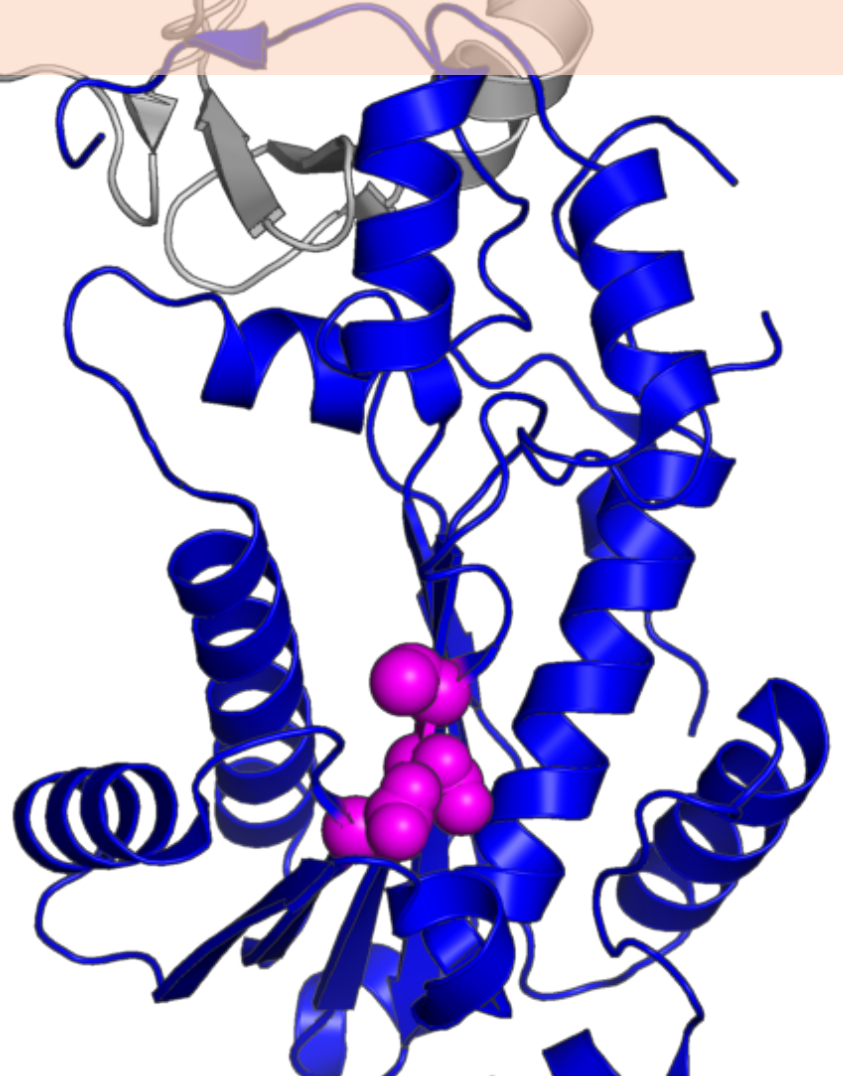




Enzimas de interés biotecnológico

Dra. Ing. María Teresita Castañeda



Copyright © Este apunte fue redactado por la Dra. María Teresita Castañeda para la cátedra de Biotecnología, perteneciente a la carrera de Ingeniería Química.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL- FACULTAD REGIONAL LA PLATA

Licencia plantilla Latex:

The Legrand Orange Book

LaTeX Template

Version 2.1.1 (14/2/16)

This template has been downloaded from: <http://www.LaTeXTemplates.com>

Original author:

Mathias Legrand (legrand.mathias@gmail.com)

with modifications by: Vel (vel@latextemplates.com)

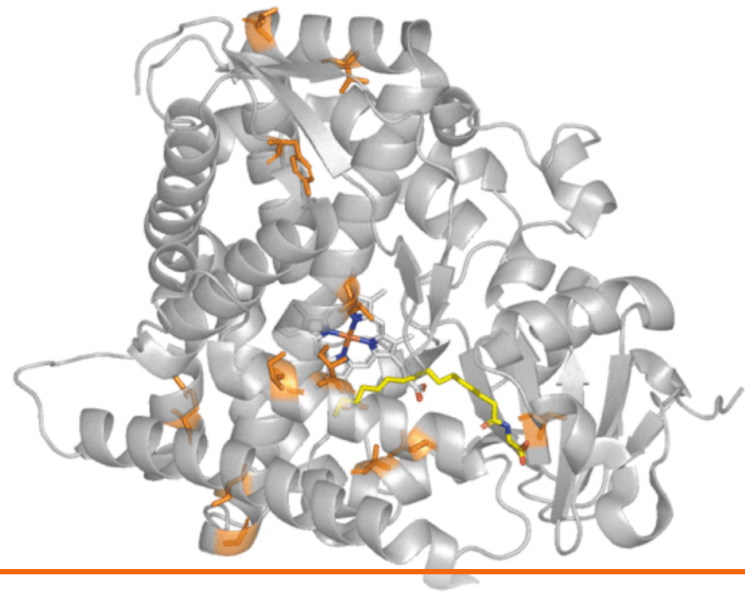
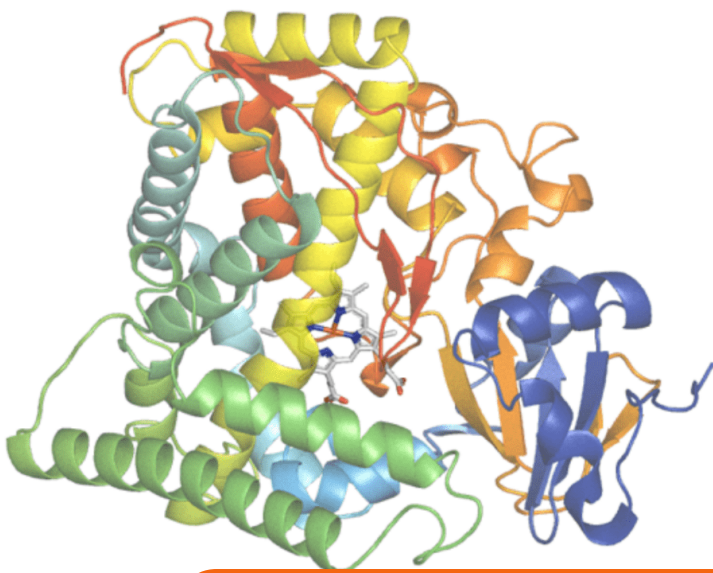
License: CC BY-NC-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

Año 2019



Índice general

1	Conceptos generales	5
1.1	Biocatalizadores	5
1.2	Estructura de las enzimas	6
1.3	Nomenclatura de las enzimas	8
1.4	Clasificación de enzimas	9
1.5	Mecanismo de catálisis enzimática	10
1.6	Cinética enzimática	11
1.7	Determinación de parámetros cinéticos	13
1.8	Actividad enzimática	14
2	Producción biotecnológica de enzimas	15
2.1	Enzimas microbianas	15
2.2	Producción biotecnológica de enzimas microbianas	16
2.3	Operaciones del Upstream	17
2.4	Fermentación	18
2.5	Operaciones del Downstream	18
2.5.1	Recuperación del biocatalizador	19
2.5.2	Purificación del biocatalizador	19
2.5.3	Formulación del biocatalizador	21
2.6	Aplicación industrial de enzimas	21
3	Bibliografía de referencia	23



1. Conceptos generales

En este capítulo veremos los conceptos generales sobre uno de los productos biotecnológicos más empleados en la industria. Su conocimiento es fundamental para el ingeniero químico, ya que permite ampliar el espectro de catalizadores que pueden utilizarse en un proceso químico. Abordaremos en este capítulo los conceptos generales sobre su naturaleza, clasificación y mecanismo de catálisis.

1.1 Biocatalizadores

Muchas de las reacciones químicas presentes en la naturaleza requieren de catalizadores para poder aumentar la velocidad a la que ocurren espontáneamente. Los catalizadores pueden definirse como moléculas que aumentan la velocidad de una reacción termodinámicamente favorable, mediante la disminución de la barrera energética de dicha reacción. En la Figura 1.1 puede observarse un esquema simplificado del mecanismo de funcionamiento de los catalizadores. El catalizador interactúa con los sustratos o reactivos formando un complejo transitorio el cual reduce significativamente la energía de activación de la reacción (E_a), para luego dar lugar a los productos previo a la liberación del catalizador, el cual no se ve afectado durante la reacción.

Los catalizadores que actúan específicamente en reacciones bioquímicas, es decir en reacciones que intervienen en el metabolismo de seres vivos, se conocen como enzimas o biocatalizadores. Las enzimas son proteínas de elevado peso molecular y altamente específicas. En los organismos vivos intervienen en reacciones metabólicas (Fig. 1.2) de forma óptima para luego ser liberadas sin alteración funcional. Esto permite que la enzima pueda emplearse en sucesivas reacciones, lo que las hace uno de los catalizadores más eficientes de la naturaleza.

Desde los inicios de la enzimología aplicada existen amplias controversias sobre si las enzimas aisladas de los organismos vivos pueden actuar como biocatalizadores de la misma forma que actúan en el organismo de origen. Sin embargo, hasta la actualidad, las enzimas han logrado aislarse, purificarse, inmovilizarse y emplearse exitosamente en diversos procesos tecnológicos, convirtiéndose en un área de especial interés para la industria en general.

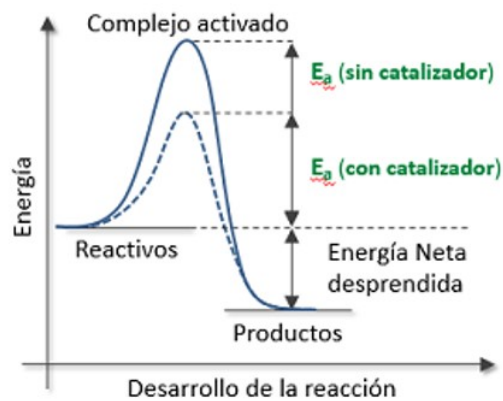


Figura 1.1: Reacción catalizada

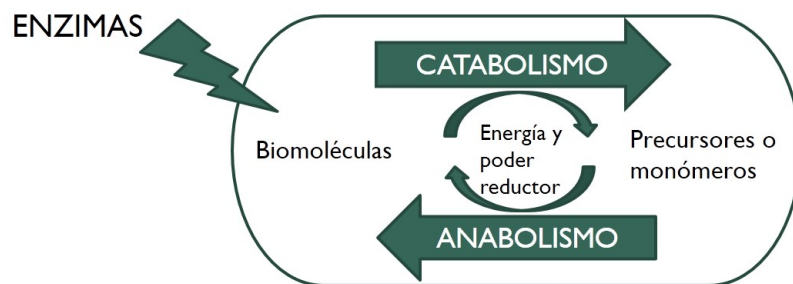


Figura 1.2: Rol de las enzimas en el metabolismo

1.2 Estructura de las enzimas

Todas aquellas propiedades que hacen de las enzimas un catalizador altamente eficiente derivan de su estructura. Las enzimas tienen naturaleza proteica y por ende presentan las estructuras básicas de las proteínas. Ya se ha visto anteriormente en la materia las estructuras de las proteínas, con lo cual las mencionaremos brevemente solamente con la intención de recordarlas. La estructura más elemental de las enzimas es la estructura primaria, la cual consiste en la unión secuencial de aminoácidos por enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente (Fig. 1.3).

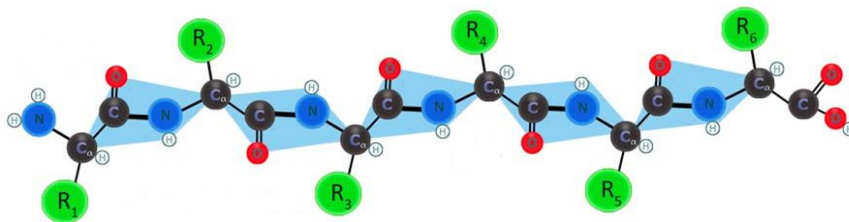


Figura 1.3: Estructura primaria de las enzimas

La secuencia con la cual se unen los aminoácidos, así como la naturaleza de los residuos (R), definen las características y el comportamiento de las enzimas.

Los aminoácidos próximos en la cadena polipeptídica pueden interactuar mediante enlaces puentes de hidrógeno entre los grupos amidas dando lugar a dos tipos de conformaciones espaciales, conocidas como estructura secundaria: α hélice (la más predominante en enzimas) y β lámina (Fig. 1.4).

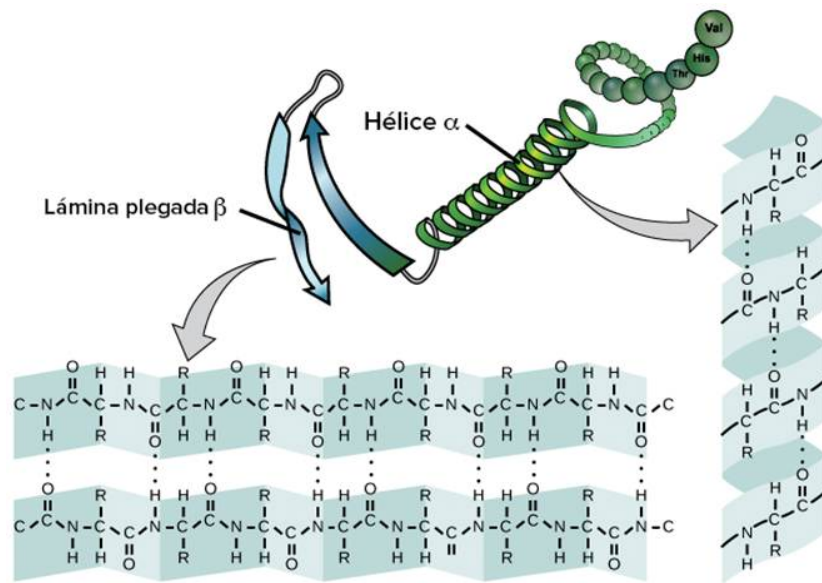


Figura 1.4: Estructura secundaria de las enzimas

Además, de estas interacciones entre aminoácidos próximos, también tienen lugar interacciones entre los R de aminoácidos produciendo un plegamiento adicional de las configuraciones nombradas. Estos plegamientos resultan en una estructura tridimensional más compleja, denominada estructura terciaria (Fig. 1.5). Las interacciones entre dichos R pueden ser muy diversas comprendiendo: enlaces puentes disulfuro, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc. Como resultado de estos enlaces, en un ambiente hidrofílico, la superficie de la proteína es rica en R de aminoácidos polares, mientras que los R hidrofóbicos quedan principalmente agrupados en el interior de la macromolécula, en tanto que lo inverso ocurre en un entorno hidrofóbico. Las enzimas presentan estructura terciaria globular, lo que les confiere algunas de sus propiedades más características como la solubilidad en agua.

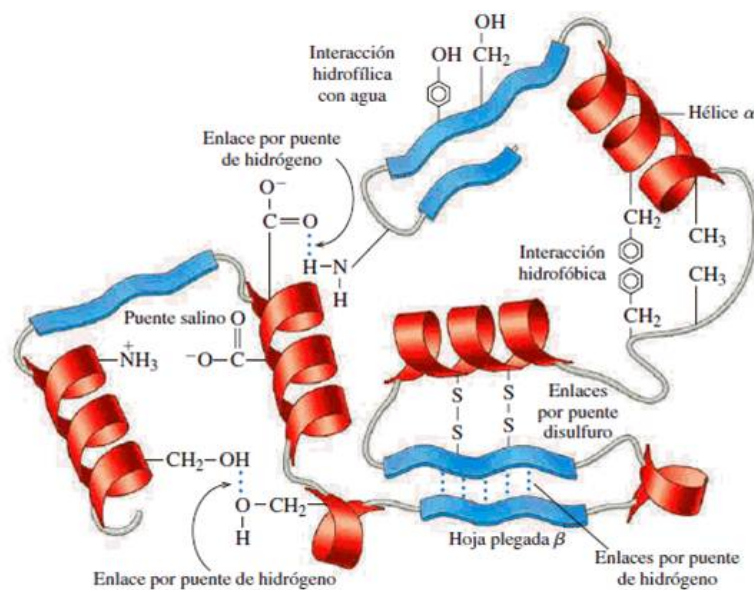


Figura 1.5: Estructura terciaria de las enzimas

Algunas enzimas pueden contar con una estructura cuaternaria constituida por varias cadenas polipeptídicas, conformando subunidades, las cuales pueden tener o no la misma función catalítica dentro de este complejo (Fig 1.6).

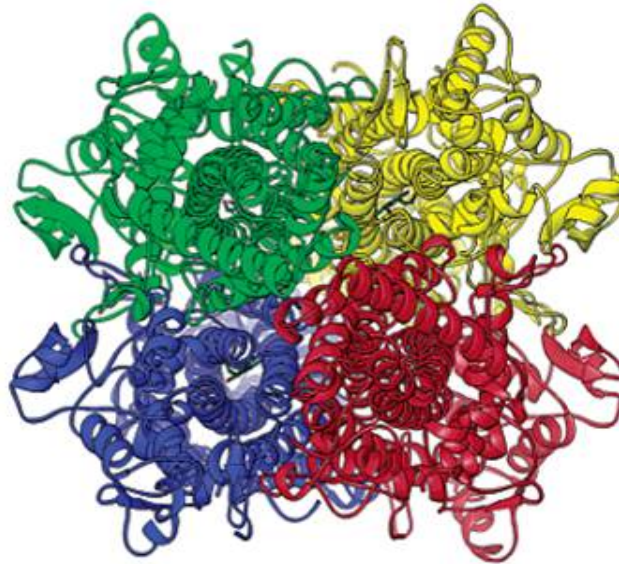


Figura 1.6: Estructura cuaternaria de las enzimas

La funcionalidad biológica de las enzimas depende de su estructura nativa, la cual se basa en la estructura tridimensional más estable de la proteína bajo condiciones fisiológicas. Si bien la estructura tridimensional de la enzima está determinada genéticamente, estará condicionada por el medio en que se encuentran. Este hecho reviste importancia a la hora de trabajar con enzimas, ya que el medio que las rodea puede diferir al entorno original donde fueron sintetizadas, con lo cual deben tomarse las precauciones para evitar pérdidas de funcionalidad.

Finalmente, es importante mencionar que algunas enzimas pueden conjugarse con diferentes macromoléculas como glúcidos, lípidos, ácidos nucleicos, etc., o bien con iones metálicos. Dichas enzimas se denominan holoenzimas y la parte no proteica conjugada se conoce como grupo prostético. Los grupos prostéticos están fuertemente unidos a las apoenzimas (grupo proteico) y no se disocian durante la catálisis.

1.3 Nomenclatura de las enzimas

Las enzimas se nombran de acuerdo a la reacción química que catalizan y el sustrato que interviene en la misma, con la terminación *-asa*. Estas tienen en general nombres comunes, sencillos y de amplio uso en la bibliografía, y un nombre sistemático que es el que corresponde por norma para definirla correctamente. Por ejemplo la enzima aldehído reductasa (nombre común) es correctamente nombrada como: aldito:NAD(P)⁺ 1- oxidorreductasa (nombre sistemático).

Además del nombre, las enzimas pueden identificarse, de acuerdo a la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular (IUBMB), con un número (EC) compuesto por cuatro dígitos:

- 1° dígito: Identifica a las enzimas por la familia o categoría a la cual pertenecen.
- 2° dígito: Indica el subgrupo dentro de la familia, el cual está relacionado con la tipología del grupo químico sobre el cual actúa.
- 3° dígito: Se refiere a la subclase dentro del subgrupo, el cual identifica el grupo químico específico que interviene en la reacción.

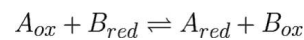
- 4° dígito: Se trata de un número correlativo que las identifica dentro de la subclase.

En la siguiente sección veremos la clasificación de enzimas que definen el primer dígito del número EC.

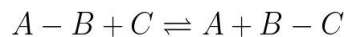
1.4 Clasificación de enzimas

En lo que refiere a la clasificación de las enzimas, pueden distinguirse 6 categorías generales de acuerdo al tipo de reacción que catalizan:

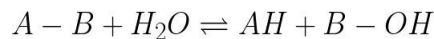
- Oxidorreductasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, que consisten en transferencia de electrones, hidrógeno u oxígeno. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “donor:aceptor oxidorreductasa”. Un ejemplo de esta familia es la Glucosa oxidasa (Beta-D-glucosa:oxígeno 1-oxidorreductasa): EC 1.1.3.4.



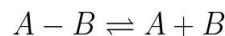
- Transferasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la transferencia de un grupo químico específico, como puede ser metil, acil, amino, glicosil, o fosfato, desde un compuesto a otro. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por “donor:aceptor grupo transferido-transferasa”. Un ejemplo de esta familia es la Glucoquinasa (ATP:D-glucosa 6-fosfotransferasa): EC 2.7.1.2.



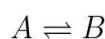
- Hidrolasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la escisión hidrolítica principalmente de los grupos C-O, C-N y C-C. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato hidroxilasa”. Un ejemplo de esta familia es la Lactasa (lactosa galactohidrolasa): 3.2.1.108.



- Liasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la escisión no hidrolítica y no oxidativa de los grupos C-O, C-N y C-C, dando lugar a un doble enlace en los productos. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato prefijo-liasa”. Un ejemplo de esta familia es la PAL (L-Fenilalanina amonio-liasa): 4.3.1.24



- Isomerasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan el reacomodamiento geométrico o estructural dentro de la molécula, sin cambiar la composición atómica del producto. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato prefijo-isomerasa”. Un ejemplo de esta familia es la Glucosa isomerasa: EC 5.3.1.5.

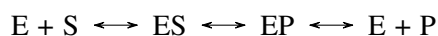


- Ligasas: Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la unión covalente entre dos moléculas. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “X:Y ligasa”. Un ejemplo de esta familia es la Piruvato carboxilasa (piruvato: dióxido de carbono ligasa) EC: 6.4.1.1.



1.5 Mecanismo de catálisis enzimática

La catálisis enzimática comienza cuando una enzima (E) se encuentra con un sustrato con el cual puede interactuar (S). Esta interacción da lugar a un estado transitorio o intermediario denominado complejo enzima-sustrato (ES). La energía asociada a la formación de este complejo impulsa la formación del complejo activado, el cual está asociado a una menor energía libre que el estado transitorio de la reacción sin catalizar. Seguidamente, la reacción prosigue con la formación del complejo enzima-producto (EP), el cual es el intermediario previo a la liberación de P y E.



El mecanismo por el cual una enzima cataliza una reacción comienza con la interacción de la enzima (E) con el sustrato (S). Esta interacción tiene lugar en un sitio muy específico de la enzima, denominado sitio activo (Fig. 1.7). El sitio activo de la enzima es un pequeño espacio tridimensional de la proteína constituido por unos pocos R de aminoácidos donde se lleva a cabo propiamente la catálisis, sirviendo el resto de la enzima como soporte del sitio activo.

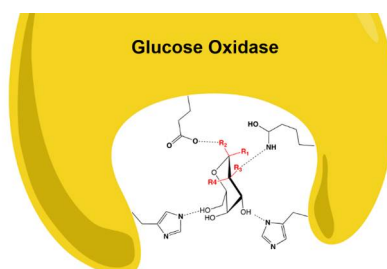


Figura 1.7: Sitio activo

Existen diferentes teorías acerca de cómo interacciona el sustrato con el sitio activo para conformar el complejo transitorio enzima-sustrato. De acuerdo al modelo de llave-cerradura (Fig. 1.8-A), el sitio activo de la enzima tiene una geometría espacial tal que el sustrato con una geometría complementaria encaja perfectamente en el mismo. Por otro lado, el modelo de ajuste inducido (Fig. 1.8-B) sugiere que el sustrato induce un cambio en la conformación del sitio activo de la enzima luego de hacer contacto con la misma. Este último explicaría la posibilidad de que una enzima pueda emplear como sustrato compuestos químicamente similares.

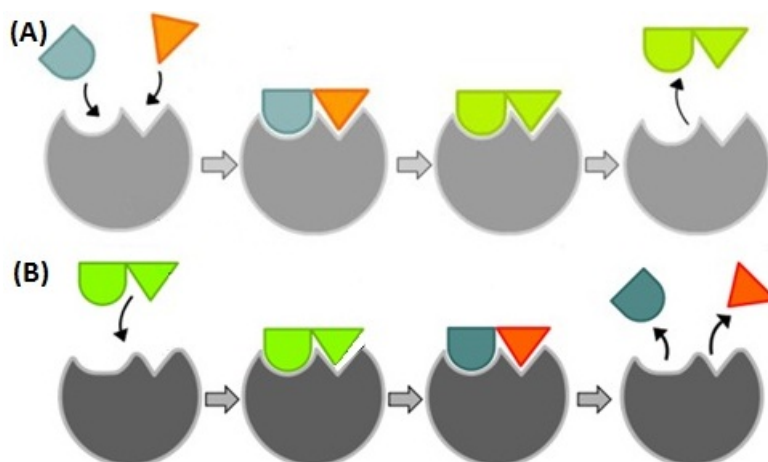


Figura 1.8: Modelos de la interacción E y S

Algunas enzimas, a su vez, requieren de ciertos compuestos para llevar a cabo la catálisis. Estos compuestos se conocen como cofactores y coenzimas. La diferencia entre éstos se ilustra en la Figura 1.9. Los cofactores son iones metálicos que se unen fuertemente a la enzima en forma reversible, con lo cual no se disocian durante la reacción y no sufren alteración alguna, mientras que el término coenzima está asociado a pequeñas moléculas orgánicas que se unen también reversiblemente a la enzima pero lo hacen durante la reacción, sin formar parte de su estructura.

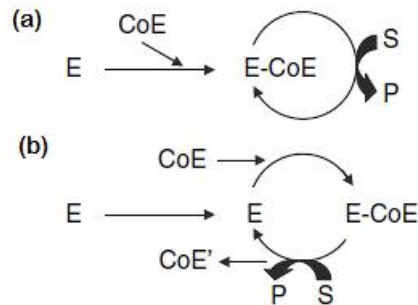
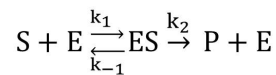


Figura 1.9: (a) Cofactores y (b) Coenzimas

1.6 Cinética enzimática

Dado que las enzimas son catalizadores biológicos es importante determinar la velocidad a la cual transcurre la catálisis. Para ello, usaremos el caso mas simple que es aquel en el que hay un único sustrato (S) y un único producto (P).



Para calcular la velocidad a la que ocurre esta reacción existen diversos abordajes, los más conocidos son los de Michaelis-Menten y Briggs-Haldane. En este apunte consideraremos una combinación de ambos. Michaelis-Menten asume que la velocidad de formación de P es mucho menor que la velocidad reversible de ES, o sea $k_2 \ll k_{-1}$, por ende la formación de P determina la velocidad de reacción. En ecuaciones esto es:

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2[ES]$$

Para hallar la concentración del complejo [ES] debemos tener en cuenta el abordaje de Briggs-Haldane, el cual propone que el cambio de la concentración de [ES] respecto al tiempo es insignificante, lo que implica que el [ES] se consume a la vez que se produce. Luego,

$$\text{Velocidad de producción: } \frac{dES}{dt} = k_1[E][S]$$

$$\text{Velocidad de consumo: } -\frac{dES}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Igualando ambas velocidades tenemos que:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Seguidamente despejamos las constantes,

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Dado que como dijimos anteriormente $k_2 \ll k_{-1}$:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_m$$

La constante K_m se denomina constante de Michaelis-Menten.

Seguidamente despejamos [ES]:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

La concentración total de enzima $[E_0]$ es fácilmente medible, no así la concentración libre de enzima [E] (no asociada al complejo ES). Ambas se relacionan de la siguiente manera: $[E] = [E_0] - [ES]$. Reemplazando en la ecuación anterior:

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{K_m}$$

Reordenando:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

Reemplazando el valor de [ES] en la ecuación de la velocidad tenemos:

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

La constante k_2 se conoce como k_{cat} . Además, cuando se cumple que $[ES] = [E_0]$, $v = v_{max}$. De lo anterior, tenemos que:

$$v_{max} = k_{cat}[E_0]$$

Reemplazando la expresión de k_{cat} en la ecuación de velocidad, nos queda la siguiente expresión:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta última se conoce como ecuación de Michaelis-Menten y se representa en la Figura 1.10.

A partir de esta ecuación podemos inferir que a bajas concentraciones de sustrato ($S \leq 0,05K_m$), la reacción es de primer orden, mientras que a concentraciones elevadas de sustrato ($S \geq 100K_m$) la reacción es de orden cero, con lo cual la velocidad no dependerá de la concentración de sustrato y el sistema se dice que está saturado. Por otro lado, K_m es igual a la concentración de sustrato para la cual $v = v_{max}/2$.

Los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} brindan información sobre la afinidad de una enzima respecto a un sustrato determinado. Por un lado, la constante K_m es un parámetro característico de

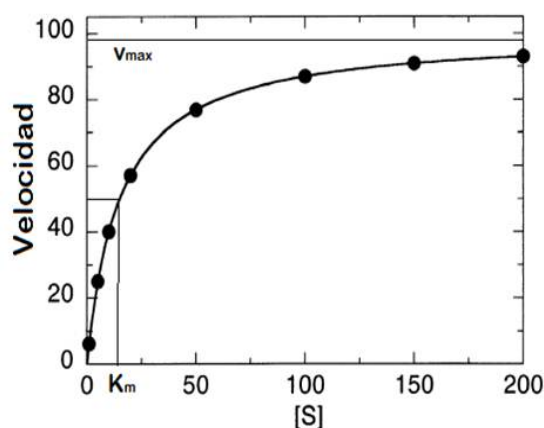


Figura 1.10: Cinética de Michaelis-Menten

las enzimas, que puede variar empleando diferentes sustratos y modificando algunos parámetros de reacción como la temperatura, el pH, etc. Por otro lado, k_{cat} es también conocido como número de recambio y se define como la cantidad de moléculas de producto formado, por molécula de enzima por unidad de tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]}$$

A partir de la ecuación anterior podemos concluir que a una concentración de enzima dada y en condiciones saturantes de sustrato, k_{cat} representa la máxima velocidad a la cual puede transcurrir la reacción catalizada. El cociente k_{cat}/K_m es el mejor índice de la eficiencia enzimática y es conocido también como constante de especificidad. Esta constante permite comparar diversas enzimas, la misma enzima con diversos sustratos e incluso la eficiencia de la enzima en una reacción reversible. Una mayor constante de especificidad implica un mayor número de recambio (elevada k_{cat}) y mayor afinidad por el sustrato (menor K_m).

1.7 Determinación de parámetros cinéticos

La representación de Michaelis-Menten, en la cual se relaciona la velocidad de formación de P con la concentración de S, permite observar a simple vista si existe una correlación de los datos obtenidos con el modelo de Michaelis-Menten. No obstante, este tipo de representación no es útil a la hora de calcular con precisión las variables cinéticas, tales como K_m o v_{max} . Para ello, se han empleado a lo largo de la historia diferentes ecuaciones que surgen de la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten. La más utilizada es la linealización de Lineweaver–Burk. Ésta se basa en obtener el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten, dando una ecuación que representa $1/v$ en función de $1/S$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}}$$

Mediante la ecuación anterior se puede determinar el valor de v_{max} por medio de la ordenada al origen y K_m por la pendiente de la recta (Fig. 1.11).

Este tipo de representación depende mucho de la exactitud de los valores experimentales y por ende puede acarrear un error en la determinación de los parámetros cinéticos. Sin embargo continúa siendo uno de los métodos de más empleados para estos fines. Otros métodos de linealización para la determinación de las constantes cinéticas se presentan en la Tabla 1.1.

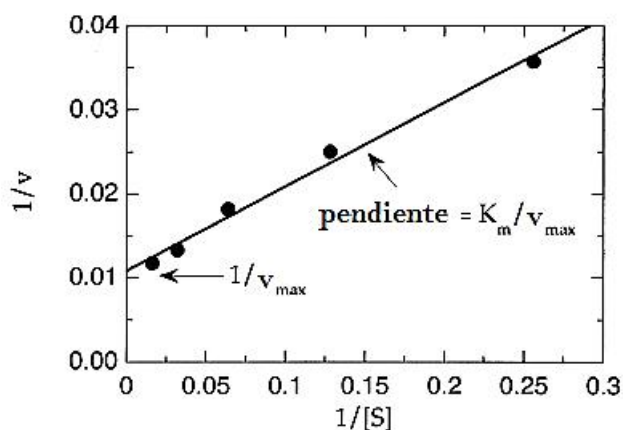


Figura 1.11: Linealización de Lineweaver–Burk

Tabla 1.1: Métodos de linealización de la ecuación de Michaelis-Menten

Método gráfico	Ecuación	Ordenada	Abscisa
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}}$	$\frac{1}{v}$	$\frac{1}{S}$
Langmuir	$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{S}{v_{max}}$	$\frac{S}{v}$	S
Eadie-Hofstee	$v = v_{max} - K_m \frac{v}{S}$	v	$\frac{v}{S}$
Hanes-Wolff	$\frac{S}{v} = \frac{S}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}}$	$\frac{S}{v}$	S

1.8 Actividad enzimática

La velocidad de catálisis enzimática (v) se mide a partir de la actividad enzimática (AE). Esta nos da una idea de que tan eficiente (veloz) es una enzima para llevar a cabo una biotransformación, en determinadas condiciones (pH, temperatura, etc.). La AE se puede determinar midiendo la formación del producto en la mezcla de reacción o bien el consumo del sustrato en la misma. La elección de uno u otro método dependerá fundamentalmente de la facilidad de cuantificación de los mismos, la exactitud de la medida, el equipamiento requerido, la posibilidad de interferencia por contaminantes, la estabilidad de la reacción, el costo, etc. La unidad que permite cuantificar la AE se denomina unidad enzimática y se representa con la letra U. La definición de una U depende de la enzima que se trate y debe aclararse las condiciones de ensayo (tiempo, pH y temperatura). Una U es la cantidad de enzima que cataliza la disminución de una cantidad de sustrato o la producción de una cantidad de producto por unidad de tiempo. Podemos expresar la AE de diferentes maneras. Por un lado, la actividad total representa todas las U que tiene el extracto enzimático. A partir de la AE total se puede calcular la AE volumétrica como el cociente entre la AE total y el volumen del extracto y se expresa normalmente en U/ml. Finalmente, la AE específica es la relación entre la AE total y la cantidad de proteínas en la mezcla y se expresa en U/mg. Esta última también puede calcularse a partir de la AE volumétrica dividiendo la misma por la concentración de proteínas. Estas medidas me permiten tener una idea de que tan ‘rico’ es el extracto enzimático en la enzima de interés. También es una medida de como se va enriqueciendo la mezcla en la enzima de interés durante la purificación. Este último concepto se verá en detalle en el siguiente capítulo.



2. Producción biotecnológica de enzimas

En este capítulo veremos en forma muy resumida como se producen biotecnológicamente las enzimas de interés industrial. Nos enfocaremos en las enzimas de origen microbiano, ya que son las más empleadas en la actualidad. Se abordará el bioproceso en forma general y se verá en mayor profundidad las etapas de downstream, ya que el upstream y la etapa de fermentación en si misma se verán mas adelante en el transcurso de la materia.

2.1 Enzimas microbianas

A lo largo de la historia las enzimas se han aislado de fuentes naturales (vegetal, animal y microbiano) para su empleo en diferentes procesos químicos y bioquímicos. A partir de la década del '60 las enzimas microbianas (principalmente amilasas y proteasas) comenzaron a reemplazar gran parte de las enzimas de origen vegetal y animal. En la década del '70, con la introducción de la ingeniería genética y la biología molecular, se lograron obtener microorganismos recombinantes, los cuales aumentaron la productividad y por ende, disminuyeron los costos de los biocatalizadores microbianos. En la Figura 2.1 se muestran los tipos de microorganismos mas empleados para la producción de enzimas microbianas.

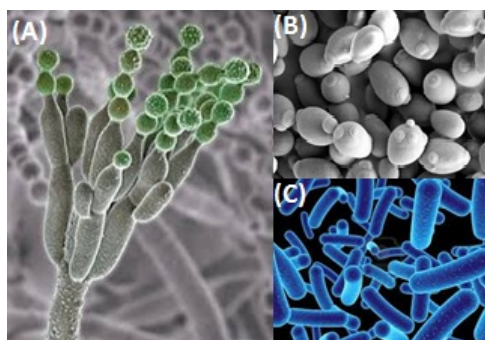


Figura 2.1: Microorganismos utilizados para la producción de enzimas: (A) hongos filamentosos, (B) levaduras y (c) bacterias.

Actualmente, la industria de enzimas microbianas representa aproximadamente un 90 % del mercado de biocatalizadores. Esto es consecuencia de algunas propiedades de los microorganismos que los diferencian de las demás fuentes naturales como las plantas y animales: tienen un metabolismo muy vigoroso, son versátiles y fáciles de propagar a gran escala, son fácilmente manipulables ya sea genéticamente o mediante cambios en su medio ambiente, sus requerimientos nutricionales son simples y no estacionales, etc. Esto hace que la producción de enzimas a partir de microorganismos sea relativamente simple, barata y confiable.

2.2 Producción biotecnológica de enzimas microbianas

A la hora de diseñar el bioproceso para la producción de enzimas microbianas deben tenerse en cuenta una serie de variables que definirán el número de etapas y el tipo de operaciones unitarias. El proceso para la producción de enzimas microbianas depende de la escala a la que se trabaje. Esta puede variar desde escala de laboratorio (para algunas enzimas muy específicas) a escala industrial para la producción de enzimas de uso masivo, las cuales se consideran hoy en día commodities. Otro factor a tener en cuenta es la pureza requerida, ya que no es lo mismo un producto de grado farmacéutico que una enzima para uso doméstico. A mayor pureza requerida, mayor será el número de operaciones del proceso y por ende el costo del producto. Por otro lado, debe considerarse la fuente natural de la enzima, o sea el tipo de microorganismo que la sintetiza (hongo filamentoso, bacteria, levadura). Como vimos ya en esta materia la morfología y la fisiología de estos microorganismos es muy diferente y, por lo tanto, la forma en que se cultiva y sus requerimientos nutricionales serán diferentes. Por último, es fundamental conocer si la enzima que vamos a producir se trata de una enzima intracelular (si es retenida dentro de la células) o extracelular (se excreta al medio de cultivo). De ello dependerán las operaciones unitarias que conformarán el proceso, fundamentalmente las etapas del downstream.

El diseño de un bioproceso para la producción de enzimas incluye una serie de etapas previas al proceso de síntesis, las cuales se conocen como Upstream y etapas posteriores o de separación conocidas como Downstream (Fig. 2.2). En las siguientes secciones se describirán sintéticamente estas etapas.

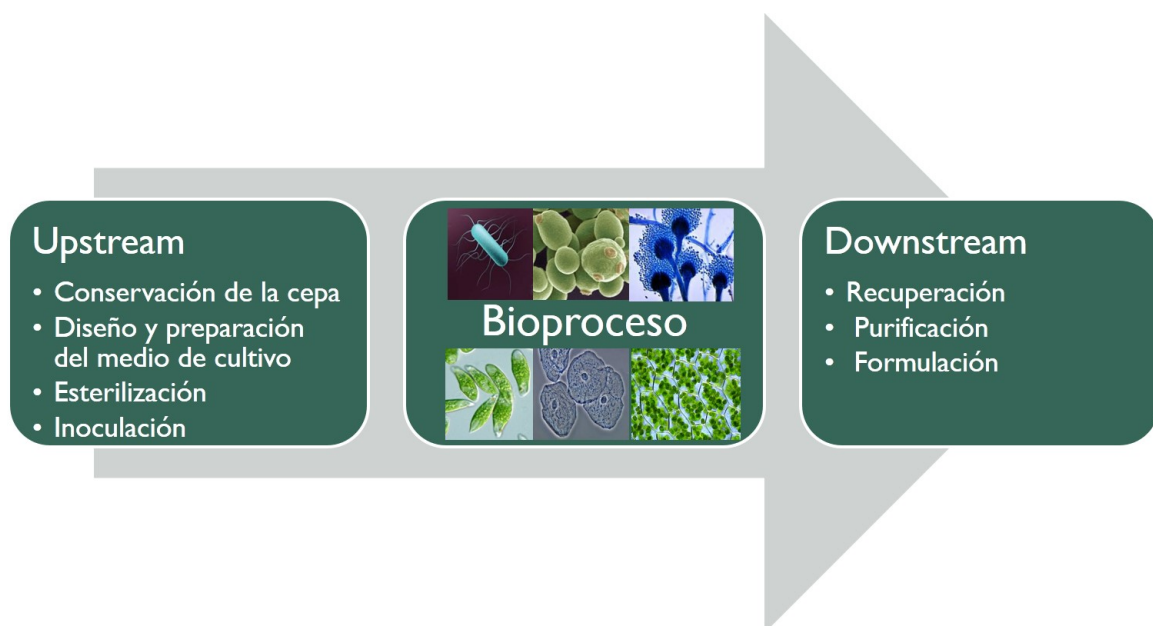


Figura 2.2: Etapas del bioproceso para la producción de enzimas

2.3 Operaciones del Upstream

Se trata de todas las operaciones previas al proceso fermentativo. Estas operaciones se verán en detalle más adelante en la materia, por lo tanto solamente se mencionarán brevemente las etapas más importantes.

La primera etapa es el mantenimiento y propagación de la cepa para la producción del inóculo (Fig. 2.3). Normalmente las enzimas se producen a partir de culturas puras, esto es, solamente debe estar presente el microorganismo de interés. Por ello, es importante mantener un stock del mismo en condiciones cultivables (congelado, liofilizado, etc) y propagarlo para generar suficiente cantidad de masa microbiana para inocular el biorreactor donde se llevará a cabo la fermentación.

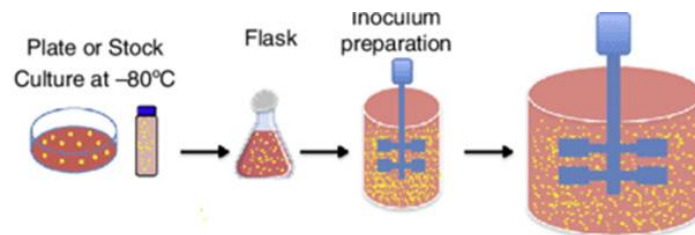


Figura 2.3: Producción del inóculo

En paralelo, se lleva a cabo la formulación y preparación del medio del cultivo. Este tendrá todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos y la producción de la enzima (inducción enzimática). La calidad y cantidad de los nutrientes dependerá del costo del mismo, la escala y los requerimientos nutricionales del microorganismo, entre otros. Si bien muchos de estos datos están en bibliografía es recomendable llevar a cabo la optimización del medio de cultivo para maximizar la producción de la enzima y minimizar los efluentes del proceso.

Como ya mencionamos anteriormente, normalmente las enzimas se producen en cultivos puros, con lo cual, tanto el medio de cultivo como el biorreactor y todo lo que ingresa al mismo (por ej. aire) deben esterilizarse. Esta operación consiste en eliminar completamente la carga (número) de microorganismos presentes en el material debido al contacto con el ambiente, el operario, etc. El material esterilizado resultará libre de microorganismos y estará apto para ser inoculado con el microorganismo de interés. Normalmente la esterilización se lleva a cabo por tratamiento térmico (en autoclaves o intercambiadores de calor) o bien por filtración absoluta en caso de componentes del medio de cultivo termolábiles.

Las etapas mencionadas anteriormente se integran en la Figura 2.4.

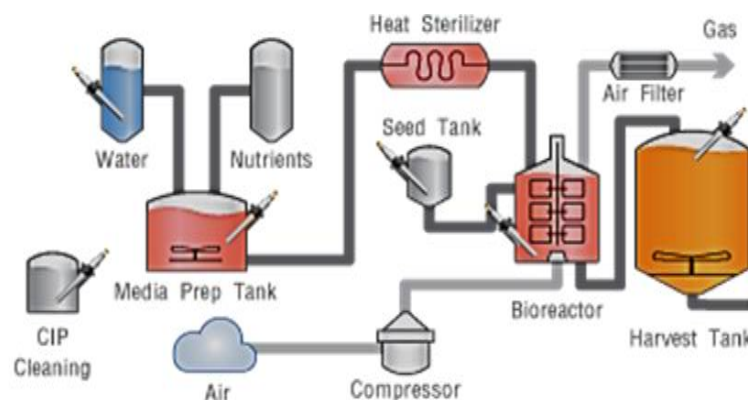


Figura 2.4: Upstream del bioproceso

2.4 Fermentación

Es el proceso en el cual se lleva a cabo propiamente la fermentación, entendiendo como tal, la etapa (aeróbica o anaeróbica) donde acontece el crecimiento del microorganismo y la producción de productos (ej. enzima) a expensas de los nutrientes del medio de cultivo. En las siguientes clases se verá en detalle esta etapa. Se estudiará la estequiometría y la cinética del proceso, se verán las diferentes configuraciones de biorreactores y se estudiarán los diferentes sistemas de cultivos para lograr el objetivo deseado. Debido a ello, nos limitaremos a decir que las enzimas pueden producirse en cultivo líquido sumergido (FLS) o en sustrato sólido (FSS). En la FLS hay una gran cantidad de agua libre disponible y los nutrientes se encuentran en solución. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse las variables y puede emplearse para una amplia variedad de microorganismos. En contraste, la fermentación en sustrato sólido (FSS) es aquella en la cual no hay agua libre, por lo cual el microorganismo (usualmente hongos filamentosos) crecen sobre la superficie de un soporte sólido húmedo (normalmente una mezcla de residuos agroindustriales). Dada la dificultad para mezclar y controlar el sistema no es muy utilizado en la actualidad, salvo en casos especiales. Lo mencionamos aquí ya que ha sido utilizado (sobre todo en países orientales) para producir enzimas a partir de hongos filamentosos. De aquí en mas, continuaremos el estudio para fermentación en cultivo líquido sumergido (FLS).

2.5 Operaciones del Downstream

El downstream del proceso incluye todas aquellas etapas posteriores a la fermentación tendientes a la recuperación y formulación del producto de interés biotecnológico, en nuestro caso el biocatalizador. Debido a que el downstream pueden incluir un gran número de operaciones unitarias, llega a representar alrededor del 60% de los costos de producción, los cuales se reflejarán en el precio final del producto. Debido a ello, la elección correcta de la secuencia y de las operaciones involucradas es fundamental. En lo que respecta a las operaciones que engloba el downstream del proceso, podemos distinguir tres grupos fundamentales: la recuperación del biocatalizador, la purificación del biocatalizador y la formulación del biocatalizador (Fig. 2.5). En las próximas secciones se describirá brevemente cada una de ellas.

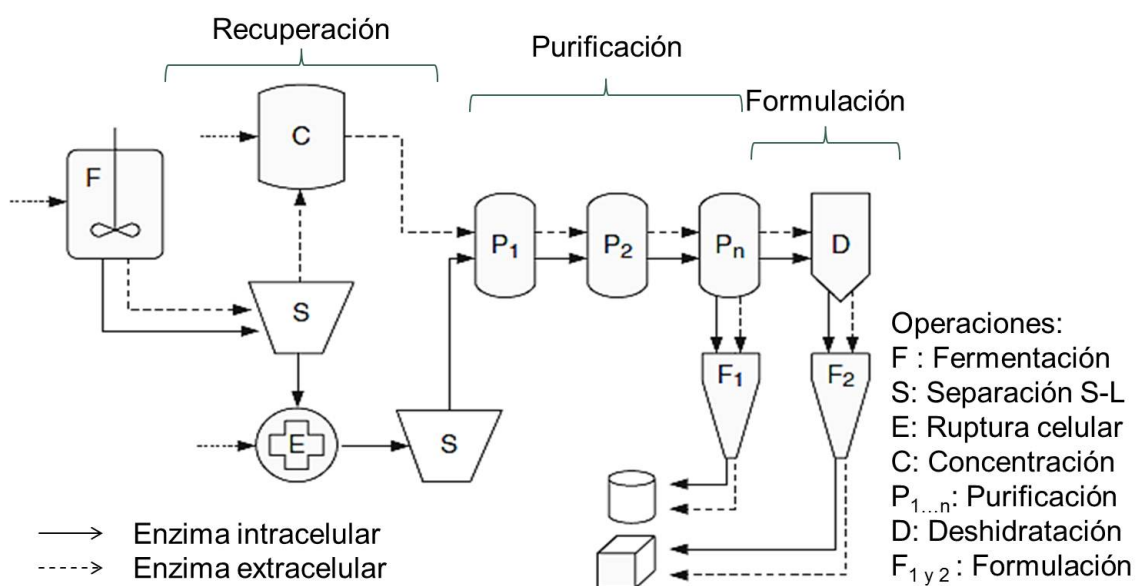


Figura 2.5: Downstream del bioproceso

2.5.1 Recuperación del biocatalizador

Las operaciones de recuperación tienen como objetivo aislar el biocatalizador del medio circundante. En el caso de biocatalizadores producidos a partir de microorganismos, el medio circundante es el medio de cultivo en el cual se encuentra inmerso el microorganismo productor y el biocatalizador. De acuerdo a la naturaleza del biocatalizador, dependerán las operaciones destinadas a su recuperación:

- **Enzimas extracelulares:** se trata de aquellas enzimas que se producen y se excretan al exterior de la célula. En este caso, la enzima quedará diluida en el medio de cultivo con lo cual las operaciones de recuperación incluirán la separación de las células del medio de cultivo conteniendo la enzima (extracto enzimático) y la concentración de dicho extracto. Debido a que el extracto enzimático contiene los componentes del medio de cultivo más las sustancias excretadas por las células, requerirá de técnicas de purificación adicionales.

- **Enzimas intracelulares:** son aquellas enzimas que quedan retenidas dentro de las células. En este caso, las operaciones de recuperación incluirán la separación de las células (conteniendo la enzima) del medio de cultivo. Una vez obtenido el pellet de biomasa puede optarse por liberar la enzima de la célula por ruptura celular, obtener el extracto enzimático y proceder a la purificación de dicho extracto, o bien puede emplearse la célula como soporte de la enzima mediante técnicas de permeabilización selectiva de la membrana plasmática. Las operaciones de recuperación utilizan las diferencias entre las propiedades físico-químicas de las sustancias a separar. El criterio de elección de estas operaciones debe priorizar aquellas que aprovechen al máximo estas diferencias y a la vez resulten económicas.

Para la separación de biomasa del medio de cultivo se utilizan operaciones de separación del tipo sólido-líquido. La elección de las mismas dependerá, entre otras cosas, del tamaño de las partículas (células), la diferencia de densidad entre las células y el medio de cultivo, la forma de dichas partículas (esféricas, alargadas, filamentosas), etc. Si bien los microorganismos pueden decantar naturalmente, la velocidad de sedimentación natural es muy lenta debido al tamaño pequeño de estos y que la densidad de los microorganismos es muy similar a la del medio de cultivo que lo rodea. Para acelerar dicha separación las operaciones más empleadas son la filtración y la centrifugación. Una vez separadas ambas fases, y dependiendo la ubicación de la enzima, se continúa el proceso con la fase líquida (producto extracelular) o con la fase sólida (producto intracelular).

La disrupción o ruptura celular es utilizada cuando el producto de interés es intracelular y se requiere liberarlo al medio para su posterior purificación. Se trata de la disgregación de la membrana y/o pared celular con la consiguiente desestabilización de la misma y liberación del contenido intracelular. La disrupción de la célula usualmente requiere de métodos fuertes, en particular en microorganismos como las bacterias y levaduras debido a la estructura de la pared celular. Los métodos de disrupción celular pueden clasificarse en: métodos físicos (molino de perlas, homogenizadores, ultrasonicadores etc.), métodos químicos (surfactantes, álcalis fuerte, solventes orgánicos, etc) y métodos enzimáticos (lisozimas, glucanasas, etc.).

Finalmente, una de las etapas previa a la purificación enzimática es la concentración del extracto crudo. Mediante esta etapa se elimina el contaminante más abundante: el agua. Además al reducir el volumen de material se facilitan las operaciones de purificación y a su vez, se reduce el costo de dichas operaciones. Las técnicas de concentración dependerán fundamentalmente de las propiedades físico-químicas del producto a recuperar. Algunos de los métodos más utilizados para estos fines son: métodos térmicos, precipitación con sales o solventes y filtración por membrana.

2.5.2 Purificación del biocatalizador

Las operaciones de purificación tienen como objetivo remover todos aquellos contaminantes que se encuentran en el extracto crudo y que pueden interferir en su uso posterior. A su vez, a través

de la purificación se logra incrementar la actividad específica de la enzima.

La composición del extracto crudo dependerá si la enzima es extracelular o intracelular. En el primer caso el extracto contendrá un pool de enzimas extracelulares y pequeños solutos de bajo peso molecular, ya que la membrana celular es una poderosa barrera que retiene todo el contenido celular. Sin embargo, en el caso de extracto de enzimas intracelulares que debieron pasar por un proceso de disrupción celular, esta contiene todos los componentes intracelulares, entre ellos, una mezcla compleja de proteínas y ácidos nucleicos. En este último caso unas de las primeras etapas de purificación debe separar los ácidos nucleicos de la muestra, lo cual puede lograrse mediante precipitación con algunos agentes o bien empleando nucleasas. El sulfato de amonio puede emplearse con este fin pero no es específico, ya que también precipita proteínas. Los componentes de bajo peso molecular, principalmente las sales, pueden ser removidas previamente ya sea mediante diálisis o cromatografía de exclusión molecular. Esta etapa se conoce como desalado.

Una vez eliminados los componentes no proteicos, el extracto crudo consiste principalmente en una mezcla de proteínas. A estas alturas la purificación del extracto estará dirigida a operaciones de fraccionamiento de las diferentes proteínas. Cada una de estas etapas incrementará la pureza del compuesto, expresado como el grado de purificación, pero a su vez se perderá parte de la enzima en cada etapa, parámetro conocido como el rendimiento de purificación. Idealmente, el grado de purificación final debe ser elevado al igual que el rendimiento. Esto dependerá en gran medida de la cantidad de etapas de purificación, ya que aun si se obtiene un rendimiento por etapa elevado, si el proceso tiene muchas etapas, el rendimiento final será bajo.

Desde el punto de vista industrial, las operaciones de purificación en general son costosas y el precio del producto muchas veces no puede compensar los costos de obtención de enzimas puras. Es por ello, que aun cuando el grado de purificación es importante, es esencial obtener un buen rendimiento final en detrimento de la purificación.

Las operaciones empleadas para la purificación de un extracto enzimático que contiene mayoritariamente proteínas, consistirá en una serie de etapas cromatográficas que utilizan las diferencias entre las propiedades físicas (tamaño molecular, solubilidad y distribución de carga en la superficie) así como también propiedades biológicas (especificidad a un determinado ligando) para separar las diversas proteínas. La cromatografía es una de las técnicas de purificación más empleadas debido a su eficacia. La configuración más común para este propósito es en columna. Esta técnica consiste en el pasaje de una mezcla de sustancias (en este caso proteínas) disueltas en una fase móvil a través de una fase estática, la cual generalmente es una matriz sólida. Durante dicho pasaje los solutos interactúan de manera diferente con la matriz, produciendo un retardo en la elución de acuerdo a sus propiedades. Existen muchas técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas, las más relevantes son: Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel (separa las moléculas por su peso molecular), Cromatografía de intercambio iónico (separa las proteínas de acuerdo a su carga neta a un determinado pH), Cromatografía por interacción hidrofóbica (separa las proteínas de acuerdo a su hidrofobicidad) y cromatografía de afinidad (separa una proteína gracias a su afinidad con un ligando absorbido en el relleno).

Finalmente, la cristalización es una forma de purificación muy antigua la cual se está empleando en la actualidad, debido a la búsqueda de alternativas factibles de aplicar a escala industrial y a su vez económicas. Algunas enzimas que se lograron cristalizar para uso comercial son las celulasas, la glucosa isomerasa y la alcohol oxidasa. La cristalización trata de la formación de partículas sólidas de la enzima de tamaño y forma definida. Para que una enzima cristalice se tienen que dar las condiciones adecuadas para que se encuentre sobresaturada en el solvente. Existen muchos factores que influyen en la cristalización incluyendo el tipo de sal y su concentración, el pH, la temperatura, la agitación, el núcleo de cristalización, etc. Mediante el control de los niveles de saturación se puede optimizar el tamaño del cristal obtenido. Adicionalmente algunas enzimas se

pueden hacer crecer en diferentes morfologías modificando las condiciones de cristalización.

2.5.3 Formulación del biocatalizador

La formulación del producto consiste en una serie de operaciones diversas tendientes a la estabilización, estandarización y presentación del producto de acuerdo a su aplicación. Las enzimas en general se presentan para su comercialización de dos maneras: sólidas o líquidas.

Para la presentación de enzimas en forma sólida, las mismas se mezclan con estabilizantes y se someten a operaciones de secado. Las técnicas de secado más comunes son el secado a baja temperatura y la liofilización. La primera técnica se emplea a escala industrial ya que es un método económico y la segunda es más comúnmente empleada a bajas escalas. Las enzimas presentadas en forma sólida tienen el beneficio de conservar la vida útil del producto por más tiempo debido a la disminución de la actividad acuosa (aw). Bajas aw reducen la velocidad de ocurrencia de la mayoría de las reacciones de deterioro, incluyendo el deterioro microbiano. Adicionalmente pueden ser almacenadas a temperatura ambiente con el concomitante ahorro de energía de refrigeración y a su vez son más fácilmente transportables, debido a la reducción de volumen. En contraposición, la presentación de enzimas en forma sólida puede producir polvo y afectar a los trabajadores, los cuales pueden sufrir de alergias debido a ello.

Por otro lado, la presentación de enzimas en forma líquida incluye la concentración, la adición de estabilizantes y la posterior filtración. Los estabilizantes más empleados son la glucosa, sacarosa y algunos polioles. Estas sustancias confieren estabilización en cuanto al mantenimiento de la estructura nativa de la proteína y de este modo evitan la desnaturalización. Además previenen la formación de agregados, manteniendo a la enzima soluble. Seguidamente el producto se filtra para eliminar sólidos insolubles y reducir la carga microbiana. Las ventajas de utilizar enzimas líquidas están dadas por la facilidad de manejo y dosificación y existe además un ahorro energético al no tener que utilizar operaciones como el secado. Sin embargo tiene la desventaja de ser más vulnerable a desestabilización y contaminación microbiana, con lo cual generalmente debe ser almacenada en condiciones de refrigeración.

En definitiva, la aplicación del biocatalizador determinará si es más factible su utilización en forma sólida o líquida. Por ejemplo, para la industria de detergentes para la ropa en general deben suministrarse en forma sólida, mientras que para la industria de jarabes de alta fructosa se prefiere la enzima líquida.

Finalmente, parte de la formulación del producto es su estandarización. Es muy común en los procesos biológicos las variaciones entre batch y batch, y desde el punto de vista de la comercialización se requiere que el producto tenga características estables en el tiempo. Una forma de disminuir las fluctuaciones del proceso es mediante la incorporación de sistemas de monitoreo y control del mismo. Aun así la estandarización del producto es necesaria para lograr obtener las especificaciones del producto y una calidad constante. Dichas especificaciones deben suministrar la siguiente información: Actividad específica, estabilidad en el almacenamiento, solubilidad, contenido de agua, etc.

2.6 Aplicación industrial de enzimas

El empleo indirecto de enzimas en la manufactura y conservación de los alimentos se remonta al antiguo Egipto, donde las mismas intervenían en el proceso de obtención de bebidas alcohólicas. Sin embargo, no fue hasta el siglo '18 que comenzaron a aislarse y estudiarse desde un punto de vista más científico. Con el avance de la biotecnología se ha logrado mayor eficiencia en la búsqueda, obtención y purificación de las enzimas, permitiendo su aplicación en diversas industrias. Algunas de las aplicaciones actuales se resumen en la Tabla 2.1.

A la hora de escoger un catalizador para su aplicación industrial, existen una serie de caracterís-

Tabla 2.1: Algunas aplicaciones industriales de las enzimas

Aplicación	Industria
Producto final	Detergentes
	Farmacéutica
	Analítica
Coadyuvantes	Textil
	Cuero
	Pulpa y papel
	Azucarera
	Café
Alimentos y bebidas	Láctea
	Cervecera
	Vinos y jugos
	Cárnica
	Panadera
	Aceites

Las enzimas hacen a las enzimas más eficientes que los catalizadores químicos. Entre las principales ventajas que surgen de la utilización de enzimas está su elevada especificidad, tanto que permite discriminar entre partes similares de las moléculas (regioespecificidad) e incluso entre isómeros ópticos de una misma molécula (estereoespecificidad). Otra ventaja importante de las enzimas respecto a los catalizadores químicos es su capacidad de trabajar en condiciones de reacción (temperatura, pH, presión, etc.) suaves, con lo cual el consumo energético es bajo y el equipamiento necesario no requiere materiales y aspectos constructivos especiales, lo que resulta favorable para su aplicación industrial. Finalmente es importante destacar que las enzimas, a diferencia de muchos catalizadores, son inalteradas por el proceso que catalizan pudiendo emplearse sucesivas veces, no son tóxicas para el ser humano si se usan correctamente, son biodegradables, etc. En contraste, las enzimas presentan algunos inconvenientes o desventajas a la hora de emplearlas. Si bien tienen una alta actividad en condiciones moderadas de operación, la mayoría son muy lábiles en condiciones de elevada temperatura o pH extremos, inestables en presencia de solventes no acuosos, pueden ser degradadas por proteasas o inactivas en presencia de algunos inhibidores. Además, algunas enzimas y sus coenzimas son costosas o difíciles de conseguir en grandes cantidades. Finalmente es necesario tener en cuenta que si bien muchas enzimas están presente en nuestros alimentos cotidianos, algunas pueden causar alergias cuando son ingeridas o inhaladas.



3. Bibliografía de referencia

Aehle, W. (Ed.). (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. John Wiley & Sons.

Brauer, H. (Ed.). (1985). *Fundamentals of biochemical engineering (Vol. 2)*. Wiley-VCH.

Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and enzyme technology*. John Wiley & Sons.

Castañeda, M. T. (2016). *Obtención, caracterización y aplicación de un biocatalizador para la reducción del contenido de fenilalanina en hidrolizados proteicos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis. Principles and Applications*. Editorial Springer-Verlag New York Inc., United States.

Straathof, A. J., & Adlercreutz, P. (2000). *Applied biocatalysis*. CRC Press.

Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (Eds.). (2009). *Enzymes in food technology*. John Wiley & Sons.