



CURSO DE "QUÍMICA SUSTENTABLE" Mendoza (Argentina) - Noviembre 13-18 de 2005



ANCEFN

Organizado por: la ANCEF N (Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales) y la UNCuyo (Universidad Nacional de Cuyo)

Auspiciado por: IANAS (InterAmerican Network of Academies of Sciences), UNESCO y Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la Nación (Argentina)

TRABAJO PRACTICO: OBTENCIÓN DE CICLOHEXANOL UTILIZANDO LEVADURAS COMO BIOCATALIZADOR

Introducción:

El estudio de las reacciones de oxido-reducción catalizadas por microorganismos han resultado de mucho interés en los últimos años. Por ejemplo, se han estudiado ampliamente los procesos para la producción de alcohol y la manufacturación de vinagre. En la actualidad, el foco de las investigaciones gira en torno a la obtención de compuestos ópticamente activos para ser utilizados como intermediarios o productos finales en las empresas farmacéuticas, de perfumería, en alimentos y en las agroquímicas.

Cuando nos enfrentamos a reacciones del tipo óxido-reducciones debemos elegir si utilizaremos enzimas aisladas, las que requieren cofactores, o células enteras, para realizar la biotransformación.

En el presente trabajo práctico realizaremos una reacción de reducción de una cetona para obtener un alcohol utilizando como biocatalizador levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), dicha reducción transcurre bajo condiciones suaves de reacción contrastando con los métodos químicos.

Protocolo:

1- Deshidratación de las levaduras:

Tomar 5 gr. de levadura comercial, agregarle 20 ml de acetona a -20°C , y agitar durante 20 minutos. Decantar y agregar otros 20 ml de acetona fría, agitar otros 20 minutos y decantar. Secar en vacío hasta obtener un polvo seco.

Pesar la biomasa obtenida (aproximadamente se obtiene 1 gr.) y guardar en la heladera hasta su utilización.

2- Biotransformación de ciclohexanona a ciclohexanol.

Colocar en un erlenmeyer las levaduras deshidratadas obtenidas en el paso anterior (aproximadamente 1 gr.), agregar 20 ml de buffer fosfato pH 7 y 500 mg. de glucosa, dejar agitar durante 30 minutos a 30°C en agitador orbital a 200 rpm. Retirar del agitador, agregar 50 microlitros de ciclohexanona y continuar agitando durante 2 horas.

3- Ensayo de caracterización

Tomar 750 microlitros del medio de reacción anterior y centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm. Tomar el sobrenadante y traspasarlo a un tubo eppendorf limpio, agregar 500 microlitros de acetato de etilo y agitar por inversión suavemente (observar que se forman dos fases). Tomar con micropipeta la fase superior (orgánica) y colocarla en un tubo de ensayo. Agregar al tubo de ensayo 1 ml de una solución saturada de KMnO_4 en ácido sulfúrico 4 N., agitar por unos minutos hasta observar la aparición de un precipitado color marrón.

Comparar el resultado con un testigo de etanol y un blanco de éter de petróleo.

Materiales por grupo:

Levadura comercial: 5 gr.

Acetona: 40 ml

Buffer fosfato pH 7 30 mM: 20 ml

Glucosa: 500 mg.

Ciclohexanona: 50 microlitros

Acetato de etilo: 500 microlitros

Solución saturada de KMnO_4 en ácido sulfúrico 4 N: 5 ml

Etanol: 50 microlitros

Eter de petróleo: microlitros

Mezcla frigorífica (hielo + sal gruesa o alcohol)

1 Termómetro

1 Erlenmeyer de 100 ml

1 Probeta de 20 ml

5 Tubos de ensayo

2 Vasos de precipitados de 50 ml

5 Tubos eppendorf

Instrumental

Centrífuga de eppendorf

Evaporador rotatorio

Balanza

Agitador orbital o plancha magnética y buzo

Micropipetas / puntas plásticas