

# **PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**

- Las enzimas son catalizadores de origen biológico.
- Son catalizadores muy activos en medios acuosos y en condiciones muy suaves de temperatura, presión, pH, etc.
- Son catalizadores muy específicos: pueden modificar un único substrato en una mezcla de substratos muy similares e incluso pueden discernir entre dos isómeros de una mezcla racémica de un compuesto quiral.
- Son catalizadores muy selectivos: pueden modificar un único enlace o un único grupo funcional en una moléculas que tenga varias posiciones modificables.

# FUENTES DE ENZIMAS

- Las enzimas pueden ser de origen vegetal, animal y microbiana.
- Entre las enzimas de tipo vegetal, se encuentran las proteasas, carbohidrasas ( las cuales descomponen residuos de azúcares de carbohidratos superiores, a-amilasas y b-amilasa
- Entre las enzimas de tipo animal están las esterasa ( Lipasa se produce en la mucosa gástrica, el páncreas, fosfotasa: Se obtiene de tejidos animales óseo, muscular, tripsina y quimotripsina se produce en el páncreas )
- Las enzimas del tipo microbiano provienen de bacterias, arqueas y de hongos.

# ENZIMAS EXTRACELULARES

- Todos los organismos producen enzimas de actividad muy variada y en general en cantidades bajas para sus procesos celulares.
- Un caso particular es el de los M.O. que pueden producir algunas enzimas en concentraciones muy altas y las excretan al medio.
- Las enzimas extracelulares son capaces de digerir muchos materiales poliméricos insolubles como celulosa, almidón, proteínas; cuyos monómeros son utilizados como nutrientes por los M.O.

# USO DE ENZIMAS

- Una cantidad importante de las enzimas se utilizan en alimentos, para usar un microorganismo que produzca enzimas de consumo humano, se deben de cumplir una serie de requisitos legales, que se centran en que tal microorganismo debe figurar en la llamada lista “GRAS” (*generally acknowledged as secure*), es decir, que haya demostrado una larga historia de seguridad.
- También se utilizan enzimas para producir sustancias de uso médico e industrial, sin tener que usar M.O. completos, esto tiene como ventaja que evita problemas de contaminación y reduce pasos de separación.

<u>Enzima</u>	<u>Proceso industrial</u>	<u>Millones\$/año</u>
Sacarosas e Isomerasas	Proc. almidón, endulzantes jarabes ricos en fructosa	150
Proteasas	Detergentes, carnes, quesos, pescado, tejidos	400
Reninas	Coagulación de leche	60
Lipasas	Detergentes, proc. pieles, saborizantes, proc. carne	20
Celulasas	jugos de frutas, envejec. tejidos	20

# PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

- Los procesos de producción de enzimas microbianas se realizan mediante cultivos aeróbicos.
- En general las enzimas se producen en pequeñas cantidades durante la fase de crecimiento activo, pero se acumulan en grandes cantidades en la fase estacionaria del crecimiento.
- Las enzimas inducibles se producen sólo cuando en el medio se encuentra el inductor (sustrato).

# PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

- Las enzimas microbianas que se producen en mayor cantidad son proteasas, utilizadas como aditivos en los detergentes para lavar ropa.
- También los detergentes contienen amilasas, lipasas, reductasas y otras.
- Muchas de estas enzimas son producidas a partir de bacterias alcalófilas, especialmente de *Bacillus licheniforme*.
- Estas enzimas tienen pH óptimo entre 9 y 10, así permanecen activas al pH alcalino de las soluciones de los detergentes.



# PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

- Amilasas, se producen mediante fermentación y se utilizan en la conversión de cereales en el producto final llamado jarabe de cereales rico en fructosa.
- Alfa amilasa provoca ataque inicial al polímero, acortando la cadena y reduciendo la viscosidad del polímero, clarificante.
- Glucoamilasa produce monómeros de glucosa, sacarificante.
- Glucosa isomerasa realiza la conversión final de glucosa en fructosa, isomerización.

# PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

- Invertasa se produce a partir del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, se utiliza para impedir la cristalización de azúcares, pues convierte sacarosa en azúcares más solubles. También se inyecta en el interior de los caramelos.
- Pectinasas, producidas por cepas de *Aspergillus*, se utiliza para licuar jugos de frutas.
- Renina, producida por cepas de *Mucor* se utiliza para coagular la leche en la producción de quesos.
- Proteasas, para ablandar carnes de *Bacillus* y *Aspergillus*.
- Lactasa, de *Kluyveromyces fragilis*, para evitar la cristalización de helados.

# ENZIMAS MICROBIANAS Y SUS APLICACIONES

Enzima	Fuente	Ap.indust.	Industria
Amilasa	Hongos	Pan	Panadería
	Bacterias	Almidonad en frío ropa	Almidón
	Hongos	Ayuda digestiva	Farmaceút.
	Bacterias	Elimin. Manchas	Detergentes
Lipasa	Hongos	Degradar grasa	Lechería, lavandería
Celulasa	bacterias	Suaviz. y ablandad. Tej.	lavandería

# ENZIMAS MICROBIANAS Y SUS APLICACIONES

Enzima	Fuente	Ap.indust.	Industria
Proteasa	Hongos	Pan	Panadería
	bacterias	Ablandador carnes	carnes
	bacterias	Limpieza heridas	Medicina
	bacterias	Detergente doméstico	Lavandería
Invertasa	levadura	Relleno blando caram.	Confitería
Gluc. oxidasa	hongos	Elim.gluc.y O	Alimentación

# ESTABILIDAD DE ENZIMAS

- La principal restricción del uso de enzimas como biocatalizadores de proceso radica en su inherente labilidad derivada de su compleja estructura molecular.
- La estabilidad de una enzima puede definirse como la capacidad de retener su actividad en una condición ambiental determinada.
- Son importantes la temperatura y la presencia de compuestos químicos inactivantes.

# ESTABILIDAD DE ENZIMAS

- Diversas estrategias han sido elaboradas para producir biocatalizadores intrínsecamente más estables y para incrementar la estabilidad durante el proceso catalítico.
- Entre las estrategias elaboradas para producir enzimas más estables y para incrementar la estabilidad durante el proceso catalítico se encuentra el uso de M.O. extremófilos y de organismos mutantes y recombinantes, obtenidos por técnicas de mutagénesis dirigida e ingeniería genética, como fuentes de enzimas de elevada estabilidad.

# ESTABILIDAD DE ENZIMAS

- Otra estrategia para asegurar la estabilidad es el uso de enzimas soportadas o contenidas en matrices y el uso de enzimas en medios de reacción no convencionales.
- Las enzimas inmovilizadas pueden ser notablemente más estables que sus contrapartes solubles, al reducirse la movilidad molecular y crearse un microambiente eventualmante protector.

# EXTREMOZIMAS

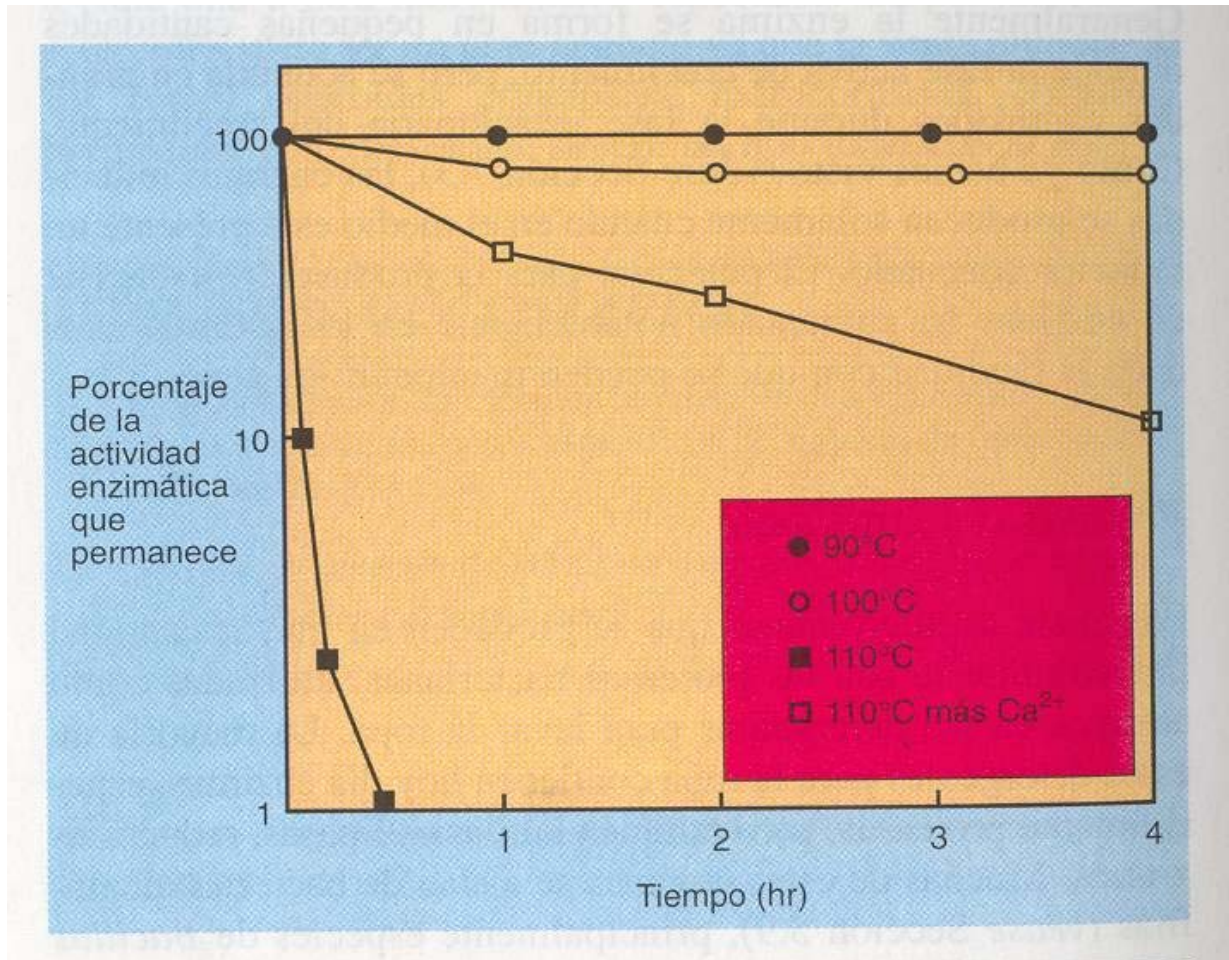
- Los microorganismos extremófilos son capaces de crecer a altas temperaturas, en algunos casos por encima de la temperatura de ebullición del agua.
- Los hipertermófilos son capaces de crecer a estas temperaturas tan altas porque producen moléculas estables al calor, incluidas enzimas.
- Se utiliza el nombre de extremozima para referirse a enzimas que funcionan a temperaturas extremadamente altas, pero también a aquellas que funcionan bien a cualquier condición, frío o altas concentraciones salinas o pH ácidos.



# **EXTREMOZIMAS**

- Muchos procesos industriales funcionan mejor a altas temperaturas, por lo que las extremozimas provenientes de M.O. hipertermófilos se están haciendo cada vez más atractivas como biocatalizadores para las aplicaciones industriales y también para uso en investigación, que requieren enzimas.
- Muy conocidas son la Taq y Pfu polimerasas que se utilizan en la reacción de la PCR.

# TERMOESTABILIDAD DE LA PULULANASA



# EXTREMOZIMAS

- Otras extremozimas producidas por M.O. hipertermófilos son: proteasas, celulasas, pululanasa y xilanasas extremadamente termoestables.
- *Thermococcus litoralis*, relacionado con *Pyrococcus woesei* produce una pululanasa catalíticamente más activa a 118°C.
- *Pyrococcus furiosus* produce una ferredoxina, proteína ferro-sulfurada implicada en transporte electrónico, activa a temperaturas similares y que no se desnaturaliza hasta 140°C.

# EXTREMOZIMAS

- Otras extremozimas son activas a bajas temperaturas, enzimas psicrófilas.
- Otras son activas en presencia de altas concentraciones de sales (de halófilos) o activas a pH muy altos o muy bajos (de alcalófilos y acidófilos respectivamente y muy seguramente serán utilizadas en los próximos años a nivel industrial en situaciones que requieren biocatálisis en condiciones extremas.

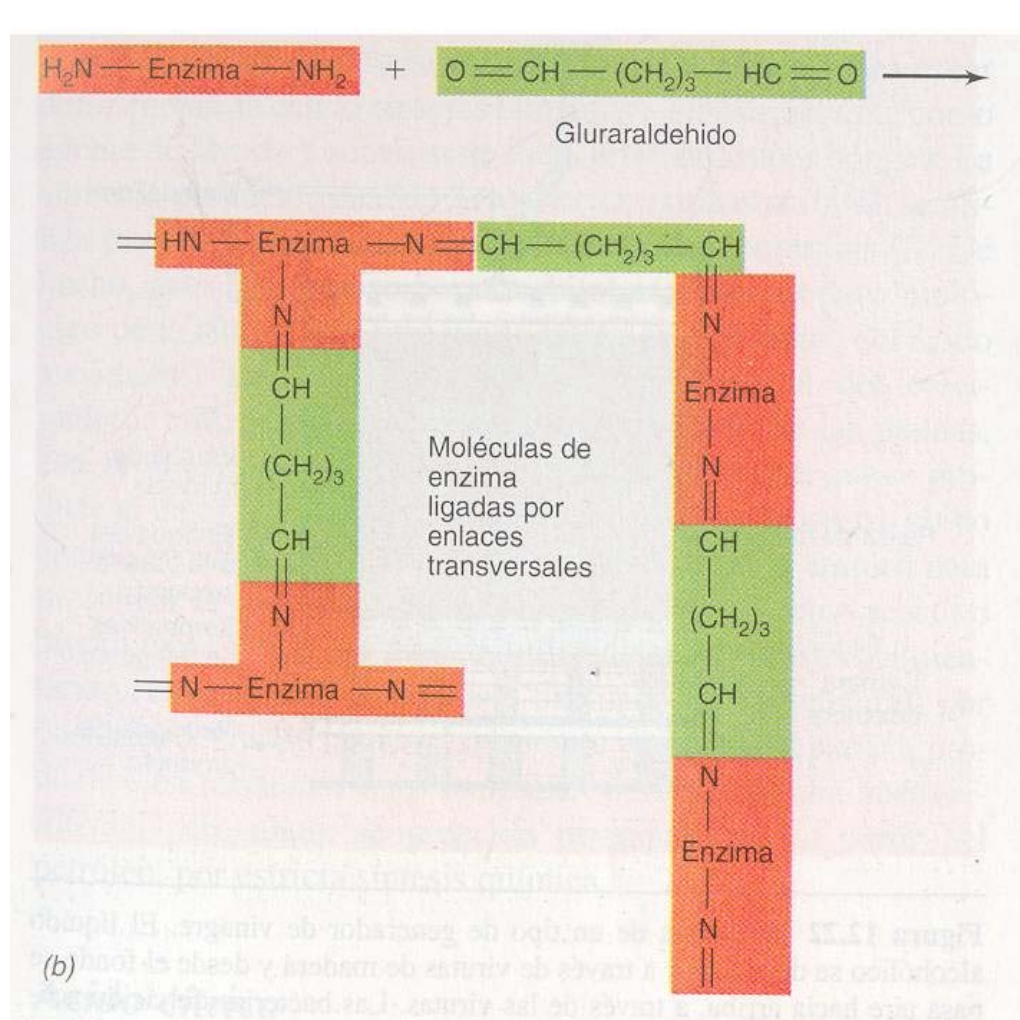
# ENZIMAS INMOVILIZADAS

- Para su utilización en procesos industriales, es mejor utilizar una enzima en forma inmovilizada.
- La inmovilización no sólo hace más fácil realizar la reacción en condiciones a gran escala, sino que además estabiliza la enzima frente a la desnaturalización.
- Existen tres formas de realizar la inmovilización:

# ENZIMAS INMOVILIZADAS

- Formación de enlaces transversales (polimerización) de las moléculas de la enzima.
- La unión de las moléculas de enzima entre si se suele hacer mediante reacción química con un agente bifuncional formador de enlaces transversales, como el glutaraldehido, reaccionando grupos aminos con este reactivo.
- Si se hace la reacción adecuadamente, la enzima puede mantener la mayor parte de su actividad.

# ENZIMAS INMOVILIZADAS POR ENLACES CON GLUTARALDEHIDO

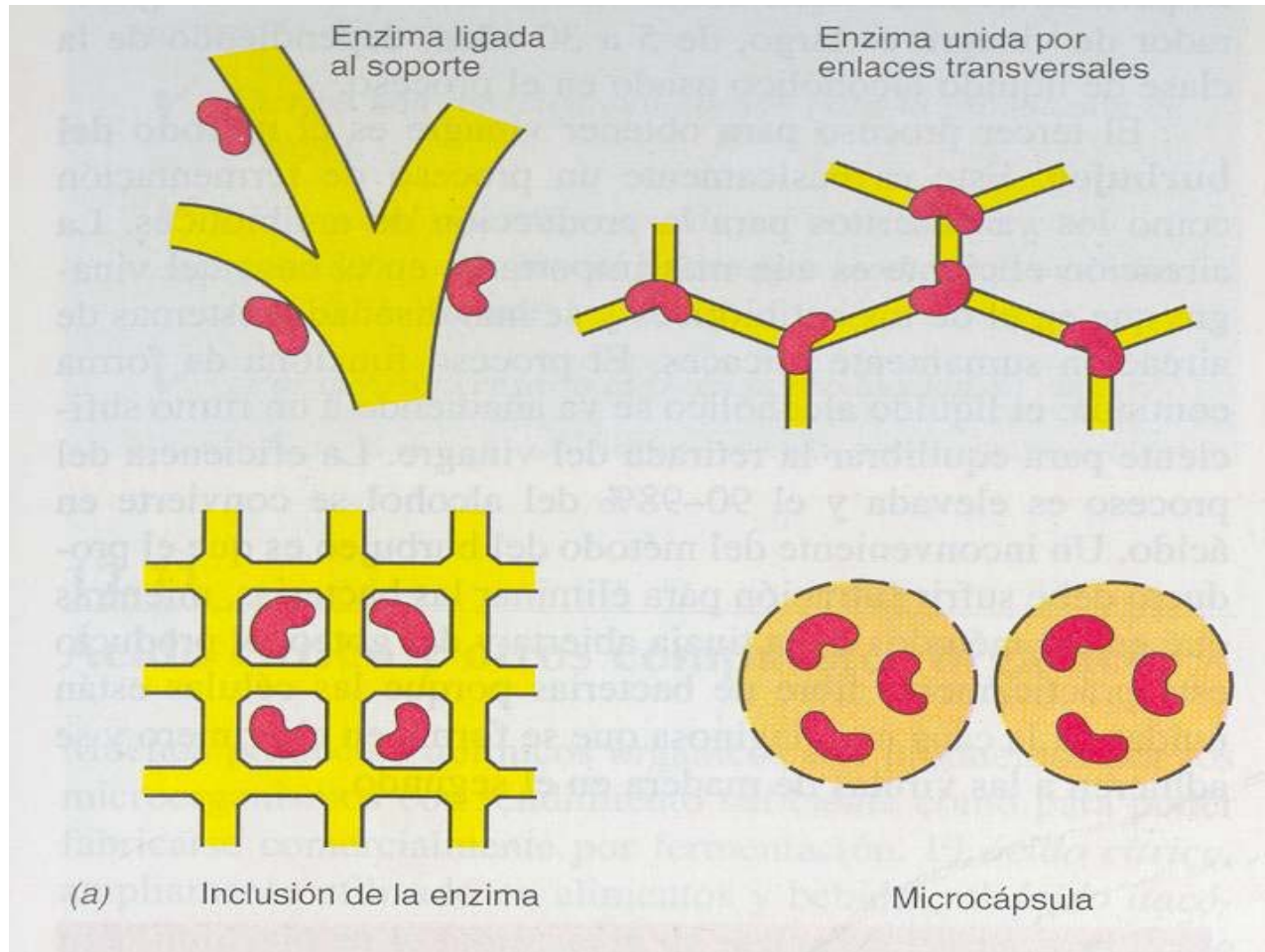


# ENZIMAS INMOVILIZADAS

- Unión de la enzima a un soporte. La unión puede ser por absorción, por enlaces iónicos o por enlaces covalentes.
- Entre los soportes utilizados figuran celulosas modificadas, carbón activado, minerales de la arcilla, óxido de aluminio y perlas de vidrio.



# PROCEDIMIENTOS PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS



# ENZIMAS INMOVILIZADAS

- Inclusión de la enzima, que implica la incorporación de la enzima a una membrana semipermeable.
- Las enzimas pueden encerrarse en microcápsulas, geles, membranas de polímeros semipermeables o polímeros fibrosos como el acetato de celulosa.
- Cada uno de estos métodos tiene ventajas e inconvenientes y el procedimiento utilizado depende de la enzima y de la aplicación industrial concreta.

# CÉLULAS INMOVILIZADAS

- En algunos casos no es necesario usar la enzima purificada .
- Las células ricas en enzimas pueden ser inmovilizadas y realizar el proceso industrial en forma continua.
- *Bacillus coagulans* que produce glucosa isomerasa, se utiliza para la producción de jarabe de cereales rico en fructosa.
- El jarabe rico en fructosa se hace pasar a través de columnas que contienen las células inmovilizadas y se produce el jarabe de fructosa.
- Las instalaciones son más pequeñas.

# ENZIMAS RECOMBINANTES

- Utilizando DNA recombinante ha sido posible producir una serie de enzimas de gran utilidad en la actualidad.
- La producción de enzimas por microbiología industrial era ya un negocio floreciente antes de la era del DNA recombinante, pero precisamente la I.G. se adapta perfectamente a los objetivos de mejora de esta biotecnología comercial, y empezó a usarse de modo casi inmediato en cuanto estuvieron a punto las técnicas.

# **ENZIMAS RECOMBINANTES**

- La ingeniería genética está realizando progresos importantes en la producción de enzimas recombinantes en microorganismos.
- Para garantizar la seguridad de su uso debe controlarse que los microorganismos de donde se extraen no sean patógenos, ni fabriquen compuestos tóxicos. Los ideales son aquellos que tienen una larga tradición de uso en los alimentos como las levaduras de la industria cervecera y los fermentos lácticos.

# ENZIMAS RECOMBINANTES

- Bacillus, Aspergillus y Sacharomyces son tres especies de microorganismos bien conocidas, su manipulación es segura, son de crecimiento rápido y producen grandes cantidades de enzimas, generalmente mediante fermentación.
- El medio de cultivo óptimo para estos microorganismos es igualmente bien conocido, lo que reduce los costos de experimentación.

# **ENZIMAS RECOMBINANTES**

- Cuando una enzima nueva es identificada en un microorganismo, el gen que codifica para la misma puede ser transferido a cualquiera de las especies anteriores.
- De esta manera se puede producir mayor cantidad de dicha enzima en el tanque de fermentación.
- El producto obtenido, la enzima recombinante, es de mayor pureza, lo cual contribuye a una mejor calidad del producto.

# ENZIMAS RECOMBINANTES

- **En la industria alimentaria:**
- **Quimosina recombinante (rennina) para la elaboración de quesos. Muy empleada en EE.UU y Gran Bretaña (90% de los quesos duros), sustituyendo a la escasa quimosina de terneros y a la biotecnológica tradicional obtenida de hongos (*Rhizomucor*, *Endothia parasitica*). La quimosina recombinante se obtiene en *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus niger* manipulados.**
- **Somatotropina bovina recombinante parece estimular la producción de leche de vacas en los EE.UU. (aprobada por la FDA en 1994)**



# ENZIMAS RECOMBINANTES

- **En la industria de detergentes:**
- **La Lipolasa® de Novo-Nordisk (ahora Novozymes) es la primera enzima recombinante aprobada para detergentes. El gen de esta lipasa, aislado de hongo filamentoso *Humicola* se transfirió a *Aspergillus oryzae*.**
- **La cutinasa de *Fusarium*, buena degradadora de ácidos grasos, se expresa por ingeniería genética en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

# ENZIMAS RECOMBINANTES

- Entre las proteasas, hay que destacar la subtilisina de *Bacillus licheniformis* y *B. amyloquefaciens*, que ayuda a eliminar manchas de sangre, comida, etc. Por ingeniería de proteínas ha sido posible mejorar las ya de por sí buenas cualidades de la subtilisina, creando variantes resistentes a la oxidación por peróxido de hidrógeno derivado de los perboratos, resistentes a pH alcalinos y termorresistentes.