productos microbianos de importancia industrial

- Metabolitos primarios
- Metabolitos secundarios
- Enzimas

Enzimas y extremófilos

Enzimas

Only when the substances have climbed the "energy hill" a reaction can take place.



- . NO SUFREN CAMBIO Y NO SE CONSUMEN EN EL PROCESO**
- . BIODEGRADABLES Y NO TÓXICAS**

. Biocatalizadores. Convierten sustratos en productos sin sufrir cambio alguno.

. Casi todas las reacciones en mundo viviente son catalizadas y controladas por enzimas.

. Especificidad. Cada reacción qca. catalizada por su propia enzima

. Aumentan velocidad de reacción. Actúan a T moderada, pH y p

. Capaces de discriminar entre sustratos similares

. Catalizan reacciones estereoespecíficas.

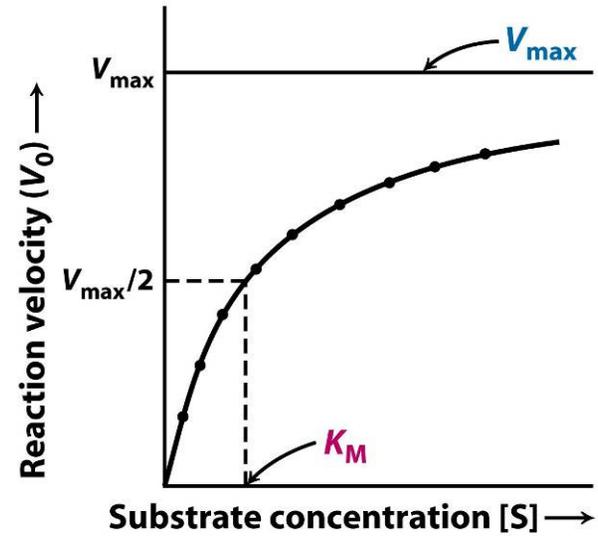
. Pueden funcionar *in vitro*

EFECTO DEL AMBIENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

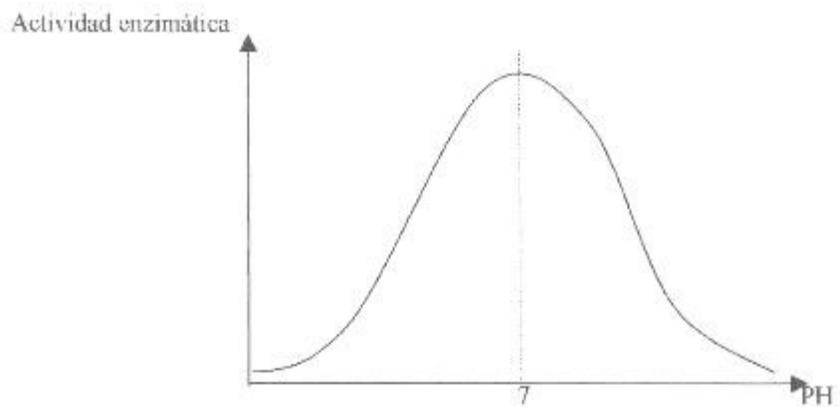
. Concentración de sustrato

. pH

. T



e 8-12
mistry, Sixth Edition
W. H. Freeman and Company



óptimo

pH
Temperatura

Animales, plantas y microorganismos como fuentes de enzimas



Vegetales: Fuentes potenciales de enzimas a escala industrial.
Granos: malta que contiene amilasas y proteasas usadas en la producción de cerveza.

Siglo XIX, métodos simples para obtención de grandes cantidades de proteasas de la savia de plantas tropicales.

Desventajas:

- .Suministro y concentración de las enzimas varía con las estaciones del año.
- .Requerimiento de grandes cantidades de plantas como material. .Procesamiento de grandes cantidades es un trabajo muy duro.



Desventajas similares para la obtención a partir de animales



Vegetales

Papaina y quimiopapaina del árbol de la papaya. Similar a la pepsina

Ablandadores de carne, digestión y limpieza de lentes de contacto.

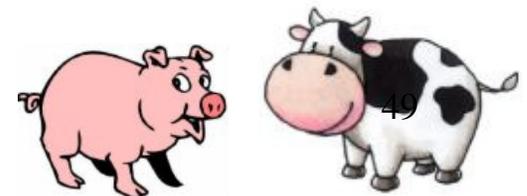
Ficina de higueras. Enzima proteolítica

Bromelaina del tallo de la planta de la piña. Enzima proteolítica

Animales

Descubrimiento de enzimas digestivas siglo XIX. Desarrollo de métodos para obtención de enzimas de matanza de animales.

Pepsina del estómago de cerdos y del cuajo del estómago de ganado bovino. Cócteles de enzimas con tripsina, quimiotripsina, lipasas y amilasas del páncreas de cerdo.



LA MAYORIA DE LAS ENZIMAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL PODRIAN PRODUCIRSE A PARTIR DE MICROORGANISMOS

Microorganismos como fuentes de enzimas

Producción de grandes cantidades con bajo costo

No afectada por las estaciones del año. Proceso de extracción más simple y menos contaminante.

Uso de mutantes y procesos de selección que aumentan la producción. "Enzimas hechas a medida" a través de ingeniería genética y diseño de proteínas

1950 gran desarrollo de procesos sumergidos

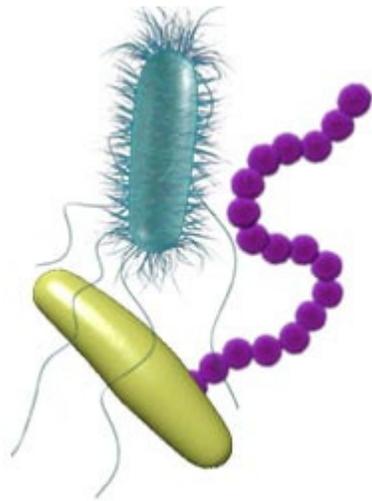
Enzimas hidrolíticas simples como: proteasas, amilasas, pectinasas, lipasas.

Degradan polímeros naturales

Enzimas extracelulares . Poco específicas

Fácil extracción . Bajo costo

Poco requerimiento de cofactores



Distribución de enzimas por áreas

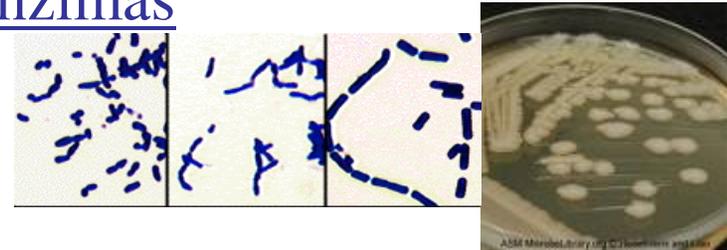
{ 90 % de microorganismos
 6% animales y 4% plantas

AREAS ESPECÍFICAS	PORCENTAJE	Aplicaciones
Alimentos	41	Clarificación de vino y jugos, cervezas, pan y galletas, edulcorantes, lacteos, suplemento de alimentos de animales
Detergentes	34	Limpieza de ropa, lentes de contacto
Textiles	11	Desengomado de telas, terminación jeans
Cueros	3	Ablandamiento
Pasta/papel	1	Blanqueamiento de pulpa de celulosa
Otras aplicaciones	6	Reactivos para análisis, manipulación genética, bioconversiones, trastornos digestivos, inflamaciones, disolventes de coágulos

Selección de organismos productores de enzimas

Gram positivos

Bacillus alta capacidad secretora
Exoenzimas

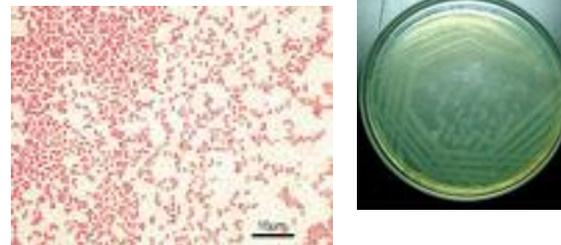


Streptomyces
glucosa isomerasa citoplasmática



Gram negativos

Pseudomonas lipasas



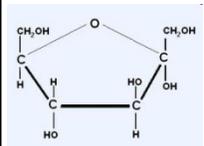
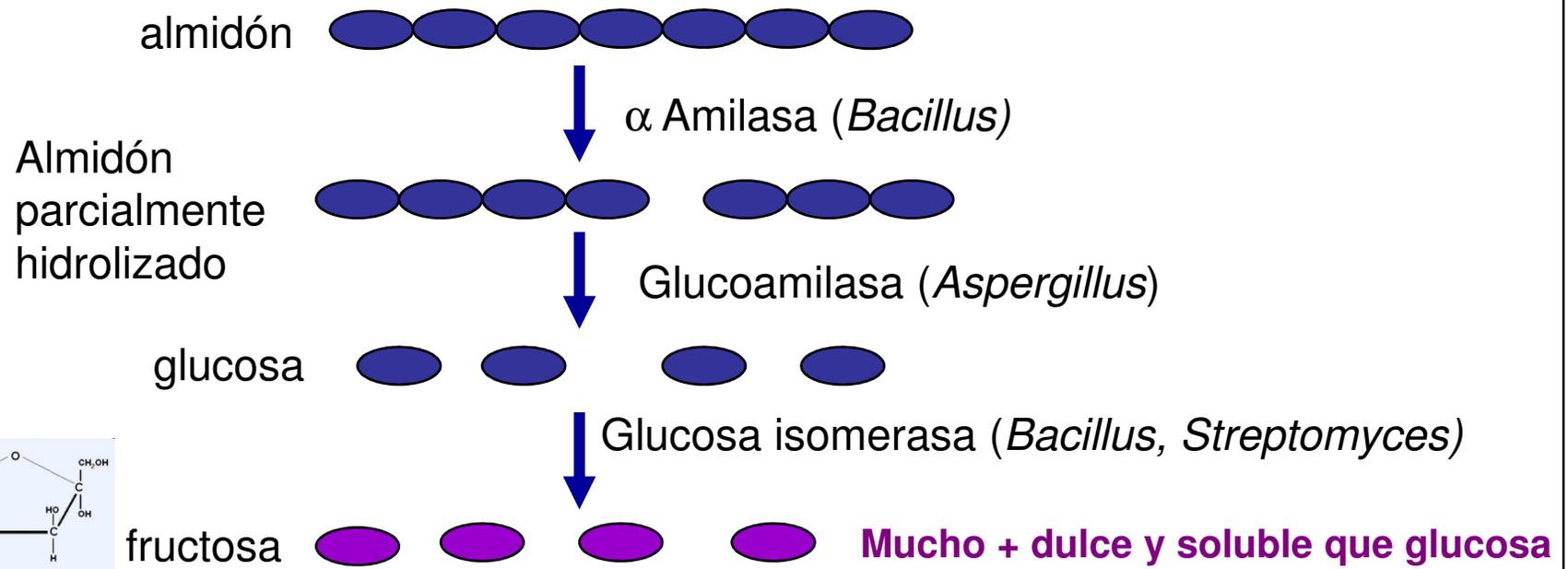
Exoenzimas vs. Enzimas intracelulares

- . Son separadas directamente del caldo de cultivo (durante fermentación) y formuladas en alta concentración**
- . Solubles en agua**

Se necesita proceso de extracción
Glucosa oxidasa: conservación de carne
Asparraginasa: terapia del cáncer
Penicilina acilasa: conversión de antibióticos
Glucosa isomerasa: jarabe de fructosa

Enzimas microbianas que participan en la degradación del almidón

Ej: Obtención de Jarabe de Maíz de Alta Fructosa (JMAF)



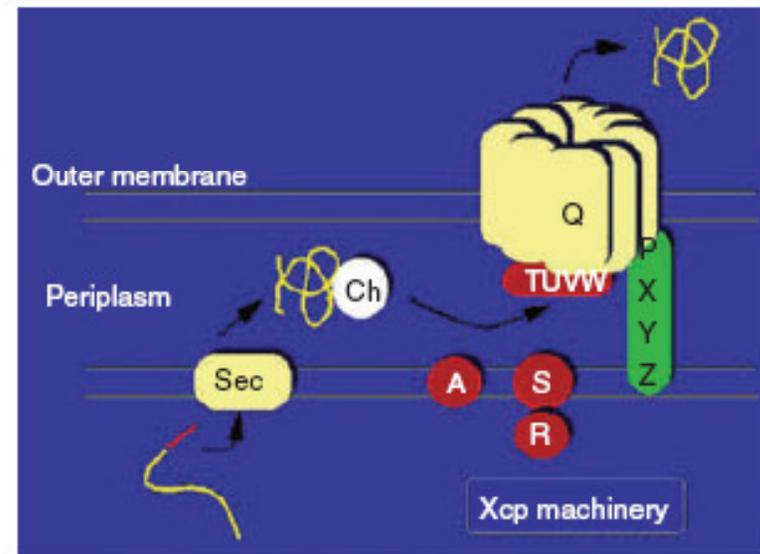
Lipasas-Aplicaciones de las Enzimas Bacterianas

Criterios de selección para lipasas como aditivos de detergentes:

- Amplio rango sobre una variedad de grasas y lípidos
- Estabilidad a pH alcalino
- Solubilidad en detergente
- Compatibilidad con las proteasas presentes (no fácilmente degradable)
- Facilidad de producción

Pseudomonas spp.

Pseudomonas alcaligenes 1995



Maquinaria de secreción

Pseudomonas sp. Strain KFCC 10818: P112Q

Pseudomonas sp. Strain 42A2

Celulasas-Aplicaciones de las Enzimas Bacterianas

Capaces de hidrolizar la unión 1,4 β -D-glucosídica en celulosa

Endoglucanasas

Exoglucanasas

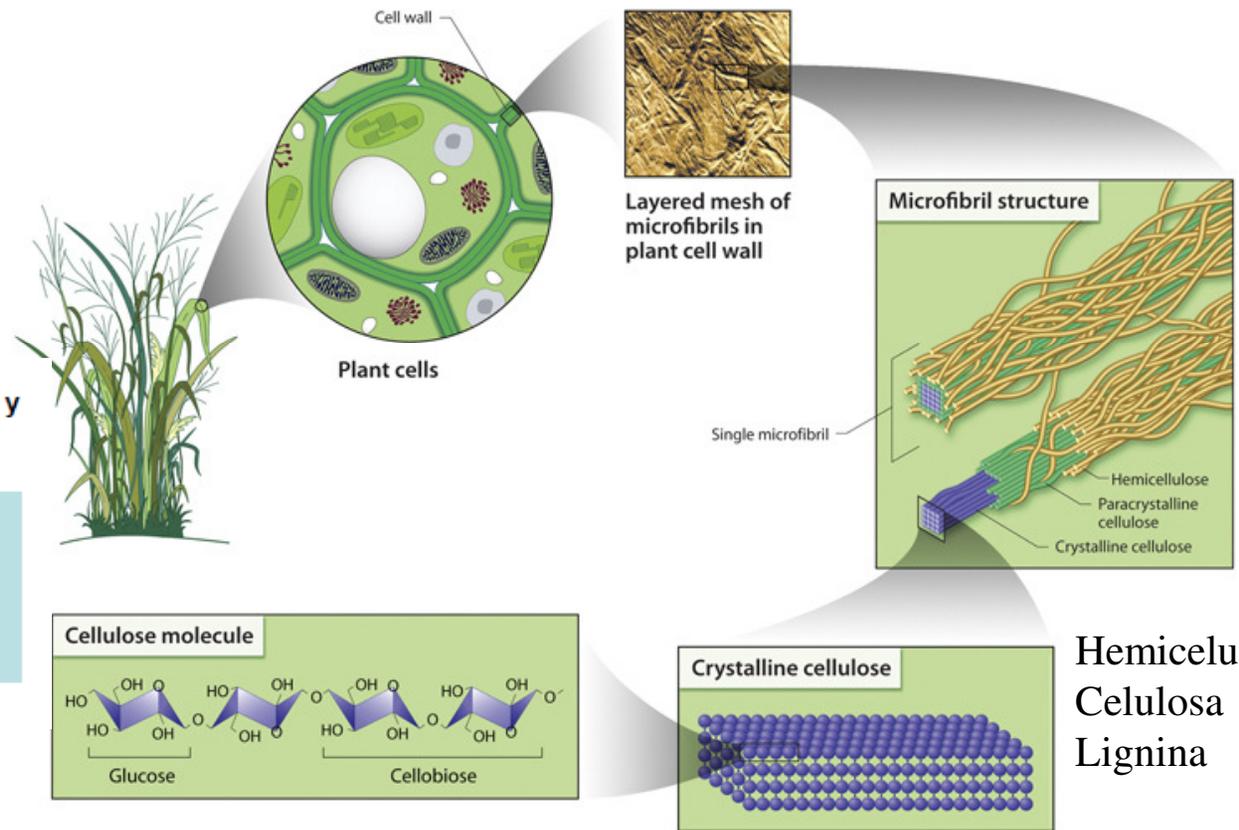
β -Glucosidasas

Bacillus subtilis

Thermomonospora fusca

Tabla 1: Niveles de celulosa, hemicelulosa y lignina en biomasa

BIOMASA	% peso seco
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-25%



Hemicelulosa
Celulosa
Lignina

Textil: Stone washed

Lignocelulosa sustrato de
interés en biotecnología 56

Detergentes biológicos

Aplicación más importante de las enzimas hidrolíticas



Componentes de las manchas:

- Proteínas difíciles de remover, no se disuelven fácilmente en agua. A altas temperaturas, se une fuertemente a las fibras textiles.
- Polvo, hollín, pigmentos y materia orgánica.
- Grasas y proteínas actúan como pegamento.

Detergentes sueltan la grasa de la tela, las proteínas permanecen en el material.

Enzimas: Proteasas, lipasas, celulasas y amilasas en la eliminación de manchas.

Condiciones en las cuales debe ser activa.

Detergentes biológicos

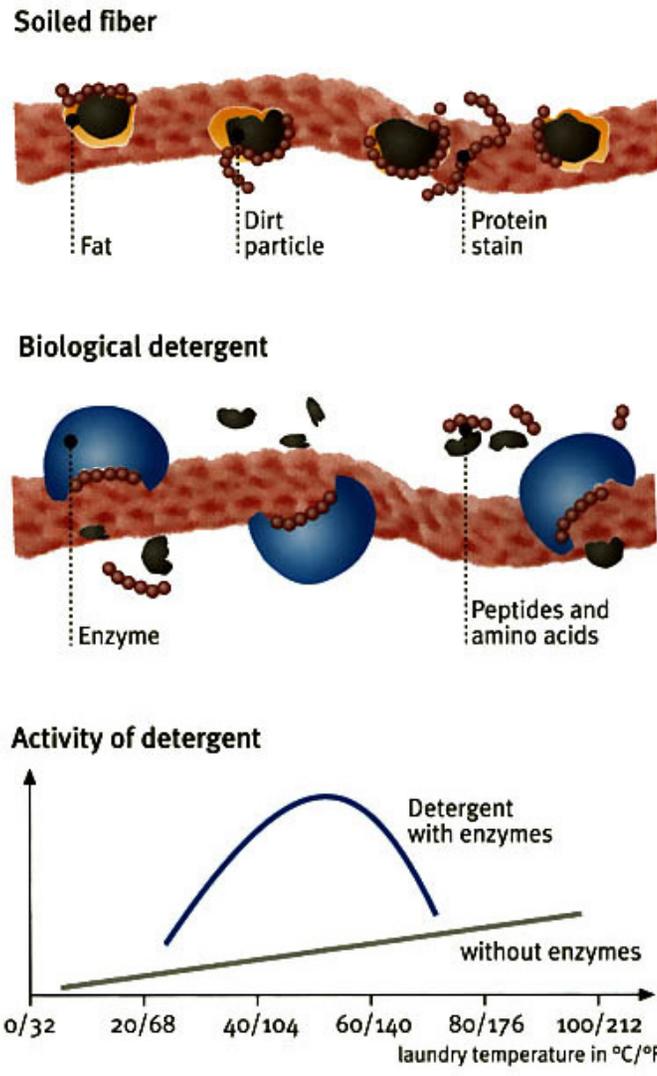
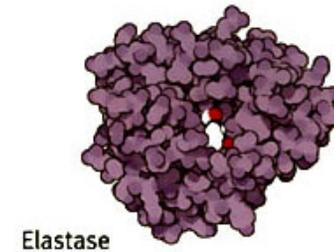
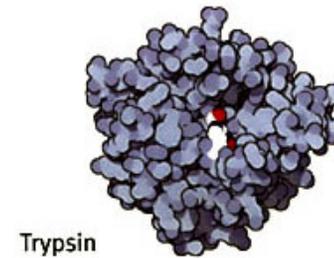
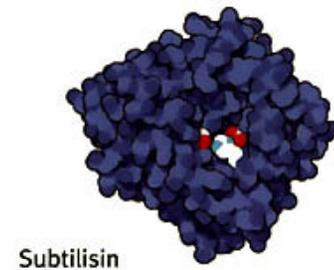


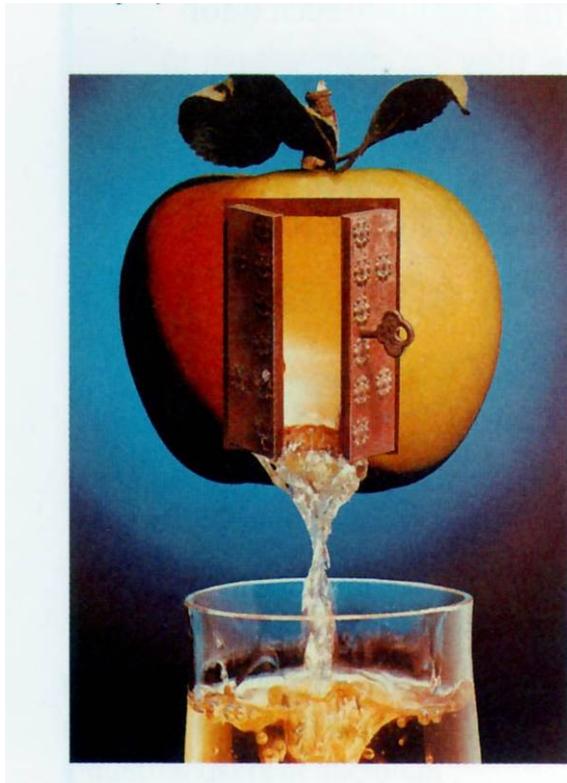
Fig. 2.17 Diagram of biodetergent action (left). Serin proteases (below). A particularly reactive serin group in the active site lends its name to the proteases.



Pectinasas

Producción de zumo de frutas

Al prensar fruta y vegetales para la obtención de jugo, las pectinasas de alto peso molecular reducen la producción.



Pectinasas procedentes de cultivos sumergidos de *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Se pica la fruta y se añaden pectinasas para degradar las pectinas de cadena larga. Se reduce la viscosidad del zumo, facilitando la filtración y se obtiene más cantidad.

Alimentación de bebés maceran las fruta y los vegetales para hacerlos más suaves y fáciles de comer.

Productos Químicos

Penicilin amidasa/Penicilin acilasa: usada para producir intermediarios para la obtención de penicilinas semisintéticas.

E. coli

Kluyvera citrophila

Alcaligenes faecalis

Pseudomonas

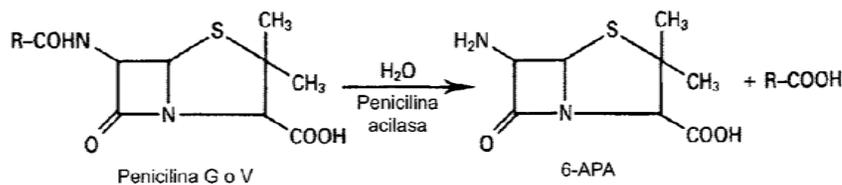
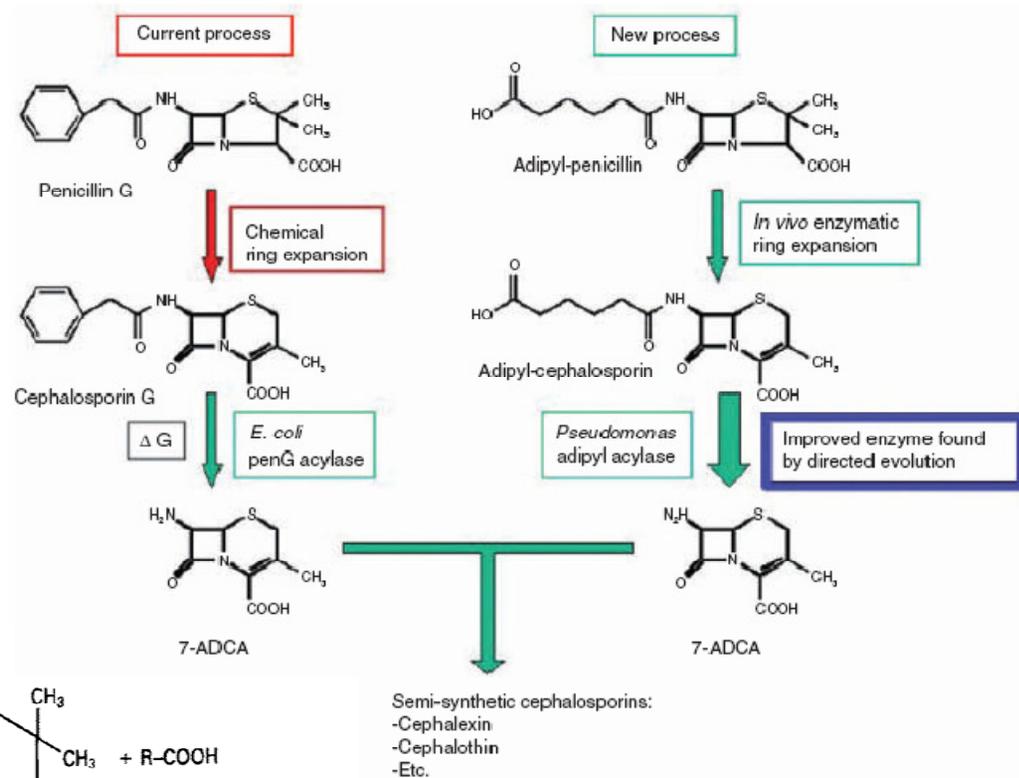


Figura 5.8 Formación de 6-APA por hidrólisis de penicilina.

Enzimas { Solución
Inmovilizadas

Enzimas en solución

Se emplean grandes volúmenes (ton), deben ser de bajo costo

Su purificación debe ser sencilla o no interferir con el producto

Ventajas:

- pueden seleccionarse de alta o baja especificidad
- generan pocos o ningún producto secundario
- actividad óptima en condiciones de reacción

Desventajas:

- costo generalmente alto
- sustratos poco solubles son difíciles de procesar
- baja estabilidad
- problemas de inhibición

Enzimas inmovilizadas

Ventajas:

- se puede reutilizar la enzima
- no requiere proceso de recuperación y separación de la enzima del producto. Menores problemas de disposición de efluentes
- puede proveer un ambiente más adecuado para la actividad catalítica de la enzima.
- Generalmente mayor pureza del producto
- Estabiliza las enzimas evitando desnaturalización

Desventajas:

- puede haber drenado de la enzima a la solución
- limitaciones significativas por restricciones a la transferencia de masa
- la actividad y la estabilidad de la enzima se puede reducir
- no se pueden controlar las condiciones en el microambiente que rodea a la enzima

Enzimas inmovilizadas

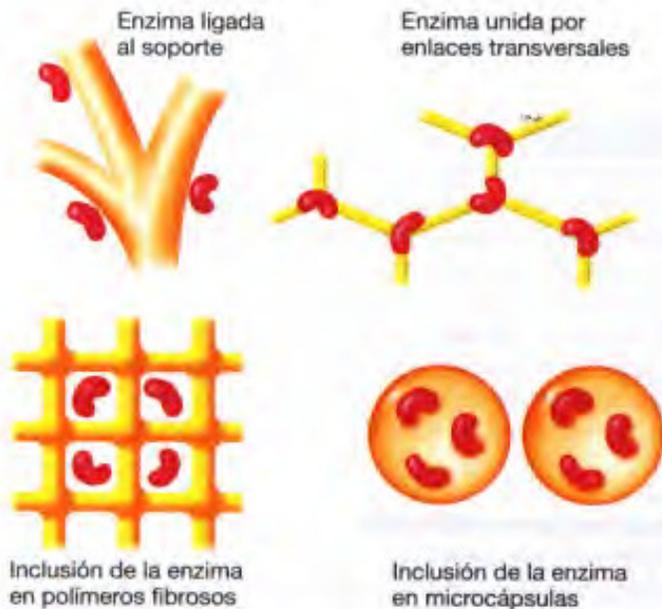


Figura 30.16 Procedimientos para la inmovilización de las enzimas. En todos los casos las moléculas enzimáticas se muestran en rojo.

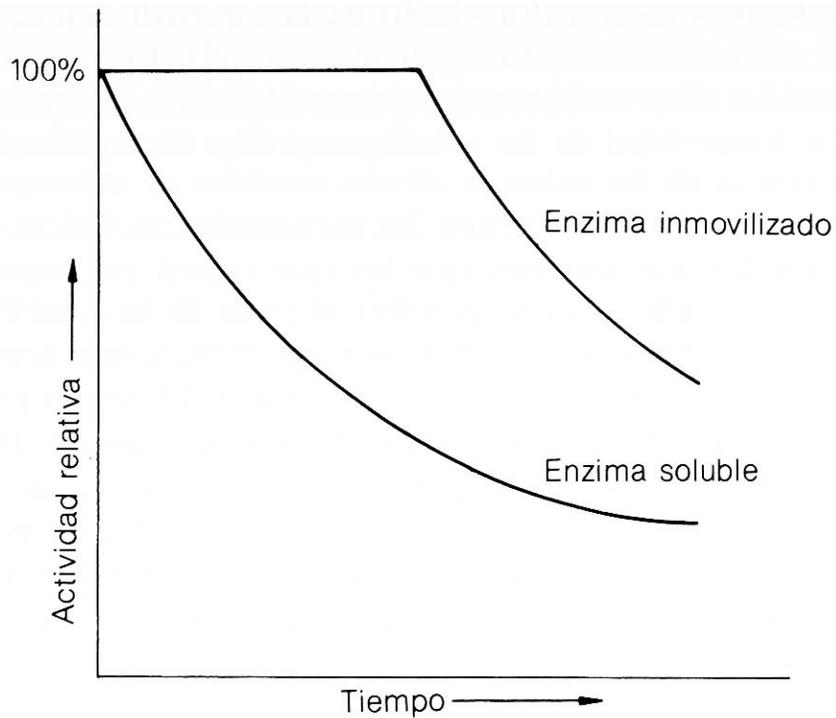
1. Unión: a soporte

- Celulosas modificadas
- Carbón activado
- Arcillas minerales
- Óxidos de aluminio
- Bolitas de vidrio

Adsorción-enlace iónico-enlace covalente.

2. Polimerización. Con agente polimerizante. Ej. Glutaraldehído. Mantener actividad de la enzima.

3. Inclusión enzimática: en membrana semipermeable. Microcápsulas, geles, polímeros fibrosos como acetato de celulosa.



Otras ventajas de los biocatalizadores inmobilizados

1. Ideales para operaciones continuas
2. Permiten un control más seguro del proceso catalítico
3. Permiten el desarrollo de un sistema de reacción multienzimático

MERCADO

Aunque enzima sea esencial cantidad necesaria en mercado pequeña

Alto volumen para grado industrial.

Bajo volumen para analítica, diagnósticas o terapéuticas.

Ej: Aditivos en masa 1-2Kg/1000 Kg de sustrato. Formulaciones líquidas. No purificadas

Diagnóstico µg-mg. Alto grado de pureza.

Dominado por Holanda y Dinamarca.

Se busca obtener:

Alto rendimiento-Estabilidad-Independencia de inductores o cofactores

Buena recuperación

. Suprimir: Olor-Color-Metabolitos no deseados.

. Bajo potencial alergénico

. Libre de microorganismos

. Certificado de material seguro

. Responsabilidad sobre el fabricante

Biorreactores para producción de enzimas

10-50 m³-30-150 h

Enzimas de extremófilos

A) Temperatura

Psicrófilos

Mesófilos

Termófilo

Hipertermófilos

B) Acidez y alcalinidad

Acidófilos

Alcalófilos

C) Disponibilidad de agua

Halófilos y Halófilos extremos (Sal)

Osmófilos (Azúcar)

Xerófilos (Ambientes Secos)

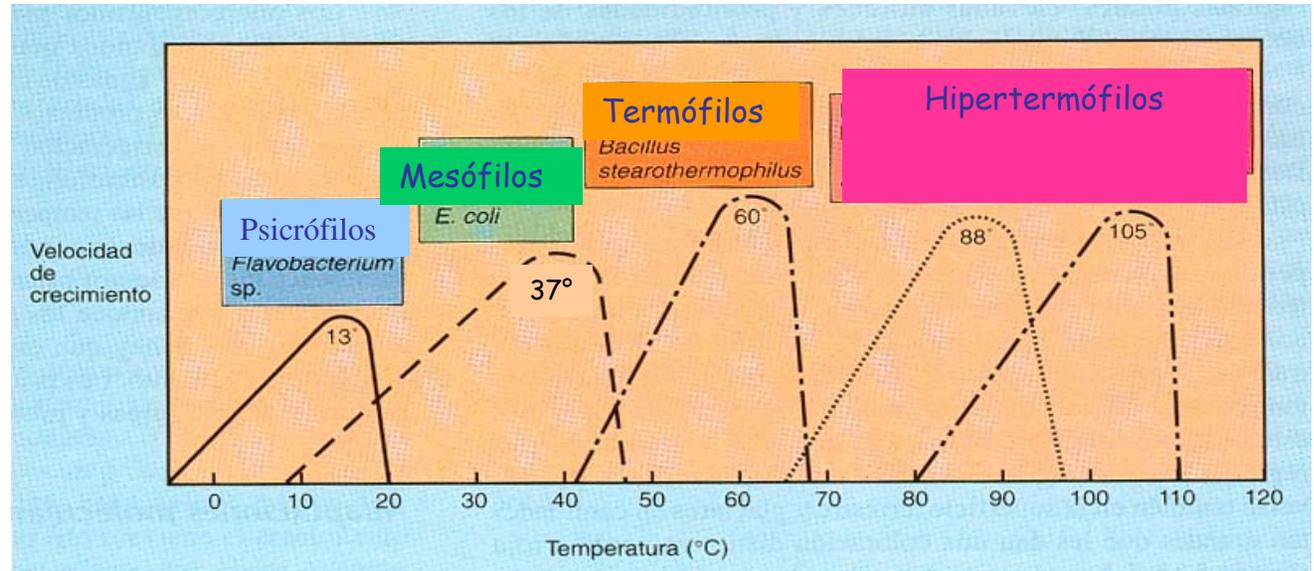
D) Alta presión

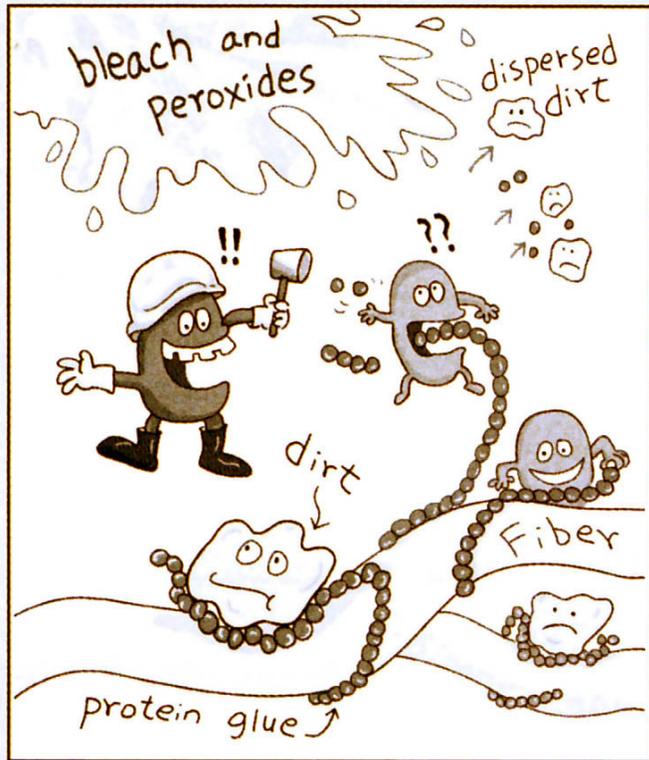
piezófilos o barófilos

E) Alta concentración de metales pesados o radiación

metalófilos

radiófilos

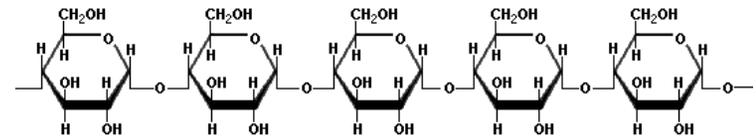




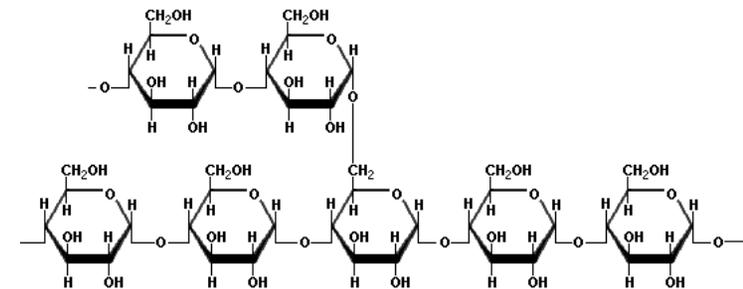
Degradación de macromoléculas

Almidón

α-amilasa
 pululanasa
 glucosa isomerasa



Amylose (α 1,4)

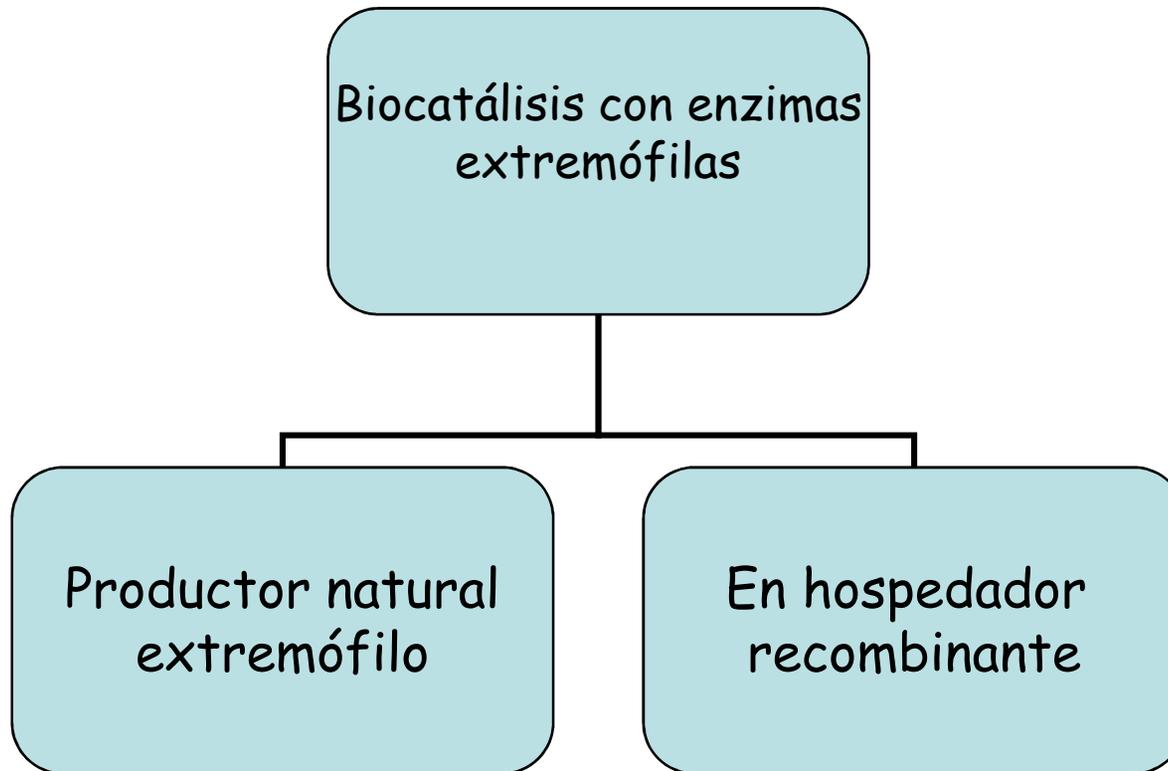


Amylopectina
 (Ramificado α 1,6 cada 24-30
 glucosa)

“Detergentes biológicos”

pH alcalino
 Baja temperatura

Producción de enzimas de extremófilos



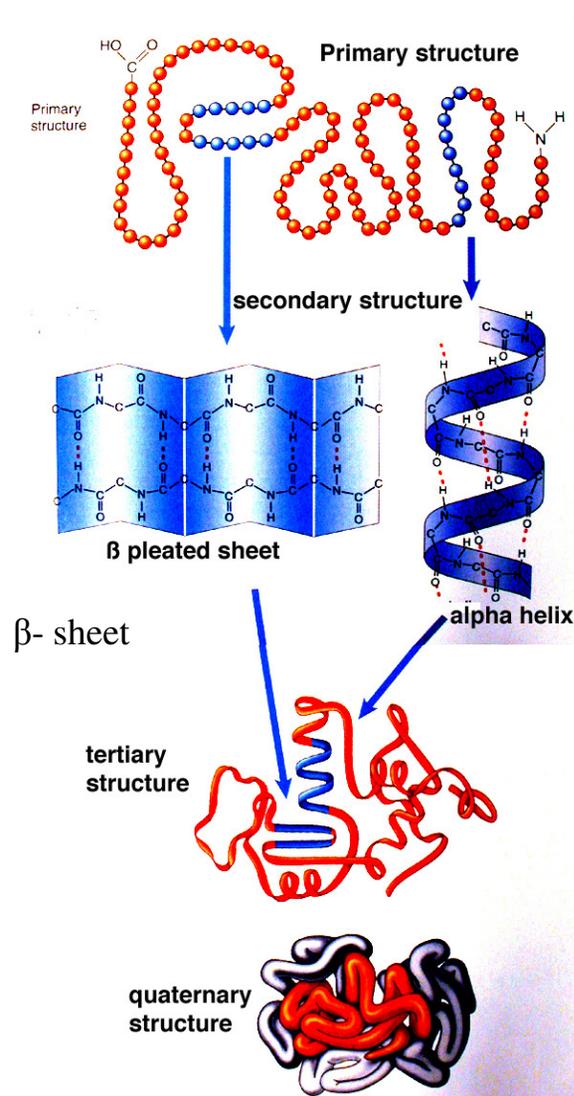
Ventajas y Desventajas

Enzimas aisladas

solubles
inmovilizadas

ENZIMAS DE EXTREMOFILOS

¿Cuál es la base de su eficiencia en ambientes extremos?



Optimización de

interacciones internas

interacciones externas

interfase proteína-solvente
con metabolitos, cofactores
y solutos compatibles

Factores que afectan la estabilidad Termófilas

Mayor número de interacciones iónicas

Cambios en aminoácidos (polares cargados)

Reducción de la relación superficie-volumen

Aumento de interacciones hidrofóbicas

Mayor asociación cooperativa

Modificación de áreas expuestas a solventes

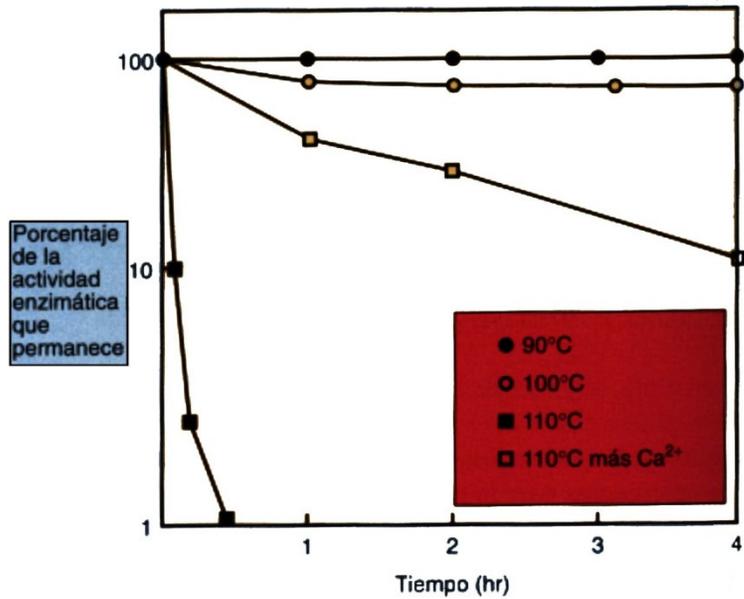
Reducción de zonas flexibles y del número de cavidades

Termoestabilidad del enzima:

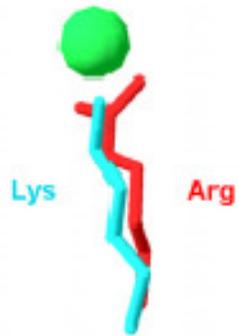
Pululanasa

Almidón → oligosacáridos

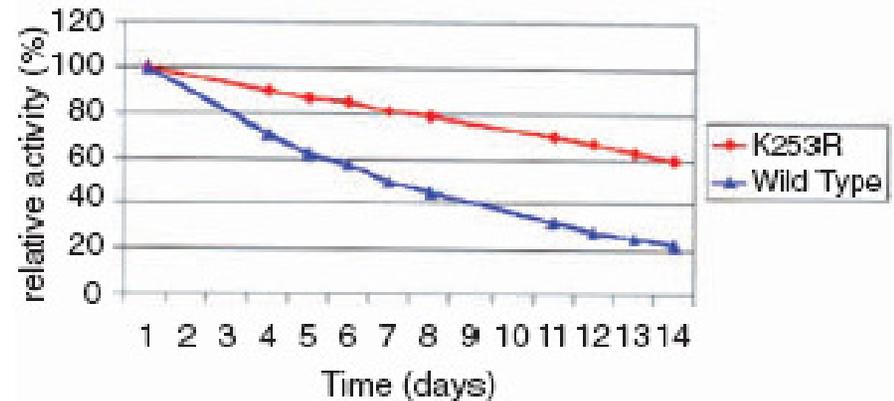
Pyrococcus woesei



c



Stability of Glucose Isomerase at 70 C



Actinoplanes missourensis

Mutanes con mayor

actividad

70

Bibliografía

- . Quax, W. J. (2006). Bacterial Enzymes. CHAPTER 3.4. Prokaryotes 1:777–796
- . Rogers, P. et al., (2006). Organic acids and solvents. CHAPTER 3.1. Prokaryotes 1:511-755.
- . Demain, A. and G. Lancini (2006) Bacterial Pharmaceutical Products. CHAPTER 3.6. Prokaryotes 1:812-833.