

Programa de **BIOCATALIZADORES EN LA INDUSTRIA**

Carrera/s: *Licenciatura en Biotecnología*

Asignatura: *Biocatalizadores en la industria*

Núcleo al que pertenece: *Complementario Electivo (Ciclo Superior de la Orientación Bioprocesos); Complementario Adicional (Ciclo Superior de la Orientación Genética Molecular)¹*

Profesores/as: *Elizabeth Lewkowicz, Andrés Muzlera*

Correlatividades previas: *Bioprocesos I*

Objetivos:

- Brindar los conocimientos necesarios que permitan a un/a estudiante de Biotecnología familiarizarse con el uso de sistemas biológicos como catalizadores.
- Aportar conocimientos para que el/la estudiante pueda discernir acerca del tipo de biocatalizadores a utilizar para un caso determinado, sean enzimas o células, sean libres como inmovilizados, sean salvajes o modificados.
- Lograr que el/la estudiante comprenda la utilidad de los biocatalizadores y sus aplicaciones en las distintas industrias.
- Hacer conocer al/la estudiante aspectos experimentales relacionados con la búsqueda y selección, la preparación y la inmovilización de diferentes tipos de biocatalizadores y su aplicación en biotransformaciones.

Contenidos mínimos:

Enzimas y células como catalizadores en reacciones orgánicas. Aspectos generales y reacciones catalizadas. Biocatalizadores inmovilizados. Métodos químicos y físicos. Biotransformaciones de interés en industrias alimentarias, farmacéuticas, textiles, cosméticas, papeleras y en tratamientos de aguas residuales, entre otras.

¹ En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo de Orientación.

Carga horaria semanal:

6 horas

Programa analítico:

- Tema 1: Enzimas como catalizadores en síntesis orgánica. Conceptos generales. Ventajas de los biocatalizadores frente a catalizadores convencionales. Relación estructura-función. Biotransformaciones en medios no convencionales. Aplicación de células enteras a la síntesis orgánica. Ventajas e inconvenientes del empleo de células frente a enzimas como biocatalizadores. Transformaciones microbianas vs. fermentaciones.
- Tema 2: Descubrimiento y diseño de nuevos biocatalizadores. Uso de técnicas de *screening*, mutagénesis, expresión y evolución. Enzimas artificiales. Microorganismos genéticamente modificados. Anticuerpos catalíticos.
- Tema 3: Reacciones catalizadas por enzimas. Hidrolasas: proteasas, esterases, lipasas, amilasas, nitrilasas. Aplicación a la síntesis e hidrólisis de péptidos y polisacáridos. Oxido-reductasas: problema de regeneración del cofactor. Transferasas, isomerasas y liasas: isomerización de hidratos de carbono, síntesis de nucleósidos.
- Tema 4: Biocatalizadores inmovilizados. Aspectos generales de la inmovilización. Métodos químicos y físicos. Influencia del tipo de soporte en la actividad catalítica. Nanobiocatálisis.
- Tema 5: Inmovilización no covalente. Distintos métodos. Influencia de las propiedades de textura del soporte en el porcentaje de enzima unida y en la actividad del derivado.
- Tema 6: Inmovilización covalente. Tipos de reacciones de inmovilización. Tipos de soportes. Influencia de la naturaleza del soporte en la actividad del derivado inmovilizado. Concepto de acuofilia. Estabilización de enzimas por unión covalente a soportes sólidos. Modificación química de enzimas.
- Tema 7: Inmovilización por atrapamiento. Distintos métodos. Características de los polímeros útiles en estos procesos. Encapsulación. Característica, propiedades y métodos.
- Tema 8: Aplicaciones industriales de los biocatalizadores. Producción de enzimas. Escalado del proceso. Optimización y parámetros indicativos del proceso industrial. Biorreactores.
- Tema 9: Biotransformaciones en industrias varias. Industria textil y curtiembres. Jabones y detergentes. Industria del papel. Tratamiento de aguas residuales. Biotransformaciones de interés

en industria farmacéutica. Antibióticos. Antivirales. L-Dopa. Síntesis de fármacos homóquiales. Biotransformaciones de interés en la industria alimentaria. Lipasas en industria aceitera. Industria láctea. Aplicación a la industria del almidón y derivados. Industria panadera. Industria cervecera y vitivinícola. Alimentos para ganado.

Bibliografía

Bibliografía principal:

1. Biocatalysis, Fundamentals and Applications, A.S. Bommarius, B.R. Riebel, Wiley-VCH, 2004.
2. Biocatalysts and Enzyme Technology, K. Buchhols, V. Kasche, U.T. Bornscheuer, Wiley-VCH, 2005
3. Biocatalizadores, del laboratorio a la industria. Elizabeth Lewkowicz Comp. Colección Nuevos enfoques en Ciencia y Tecnología, Editorial UNQ, 2011.
4. Carrier-bound Immobilized Enzymes, L.Cao, Wiley-VCH, 2005.
5. Biotransformations in organic chemistry, K. Faber, Springer-Verlag, 1997
6. Applied Biocatalysis, JMS Cabral, D. Best, L. Boross and J. Tamper Ed. Harwood academic publishers, 2000
7. Enzyme in Industry, W. Aehle, Ed. Wiley-VCH, 2007
8. Practical Biotransformations, Gideon Grogan, Wiley, 2009

Bibliografía de consulta

1. Enzyme catalysis in Organic Synthesis, K. Drauz and H. Waldmann eds., VCH, 1995
2. Protein immobilization, Fundamental and Applications, R.F. Taylor, ed. Marcel Dekker, Inc., 1991
3. Immobilization of enzymes & cells, J.M.Guisan (ed) Humana Press, 2006
4. Principios de Biotecnología, A. Weiseman, Acribia, 1986
5. Industrial Applications of immobilized biocatalysis, A. Tanaka, T. Tosa y T. Kobayashi, eds. Marcel Dekker, 1991
6. Immobilized cells: Basics and Applications, Progress in Biotechnology, Vol 11, Elsevier, 1996
7. Enzymes in synthetic Organic Chemistry, Wong and Whitesides, Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 12, Baldwin and Magnus Ed., Elsevier, 1995

8. Industrial Biotransformations, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Wiley-VCH, 2006.
9. Evolutionary Methods in biotechnology, S. Brakmann, A. Schwienhorst, Wiley-VCH, 2004.
10. An introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, J. R. Hanson, Verlag, 1995
11. Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes, Vicente Gotor, Wiley-VCH, 2008
12. Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media, Giacomo Carrea, Wiley-VCH, 2008
13. Multi-step Enzyme Catalysis, E. Garcia Junceda Ed, Wiley-VCH, 2008
14. Biotransformations, Biotechnology, Rehm and Reed Ed., Vol 8a (1995) and 8 b (2000)

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

Organización de las clases:

- La asignatura consta de clases divididas en sesiones teórico-prácticas, que incluyen clases teóricas, resolución de problemas y trabajos de laboratorio.
- Las clases teórico - prácticas consistirán en una discusión de los temas propuestos en las guías de estudio:
 0. Nivelatoria: Revisión de conceptos previos fundamentales para el cursado de la asignatura.
 1. Conceptos generales de biocatálisis y biotransformaciones.
 2. Búsqueda y diseño de biocatalizadores.
 3. Reacciones catalizadas por enzimas.
 4. Conceptos generales de inmovilización de biocatalizadores.
 5. Inmovilización no covalente.
 6. Inmovilización covalente.
 7. Inmovilización por atrapamiento.
 8. Biocatalizadores industriales.
 9. Biotransformaciones de interés industrial.
- En las clases de laboratorio se desarrollan los siguientes trabajos prácticos:

Trabajos de Laboratorio

TP N°1: Reacciones con células de distintas fuentes

Objetivos:

1. Familiarizarse con el uso de biocatalizadores de células enteras en crecimiento
2. Empleo de células de distintas fuentes: bacterias, hongos, levaduras y vegetales
3. Realizar biotransformaciones catalizadas por enzimas redox
4. Habitarse al manejo de técnicas de preparación de biocatalizadores y de análisis de muestras

Breve descripción de las actividades que se realizan.

El estudio de las reacciones de óxido-reducción biocatalizadas ha resultado de gran interés en los últimos años para realizar una gran variedad de procesos industriales especialmente utilizando células enteras que evita la regeneración del cofactor. En este trabajo práctico, se lleva a cabo la reducción de una cetona y un aldehído utilizando biocatalizadores de distintas fuentes con el fin de evaluar y comparar la *performance* de cada uno de ellos. Los biocatalizadores que se emplearán serán: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panificación), *Mucor piriformis* (un hongo del grupo Zygomycetes), *Pseudomonas putida* (una bacteria gram negativa) y *Daucus carota* (zanahoria).

TP N°2: Screening de enzimas

Objetivos:

1. Familiarizarse con el uso de biocatalizadores en forma de enzimas libres
2. Aprender sobre técnicas de screening de biocatalizadores y uso de medios no convencionales
3. Conocer sobre enzimas hidrolíticas y promiscuidad enzimática

Breve descripción de las actividades que se realizan

Las enzimas hidrolíticas o hidrolasas son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de enlaces de ésteres, amidas, epóxidos, entre otros, con la participación de un nucleófilo, el cual puede ser agua (reacciones de hidrólisis) o bien un alcohol (reacciones de transesterificación o de alcoholisis). De este modo, se las puede clasificar en diferentes tipos, siendo las de mayor uso las lipasas, esterasas, glicosidasas, amidasas/proteasas/acilasas, fosfolipasas y fosfatasas. En este trabajo práctico se compara el comportamiento de diferentes hidrolasas frente a dos sustratos, una amida y un éster, en biotransformaciones en medio acuoso y en medio orgánico y se pretende relacionar la actividad enzimática observada con el tipo de hidrolasas que fueron utilizadas.

TP N°3: Biocatalizadores modificados genéticamente

Objetivos

1. Comprobar ventajas y desventajas de emplear biocatalizadores genéticamente modificados
2. Llevar a cabo biotransformaciones con fosfohidrolasas

Breve descripción de las actividades que se realizan.

Actualmente una alternativa interesante, desde el punto de vista de los procesos, es utilizar técnicas de ingeniería genética que permitan sobre expresar enzimas de interés

en vectores de expresión. Una vez obtenidos los clones que contienen los fragmentos de la proteína a expresar, se los aísla, purifica y se los inserta en plásmidos de expresión transformando un microorganismo como *E. coli*.

Las fosfohidrolasas ácidas bacterianas (NSPAs), son enzimas no específicas capaces de hidrolizar enlaces fosfoéster o fosfoanhidrido de un amplio rango de compuestos orgánicos a pH ácido o neutro. Utilizando células enteras WT y genéticamente modificadas con actividad fosfatasa ácida de bacterias pertenecientes a la familia de las Enterobacterias, en el práctico, se prepara inosina monofosfato a partir de inosina usando pirofosfato de sodio como fuente económica de fosfato.

TP N°4: Inmovilización por adsorción

Objetivos

1. Familiarizarse con las metodologías de inmovilización de enzimas por adsorción
2. Aprender técnicas de determinación de carga y medición de actividad de biocatalizadores inmovilizados
3. Realizar reacciones de síntesis e hidrólisis con Lipasas

Breve descripción de las actividades que se realizan.

La inmovilización de biocatalizadores es un método que está ampliamente difundido para el uso de los mismos a nivel industrial ya que resulta en grandes mejoras en cuanto a operatividad (manipulación, recuperación y estabilidad del biocatalizador) y productividad, debido a la posibilidad de reuso. Los métodos de inmovilización pueden clasificarse de diversas formas y la selección del mismo depende del biocatalizador y de la aplicación. En este trabajo práctico se realiza la inmovilización de una lipasa por adsorción sobre una resina de intercambio iónico comercial, se evalúa la eficiencia de la inmovilización determinando la carga enzimática y la actividad hidrolítica, y se analiza su utilidad en la síntesis de un éster. Se compara respecto de la enzima libre.

TP N°5: Inmovilización covalente

Objetivos

1. Familiarizarse con las metodologías de inmovilización de enzimas por uniones covalentes
2. Aprender técnicas de determinación de carga y medición de actividad de biocatalizadores inmovilizados
3. Realizar reacciones de hidrólisis con proteasas

Breve descripción de las actividades que se realizan.

En este trabajo práctico se lleva a cabo la inmovilización de α -quimotripsina por dos metodologías diferentes de inmovilización covalente: la inmovilización covalente propiamente dicha sobre soportes poliméricos y la inmovilización por entrecruzamiento. Para el primer caso se emplea una resina comercial Lewatit y para el segundo se preparan CLEAs formando agregados por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En ambos casos se evalúa la eficiencia de la inmovilización determinando carga enzimática y actividad hidrolítica de un péptido.

TP N°6: Inmovilización por atrapamiento

Objetivos

1. Familiarizarse con las metodologías de inmovilización de células enteras por atrapamiento
2. Llevar a cabo biotransformaciones con transferasas
3. Utilizar caminos enzimáticos contenidos en células enteras en reposo

Breve descripción de las actividades que se realizan.

Los nucleósidos y desoxinucleósidos son intermediarios importantes en la síntesis de moléculas con actividad farmacológica. La síntesis química de estos compuestos es compleja debido a que requiere varios pasos de protección y desprotección de los grupos OH del azúcar. Una alternativa a este proceso es el uso de reacciones de transglicosidación, las cuales pueden llevarse a cabo mediante un proceso de dos pasos que involucra enzimas denominadas nucleósidofosforilasas. Para poder aumentar la productividad de este proceso, una opción interesante es la inmovilización por atrapamiento de las células enteras usadas como biocatalizadores para tal fin. En este trabajo se propone inmovilizar células de *Escherichia coli* en diversos soportes para evaluar y comparar su empleo en la reacción de obtención de adenosina partiendo de uridina y adenina respecto de las células libres.

TP N°7: Biotransformaciones multienzimáticas

Objetivos

1. Aprender sobre el uso de sistemas multienzimáticos: *one pot*, secuencial, cascada.
2. Utilizar biotransformaciones acopladas en síntesis complejas
3. Llevar a cabo biotransformaciones con liasas.

Breve descripción de las actividades que se realizan.

El desarrollo de biotransformaciones acopladas que permitan superar problemas no sólo sintéticos sino también económicos reviste especial interés cuando se concibe un proceso industrial de síntesis de fármacos. En este marco, la producción de desoxirribosa-5-fosfato con células de *E. carotovora* con actividad 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DERA) puede ser optimizada si se lleva a cabo una biotransformación previa que permita acumular 1,6-fructosa-bisfosfato (FBP), uno de los intermediarios metabólicos en la biosíntesis del sustrato de DERA. Esto puede lograrse aprovechando la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* de acumular FBP fuera de la célula en presencia de glucosa y fosfato cuando células de este microorganismo son tratadas con agentes porantes.

TP N°8: Biocatalizadores en la industria

Objetivos

1. Conocer acerca de otros usos industriales de las enzimas
2. Estudiar el caso particular de los agentes de limpieza

Breve descripción de las actividades que se realizan.

Las enzimas son utilizadas por la industria no solo como biocatalizadores industriales para preparar compuestos químicos o farmacológicos, sino que se emplean en muchos y muy variados procesos como ser en la producción de alimentos y bebidas, como herramientas de ayuda en procesos industriales o bien están presentes en productos finales como en los alimentos para animales, los biosensores o los productos de

limpieza. En este trabajo práctico se intenta preparar un detergente biológico para ropa y se compara su eficiencia con los productos comerciales.

Modalidad de evaluación:

- 1- Para la aprobación de los trabajos prácticos se evaluará el uso adecuado del cuaderno del laboratorio, la calidad y precisión de los datos obtenidos, la presentación oral y escrita del trabajo realizado y el desempeño en el laboratorio.
- 2- La asistencia a las clases de laboratorio es obligatoria. El trabajo no realizado por ausencia justificada o desaprobado debe recuperarse en las fechas propuestas.
- 3- Se rendirán un examen parcial escrito, un examen parcial oral y un examen integrador oral, calificados sobre 10 puntos cada uno. Todos ellos constan de su respectiva recuperación.
- 4- Los estudiantes que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y hubieran aprobado el examen integrador darán por aprobada la asignatura.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumnos/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

Modalidad de evaluación exámenes libres:

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los

especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

CRONOGRAMA TENTATIVO

Semana	Tema/unidad	Actividad*			Evaluación
		Teórico	Práctico		
			Res Prob.	Lab.	
1	Guía Nivelatoria	x	x		
2	Guía 1	x	x		
3	Guía 2- Guía 3	x	x		
4	Guía 4	x	x		
5	TP1			x	
6	TP2			x	
7	TP3			x	
8	TP3			x	
9	Temas 1 a 4		x		
10	Guía 5 -6	x	x		Parcial 1
11	Guía 7	x	x		
12	Guía 8-9	x			
13	TP4-5			x	
14	Temas 5 a 9.TP6	x		x	
15	Temas 5 a 9.TP7	x		x	
16	TP8		x	x	Parcial 2
17	Repaso. Recuperatorios		x		Recuperación Parciales
18	Integrador				Integrador

*INDIQUE CON UNA CRUZ LA MODALIDAD