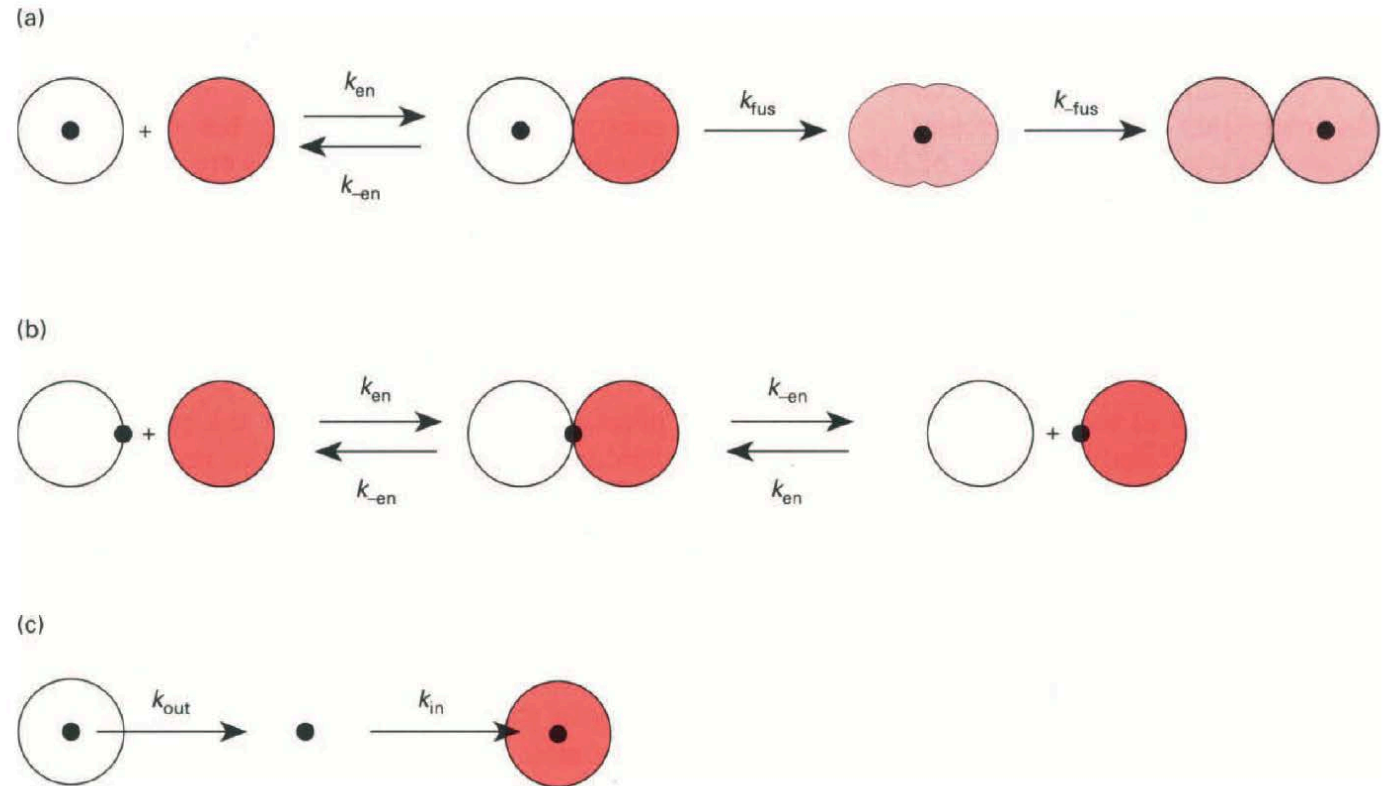


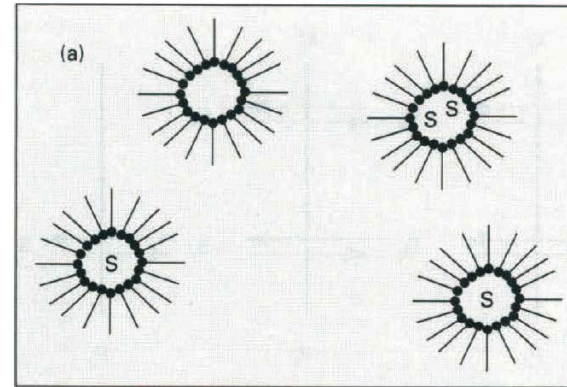
Intercambio del contenido

- Determina la reactividad
 - Transporte de sustrato
 - Transporte de producto
- Depende de la solubilidad de la molécula a intercambiar
- La transferencia puede limitar la reacción de la enzima

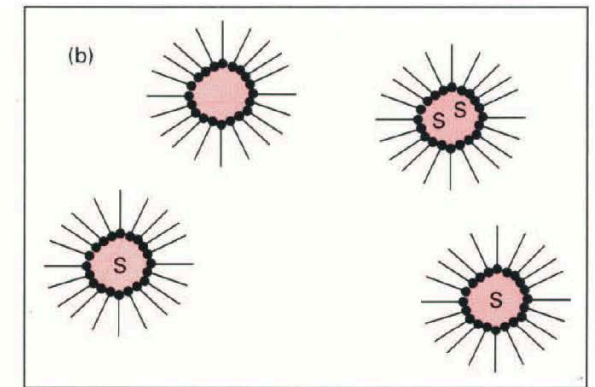


Concentraciones

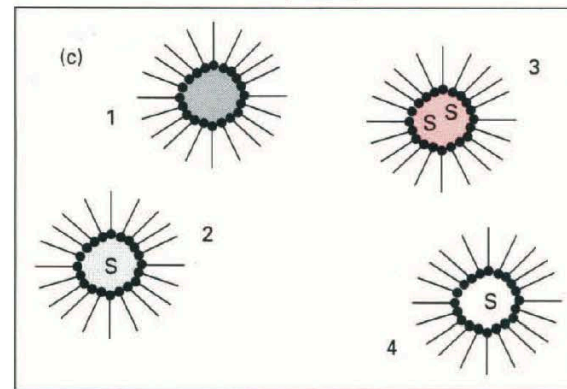
- Depende de la distribución del componente
 - Concentración total
 - Concentración del pool de agua
 - Concentración intramicelar
 - Concentración intramicelar promedio (excluye el volumen de micelas desocupadas)
- Afectan K_m aparente
- Es importante definir con qué se trabaja



$$[S_{ov}] = \frac{4S}{\text{[pool de agua]}}$$



$$[S_{wp}] = \frac{4S}{\text{[pool de agua]}}$$

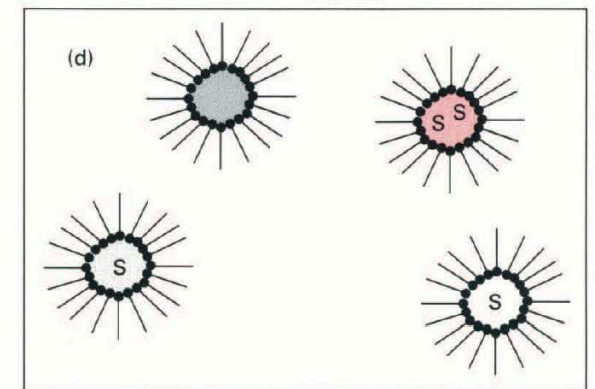


$$1 \quad [S_{im}] = \frac{0S}{\text{[volumen de micela]}}$$

$$3 \quad [S_{im}] = \frac{2S}{\text{[volumen de micela]}}$$

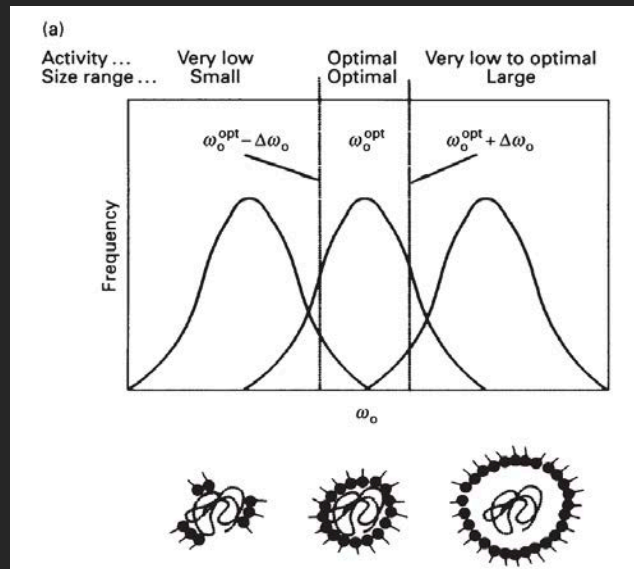
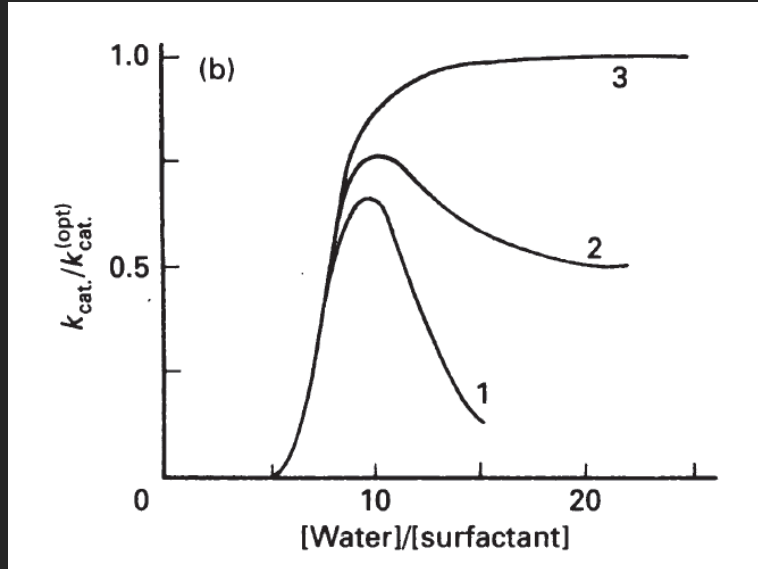
$$2 \quad [S_{im}] = \frac{1S}{\text{[volumen de micela]}}$$

$$4 \quad [S_{im}] = \frac{1S}{\text{[volumen de micela]}}$$



$$[\bar{S}_{im}] = \frac{(0+1+2+1)S}{\text{[volumen de micela]}}$$

$$[\bar{S}'_{im}] = \frac{(1+2+1)S}{\text{[volumen de micela]}}$$



Actividad vs. w_0

- Forma de campana
- Indica tamaño óptimo para actividad
 - Muy bajo, enzima expuesta al solvente
 - Muy alto, baja movilidad, difusión

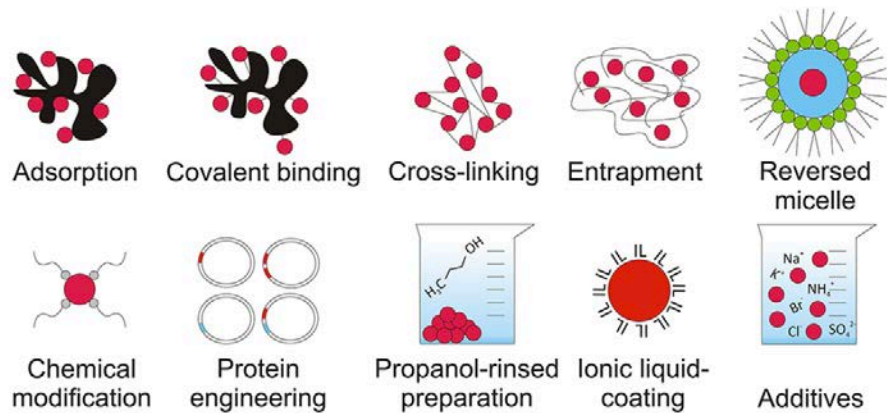


Figure 1. Strategies for stabilization of enzymes toward organic solvents.

Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents

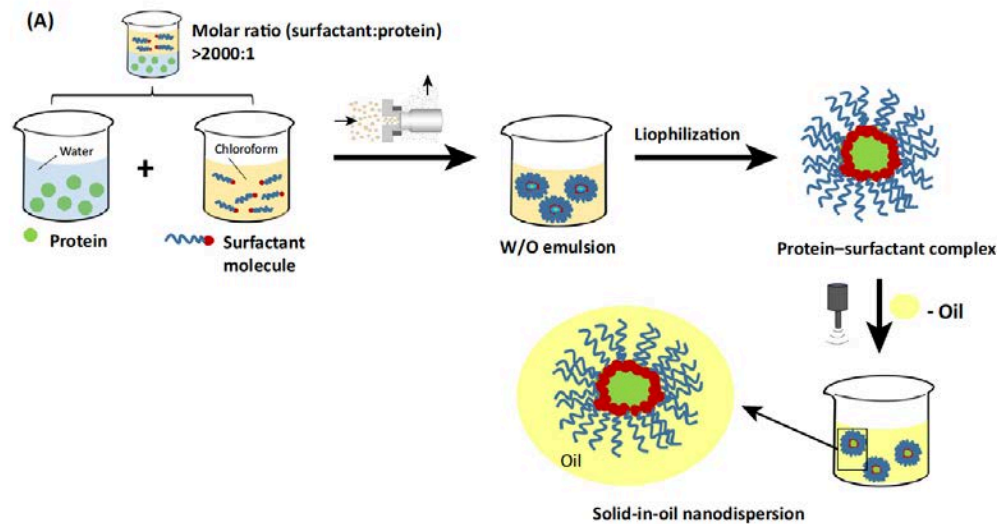
Veronika Stepankova,^{†,‡,§} Sarka Bidmanova,[†] Tana Koudelakova,[†] Zbynek Prokop,^{†,§}
Radka Chaloupkova,^{*,†} and Jiri Damborsky^{*,†,‡,§}

[†]Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

[‡]International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic

[§]Enantis, Ltd., Palackeho trida 1802/129, 612 00 Brno, Czech Republic

Ongoing (2013)



Review

Protein Formulations for Emulsions and Solid-in-Oil Dispersions

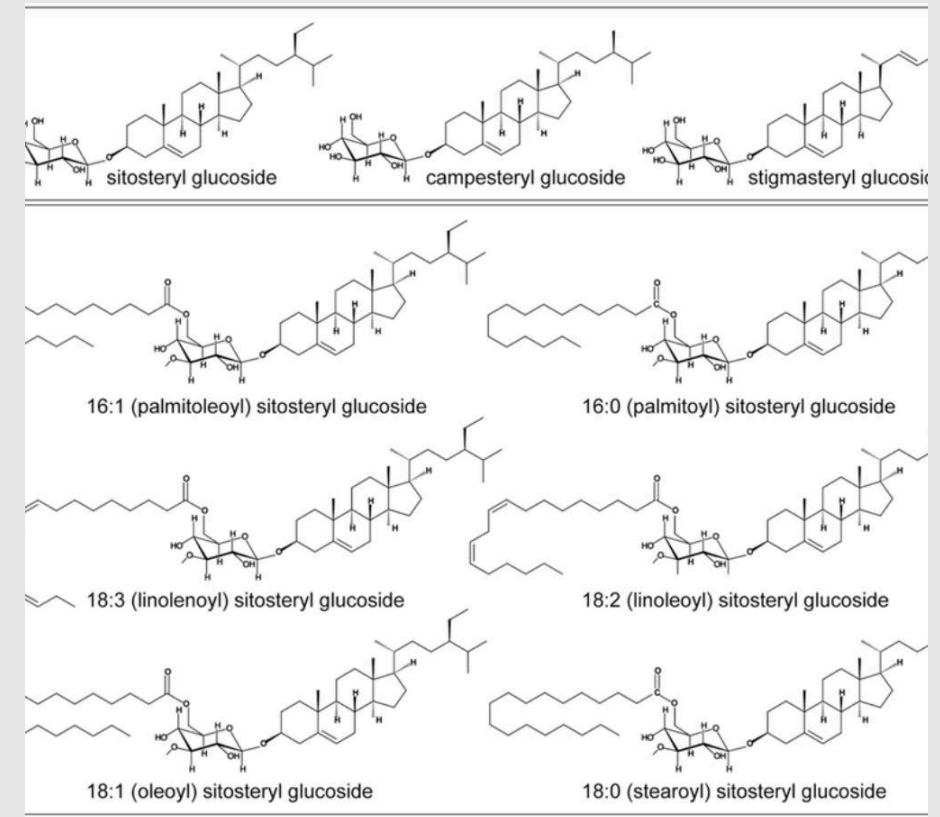
Ongoing (2016)

Case study: esterilglucosidasa. Contexto e interés

- Mayor exportación de la República Argentina → derivados de soja
- Rosario y región, uno de los polos exportadores agrícola-aceitero más importante del mundo
- Derivados con mayor valor agregado: aceite y el biodiesel
- En los próximos años Argentina será el mayor exportador de biodiesel de América Latina (!?!)
- Cámara Argentina de Biocombustibles (CARBIO)
 - AGD
 - Bunge
 - Cargill
 - Explora
 - Louis Dreyfus
 - Molinos Río de la Plata
 - Noble Argentina
 - Renova
 - Unitec Bio
 - Vicentin
- Más de U\$S 1000.000.000 invertidos

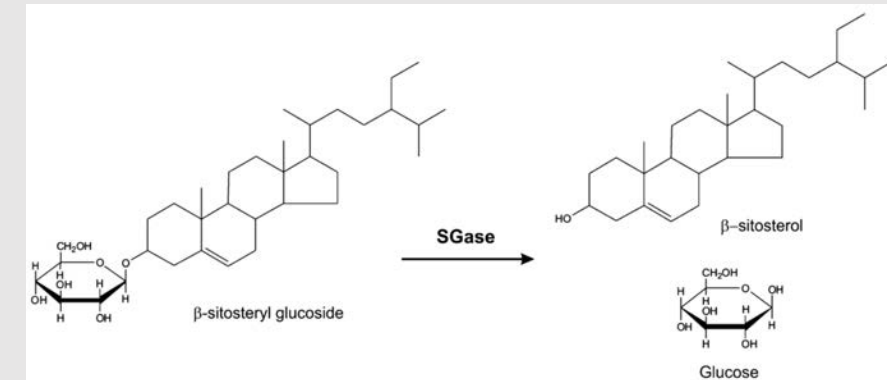
Biodiesel y SG

- Biodiesel de calidad comparable al diesel de petróleo? → precipitados insolubles durante su producción ☹
- Aceite → esteril glicósidos acilados (ASGs) solubles.
- Transesterificación → ~~grupo aceite~~ → insolubles a bajas temperaturas
- Partículas de SG sedimentan → agregación de otros contaminantes → bloqueo de filtros
- Requerimientos de calidad de filtrabilidad (EU)
- Método remoción de SGs → destilación
 - costoso
 - alto consumo de energía



Búsqueda SGasa

- β -glucosidasas tipo III
 - reconocen la porción glucosídica
 - son relativamente promiscuas respecto al aglicón
- Análisis de secuencias $\rightarrow$ tres familias de enzimas
- Genes sintéticos, clonado y expresión en *E. coli*
- beta-glucosidasa LacS de *Sulfolobus solfataricus* resulta activa en ensayos realizados en buffer acuoso
- SGs solubles en biodiesel a alta temp $\rightarrow$ enzimas termofílicas
- Homólogas a LacS de organismos termófilos
- 10 genes $\rightarrow$ sintetizados $\rightarrow$ clonados $\rightarrow$ expresados en *E. coli*

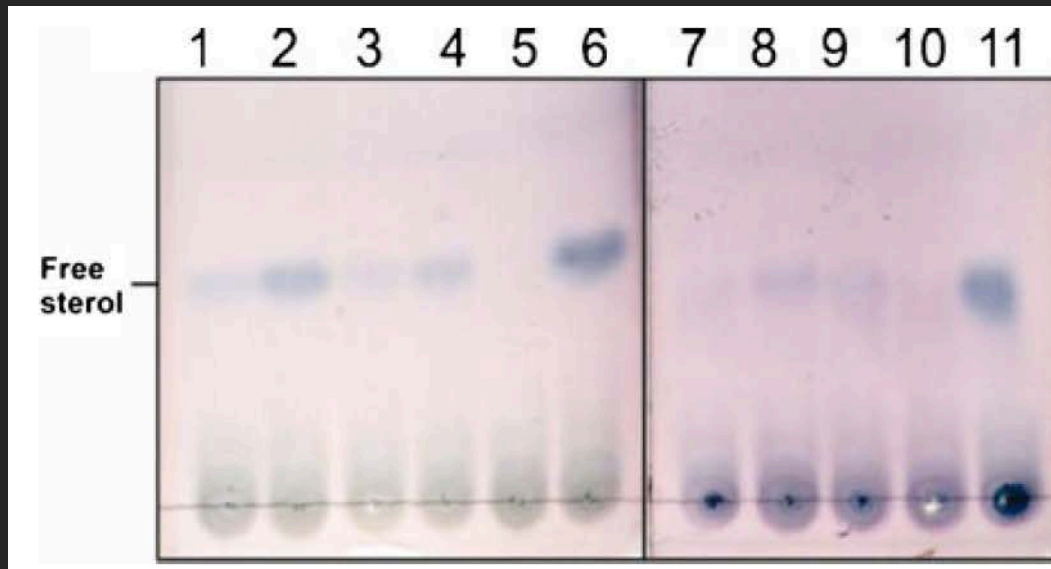
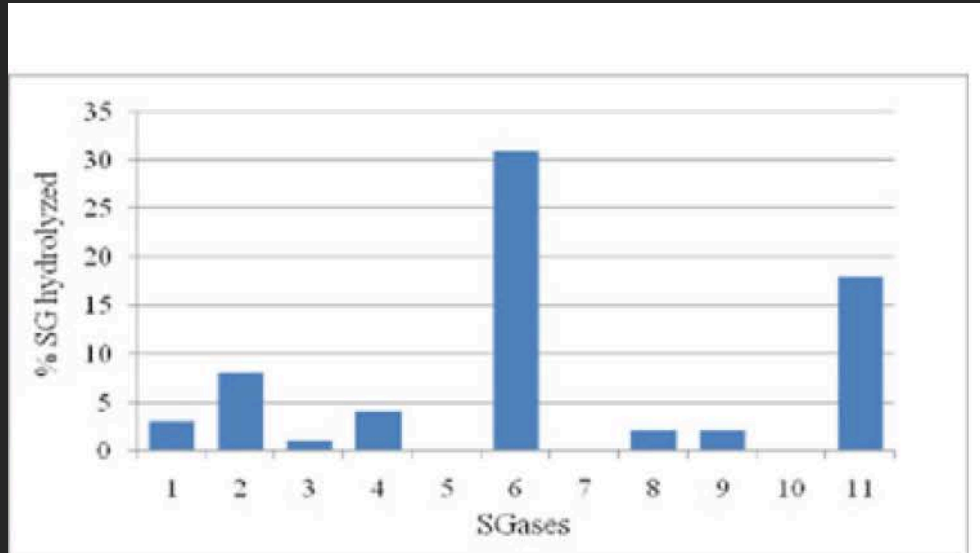


Appl Microbiol Biotechnol (2014) 98:4033–4040
DOI 10.1007/s00253-013-5345-4

BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS

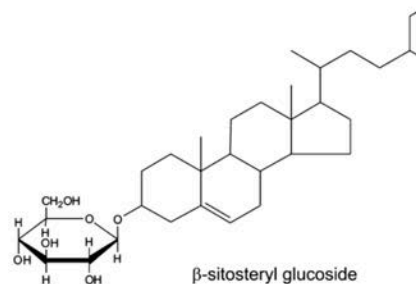
Enzymatic hydrolysis of steryl glucosides, major contaminants of vegetable oil-derived biodiesel

Andres Aguirre • Salvador Peiru • Florencia Eberhardt •
Leandro Vetcher • Rodolfo Cabrera • Hugo G. Menzella



Cómo medir actividad en biodiesel?

- TLC
- cromatografía de gas a altas temperaturas
- HPLC y EM
- Instrumentos analíticos de alto costo
- No cuantitativos (TLC)
- Lentos!! No permiten obtener resultados de actividad en gran cantidad para la evaluación de varias enzimas en distintas condiciones de reacción
- Nuevo método de medición de SGs en biodiesel de mediano débito.

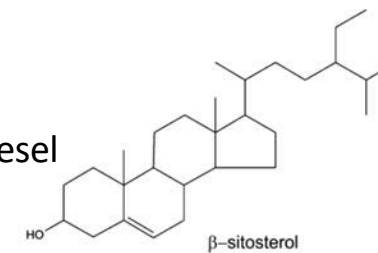


Emulsión
(mayonesa)

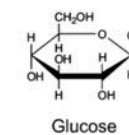
6/10/23

Biotechnología de enzimas

Biodiesel



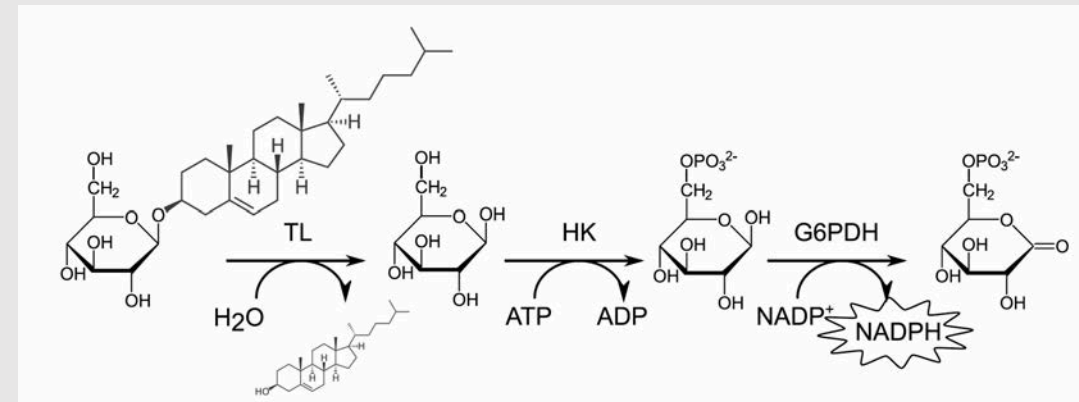
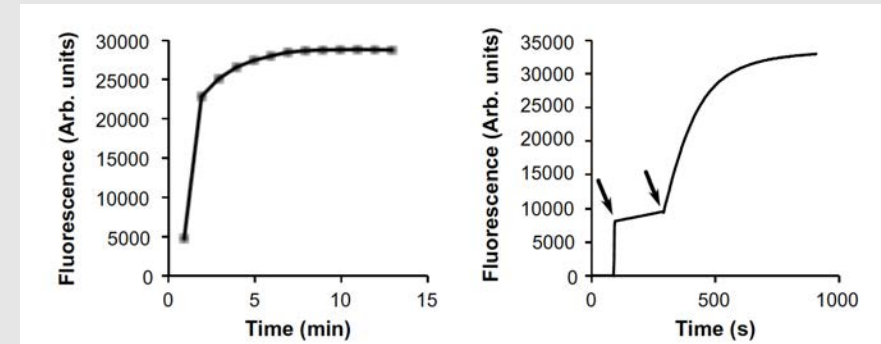
Agua



Reacción en dos fases

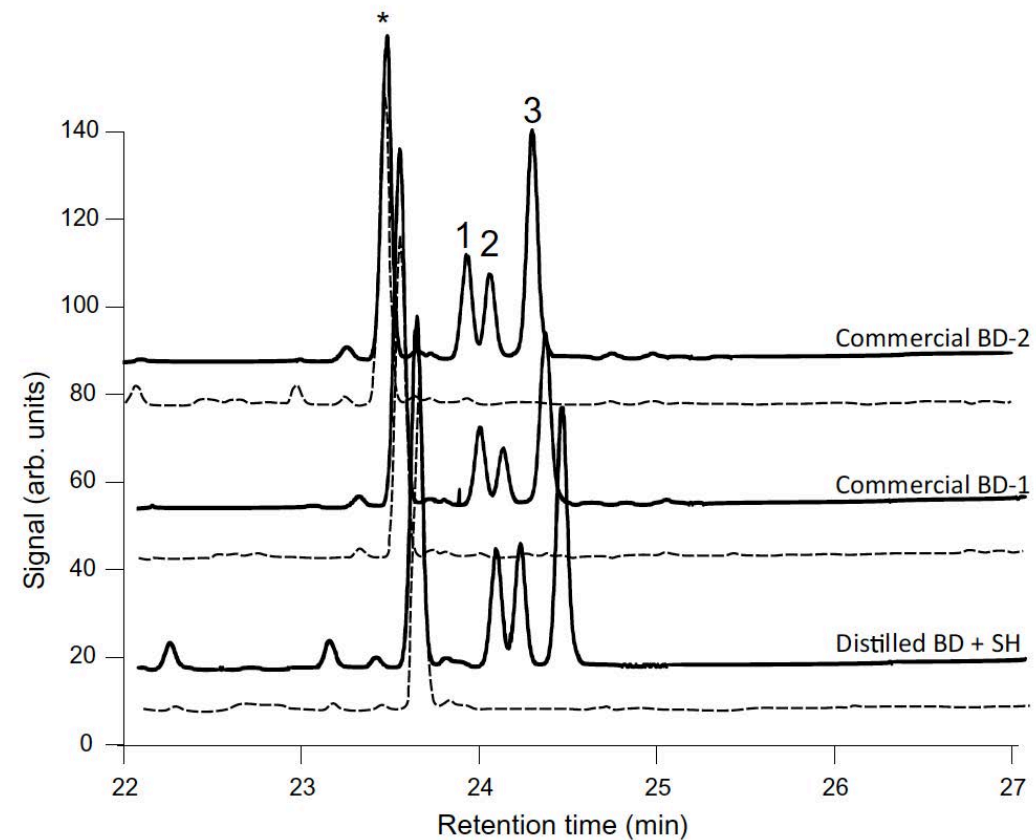
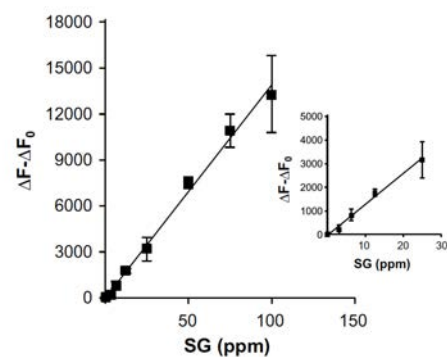
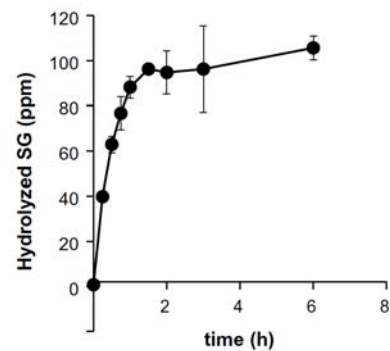
Medición de glucosa en fase H₂O!

- Reacción con hexokinasa (HK)
- Reducción con G6PDH
- Cuantificación de NADPH!
 - Abs
 - Fluo!!
- Formato 96 wells



A Fluorometric Enzymatic Assay for Quantification of Steryl Glucosides in Biodiesel

Andrés Aguirre · Matías Cabruja · Rodolfo Cabrera ·
Florescia Eberhardt · Salvador Peirú ·
Hugo G. Menzella · Rodolfo M. Rasia





Con esto

Peiru et al. *Biotechnol Biofuels* (2015) 8:223
DOI 10.1186/s13068-015-0405-x

Biotechnology for Biofuels

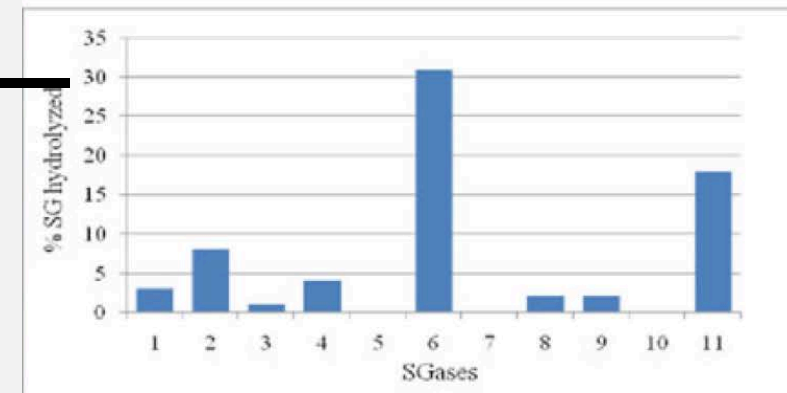
RESEARCH

Open Access



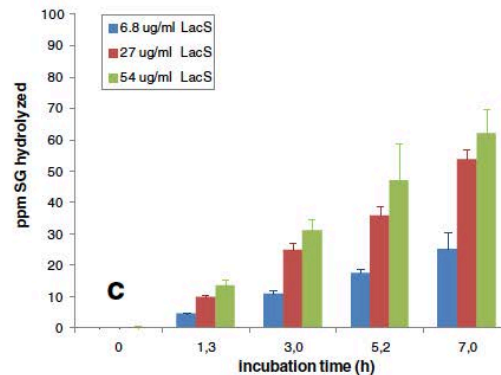
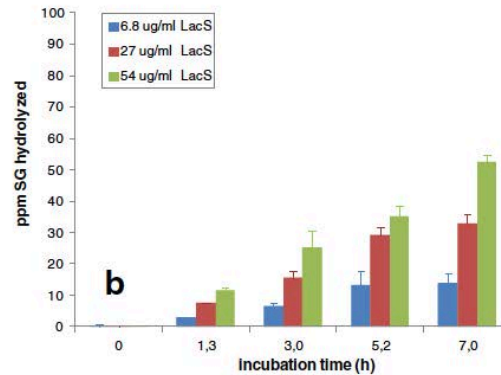
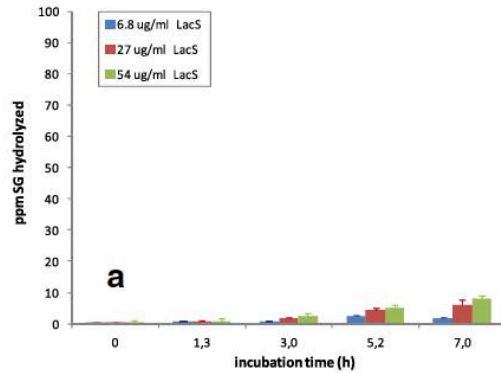
An industrial scale process for the enzymatic removal of steryl glucosides from biodiesel

Salvador Peiru^{1,2†}, Andres Aguirre^{1,2†}, Florencia Eberhardt¹, Mauricio Braia¹, Rodolfo Cabrera³ and Hugo G. Menzella^{1,2*}



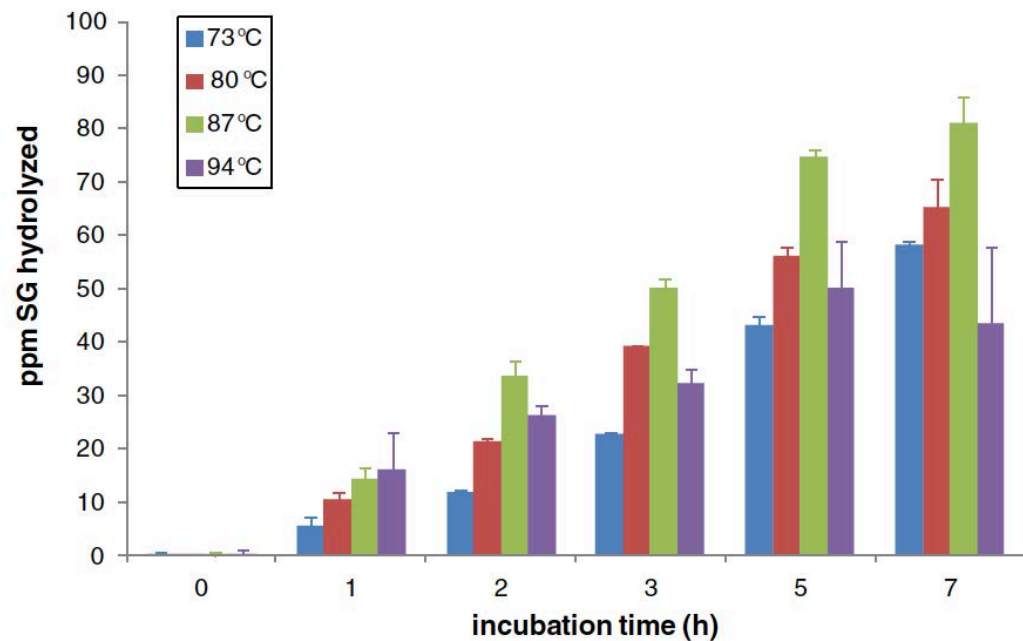
Efecto de surfactante

- Polyglycerol polyricinoleate (PGPR)
 - Sin surfactante
 - 0.3% PGPR
 - 0.9% PGPR

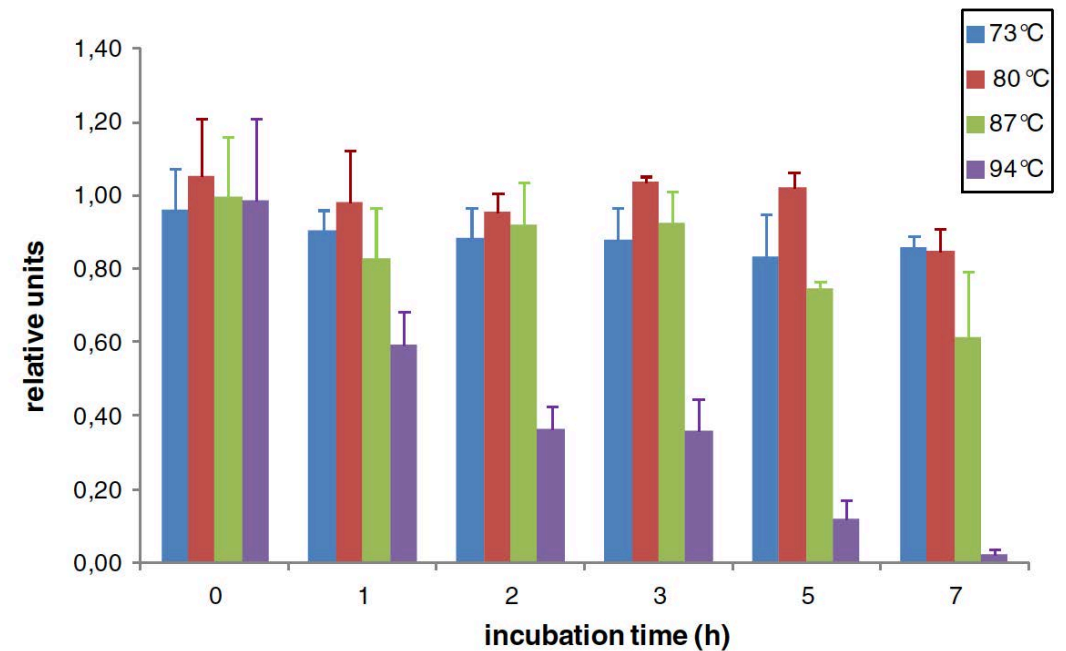


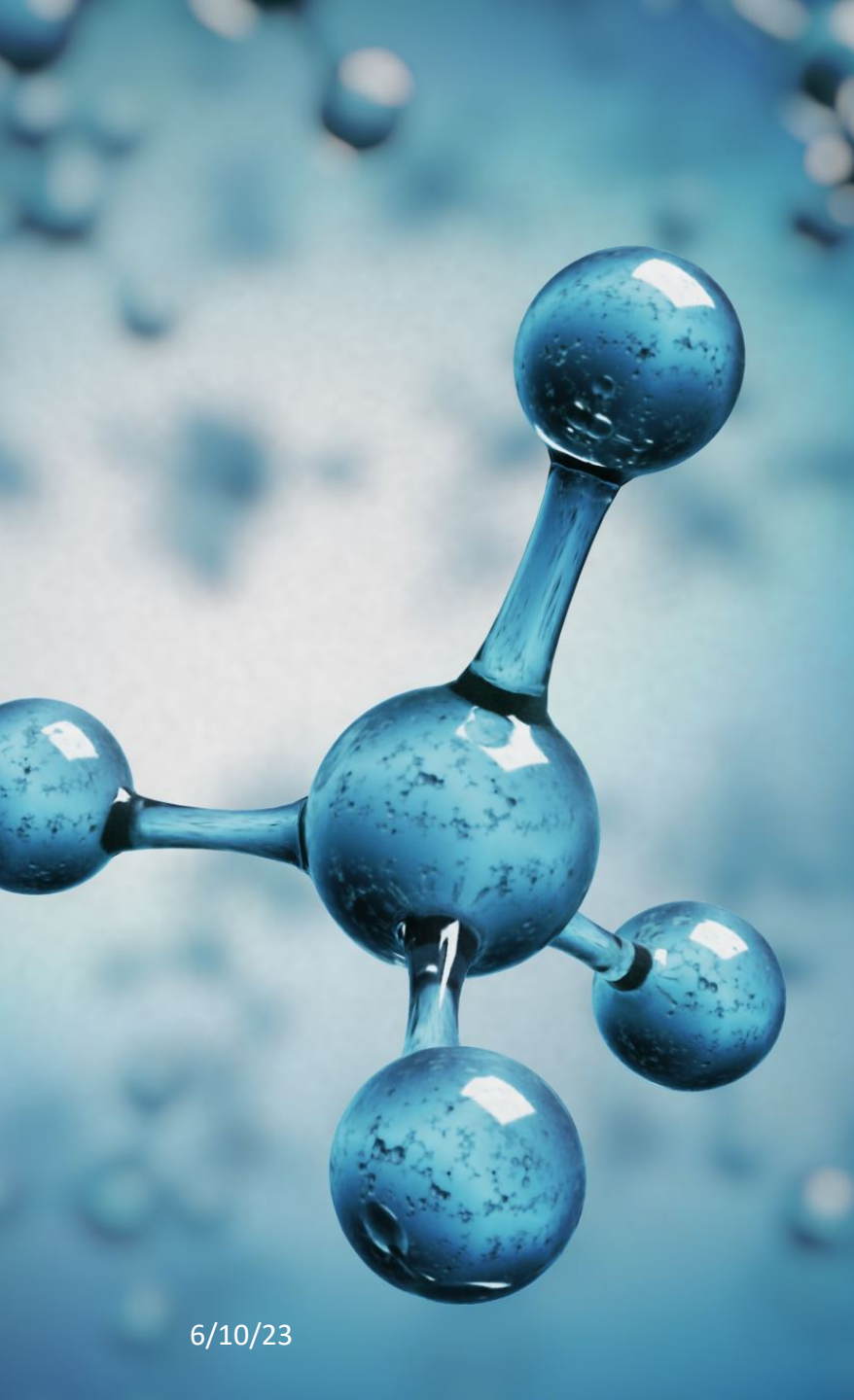
Reactividad y estabilidad con la temperatura

Time course reacción → óptimo 87 °C



Actividad recuperada después de reacción → estable hasta 80 °C





Take home

- Las enzimas evolucionaron para catalizar reacciones en medio acuoso, pero pueden ser buenos catalizadores en medios no acuosos
- La actividad en medio orgánico aprovecha la regio- y estereoselectividad de las enzimas
- Se pueden usar también en solventes iónicos
- Las enzimas **no** se disuelven en el medio orgánico! Funcionan en fase heterogénea gracias al agua estructural
- Alternativamente se pueden incorporar en micelas reversas
- La formulación de enzimas para su aplicación en medios no convencionales es un campo de investigación activo