

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSIAMN)



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas***

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERIA AGRONÓMICA

Alumno: Santiago Cebrián Cabo

Tutor Académico: Édgar Pérez Esteve

Cotutores: José Manuel Barat Baviera

Héctor Gómez Llorente

***Curso Académico: 2019/2020***

**VALENCIA, 8 de JUNIO de 2020**

## **Título: Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas**

**Resumen:** Las enzimas son catalizadores biológicos que desempeñan un papel muy relevante en el desarrollo de muchas industrias, entre las que se encuentran las industrias alimentarias. En este campo de aplicación, la inmovilización permite obtener enzimas compatibles con el medio y condiciones de proceso (pH, temperatura), ser reutilizables y con un mayor rendimiento, además de solucionar algunas limitaciones del enzima: pureza necesaria, estabilidad, actividad, especificidad, selectividad o inhibiciones. Por este motivo, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los parámetros de proceso que favorecen una correcta inmovilización.

En este contexto, el presente trabajo tiene por objetivo estudiar y comparar los principales métodos y soportes, modernos y tradicionales, empleados para la inmovilización de enzimas, evaluando la influencia tanto del tamaño, morfología, compatibilidad enzima/soporte y composición del material utilizado. Los métodos tradicionales más empleados son la adsorción en polímeros y el enlace covalente en macroestructuras, los cuales han sido la base para el desarrollo de los métodos modernos. Aunque éstos últimos emplean como base los principios clásicos de la inmovilización, utilizan estructuras de tamaño nanométrico para mejorar la efectividad de la encapsulación y la actividad enzimática. Entre los nuevos soportes destacan el oro, la sílice, y nanopartículas magnéticas que responden a la presencia de un campo magnético.

Conocer estos principios de inmovilización de enzimas no sólo es positivo para mejorar las el rendimiento de transformaciones enzimáticas de alimentos, sino que abre la puerta a nuevas vías para la inmovilización de otros compuestos bioactivos, como moléculas con capacidad antimicrobiana o antioxidante.

**Palabras clave:** Inmovilización, enzimas, retención física, unión química, soportes, nanoestructuras

**Alumno:** Santiago Cebrián Cabo

**Tutor Académico:** Édgar Pérez Esteve

**Cotutor:** José Manuel Barat Baviera, Héctor Gómez Llorente

**VALENCIA, 8 JUNIO de 2020**

## **Title: New methods and supports for enzyme immobilization**

**Abstract:** Enzymes are biological catalysts that play a very important role in the development of many industries, among which are the food industries. In this field of application, immobilization allows enzymes compatible with the medium and process conditions (pH, temperature), to be reusable and with a higher yield, in addition to solving some limitations of the enzyme: necessary purity, stability, activity, specificity, selectivity or inhibitions. For this reason, in recent years much progress has been made in understanding the process parameters that favor correct immobilization.

In this context, the objective of this work is to study and compare the main methods and supports, modern and traditional, used for the immobilization of enzymes, evaluating the influence of size, morphology, enzyme/support compatibility and composition of the used material. The most widely used traditional methods are polymer adsorption and covalent bonding in macrostructures, which have been the basis for the development of modern methods. Although the latter use the classical principles of immobilization as a basis, they use nanometer-sized structures to improve the effectiveness of encapsulation and enzymatic activity. Among the new supports stand out gold, silica, and magnetic nanoparticles that respond to the presence of a magnetic field.

Knowing these principles of enzyme immobilization is not only positive for improving the performance of enzymatic transformations of food, but it opens the door to new ways for the immobilization of other bioactive compounds, such as molecules with antimicrobial or antioxidant capacity.

**Key words:** Immobilization, enzymes, physical retention, chemical union, supports, nanostructures.

### **Títol: Nous mètodes i suports per a la immobilització d'enzims**

**Resum:** Els enzims són catalitzadors biològics que tenen un paper molt rellevant en el desenvolupament de moltes indústries, entre les quals es troben les indústries alimentàries. En aquest camp d'aplicació, la immobilització permet obtenir enzims compatibles amb el medi i condicions de procés (pH, temperatura), ser reutilitzables i amb un major rendiment, a més de solucionar algunes limitacions de l'enzim: puresa necessària, estabilitat, activitat, especificitat, selectivitat o inhibicions. Per aquest motiu, en els últims anys s'ha avançat molt en el coneixement dels paràmetres de procés que afavoreixen una correcta immobilització.

En aquest context, el present treball té per objectiu estudiar i comparar els principals mètodes i suports, moderns i tradicionals, emprats per a la immobilització d'enzims, avaluant la influència tant de la mida, morfologia, compatibilitat enzim / suport i composició de l'material utilitzat. Els mètodes tradicionals més emprats són l'adsorció en polímers i l'enllaç covalent a macroestructures, els quals han estat la base per al desenvolupament dels mètodes moderns. Encara que aquests últims fan servir com a base els principis clàssics de la immobilització, utilitzen estructures de mida nanomètrica per millorar l'efectivitat de l'encapsulació i l'activitat enzimàtica. Entre els nous suports destaquen l'or, la sílice, i nanopartícules magnètiques que responen a la presència d'un camp magnètic.

Conèixer aquests principis d'immobilització d'enzims no només és positiu per millorar les el rendiment de transformacions enzimàtiques d'aliments, sinó que obre la porta a noves vies per a la immobilització d'altres compostos bioactius, com molècules amb capacitat antimicrobiana o antioxidant.

**Paraules clau:** Immobilització, enzims, retenció física, unió química, suports, nanoestructures

## Índice General

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Uso industrial de las enzimas</b> .....	2
<b>1.2. Usos de los enzimas en la industria agroalimentaria</b> .....	3
<b>1.2.1. Industria del almidón y del azúcar</b> .....	5
<b>1.2.2. Productos Lácteos</b> .....	5
<b>1.2.3. Panificación y productos de trigo</b> .....	6
<b>1.2.4. Industria de grasas y aceites</b> .....	6
<b>1.2.5. Productos cárnicos</b> .....	6
<b>1.2.6. Industria Cervecera</b> .....	7
<b>1.2.7. Jugos y vinos</b> .....	7
<b>1.3. Origen y fabricación de los enzimas utilizados en la industria alimentaria</b> .....	7
<b>1.4. Limitaciones del uso de enzimas libres en procesos alimentarios industriales</b> .....	9
<b>1.5. Posibles soluciones a las limitaciones de las enzima en las industrias</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	11
<b>3.1. Metodología de búsqueda de información</b> .....	11
<b>3.2. Nomenclatura de las enzimas</b> .....	12
<b>3.3. Creación de gráficos, tablas y figuras</b> .....	12
<b>3.4. Referencias</b> .....	12
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>4.1. Definición y objetivos de la inmovilización de las enzimas</b> .....	13
<b>4.2. Efectos de la inmovilización de enzimas</b> .....	14
<b>4.2.1. Estabilidad</b> .....	14
<b>4.2.2. Actividad enzimática</b> .....	15
<b>4.3. Tipos de inmovilización tradicionales</b> .....	15
<b>4.3.1 Métodos de Inmovilización de enzimas sin soportes: entrecruzamiento</b> .....	16
<b>4.3.2 Métodos de Inmovilización de Enzimas por Retención Física</b> .....	16
<b>4.3.2.1 Atrapamiento</b> .....	17
<b>4.3.2.2 Inclusión en membranas</b> .....	17
<b>4.3.2.2.1 Micro-encapsulación</b> .....	18
<b>4.3.2.2.2 Reactores de membrana</b> .....	19
<b>4.3.3 Métodos de Inmovilización de Enzimas por Unión Química</b> .....	19
<b>4.3.3.1 Adsorción</b> .....	21
<b>4.3.3.1.1 Adsorción no específica</b> .....	22
<b>4.3.3.1.2 Adsorción hidrofóbica</b> .....	22
<b>4.3.3.2 Unión covalente</b> .....	22

4.3.3.3	Quelación o enlace metálico .....	24
4.3.4	Conclusión a la inmovilización por métodos tradicionales .....	24
4.4	Nuevos métodos de inmovilización .....	25
4.4.1	Nanopartículas de sílice.....	25
4.4.2	Inmovilización sobre nanopartículas de oro.....	27
4.4.3	Inmovilización en nanopartículas magnéticas.....	27
4.4.4	Otros soportes para la inmovilización .....	29
4.5	Selección del tipo de soportes .....	31
4.5.1.	Clasificación de los soportes .....	31
4.5.1.1	Origen.....	31
4.5.1.2	Tamaño .....	32
4.5.1.3	Tipos de soportes.....	32
4.5.2	Selección de soportes .....	33
4.6	Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.....	34
4.6.1	Biosensores .....	35
4.6.2	Medicina y farmacia .....	35
4.6.3	Química .....	35
4.6.4	Industria Alimentaria.....	35
5.	CONCLUSIONES.....	36
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	37

## Índice de figuras

Figura 1. Comparación de una reacción sin enzima y con enzima mediante su modo de funcionamiento. Elaboración propia.....	1
Figura 2. Representación de la diferencia de la energía libre de una reacción con el uso de enzimas y sin enzimas. Elaboración propia.....	1
Figura 3. Gráfico de los porcentajes del uso de las enzimas en distintos sectores de las industrias según la OCDE-FAO Agricultural Outlook. Creación propia. ....	3
Figura 4. Etapas en el escalado industrial o ciclo biocatalítico de una enzima llevada del laboratorio a un proceso industrial biocatalizado por estas mismas sin modificar sus características. Elaboración propia. ....	11
Figura 5. Formas principales de inmovilización de las enzimas según el tipo de unión. Elaboración propia. ....	15
Figura 6. Enzimas inmovilizadas por enlaces cruzados. Elaboración propia.....	16
Figura 7. Enzima inmovilizada por atrapamiento. A la izquierda (A) un atrapamiento en gel y a la derecha (B) un atrapamiento en fibras. Elaboración propia.....	17
Figura 8. Micro-encapsulación de enzimas en esferas de membrana semipermeable. Elaboración propia. ....	18
Figura 9. Esquema de los materiales más utilizados en la inmovilización química de enzimas según su origen sean orgánicos o inorgánicos y ejemplos. Elaboración propia. ....	20
Figura 10. Representación esquematiza de la unión de soporte y enzima por adsorción. Elaboración propia. ....	21
Figura 11. Esquema de unión de enzimas (hexágono verde) al soporte (fondo azul) mediante un enlace covalente. Elaboración propia.....	23
Figura 12. Acción de las nanopartículas magnéticas sufriendo una interacción con el campo magnético.....	28

## Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los atributos y los efectos de las enzimas clasificadas en intrínsecas y extrínsecas. ....	2
Tabla 2. Tipos de reacciones en las que intervienen las enzimas y desempeñan su función para mejorar la eficiencia. Muestra una explicación de la reacción y un ejemplo. ....	4
Tabla 3. Cuadro resumen de las enzimas más utilizadas en la industria, la fuente de la que son extraídas, la acción y la aplicación tecnológica.....	8
Tabla 4. Resumen de las ventajas e inconvenientes de las enzimas frente a su uso en las reacciones. ....	10
Tabla 5. Tipos de inmovilización de enzima según el método de retención. ....	25
Tabla 6. Ventajas y desventajas de las enzimas inmovilizadas en nanopartículas en la industria alimentaria. ....	30
Tabla 7. Ejemplos de enzimas inmovilizadas sobre nanopartículas.....	31
Tabla 8. Ejemplos de materiales y enzimas que poseen afinidad entre ellos. Reacción que desempeña la inmovilización. ....	33
Tabla 9. Distintos campos y sectores en los que son utilizados los enzimas en los procesos de fabricación a nivel industrial. ....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha experimentado un creciente uso e implantación de las enzimas en todas las industrias, pero sobre todo en la industria alimentaria. Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica globular, formadas por una o más cadenas polipeptídicas plegadas, creando una “hondonada” donde encaja el sustrato y tiene lugar la reacción. Esta zona de la enzima se denomina “centro activo”. Su función principal en los seres vivos es la de catalizar reacciones químicas específicas (Cremosi, 2002), las cuales son esenciales para que la célula esté metabólicamente activa.

En todas las reacciones hay unas moléculas iniciales, llamadas sustrato y unas finales que son los productos. Para alcanzar los productos finales se necesita un aporte o extracción de energía, mayoritariamente aporte, y las enzimas lo que hacen es reducir esta cantidad por su función de catalizador (Lehninger *et al.*, 2006). El resultado final de una reacción con enzimas o sin enzimas es el mismo, pero la diferencia se observa en el consumo de tiempo y energía. En la **Figura 1** se observan las dos reacciones: la ruta A sin enzimas y la ruta B con enzimas. En la ruta A el sustrato sufre las transformaciones pertinentes y se obtiene unos productos. Estas transformaciones implican un gasto de energía, espacio y tiempo. En la ruta B el sustrato se adhiere a la parte de la enzima en la que se encuentra el sitio activo, ayudando a que se realice la reacción en menor tiempo y con menos gasto de energía. Sin muchas de las enzimas, las reacciones no serían posibles, debido a que son muy lentas o necesitan de mucha energía para desarrollarse (de Lera Santín, 2011).

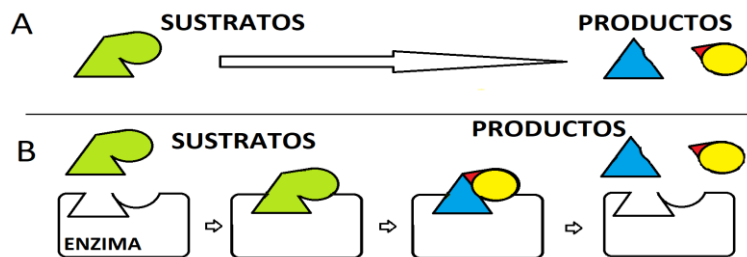


Figura 1. Comparación de una reacción sin enzima y con enzima mediante su modo de funcionamiento. Elaboración propia.

Por todo esto se puede concluir que la función de la enzima es catalizar, disminuir la energía de activación necesaria para la reacción, favoreciendo la ruptura de enlaces del sustrato y favoreciendo la unión en el producto (de Lera Santín, 2011). En la **Figura 2** se representan las reacciones con enzima (línea azul) y sin enzima (línea roja), pudiéndose observar la diferencia de energía libre de activación. Los productos finales son los mismos pero la energía consumida es prácticamente un tercio menor con respecto a la misma reacción sin enzima.

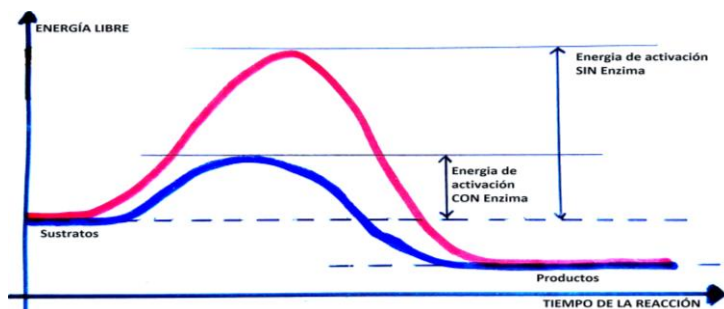


Figura 2. Representación de la diferencia de la energía libre de una reacción con el uso de enzimas y sin enzimas. Elaboración propia.



Las enzimas son sustancias autógenas, es decir, que son autogeneradas por los organismos para poder realizar las reacciones de forma más eficiente. Sin embargo, aunque formen parte del metabolismo o pertenezcan a otros seres vivos, como plantas, animales o microorganismo, no significa que no se puedan utilizar en otros que no sean ellos mismos debido a la propiedad de la autogénesis, sino que se pueden extraer purificar y utilizar en los procesos industriales.

### 1.1. Uso industrial de las enzimas

Tras el estudio y el descubrimiento de las enzimas a nivel biológico, con el paso del tiempo se ha visto la posibilidad de extraerlas para aplicarlas a nivel industrial, debido a sus propiedades frente a la catálisis en las reacciones. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas:

- Gran actividad catalítica, ayudan a realizar las reacciones de manera más eficaz.
- Gran especificidad de sustrato y reacciones, hay enzimas para solo un tipo de sustrato y reducen los productos secundarios y subproductos indeseables en las reacciones
- Cantidad específica en las reacciones, es decir, que solo se necesita una cantidad concreta para un sustrato a las condiciones óptimas de temperatura y tiempo, mayor eficiencia.
- Son muy activas a temperatura ambiente y presión atmosférica, ya que son las condiciones óptimas de su funcionamiento en muchos casos. Necesitan de un pH óptimo para cada enzima, ya que es un factor clave para desarrollar su actividad.
- Su actividad se puede regular por estímulos o factores externos a la reacción, lo que hace que se pueda controlar la duración de la reacción con el efecto de la enzima.
- Son más respetuosas con el medio ambiente al cambiar las condiciones las reacciones.
- Durante la reacción no se ven alteradas, por lo que se pueden volver a reutilizar.

En la siguiente **Tabla 1** se muestra un resumen de las propiedades de las enzimas, clasificadas de forma intrínseca y extrínseca, ya que las propiedades son afectadas por el entorno y puede modificar las propiedades de las enzimas.

Tabla 1. Resumen de los atributos y los efectos de las enzimas clasificadas en intrínseco y extrínsecos.

Propiedades de las enzimas	
Atributo	Efecto
<b>Intrínsecas a la enzima</b>	
Actividad catalítica	Mayor eficacia
Actividad específica	Mayor eficiencia
No se alterar en la reacción	Reutilizables
Gran especificidad de sustrato	Efecto diana
<b>Extrínseca a la enzima</b>	
Temperatura ambiente	Condiciones óptimas de su funcionamiento
Presión atmosférica	Condiciones óptimas de su funcionamiento
pH neutro	Condiciones óptimas de su funcionamiento
Respetuosas con el medio ambiente	Cambiar las condiciones de las reacciones

La industria utiliza las enzimas debido a la capacidad de desarrollar reacciones químicas a gran velocidad y a temperaturas relativamente bajas (Cremosi, 2002), propiedad emulada de las células de origen. Esto hace que el rendimiento sea mayor y se respete más el medio ambiente y el coste económico (Arroyo et al., 2014), haciendo las condiciones de trabajo industriales

mejores para conseguir más eficiencia. Esto es debido a la gran especificidad que tienen las enzimas al catalizar las reacciones de carácter industrial alimentario.

Generalmente, el pH óptimo para las reacciones es de neutro o alcalino, alrededor de 7-9 y en un rango de temperaturas concretas. El valor del pH en los procesos alimentarios industriales es un factor y una propiedad de mucha importancia, ya que este factor no se puede modificar en el alimento y es difícil de hacer en el proceso industrial sin alterar otras propiedades. La enzima debe de estar bien adaptada a ese pH o se debe seleccionar una adecuada para dicho valor de pH. En consecuencia, debe escogerse la enzima en base a su actividad enzimática y respecto al pH natural del alimento (Frost, 1987) de este modo se asegura que el funcionamiento es el adecuado. También puede ocurrir que se obtenga más de un valor de pH óptimo, manteniendo invariables las demás condiciones (Kiyotani *et al.*, 1983). Esto es debido a que afectan otros factores y propiedades para el funcionamiento de las enzimas a parte del pH. La temperatura óptima para una enzima depende, entre otros factores, del sustrato con el que se trabaje, ya que se ejerce un efecto de desnaturalización térmica (Chávez *et al.*, 1990).

### 1.2. Usos de los enzimas en la industria agroalimentaria

Uno de los sectores industriales donde se ha visto un gran aumento del uso de enzimas es el sector, formando las enzimas parte de muchos procesos industriales. Se calcula que alrededor del 30% de las enzimas creadas en el mundo son para la industria alimentaria, si incluimos también el sector primario, fuente principal de los alimentos, la cifra asciende a un 45%. Según la OCDE-FAO *Agricultural Outlook 2017*, la producción mundial se espera que aumente aproximadamente un 11% en la próxima década. En la gráfica siguiente (Figura 3) se muestran los porcentajes del uso de las enzimas en las industrias más importantes (Brufau, 2019 y Kumar, 2014). Se observa como el mayor porcentaje pertenece a los alimentos (45%), seguido de la biotecnología (23%) y la agricultura (15%).

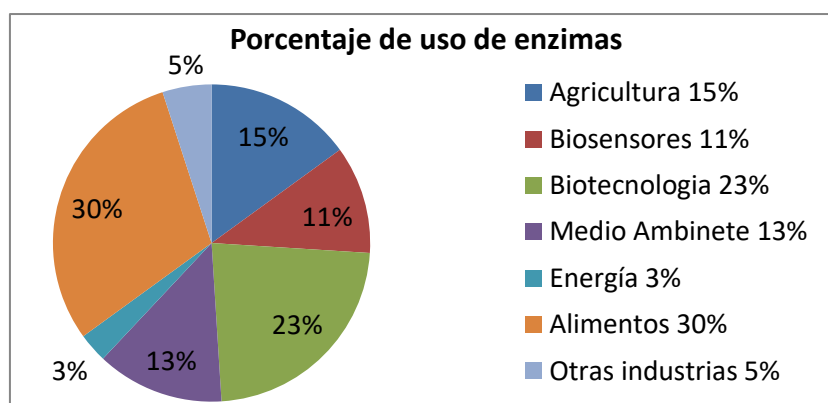


Figura 3. Gráfico de los porcentajes del uso de las enzimas en distintos sectores de las industrias según la OCDE-FAO *Agricultural Outlook*. Creación propia.

El uso de las enzimas en los procesos industriales es debido a que se ha descubierto que tiene menos efectos negativos y aportan beneficios, tanto económicos, como medioambientales y organolépticos en los productos finales, con respecto a los procesos anteriormente diseñados sin el uso de las enzimas. Éstas son utilizadas para recuperar subproductos, mejorar la fabricación de compuestos alimentarios esenciales, corrección de aromas en alimentos y estabilizar la calidad de los productos finales garantizando la seguridad y sanidad alimentaria, entre otras funciones. En la industria alimentaria las enzimas son necesarias para muchos

procesos de obtención de materias primas, fundamentales para todos los procesos, de productos finales y para los subproductos.

Además intervienen en procesos de transformación de los alimentos como son la panificación, productos lácteos, cárnicos y en la producción de edulcorantes, por mencionar sólo unos ejemplos.

Debido al aumento del uso y aplicaciones de las enzimas, el negocio de venta de enzimas, ha crecido incesantemente en los últimos años. Las expectativas indican que el mercado global se puede situar en cifras superiores a los 5.000 millones de dólares en los próximos años, en la optimización, mejora y la de la producción de las industrias interesadas en enzimas (Guerrand, 2018).

Las enzimas en la industria alimentaria, se clasifican atendiendo al tipo de reacción en la que intervienen. En la **Tabla 2** se resumen las principales reacciones que sufren los alimentos en los procesos industriales, aportando ejemplos de las enzimas que son empleadas para esa reacción y cómo funcionan. Son muy variadas, pero cada una se especifica en un tipo de alimento y en un fin. De todas ellas, las más usadas en alimentación son las proteasas, lipasas y amilasas. Todas ellas presentan una gran eficiencia y especificidad en los procesos en los que intervienen (Cheetham, 1995).

Tabla 2. Tipos de reacciones en las que intervienen las enzimas y desempeñan su función para mejorar la eficiencia. Muestra una explicación de la reacción y un ejemplo.

Tipo de reacción	Explicación	Ejemplo
<b>Oxidoreductasas</b> EC.1	Aceleran reacciones de óxido-reducción $A^- + P \rightarrow N + B^{--}$	Catalasa Lactoperoxidasa
<b>Transferasas</b> EC.2	Transfieren grupos químicos entre moléculas $A-X + B \rightarrow A + B-X$	Amilomaltasa Glucosiltransferasa
<b>Hidrolasa</b> EC.3	Rompen o sintetizan enlaces covalentes $A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H$	$\alpha$ -amilasa Quimosina
<b>Liasas</b> EC.4	Rompen enlaces formando a su vez dobles ligaduras $C-C, C-N, C-O, C-S; RCOCOOH \rightarrow RCOH + CO_2$	Lipasa
<b>Isomerasas</b> EC.5	Catalizan un re-arreglo espacial de grupos químicos en la molécula sin modificar su composición química $A \rightarrow B$	Glucosa Isomerasa Lisina
<b>Ligasas</b> EC.6	Promueven la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato como fuente de energía $X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	Tirosina
<b>Traslocasas</b> EC.7	Cataliza el movimiento de iones o moléculas a través de las membranas o su separación dentro de las membrana $ATP + H_2O + H^+_1 = ADP + phosphate + H^+_2$	ATP phosphohidrolasa

En la industria de los alimentos se utilizan alrededor 59 enzimas distintas y cada vez el número aumenta más debido a los descubrimientos de sus funciones y especificidades (Moral *et al.*, 2015). Otro factor que aumenta el número son las mutaciones y las combinaciones genéticas que se realizan en las bacterias en los laboratorios, ya que están suelen ser las fuentes de fabricación de las enzimas. Estos datos son tomados de la *Asociación de Manufactureros y Formuladores de productos enzimáticos (AMFEP, por sus siglas en inglés)*, que prevé que las

enzimas aumenten sus funciones debido a nuevas técnicas de dosificación. El uso de las enzimas depende de la industria alimentaria en la que se utilizan.

### 1.2.1. Industria del almidón y del azúcar

Una de las industrias donde se ha utilizado tradicionalmente más enzimas es la industria del almidón y derivados. Partiendo del almidón como materia prima se pueden obtener muchos productos de diferente composición y propiedades físicas. Estos son jarabes de carácter dulce, los cuales se utilizan en la formulación de alimentos como gaseosas, dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas y conservas (Carrera, 2003).

En la elaboración de jarabes de glucosa y maltosa, intervienen varias enzimas dependiendo de la etapa en la que se encuentre la reacción. Estas etapas son la gelatinización, la licuefacción y la sacarificación. Las enzimas utilizadas en estos procesos deben ser termoestables y con alta actividad a temperaturas mayores a 50°C. Generalmente, son extraídas de microorganismos como *Bacillus subtilis*, *B.stereotermophilus*, *B.amyloliquefaciens*, debido a la gran cantidad de enzimas requerida en la industria para la creación de los jarabes (Bano *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2010). Las enzimas utilizadas para estos procesos son **α-amilasa (E.C.3.2.1.1)**, **glucoamilasas y pululanosas (E.C.3.2.1.41)** y **glucosa isomerasa (E.C.5.3.1.18)** (Parker *et al.*, 2010). De igual manera, gracias al empleo de enzimas se han elaborado derivados del almidón que actúan como gelificantes termorreversibles, que son utilizados como sustitutos de algunas grasas en productos lácteos y dextrinas ramificadas empleadas en bebidas para deportistas, las cuales se ha demostrado que ayudan de forma positiva en el tiempo de vaciamiento gástrico. La enzima responsable de estas transformaciones es una **amilomaltasa o 4-α-glucanotransferasa (E.C.2.4.1.25)** (Alting *et al.*, 2009).

El uso de enzimas en la industria del almidón y los azúcares no acaba aquí. La maltosa es un azúcar que puede ser transformado en isomaltooligosacáridos (IMO) utilizando una **α-glucosidasa específica (E.C.3.2.1.3)**. Otras enzimas son las glucanotransferasas, como es la **amilomaltasa (E.C.2.4.1.25)**, las ciclodextrinas consideradas fibra dietética no digerible y totalmente fermentable, son producidas por licuefacción por la enzima **ciclodextrin glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.19)**. Su función principal es la degradación de fibras largas en fibras más cortas o en unidades básicas de las fibras.

### 1.2.2. Productos Lácteos

En la industria láctea, las enzimas también cobran un gran papel, ya que la gran mayoría de las reacciones de los procesos son fermentaciones o cuajado de proteínas y en ellos intervienen de manera natural enzimas. Algunos ejemplos son la fabricación de una amplia gama de quesos blandos y duros, leches fermentadas (yogur, leche ácida, kéfir), leche deslactosada, etc.

En los quesos, las principales enzimas que se utilizan son la **quimosina (E.C.3.4.23.4)** y **pepsina (E.C.3.4.23.1)** debido a que ambas son esenciales para la formación del cuajo y curado del queso. Estas se obtienen tradicionalmente del abomaso de los terneros lactantes, pero ahora se pueden producir en laboratorios mediante cultivos bacterianos, haciéndola más eficiente y específica mediante la purificación. En los quesos industriales es utilizada la **proteinasas (E.C.3.4.23.23)** obtenidas de microorganismos en lugar del cuajo animal. Es más termoresistente que la natural, lo que hace que sea más utilizada (Hutkins, 2007). También permite acortar los tiempos de maduración de algunos quesos (Sharma *et al.*, 2001). Otra enzima que afecta en la fabricación del queso, pero esta vez en el sabor, es la **lipasa**

**(E.C.3.1.1.3).** Esta enzima está presente en la leche de forma endógena y no es necesaria su adición, por este motivo es importante la materia prima en los procesos industriales, ya que la presencia de enzimas autógenas afecta al resultado final. De no poseerla, se puede añadir.

Otra enzima muy utilizada desde hace poco tiempo es la  **$\beta$ -galactosidasa o lactasa (E.C.3.2.1.23)**. Su función principal es la de hidrolizar la lactosa en D-glucosa y D-galactosa, haciendo posible la obtención de productos deslactosados, aptos para personas intolerantes a la lactosa (Neelakantan *et al.*, 1999). Otra función es la de prevenir la formación de cristales de hielo de gran tamaño en productos congelados, tales como helados, obteniendo mayor cremosidad en el producto final. Más enzimas que están involucradas en la industria láctea son: la **glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4)**, **catalasa (E.C.1.11.1.6)**, **dismutasa (E.C.1.15.1.1)**, **formaldehído dismutasa (E.C.1.2.9.4)** y **lactoperoxidasa (E.C.1.11.1.7)**, entre otras.

### 1.2.3. Panificación y productos de trigo

El trigo no dispone de azúcares libres fermentables por las levaduras durante la panificación. El azúcar debe producirse por la acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa, cuyo contenido depende de las condiciones en las que se ha cultivado, cosechado y almacenado el trigo. Esto hace que en la harina tenga diferente contenido de amilasa por lotes, por lo que se debe corregir con la adición de forma exógena (Carrera, 2003). De esta manera, en panificación las enzimas más relevantes son  **$\alpha$ -amilasa (E.C.3.2.1.1)** y  **$\beta$ -amilasa (E.C.3.2.1.2)** microbianas, que hidrolizan preferentemente el enlace glucosídico-(1-4) de la amilosa y la amilopectina, mejorando la calidad del pan (Benjamin, 2013).

También las **lacasas (E.C.1.10.3.2)** están siendo añadidas en la fabricación del pan para entrecruzar biopolímeros e incrementar la resistencia y disminuir la extensibilidad de las masas (Rodríguez-Cuoto y Toca Herrera, 2006). Otro enzima utilizado son las **transglutaminasas microbianas (E.C.2.3.2.13)** para mantener el volumen de las masas.

En la industria de la pasta o fideos orientales la adición de **transglutaminasas microbianas (E.C.2.3.2.13)** previene el deterioro de la textura después del cocinado y mejora la fuerza del producto independientemente de la fuerza de la harina o de la calidad de la misma (Motoki, 1998). Más enzimas utilizados en esta industria son las **lipooxigenasas (E.C. 1.13.11.X)** y las **endoxilasas (E.C. 3.2.1.8)**.

### 1.2.4. Industria de grasas y aceites

Muchas reacciones que suceden durante el almacenamiento de productos con grasas como el enranciamiento y formación de algunos subproductos (Illanes, 1994) precisan de enzimas o ausencia de las responsables de estos deterioros. Las **lipasas (E.C.3.1.1.3)** son las enzimas más específicas, que actúan solo sobre los ácidos grasos de los triglicéridos. Se debe controlar su presencia en los productos alimentarios y farmacéuticos (Sharma *et al.*, 2001).

### 1.2.5. Productos cárnicos

En la industria cárnica el uso de enzimas permite tenderizar y ablandar la carne. Son por tanto, enzimas proteolíticas específicas para la hidrólisis del colágeno y la elastina del tejido conectivo. Un factor muy importante que se debe tener en cuenta es el pH de la carne, ya que es indicador de la calidad. El pH óptimo de la carne es de 5,7. Sin embargo, también hay dos tipos de defectos según el pH: carnes PSE (pálidas, blandas y exudativas, pH 5,2) o DFD (oscuras, firmes y secas, pH 6,2). Esto hace que la elección de la enzima esté condicionada por

la carne. Las enzimas proteasas más utilizadas son la **bromelina (E.C.3.4.22.33)**, **papaína (E.C.3.4.22.2)** y **actinidina (E.C.3.4.22.14)** de origen vegetal y la **elastasa (E.C.3.4.21.63)** de *Bacillus subtilis* de origen microbiano (Qihe *et al.*, 2006). Actualmente se están desarrollando nuevas enzimas que aumenten la ternura de la carne, ya que las anteriormente nombradas en algunos casos causan alergias o hipertensión (Castro *et al.*, 2010).

Otras enzimas utilizadas son las **transglutaminasas microbianas (E.C.2.3.2.13)**, cuya función es la mejora del sabor y textura de la carne mediante la unión de las fibras musculares, dándole consistencia más firme y agradable al paladar. Son utilizadas en productos de carne que han sido procesados industrialmente, es decir, albóndigas, salchichas y embutidos picados, elaborados a partir de piezas de carne de más baja calidad. El uso de esta enzima está regulado, ya que se puede cometer fraude por adición de proteínas exógenas a los músculos empleados (Aguilar-Zárate *et al.*, 2012).

#### 1.2.6. Industria Cervecera

En la industria de la cerveza se utilizan enzimas dependiendo de la etapa en que se encuentre. Las más utilizadas son las **amilasas (E.C.3.2.1.1-2)** y **glucanasas (E.C.3.2.1.3-6)**. La acción de estas es conseguir una buena extracción de los azúcares, facilitar la posterior filtración y controlar la turbidez de la cerveza. Las amilasas sirven para que se produzcan dextrinas y maltosas que sirven como sustratos para las levaduras y las proteasas degradan proteínas formando aminoácidos y péptidos. En las fases de maduración y fermentación controlan las propiedades organolépticas, sabor y aroma del producto final (Carrera, 2003).

#### 1.2.7. Jugos y vinos

En la industria de los zumos, las pectinas como **Endo-polygalacturonase (E.C.3.2.1.15)** y **Galacturonan 1,4-alpha-galacturonidase (E.C.3.2.1.67)** (Demir *et al.*, 2001) son empleadas para clarificar los zumos y jugos. Durante el procesamiento las frutas y verduras liberan pectinas al medio, pero estas son anuladas debido a la acción del pH de la disolución, lo cual hace que se reduzca su efecto, por lo que se deben añadir pectinas que sean adecuadas para el nivel del pH del zumo. Otra enzima es la **lacasa (E.C.1.10.3.2)**, responsables de clarificar el zumo por la eliminación de compuestos fenólicos (Rodríguez-Cuoto y Toca Herrera, 2006).

En la industria del vino es común la adición de **pectinasas (EC.3.2.1.X)** en la elaboración del vino blanco para clarificarlo e hidrolizar las pectinas de la uva, de este modo hay más azúcares disponibles para las levaduras (Hutkins, 2007). Otra enzima empleada es la **glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4)**, para la reducción de glucosa en el mosto y por tanto de alcohol en el producto final (Malherbe *et al.*, 2003).

### 1.3. Origen y fabricación de los enzimas utilizados en la industria alimentaria

A nivel industrial el uso de las enzimas se ha realizado desde hace muchos años en muchas reacciones, pero no se sabía que esas sustancias eran las responsables de la reacción; solo se añadían productos más complejos y compuestos de varios elementos que en su interior contenían la enzima y esta actuaba. Gracias a los avances científicos se han podido aislar las enzimas y aplicar directamente de forma consciente sobre los productos de la reacción.

Para poder abastecer a todos los sectores mencionados anteriormente, las enzimas son extraídas de los microorganismos modificados genéticamente, los cuales han sido diseñados

para este fin (Beisson *et al.*, 2000). Otra forma de extracción es mediante plantas o animales, pero esta es más lenta y no tan segura.

Los microorganismos están modificados genéticamente para beneficiarse de sus propiedades y acelerar el proceso de formación de las enzimas, debido a su rápido crecimiento y facilidad de la manipulación genética (Wiseman, 1995). Los microorganismo que se utilizan son bacterias, debido a su coste, generalmente menor y a su tiempo de desarrollo, por realizarse en un periodo relativamente breve. Además los requerimientos nutricionales son simples a diferencia de los organismos superiores. Gracias a la adaptación y mutación de los microorganismos manipulados genéticamente se han obtenido mayores producciones y mejores metabolitos (Hasan *et al.*, 2006).

Otro factor por el cual han sido utilizados los microorganismos es por el ahorro de espacio que supone su desarrollo, ya que son creados en biorreactores mediante técnicas modernas. Dentro de estos laboratorios se van seleccionando cepas para poder crear nuevos tipos de microorganismos que puedan favorecer nuevas necesidades. Este mismo proceso en cualquier otro tipo de obtención de las enzimas sería mucho más lento (Davids *et al.*, 2013).

En muchas aplicaciones de las enzimas es necesario que sean puras, es decir, el 100% del material debe ser enzima. Esto ocurre en la farmacéutica o en medicina, en alimentación no es muy importante este factor aunque con los avances en cultivo y generación de enzimas con las bacterias, la pureza es cada vez más cercana al 100% sin métodos de purificación.

Debida a la nueva ola de fabricación y utilización de las enzimas y de la recombinación genética, se ha creado la biocatálisis, ciencia que ha surgido como una nueva área de la Biotecnología. Esta nueva rama de la Biotecnología permite la aplicación de las enzimas y compuestos bioactivos en un gran número de industrias, en las cuales se precisaba de su uso como una alternativa fiable, pero no eran capaces de desarrollar su función debido a las condiciones del proceso.

Gracias a la tecnología del DNA recombinante se ha logrado la expresión de grandes cantidades de enzimas mediante los microorganismos. Además las técnicas de mutagénesis y evolución dirigida, han permitido la creación de nuevos biocatalizadores con mayores cualidades para un aumento de actividad, estabilidad y especificidad.

Cabe resaltar que estos avances van en paralelo con las nuevas técnicas de inmovilización de las enzimas, que han logrado muchos avances en la utilización y la posible reutilización de algunas enzimas (Arroyo, 2014).

En la siguiente tabla (**Tabla 3**) se presentan ejemplos de enzimas y la fuente más común para fabricarlas, su uso en la industria y la aplicación en las distintas industrias.

Tabla 3. Cuadro resumen de las enzimas más utilizadas en la industria, la fuente de la que son extraídas, la acción y la aplicación tecnológica.

Enzima	Fuente	Acción enzimática	Aplicación tecnológica
<b><math>\alpha</math>-Acetolactato descarboxilasa</b>	<i>B. subtilis</i>	Conversión de acetolactato a acetoína	Reducción tiempo maduración del vino
<b>Amiloglucosidasa</b>	<i>A. niger</i> , <i>Rhizopus spp.</i>	Hidrólisis de dextrina a glucosa	Producción de jarabes fructosados y cerveza "lite"
<b>Bromelina, ficina y papaína</b>	<i>Piña, látex de higo y de papaya inmadura.</i>	Hidrólisis de proteínas del tejido conectivo y muscular.	Tenderización carne
<b>Catalasa</b>	<i>A. niger</i> , <i>M. luteus</i>	Conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno	Junto glucosa oxidasa, remueve el oxígeno

Enzima	Fuente	Acción enzimática	Aplicación tecnológica
<b>Celulasa</b>	<i>A. niger, Trichoderma spp.</i>	Hidrólisis de celulosa.	Ablandamiento de la fruta en jugos
<b>Dismutasa lactoperoxidasa</b>	<i>Saliva y leche de mamíferos</i>	Oxida compuestos en presencia de agua y peróxido de hidrógeno	Combinada con tiocianato oxidado y peróxido de hidrógeno da origen a compuestos antibacterianos
<b><math>\beta</math>-Glucanasa</b>	<i>Aspergillus spp., Bacillus subtilis</i>	Hidrólisis de $\beta$ -glucanos	Evita la turbidez en la cerveza
<b>Glucosa isomerasa</b>	<i>A. missouriensis, B. coagulans, S. lividans, S. rubiginosus</i>	Conversión de glucosa a fructosa	Producción de jarabes partir de almidón
<b>Glucosa oxidasa</b>	<i>A. niger, P. chrysogenum</i>	Oxidación de glucosa a ácido glucónico	Evita el pardeamiento clara del huevo
<b>Hemicelulasa y xilanasa</b>	<i>Aspergillus spp., B. subtilis, T. reesei</i>	Hidrólisis de hemicelulosa	Mejora la textura del pan
<b>Lacasa</b>	<i>T. versicolor y T. hirsuta</i>	Reducción del oxígeno a agua con la oxidación de sustrato como diaminas aromáticas y polifenoles	Gelatiniza la pectina de la remolacha en la fabricación de azúcar
<b>Lipasa y esterasa</b>	<i>Aspergillus spp., B. subtilis, Rhizopus spp.</i>	Hidrólisis de triacilgliceroles en ácidos grasos y glicerol	Sintetiza ésteres
<b>Lipoxigenasa</b>		Oxidación de ácidos grasos insaturados	
<b>Lisozima</b>	<i>Huevo blanco</i>	Hidrólisis de la pared celular bacteriana	Bacteriostático
<b>Pectinesterasa</b>	<i>Aspergillus spp</i>	Remoción de grupos metilo de las unidades de galactona en la pectina	Despectinización
<b>Pentosanasa</b>	<i>H. insolens, T. reesei</i>	Hidrólisis de pentosano	Mejora la calidad y textura de la masa de panificación
<b>Pululanasa</b>	<i>Bacillus spp., Klebsiella spp.</i>	Hidrólisis de enlaces $\alpha(1-6)$ del almidón	Mejora la eficiencia de la sacarificación del almidón
<b>Proteasas (Aminopeptidasa y proteinasa, tripsina)</b>	<i>Aspergillus spp., R. miehei, C. parasitica, abomaso de ternero, páncreas bovino</i>	Hidrólisis de proteínas	Producción de hidrolizados para sopas y saborizantes Mejora la textura de la masa de panificación
<b>Transglutaminasa</b>	<i>Aspergillus spp., S. mobaraense, Maíz</i>	Reacción de transferencia entre grupos carboxiamida y acil	Producción de embutidos Mejora la textura del yogur

#### 1.4. Limitaciones del uso de enzimas libres en procesos alimentarios industriales

Como se ha comentado hasta el momento, las enzimas son muy activas en condiciones suaves de temperatura y pH, es decir, las propias de su funcionamiento biológico. Esto hace que aunque su uso en aplicaciones industriales reduzca el nivel de energía necesario para las reacciones, con el consiguiente ahorro de tiempo y energía, el empleo de biocatalizadores o enzimas a nivel industrial muestre una serie de limitaciones de carácter prácticamente inevitables.

Las más relevantes son la disminución de actividad en condiciones extremas de pH, presencia de disolventes orgánicos y temperatura, y la liberación de la enzima por lixiviado, problema de contaminación de los productos y resultados implicados (Sheldon *et al.*, 2007). Además, presentan limitaciones por la estabilidad de su funcionamiento, porque son proteínas que se pueden desnaturalizar y perder totalmente su actividad, debido a la temperatura y al pH de los procesos industriales los cuales se desarrollan a mayores valores con respecto a los óptimos de las enzimas. Otra limitación, pero esta es debida a la afinidad de la enzima y sustrato, es la



dificultad que entraña su unión y separación de los productos en el medio de reacción debida a su afinidad. (Arroyo *et al.*, 2014). Este factor es necesario que se reduzca o elimine porque no se alcanza los rendimientos adecuados para la justificación de la enzima en la reacción.

En la **tabla 4** se resumen las ventajas y las limitaciones que supone el uso de las enzimas en la industria alimentaria. Aunque tengan limitaciones, el uso de las enzimas es necesario debido a la reducción de la energía de activación de las reacciones. Es una ventaja idónea para los procesos industriales.

Tabla 4. Resumen de las ventajas e inconvenientes de las enzimas frente a su uso en las reacciones.

<b>Ventajas</b>
Catálisis de los procesos y reacciones químicas
Muy activas en condiciones suaves de temperatura y pH
Reducción del nivel de energía
Gran especificidad en las reacciones y con los sustratos
Reducción de productos secundarios y subproductos indeseables en las reacciones
<b>Limitaciones</b>
Disminución de actividad en condiciones extremas de pH, presencia de disolventes orgánicos y temperatura
Liberación de la enzima por lixiviado
Se pueden desnaturalizar y perder totalmente su actividad
Sensibles a cambios en el pH y la temperatura por lo que pueden ser fácilmente desnaturalizadas y desactivadas

Como se observa en la **Tabla 4** las enzimas son sensibles a cambios en el pH y la temperatura, por lo que pueden ser fácilmente desnaturalizadas y desactivadas. Es difícil de mantener su estructura y reactividad bajo las condiciones de las reacciones que se ocasionan en la industria alimentaria (Mangrulkar *et al.* 2012). Esto lo hace una ventaja y desventaja a la vez, porque bajo sus condiciones actúan de manera muy eficiente, pero si estas condiciones son alteradas, como ocurre en cualquier proceso industrial en el que intervenga un cambio de temperatura y pH, la reacción puede no llevarse a cabo con la mayor eficiencia o anularse completamente. Para poder eludir estas limitaciones se han creado varias soluciones, son muy diversas porque hay tipos de reacciones que se realizan en la industria alimentaria.

### **1.5. Posibles soluciones a las limitaciones de las enzimas en las industrias**

Aunque las enzimas presenten ciertas limitaciones son muy importantes en la industria alimentaria, ya que son utilizadas en la gran mayoría de los procesos y reacciones. Con el objetivo de mejorar su actividad existen diferentes estrategias. La primera de ellas consiste en caracterizar el “ciclo biocatalítico” de una nueva enzima para un proceso industrial. Este ciclo está representado en la **Figura 4** (Aehle, 2007), en la cual esquematiza los siguientes pasos:

- Selección de las enzimas más adecuada para el proceso industrial.
- Purificación al grado que sea necesario.
- Caracterizar las enzimas y las condiciones de los procesos para que la catálisis enzimática sea idónea. En este punto es cuando se pueden seleccionar y elegir las más adecuadas.
- Inmovilizar la enzima para poder adaptarla y reutilizarla.

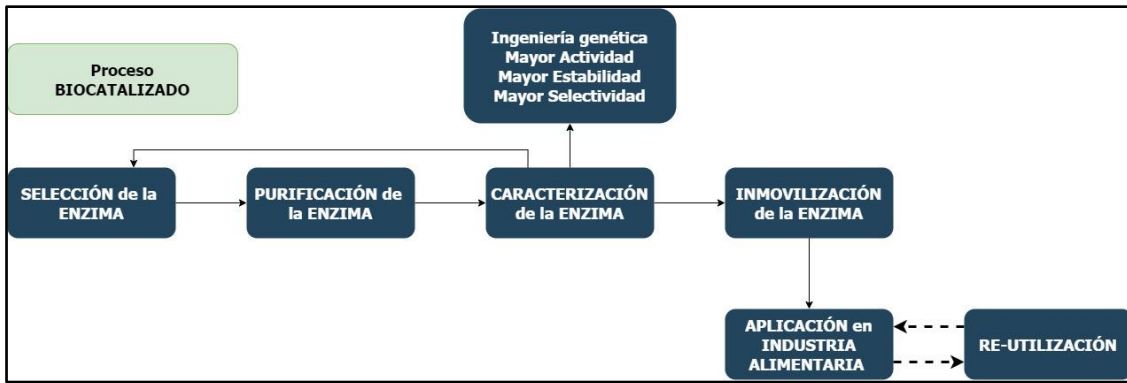


Figura 4. Etapas en el escalado industrial o ciclo biocatalítico de una enzima llevada del laboratorio a un proceso industrial biocatalizado por estas mismas sin modificar sus características. Elaboración propia.

Como se puede observar, el último paso del ciclo biocatalítico es la inmovilización de las enzimas sobre un soporte. Esta es una posible y factible solución a la inestabilidad de las enzimas en aplicaciones alimentarias industriales, debido a que ayuda a preservar y fortalecer las cualidades de las enzimas. Gracias a esto se pueden utilizar enzimas en reacciones en las cuales antes no se podía por las limitaciones de temperatura y de pH, que no eran aptas para las propias enzimas. Además, la inmovilización permite poder separar el enzima de forma rápida para que no esté presente en el producto final. Tras retirar la enzima inmovilizada, ésta puede ser incorporada en ciclos de producción posteriores, reduciendo así el coste económico de la utilización de enzimas.

## 2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo estudiar y comparar los principales métodos y soportes, modernos y tradicionales, empleados para la inmovilización de enzimas, evaluando la influencia tanto del tamaño, morfología, compatibilidad enzima/soporte y composición del material utilizado. Para hacer este análisis, en primer lugar se revisarán los métodos tradicionales que han dado origen a esta técnica, y posteriormente se estudiará cómo han ido evolucionando para dar lugar a los más novedosos y avanzados. Esta recopilación de métodos y soportes para la inmovilización de enzimas pretende ser también un catálogo de estrategias para la inmovilización de otras moléculas bioactivas en soportes rígidos, como son los antimicrobianos y los antioxidantes.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Metodología de búsqueda de información

El método que se ha utilizado para el desarrollo del trabajo es el de búsqueda masiva de información, lectura detenida de la que se considere relevante y adaptación al nuevo documento. Esto se ha realizado sobre la mayor cantidad de documentos posibles, a fin de contrastar información de distintos autores y de verificar la información.

La primera fase ha consistido en una búsqueda, basándose en las **palabras clave** de este trabajo (Inmovilización, enzimas, retención física, unión química, soportes, nanoestructuras) y relacionándolas con en el título y las palabras clave del propio documento de objetivo de búsqueda. De este modo se tiene conocimiento de la posible relación con el objetivo y tema principal del trabajo. Seguidamente, si el título era de interés, se ha leído el apartado del

resumen y el índice, para tener una mayor concreción de la información y asegurar el interés del documento.

Las herramientas de búsqueda han sido los buscadores web de Google Scholar, Polibuscador de la UPV, SciFinder y Scopus. A través de los buscadores se introducían las palabras clave y se realiza la consulta de los documentos. Como muchos documentos son publicaciones de revistas científicas de pago, se ha podido acceder a ellas gracias a la posibilidad de conectarse a través de la VPN de la Universitat Politècnica de València (UPV). El resto de documentos eran de acceso libre y con posibilidad de descarga, lo que facilita la lectura y síntesis de la información.

Los materiales que se han empleado para el desarrollo del trabajo son los documentos, artículos y trabajos publicados anteriores a la fecha de presentación del este documento, que están relacionados con el tema de la inmovilización de enzimas, los métodos de inmovilización y los materiales que son utilizados para dicha inmovilización. Para la información que se basa en los fundamentos de la inmovilización o en las definiciones de un propio método o componentes no se ha hecho ninguna restricción temporal, ya que este es un concepto que se está estudiando desde hace más de 30 años y se está perfeccionando y reinventando con el paso del tiempo y los nuevos descubrimientos. Sin embargo, para acotar qué es un nuevo método o soporte para la inmovilización se ha decidido utilizar documentos de hasta cinco años atrás

Finalmente, si los temas tratados en el documento aportan información de interés y la fecha es la adecuada, son adoptados y transcritos para adecuarlos a la estructura del documento objeto de redacción.

### **3.2. Nomenclatura de las enzimas**

Las enzimas se han nombrado mediante los códigos E.C. (*Enzyme Commission numbers*). Son un esquema de clasificación de las enzimas atendiendo a su tipo de reacción química que catalizan. Cada número E.C. está compuesto de 4 dígitos separados por puntos y cada uno representa una clasificación progresiva más específica de cada una de las reacciones. Todo número E.C va asociado a un nombre recomendado de la enzima.

### **3.3. Creación de gráficos, tablas y figuras**

Tras la lectura y estudio de la información de los documentos, se han creado los gráficos, figuras y tablas para facilitar la comprensión y entendimiento de la información. La gran mayoría de figuras son de esquemas de los métodos de inmovilización, de este modo se entiende la relación que tiene la enzima con el material apto para la inmovilización. De esta manera, todos gráficos y las figuras son de creación propia.

Para las tablas y figuras se han utilizados programas de edición de información para ser creadas y realizarlas de manera propia. Para las figuras se ha utilizado el mismo procedimiento, con un programa de edición de imágenes e han creado para la inserción en el texto. Los programas utilizados son los correspondientes al paquete *Microsoft Office*.

### **3.4. Referencias**

Como es un trabajo bibliográfico, hay que dar especial importancia a las citaciones de los documentos, artículos y trabajos que se han consultado. Están incluidos en el apartado de Bibliografía del documento, el cual posee las citaciones con el método APA. La cita mediante

APA (*American Psychological Association*) es colocada en el texto y sigue la ordenación de citar el autor o autores, años de publicación y la página de la cual se extrajo la idea.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se describe toda la información recopilada sobre métodos y soportes para la inmovilización de las enzimas, una vez procesada y clasificada. En primer lugar, se describen los objetivos de la inmovilización de enzimas, así como los efectos que tiene sobre estabilidad y actividad enzimática. En segundo lugar se describen los métodos y soportes tradicionales, los cuales, como se verá en las secciones siguientes, son la base de los métodos más modernos y actuales, la mayoría de los cuales están basados en el uso de nanoestructuras. Por último, en base a todo a lo anterior se dan claves sobre los factores que deben tenerse en cuenta para la selección de los métodos y soportes más convenientes para una determinada aplicación.

##### 4.1. Definición y objetivos de la inmovilización de las enzimas

Como se ha definido en la introducción, las enzimas son biomoléculas que pueden ser añadidas a los procesos industriales para modificar la velocidad y características de las reacciones bioquímicas que en ellos intervienen. Aunque algunas se pueden añadir directamente a la mezcla de ingredientes de la reacción que se pretende catalizar, como ocurre en panificación con la  **$\alpha$ -amilasa (E.C.3.2.1.1)** o con la **lacasa (E.C.1.10.3.2)** en los zumos, en otros casos no es conveniente. Este es el caso de aplicaciones donde es necesario aumentar la estabilidad de la enzima (pH o temperatura fuera del rango óptimo de trabajo), o aplicaciones donde las enzimas podrían recuperarse al finalizar la reacción y volver a utilizarse en reacciones futuras. En ambos casos, como ocurre con la  **$\beta$ -galactosidasa o lactasa (E.C.3.2.1.23)** introducida en la leche para hidrolizar la lactosa, la inmovilización del enzima conlleva muchas ventajas.

La inmovilización de las enzimas es un proceso por el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio sobre algún medio o sustrato, para dar lugar a formas compuestas que retienen su actividad catalítica y propiedades de la propia enzima (Arroyo, 1998). Esta permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente dependiendo del tipo de inmovilizado, ya que hay formas permanentes, formas de liberación progresiva o formas de liberación específica.

La técnica de inmovilización debe ser capaz de otorgar el mayor número de usos para una misma enzima, ser sencilla y de bajo coste, sin olvidar que se deben mantener las propiedades de las enzimas o en todo caso maximizarlas (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). Esto ha sido el objetivo de muchos laboratorios a lo largo del tiempo: desarrollar técnicas más eficaces de inmovilización y que sea apta para su uso en la industria alimentaria. El fundamento de estas técnicas ya ha sido desarrollado, pero se deben de ir mejorando para adaptarlas a técnicas modernas de la industria alimentaria.

La inmovilización es una forma de preservar la actividad enzimática y catalítica de la molécula cuando está unida, permitiendo el flujo del sustrato o de los reactivos y productos de una reacción (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014). Se combina la actividad elevada y específica de biomoléculas activas, como las enzimas, con la estabilidad química y mecánica del soporte. Proporciona una base para lograr la reutilización y una eficacia funcional, aumentando la estabilidad de la propia enzima (Datta, *et al.*, 2012). Puede producir incrementos en el rango de los valores de temperatura óptima de trabajo de las enzimas (Palomo *et al.*, 2004; Wei y

Wu, 2008), debido a su efecto sobre la estabilidad enzimática. Además, algunas por ser insolubles, pueden recuperarse y separarse fácilmente de los productos de reacción (Gascón V. *et al.*, 2014).

Es evidente el mayor ahorro, tanto económico como ecológico, en las reacciones que se realizan en los distintos sectores de la industria alimentaria por el uso de los inmovilizados enzimáticos (Silva *et al.*, 2002). Estudios revelan que las aplicaciones más exitosas de las enzimas son aquellas que se consiguen con sus formas inmovilizadas, debido a que eluden el alto costo de añadir nuevas y no reutilizar, problemas de estabilidad bajo efectos de temperatura y pH y la difícil separación del producto final de las enzimas no inmovilizadas (Cao, 2005).

A modo de resumen, las ventajas más evidentes de la inmovilización de las enzimas son (Knežević *et al.*, 2004):

- El aumento de la estabilidad de la enzima ante el pH y la temperatura.
- Control de las concentraciones de enzima en el proceso.
- Protección frente a otras enzimas proteolíticas que sean capaces de destruirlas.
- La posible reutilización del derivado.
- Y gracias a la ventaja anterior se disminuyen los costes del proceso y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control.
- Reducción del consumo energético y económico.

#### **4.2. Efectos de la inmovilización de enzimas**

Cuando se realiza la inmovilización la enzima sufre un cambio físico y químico, dependiendo del tipo de inmovilización utilizado. Su estabilidad y a la actividad enzimática, debido a que se modifican sus condiciones habituales de trabajo, son las que mayores cambios sufren, pudiendo conseguir que mejoren.

##### **4.2.1. Estabilidad**

Por lo general cuando se inmoviliza una enzima se observa que aumenta su estabilidad, ya que es uno de los motivos por los que se realiza la inmovilización y se quiere garantizar la mayor eficacia (Klibanov, 2001). Esto es debido a los siguientes factores:

- Una estabilidad conformacional de las uniones multipuntuales enzima/soporte, la enzima se hace más resistente a la desactivación térmica y química.
- Protección frente a las proteasas en el medio, ya que degradan la proteínas de las enzimas.
- Alteración del microentorno de la enzima y el soporte, haciéndola resistente a condiciones que antes no era capaz de soportar.
- Evitar la agregación intermolecular que mantiene retenidas las moléculas de la enzima en el espacio.

Para poder aumentar la estabilidad de los inmovilizados, se han creado técnicas o factores que ayudan a que la estabilidad aumente.

Se han estudiado métodos como utilizar sustratos del mismo tamaño de la enzima, asegurando su correcto encaje o añadir azúcares en la creación del inmovilizado para mantener la estructura de la enzima (Mureseanu *et al.*, 2005).

#### 4.2.2. Actividad enzimática

Al cambiar las condiciones de la enzima se modifican sus propiedades, lo que puede alterar su actividad enzimática. La enzima puede perder completamente su funcionalidad (Gustavsson *et al.*, 2006) y puede ser debido a que:

- La unión impide el paso del sustrato al centro activo.
- El centro activo del soporte reaccione con la parte activa de la enzima.
- La inmovilización haga un cambio en el centro activo de la enzima y la inactive.
- Las condiciones de inmovilización desnaturalicen la enzima

Pero puede ocurrir que la pérdida no sea total, sino que hay una disminución o aumento de la actividad enzimática tras la inmovilización y se debe principalmente a (Goldestein *et al.*, 2011):

- Efectos disfuncionales/incrementales debido a la difusión de los sustratos hacia el centro activo. Son externos e internos, como el lugar de inmovilización de la enzima y como la geometría del material inmovilizante.
- Efecto electrostático entre el sustrato y el soporte. Pueden ser de atracción y de repulsión lo que facilita la unión y el acercamiento de las partículas.
- Impedimentos estéricos o de tamaño de saturación.
- Efectos en el microentorno debido a que la enzima se encuentra en uno que no es el habitual para su funcionamiento, pero ese es el fin de la inmovilización, adaptar a la enzima a ese entorno y facilitar su correcta actividad enzimática. Las principales modificaciones suelen ser frente al pH y temperatura.

#### 4.3. Tipos de inmovilización tradicionales

En la naturaleza hay muchos tipos de enzimas, con diferentes estructuras y funciones. Por este motivo, seleccionar la forma de inmovilizar más adecuada para cada enzima es esencial para garantizar que tras la inmovilización se sigue manteniendo su efectividad. Las enzimas pueden ser inmovilizadas de dos maneras, por retención física o por unión química (Sánchez-Ramírez, *et al.*, 2014). En la **Figura 5** se muestran las diferentes maneras de inmovilizar. En el apartado **A** está la unión química, la cual a su vez puede ser dividida en unión covalente (A1), adsorción iónica (A2) y entrecruzamiento o reticulado (A3). En el apartado **B** se representa la unión física, con sus dos formas de inmovilización diferentes: el atrapamiento (B1) y la encapsulación (B2).

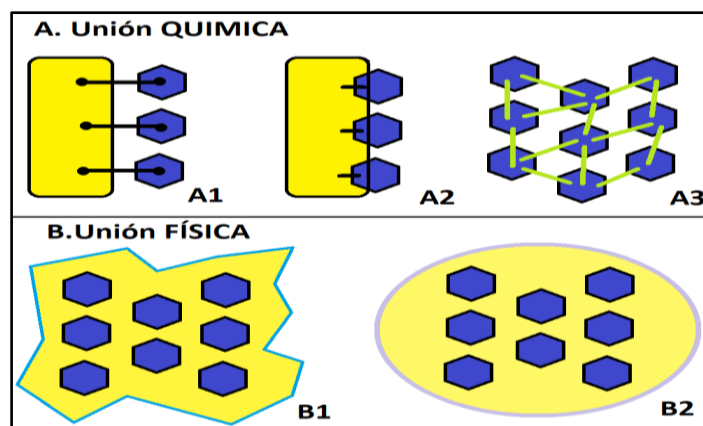


Figura 5. Formas principales de inmovilización de las enzimas según el tipo de unión. Elaboración propia.

Sea cual sea el método de inmovilización debe garantizar que ésta no afecte a la afinidad de la enzima por el sustrato y que la estabilidad del biocatalizador sea apta en un amplio rango de pH y temperatura. Una vez inmovilizado, debe ser fácilmente separable del medio. Desde la perspectiva de la industria, este proceso debe ser sencillo, rentable y que sea estable (Datta *et al.*, 2012).

#### 4.3.1 Métodos de Inmovilización de enzimas sin soportes: entrecruzamiento

Hay un tipo especial de enzimas que se pueden unir entre ellas, sin sustrato, a través del entrecruzamiento. Es una técnica de inmovilización que se ha empleado para muchos tipos de enzimas donde la enzima es el propio soporte (Lee *et al.*, 2010). Con esta técnica las enzimas se inmovilizan unas con otras o mediante un agente de unión que ayude a generar enlaces entre ellas. La ventaja de este método es la sencillez de su elaboración.

El tipo de unión es covalente, tanto entre enzimas, como enzimas y agente de unión. El principal problema es su susceptibilidad a cambios en el pH y temperatura del medio, son capaces de soportarlas a un parámetro dado, pero no soportan el cambio (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). Los enlaces resultantes de la inmovilización son de carácter intermolecular irreversibles, lo que les hacen capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura puntuales, factor muy limitante para el uso de enzimas. Para la inmovilización se emplean reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima o mediante los agentes de unión. En la **Figura 6** se muestra esquemáticamente la una unión de enzimas sin sustrato mediante un agente de unión y la unión entre enzimas solas. En la representación **A** de la **Figura 6**, las uniones son mediante un agente reticulante de unión, mientras que en la representación **B** de la **Figura 6**, las uniones son solo mediante las enzimas por enlaces covalentes entre las propias enzimas.

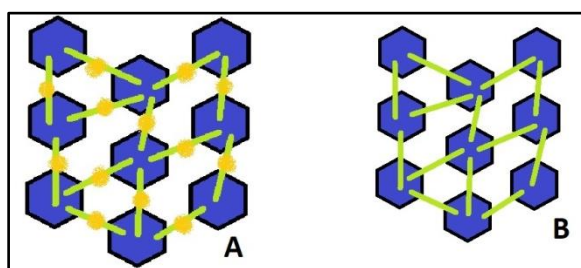


Figura 6. Enzimas inmovilizadas por enlaces cruzados. Elaboración propia.

La estructura formada por las enzimas posee canales microscópicos de entre 20 y 50Å, que permiten el paso de los sustratos hasta el centro activo de las enzimas. Estas uniones de enzimas son capaces de soportar el ataque de las proteasas lo cual permite que se puedan utilizar en las reacciones de obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos (Margolin, 1996). Este tipo de inmovilización se utiliza en casos donde no es relevante la presencia de enzimas en el producto final.

#### 4.3.2 Métodos de Inmovilización de Enzimas por Retención Física

Los métodos de inmovilización por retención física son aquellos en que la enzima queda retenida por el soporte utilizando fuerzas físicas. Es decir, ninguna parte de la enzima reacciona con el soporte. Dentro de este grupo de métodos se distinguen diferentes opciones.

#### 4.3.2.1 Atrapamiento

La inmovilización mediante atrapamiento es el resultado de la retención de las enzimas dentro de la matriz sólida porosa del sustrato en sus cavidades interiores. Ese sustrato suele ser generalmente un prepolímero fotoentrecruzable, un polímero del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano (Arroyo, 1998). El atrapamiento en sí, se realiza en geles o en fibras dentro de su matriz de organización. Las fibras son más resistentes que los geles. En los geles, la enzima se queda encerrada dentro de su estructura y en las fibras ésta se coloca dentro de las microcavidades sintéticas de la propia fibra (Hartmeier, 2012). La ventaja más significativa es la eficiencia del proceso. Además, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura dado que la unión es por método físico. El atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización (Matosevic et al., 2011).

El procedimiento para la elaboración consiste en realizar una suspensión de la enzima en una solución. Seguidamente se inicia la polimerización que es ocasionado por un cambio en la temperatura o por la adición de un reactivo químico. En la **Figura 7** se representa dos ejemplos de enzimas atrapadas en los sustratos: a la izquierda (**A**) un atrapamiento en gel y a la derecha (**B**) un atrapamiento en fibras.

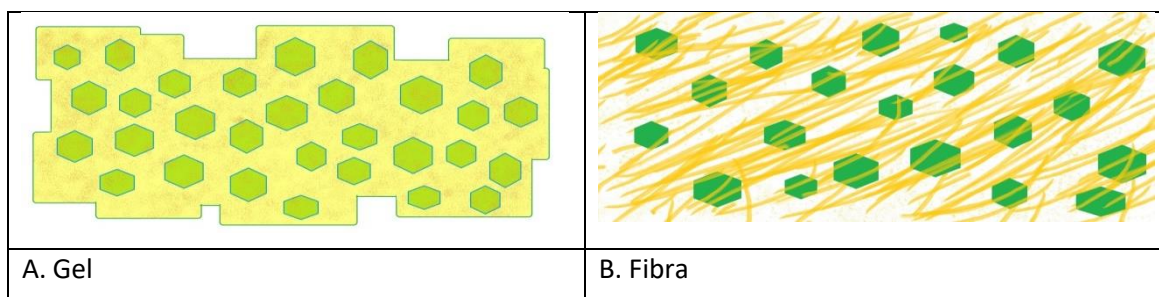


Figura 7. Enzima inmovilizada por atrapamiento. A la izquierda (A) un atrapamiento en gel y a la derecha (B) un atrapamiento en fibras. Elaboración propia.

#### 4.3.2.2 Inclusión en membranas

El segundo de los métodos de inmovilización física consiste en la inclusión de las enzimas en membranas. La enzima queda atrapada dentro del gel o material que se ha utilizado para su inmovilización, permitiendo una fácil difusión de los productos. Para ello se crea una especie de barrera en la que dentro están las enzimas, siendo el compuesto inmovilizador el que las recubre. La matriz puede ser de origen natural o sintético y de diversos materiales como poliacrilamida, sílica-gel, agarosa o carragenatos, entre otros. Según la naturaleza de la matriz, los geles resultantes pueden clasificarse como húmedos, secos o en aerosol (Mureseanu et al., 2005).

La principal ventaja de este método es la prevención del acceso de otras enzimas que rompan los enlaces de algunas proteínas de las que están formadas las enzimas inmovilizadas, para mantener intacta la estructura de las enzimas. Esto es utilizado para hacer una liberación controlada de las enzimas en algún momento de la reacción, evitando que se destruyan y favoreciendo hagan su función en el momento justo. Puesto que el enzima abandona el gel para efectuar su acción, este método implica que el gel se destruya, que se liberen las enzimas, y por tanto que las enzimas deban de ser recuperadas posteriormente del producto final, aumentando el coste de la operación. Otro inconveniente es que no se puede controlar el



tamaño de partícula ni el tamaño de los poros para permitir el acceso del sustrato hasta alcanzar la enzima.

Para la fabricación de este método se deben colocar las enzimas en una solución del material inmovilizante y después, este gelificará mediante un cambio de temperatura o por acción química. Una vez formados, los geles sufren un secado y molido para obtener mayor área de contacto y poder ser almacenados en mejores condiciones. Hay dos tipos de inclusión en membranas: la micro-encapsulación y los reactores de membrana.

#### 4.3.2.2.1 Micro-encapsulación

La técnica de la micro-encapsulación consiste en rodear las enzimas con membranas semipermeables, que permitan el paso del producto hacia el interior, pero no el de las enzimas al exterior. Estas membranas pueden ser permanentes, originadas por polimerización interfacial, o no permanentes, generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”. El método se puede llevar a cabo por dos tipos de soportes: uno es mediante soportes porosos que permiten el mayor paso del sustrato, pero con una mayor pérdida de la enzima, y el otro es con una microemulsión que no dejan tanto paso del sustrato pero retienen más la enzima (Kuiper *et al.*, 2008). Ambos métodos se pueden combinar para fortalecer las desventajas del otro y tener más opciones de actuación en las reacciones. El resultado que se obtiene son microcápsulas de forma esférica, con un rango de tamaños entre 1 y 100mm de diámetro. En la **Figura 8** se puede ver una microesfera en la que en su interior hay enzimas, las cuales están siendo atrapadas por la membrana formada por el material quedando las enzimas dentro de una microcápsula que les protege del exterior y quedando inmovilizadas en su interior

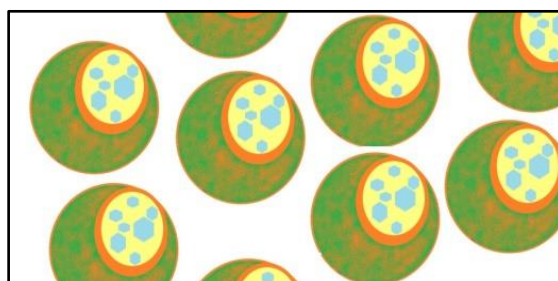


Figura 8. Micro-encapsulación de enzimas en esferas de membrana semipermeable. Elaboración propia.

Con este método se pueden hacer mezclas de enzimas y encapsularlas en un mismo sustrato para un mismo fin, haciendo que se haga una sinergia de las funciones de las enzimas o que se realice una liberación escalonada de las distintas enzimas para diferentes pasos de las reacciones (Klei *et al.*, 1985).

El tipo de micro-encapsulación en partículas porosas se suele realizar en partículas de sílice nanoporosas. Para su fabricación se ponen en suspensión con las enzimas hasta que se introduzcan en el interior de la sílice. Este método por su naturaleza de interacción suave, permite una alta actividad y resistencia a cambios de pH y temperatura (Wang y Caruso, 2004). La principal desventaja es que la inclusión no llega a ser en el interior completamente de la matriz del sílice, sino que sucede en la parte más externa de la superficie, lo que hace que se desprendan y sean liberadas al medio, siendo esto un problema para su reutilización y por la contaminación del sustrato (Volodkin *et al.*, 2004). Para contrarrestar este problema se da un tratamiento a la sílice, ya funcionalizada con las enzimas, para que recubra su superficie y no

permita el desprendimiento excesivo (Wang y Caruso, 2005). Estos recubrimientos suelen ser de policloruro de dialilamonio o poliestirensulfonato.

De esta manera, el método de micro-encapsulación en microemulsiones es un método que protege a las enzimas encapsuladas en su interior. Para aumentar el nivel de protección se pueden crear varias capas protectoras de diferentes materiales, repitiéndose la operación tantas veces como sea necesario. Esto es llamado emulsión múltiple y son utilizados emulsificantes secundarios y espesantes, como goma arábica, Tween 80 y poliestireno-40-b-*poili* (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). El diámetro de las micelas puede variar de 100 a 250 nm, dependiendo de los emulsificantes utilizados, de la fluidez del copolímero y de la habilidad de la enzima para ser adsorbida en la membrana. La desventaja de este método es la gran pérdida de actividad enzimática, debida a que queda atrapada gran parte de la enzima en la interfase de agua/aceite de la emulsión y no es liberada correctamente o deja el paso del producto por el interior de la emulsión. Otro factor es que la enzima queda desnaturalizada por el esfuerzo cortante de la formación de la emulsión (Kuiper *et al.*, 2008).

#### 4.3.2.2 Reactores de membrana

El segundo método de inclusión en membranas consiste en un sistema que tiene enzimas en su interior dentro de una placa permeable al producto, que debe ser líquido, e impermeable a las enzimas. Se hace pasar el producto por dicha membrana, se deja que actúe la enzima y sale el producto terminado, con la enzima reteniéndose dentro del reactor (Agresti *et al.*, 2010). Se debe garantizar que la enzima se queda adherida a las paredes del reactor o el filtro por el que se hace pasar el producto. Este método de inmovilización ha despertado gran interés en la industria alimentaria, sobre todo en las bebidas, porque es fácil y rápido. El procedimiento consiste en dejar que el líquido por un filtro con enzimas y que estas actúen.

#### 4.3.3 Métodos de Inmovilización de Enzimas por Unión Química

Los métodos de inmovilización química son los métodos de inmovilización más utilizados, ya que permiten el uso de gran variedad de soportes, tanto orgánicos como inorgánicos. Cada uno posee unas propiedades especiales para el tipo de producto que se quiera conseguir, siendo importantes el tamaño, la densidad, la porosidad y la forma, aunque generalmente se comercializan en forma de cilindro, hojas, fibras, y esferas (DiCosimo *et al.*, 2013).

Este tipo de inmovilización es la que mayores rendimientos da en productos líquidos, que son la gran mayoría empleados en la industria alimentaria y de los que se quiere aplicar las enzimas (Daoud *et al.*, 2010). Para la elección del soporte y el tipo de enlace se debe tomar en cuenta varios factores que interfieren en la reacción, tales como la inercia, fuerza física, estabilidad, presencia de grupos funcionales necesarios para unirse a los grupos de la enzima (Elnashar, 2010), así como la capacidad para aumentar la especificidad enzima/actividad, reducir la inhibición con el producto y la contaminación microbiana.

Una condición indispensable para que se de este tipo de inmovilización es que no haya interferencia entre la sustancia activa de la enzima y la estructura del soporte, ya que se puede comprometer su actividad biológica (Mitchell *et al.*, 2002). La correcta afinidad se demuestra cuando disminuye la inhibición, amplía el intervalo de pH y temperatura óptimo y se reducen las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado (Arroyo, 1998).

Para este tipo de inmovilización se utiliza una gran variedad de materiales de diferente origen: naturales u orgánicos (celulosa, quitosán, dextrano, alginato, etc.), inorgánicos (zeolitas, sílice, carbón, óxidos de metales, etc.) y polímeros sintéticos (cloruro de vinilo, poliestirenos, alcohol polivinílico, poliuretano, etc.) (Datta *et al.*, 2013). Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma (Wang y Caruso, 2005). Atendiendo a estos criterios, los soportes se pueden clasificar en:

- Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo se subdividen en dos subgrupos. Están los que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc).
- Soportes orgánicos. Son distintos tipos de polímeros y se pueden clasificar en:
  - Polímeros naturales:
    - polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc).
    - proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
  - Polímeros sintéticos:
    - Poliolefinas (como el poliestireno).
    - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
  - Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

La **Figura 9** muestra de manera visual la clasificación de los principales tipos de soportes utilizados en la inmovilización química dependiendo del origen.

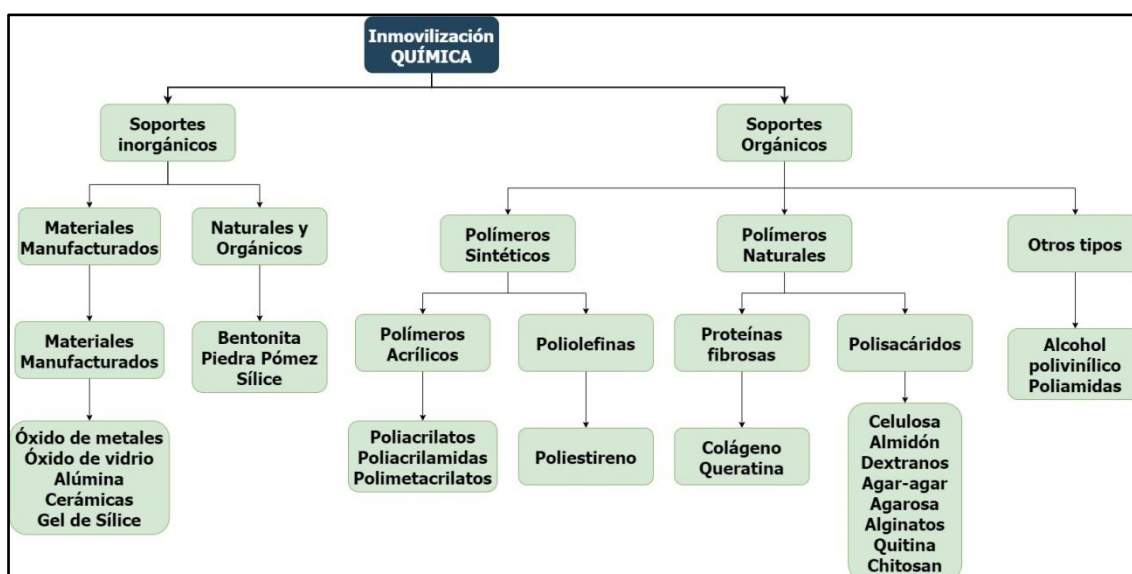


Figura 9. Esquema de los materiales más utilizados en la inmovilización química de enzimas según su origen sean orgánicos o inorgánicos y ejemplos. Elaboración propia.

El soporte debe tener una adecuada afinidad al producto, como tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación y ser fácilmente separable del medio para que pueda ser reutilizado. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador.

Hay dos métodos principales de unión: uno es la unión no covalente y el otro la unión covalente (Ali *et al.*, 2010). Dentro del método no covalente, están las uniones mediante

interacciones específicas e interacciones no específicas (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). También hay un método que es con partículas metálicas.

#### 4.3.3.1 Adsorción

Consiste en una técnica en que la enzima se une sin funcionalizar mediante las interacciones iónicas como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrogeno. En la **Figura 10** se muestra un esquema de cómo son las uniones de este tipo. En este ejemplo, el soporte está con carga negativa (fondo naranja) y la enzima está cargada positivamente (hexágonos azules). Gracias a la diferencia de las cargas se puede realizar la unión de ambos componentes.

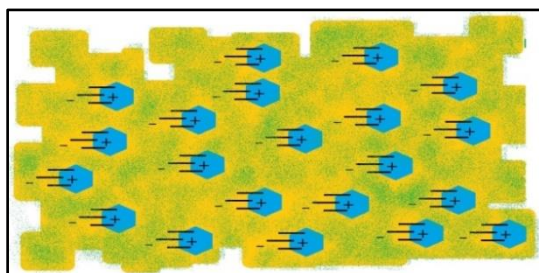


Figura 10. Representación esquematizada de la unión de soporte y enzima por adsorción. Elaboración propia.

Los factores que influyen principalmente en este método son cuatro (Arroyo, 1998):

- El pH del medio: responsable del control del número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- La fuerza iónica: al aumentarla se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína (Lee *et al.*, 2010).
- El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima (Rodríguez *et al.*, 2013).
- La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado (Barbosa *et al.*, 2014).

Este método presenta como ventajas su sencilla preparación, que es de bajo coste, que las enzimas no sufren con respecto a su especificidad y que los derivados son estables en los medios de trabajo con bajo contenido en agua. Entre sus inconvenientes, cabe destacar que se deben controlar muy bien las variables de proceso, ya que los derivados que se obtienen son poco estables desde el punto de vista mecánico porque la unión soporte es débil (Arroyo, 1998).

Para crear estos inmobilizados se debe poner la enzima en solución acuosa con el soporte para que haga la adsorción. Este proceso puede durar de 2 a 48 horas y una vez finalizado se debe lavar bien el material inmobilizado para asegurar que no hay enzima residual, solo inmobilizada en el soporte. Para este tipo de inmobilización se emplean tanto soportes orgánicos como inorgánicos, siempre que estos posean un adsorbente activo donde las enzimas son atraídas y retenidas por interacciones iónicas o fuerzas débiles. Por otra parte, según la naturaleza de las fuerzas que intervienen en la adsorción, se pueden distinguir diferentes situaciones:

#### 4.3.3.1.1 Adsorción no específica

La adsorción no específica es un método que se basa en la adsorción física o enlace iónico de las enzimas y los soportes, siendo el más simple y reversible de los métodos, pero mantiene siempre la actividad enzimática en niveles altos y aceptables. Las uniones son realizadas por enlaces iónicos de sales y las enzimas. Permiten que cambiando las condiciones del medio mediante el pH, la resistencia iónica, la temperatura o la polaridad del solvente, se modifique la resistencia a la interacción. Este fenómeno supone un problema, porque se puede ocasionar una liberación de las enzimas cuando las interacciones son débiles y se ocasiona alguna interacción con el medio (Hartmann, 2005).

#### 4.3.3.1.2 Adsorción hidrofóbica

En este método son usadas las interacciones hidrofóbicas, que consiste en ensayar con variables conocidas del pH, concentración de sales y la temperatura hasta lograr la interacción del sustrato y de la enzima que radica en la hidrofobicidad del sustrato (Porath, 1987). La hidrofobicidad del adsorbedor puede ser regulada por el grado de sustitución del soporte y por el tamaño de la molécula ligante hidrofóbica. El éxito de este tipo de inmovilizados radica en la reversibilidad de los soportes y la enzima, de este modo se puede recuperar la enzima del inmovilizado y poder ser utilizada para otros fines.

#### 4.3.3.2 Unión covalente

Una unión covalente, propiamente dicha, es un vínculo entre dos o más elementos que comparten electrones y son aceptados por ambas partes de la unión. Los átomos pueden aceptar o ceder electrones, aunque lo que realmente se hace es compartirlos para completar la última capa atómica y lograr la estabilidad. Esto ocurre con átomos no metálicos (Pérez Porto y Gardey 2016). La unión covalente es la técnica más estudiada en el campo de inmovilización de enzimas, porque es la más eficiente y eficaz en cuanto a estabilidad para los procesos industriales alimentarios, (Hirsh *et al.*, 2010) por esto son empleados cuando existe un requerimiento estricto de ausencia de enzimas en el producto. La principal ventaja que hace el mayor uso de este método es la naturaleza estable de los enlaces formados por los enzimas y el soporte haciendo posible que se puedan realizar numerosas reutilizaciones del material inmovilizado (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011). Además, confiere a la enzima una inmovilización más estable a cambios de pH y temperatura en el medio.

El enlace se realiza entre la enzima y un soporte insoluble natural o sintético, basándose en la actividad de los grupos químicos del soporte para que los nucleófilos de las enzimas puedan reaccionar. Se da entre los grupos funcionales de la enzima como el Amino, Cis-tiol, Tir-hidroxil o His-imidazol y en los grupos del soporte como Monocapas tiol autoensambladas, oro o CNBr-Sepharosa. La unión ocurre tras el ataque del nucleófilo de determinados aminoácidos expuestos al exterior de la superficie del enzima sobre los grupos reactivos químicos del soporte previamente funcionalizados, ya que si no se funcionalizan no se asegura la unión del nucleótido (Hirsh *et al.*, 2010). Para realizar el acople de sustrato/enzima se precisan de dos pasos: primero la activación de la matriz o soporte por adición de una función reactiva en un polímero, seguido de la modificación del polímero para producir un grupo activado.

Como está representado en la **Figura 11**, las enzimas están orientadas a los enlaces dejando su centro activo al descubierto y la unión se realiza mediante el grupo funcional de esta. Es

conveniente que ambas partes estén bien aisladas o separadas para que no tengan interferencias.

De los 20 aminoácidos diferentes que existen en las enzimas, los principales grupos expuestos de las enzimas son la lisina, a través de su grupo  $\epsilon$ -amino, los grupos cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico (Sheldon *et al.*, 2013). El resto de los aminoácidos no se encuentran expuestos al exterior de las proteínas debido a su carácter hidrófobo, por lo tanto no se encuentran aptas para intervenir en la unión covalente.

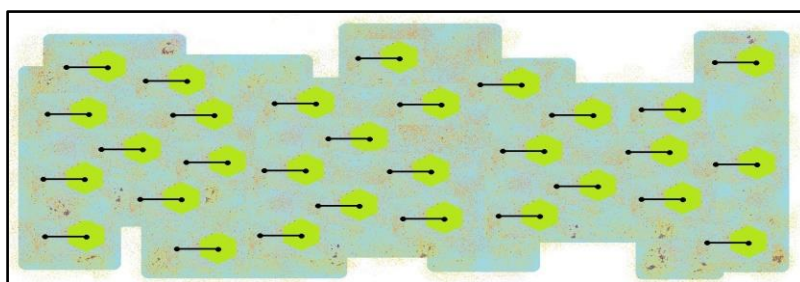


Figura 11. Esquema de unión de enzimas (hexágono verde) al soporte (fondo azul) mediante un enlace covalente. Elaboración propia.

Las ventajas de este método son destacables con respecto a los otros métodos porque se adaptan mucho a las necesidades de las industrias alimentarias (Arroyo, 1998). Estas son:

- Es sencilla la manipulación de los derivados inmovilizados una vez creados.
- La carga de la enzimática no se ve afectada después de la inmovilización. Las enzimas inmovilizadas tienen mayor resistencia al efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.
- Los derivados pueden utilizarse en un gran número de reactores como reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.

Los inconvenientes de la inmovilización por enlace covalente son necesarios conocerlos para poder realizar las uniones más afines entre el sustrato y la enzima, ya que dependen en su gran medida de la afinidad de estos (Arroyo, 1998).

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte. También es necesario conocer la geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El sitio del enlace puede modificar el sitio activo de la enzima o pueden crear impedimentos estéricos que reduzcan su actividad.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

Una vez finalizada la inmovilización se realiza un análisis de la concentración de las proteínas libres, generalmente por el método Bradford, y de las proteínas unidas covalentemente al soporte (Heering *et al.*, 2004), para asegurarse de que la unión del sustrato y la enzima ha sido correcta y no hay enzimas libres o sueltas. Por otro lado puede decirse que, aunque es un método muy costoso, a la vez que fiable en lo referido a inmovilización, por lo tanto se comprueba y garantiza su correcta inmovilización para asegurar la pureza y la no contaminación con la propia enzima del sustrato.

#### 4.3.3.3 Quelación o enlace metálico

El último método de inmovilización química es la inmovilización sobre soportes metálicos. Con los grupos nucleofílicos de la matriz ha sido posible crear enlaces con metales de transición o hidróxidos depositados en la superficie de los soportes inorgánicos. Son utilizados principalmente sales de titanio y circonio. La sal metálica es precipitada sobre el soporte que generalmente es celulosa, quitina, ácido algínico y bases de sílice. Debido a los factores estéricos es posible para la matriz ocupar todas las posiciones del metal (Seijás, 2012).

#### 4.3.4 Conclusión a la inmovilización por métodos tradicionales

A pesar de que los preparados inmovilizados son de alto costo, la recuperación de la enzima del medio de reacción y el desarrollo de operaciones en continuo, disminuyen los costos del proceso (Elnashar, 2010; Tran, 2011). Cada tipo de inmovilización descrito en la sección anterior tiene sus ventajas e inconvenientes, pero estas deben ser asumidas, porque cada enzima y cada sustrato de inmovilización cumplen una función.

Generalmente se considera que el método de la adsorción o del atrapamiento, pertenecientes al grupo de retención física, son los más económicos y sencillos, pero presentan pérdidas a largo plazo de su actividad enzimática debido a que la unión es muy débil (Arroyo, 1998). De forma contraria, los métodos de unión covalentes, pertenecientes a la unión química, son los más difíciles de preparar y costosos económicamente, pero permiten obtener los inmovilizados más estables y duraderos, por eso son los más utilizados en la industria alimentaria. De esta manera son los que mejor cumplen con las premisas de reutilización y estabilidad que se quiere conseguir con una inmovilización. Los métodos más representativos están descritos y resumidos en la **Tabla 5** (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014).

Gracias a estos avances que se han conseguido con las inmovilizaciones de las enzimas, hoy en día se pueden biocatalizar muchos procesos industriales, reduciendo sus costes de fabricación. Sin embargo, todavía quedan una serie de limitaciones referidas a su proceso (Hagopian, 2012). Estas son:

- Alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización, pero es un pequeño porcentaje.
- La velocidad de difusión de la enzima se ve afectada y limitada por los sustratos y productos del sistema, por lo que el sustrato debe ser afín a los productos y facilitar su paso, para no impedir el contacto enzima/producto.
- En lo referido al aspecto económico, la inmovilización es más cara que la enzima nativa, ya que precisa de su investigación y síntesis.

Todo esto hace que aunque los métodos tradicionales siguen siendo válidos para hacer nuevos sistemas de enzimas inmovilizados, con el paso del tiempo se estén desarrollando y descubriendo nuevas formas, soportes y propiedades de los métodos para inmovilizar y recuperar las enzimas. Como se mostrará en las secciones siguientes, los nuevos métodos están basados en los métodos tradicionales, pero con modificaciones que los hacen más eficientes.

Tabla 5. Tipos de inmovilización de enzima según el método de retención.

<b>Unión SIN soportes</b>			
<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Reticulado	Reactivos que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.	Gran estabilidad de la enzima debido a la rigidez de la estructura.	Pérdida de actividad enzimática.
<b>Retención Física</b>			
<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Atrapamiento	Retención en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa	La enzima no sufre alteraciones químicas, mayor estabilidad	La enzima puede desprenderse del soporte
Encapsulación	Cubierta de membranas semipermeables. Permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, no de enzima.	Se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas.	Rotura de las capsulas.
<b>Unión Química</b>			
<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Adsorción	Unión mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno.	Retención de actividad enzimática, preparación sencilla.	La unión es muy débil, forma derivados poco estables
Unión covalente	Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las enzimas. Ej. Nanopartículas.	La unión es muy fuerte mayor estabilidad.	Pérdida de actividad enzimática, requiere protección del centro activo
Quelación	Unión de los grupos nucleofílicos con metales de transición.	La separación del inmovilizado es rápida y eficaz debido a las propiedades ferromagnéticas del sustrato.	Puede contaminar por oxidación del metal, debido a la gran área superficial.

#### 4.4 Nuevos métodos de inmovilización

En la sección anterior (**Apartado 4.3**) se han revisado las principales vías clásicas para la inmovilización de enzimas. En esta sección, se describen nuevos métodos, soportes más avanzados y modernos. Están basados la mayoría en la utilización de nanoestructuras, ya que son el mayor campo de investigación de los materiales para la inmovilización de partículas.

##### 4.4.1 Nanopartículas de sílice

Las nanopartículas son aquellas partículas que comprenden entre 1 y 100 nm de diámetro. De todos los tipos de nanopartículas las de óxido de silicio o sílice han sido ampliamente estudiadas para la inmovilización de enzimas, ya que poseen gran resistencia mecánica, estabilidad química, ausencia de toxicidad por no interactuar con los productos, biocompatibilidad con numerosas enzimas y versatilidad química para crear enlaces con estas (Linàs y Sánchez-García, 2014).

La inmovilización que se realiza más a menudo es mediante enlaces covalentes, aunque también son utilizados la adsorción, el atrapamiento y la reticulación. En cuanto a las partículas



de sustrato, las más utilizadas son las nanopartículas de sílice amorfa, ya que son estables a pH neutro y a temperaturas altas de trabajo de las reacciones (Jackson *et al.*, 2015). Los enlaces covalentes son creados gracias a que la sílice posee grupos hidroxilos que permiten el tratamiento para realizar cambios en su funcionalidad y poder crear el enlace (DiCosimo *et al.*, 2013). Aunque existen muchos más tipos de enlaces de la enzimas/sustrato, todo depende del fin al que se va a dedicar el compuesto inmovilizado y de las propiedades, las cuales son la retención física a la compresión, la hidrofilia, la inercia a las enzimas y su biocompatibilidad, la resistencia al ataque microbiano y su costo (Ahmad y Sardar, 2015).

Las enzimas que están unidas a nanopartículas muestran un movimiento Browniano cuando se encuentran en medios líquidos o disoluciones acuosas, demostrando su amplia dispersión en el medio y siendo mejores que las enzimas libres (Gupta *et al.*, 2011). Las nanopartículas pueden reducir el desarrollo de las enzimas y mejoran la estabilidad y rendimiento de las reacciones en comparación con macropartículas.

El problema que tiene la inmovilización en las nanopartículas de sílice es su recuperación. Para que se pueda producir este proceso el soporte debe dejarse que se acumule y después realiza la retirada. En líquidos la tarea puede ser fácil, dependiendo de muchos factores, pero en productos más densos o sólidos se dificulta su recuperación. Otro problema que tiene la sílice es que posee varios grupos funcionales libres, las enzimas solo se ancla a unos específicos y los otros están libres lo que permite que se puedan adherir e interactuar moléculas no deseadas (Bonifert *et al.*, 2016). Las moléculas que se han unido pueden interactuar con otras de las productos los cuales no son deseables para la reacción y se creen compuestos citotóxicos, o que hagan que la sílice interactúe entre ella y se agreguen las partículas formando agregados más grandes, perdiendo la cualidad de nanopartículas. Para evitar este fenómeno, lo que se realiza previamente la inmovilización de la enzima es anular los puntos activos de la sílice que no son deseables para la inmovilización (Ache Manzione, 2018).

Mediante la síntesis y manipulación de la sílice se pueden crear nanopartículas que posean forma esférica y que se pueda encapsular las enzimas dentro de ellas. Algunos ejemplos de esta técnica son los aplicados a nanosoportes de sílica biomimética para la inmovilización de enzimas (Ache Manzione, 2018). La técnica consiste en inmovilizar la enzima mediante atrapamiento, obteniendo un porcentaje de inmovilización de  $99\pm 1\%$  y un rendimiento de  $87\pm 7\%$  de acción enzimática. Las enzimas inmovilizadas presentan un gran aumento en la estabilidad térmica a  $45^{\circ}\text{C}$  y pH, factores que se deben salvar en muchas reacciones con enzimas. Con estos valores de temperatura y pH se confirma que la inmovilización funciona como potenciador de la resistencia a las propiedades del medio.

Se pueden hacer combinaciones de nanomateriales, como ocurre con las nanopartículas de aluminosilicatos. En un ejemplo de aplicación, (Beltrán y Castrillón, 2016) unieron la **papaína (E.C.3.4.22.2)** a una matriz de aluminosilicatos nanoestructurados mediante la creación de enlaces covalentes, desarrollándose la inmovilización de proteasas en nanopartículas. En el producto de la inmovilización se determinó la actividad enzimática para estimar su uso en la hidrólisis de ingredientes proteicos utilizados en la elaboración de alimentos. Al finalizar el proceso se comprobó la actividad de la enzima inmovilizada con una inicial sin inmovilizar. Las enzimas inmovilizadas presentaban un 86% más de actividad enzimática que las no inmovilizadas, debido a su alta dispersión en el medio y a la facilidad con la que los ingredientes proteicos se unían al centro activo de las enzimas (Hlophe-Ginindza *et al.*, 2016).

A parte de las combinaciones con otros materiales, la sílice mesoporosa posee diferentes estructuras, morfologías y porosidades. Estas son estudiadas para conseguir una correcta afinidad con la enzima y los productos. Una de las enzimas que se ha inmovilizado correctamente sobre dos tipos de sílice porosa (Aeroperl® y SBA-15) es la enzima **polifenol oxidasas (E.C.1.14.18.1)** (Escuin *et al.* 2017). Esta enzima debe ser inmovilizada para que no degrade los jugos de frutas y pierdan sus propiedades organolépticas como el color y compuesto vitamínicos. Los autores de este tipo de inmovilización demostraron que el Aeroperl y la SBA-15 son los dos materiales que pueden atrapar mayor cantidad de **polifenol oxidasas (E.C.1.14.18.1)** cuando la solución tiene un valor de pH de 4.00, puesto que a ese valor de pH pueden establecerse las interacciones electrostáticas necesarias para que el enzima pueda quedar adsorbido en las paredes del material.

#### 4.4.2 Inmovilización sobre nanopartículas de oro

El oro es un material que ha empezado a ser utilizado desde hace poco menos de 10 años. Su uso es mediante nanopartículas, denominadas np-Au o NPG. Sus características son la facilidad de preparación del material, la capacidad de ajuste del tamaño del poro, la alta superficie específica que poseen las nanopartículas y sobre todo su compatibilidad con las enzimas debido a su rápida unión y durabilidad de esta. El ajuste del tamaño de poro es debido a la alta conductividad del material, la cual confiere estabilidad térmica al conjunto inmovilizado (Stine, 2017).

La estructura de las nanopartículas de oro consiste en una formación de ligamentos interconectados los cuales crean poros entre sus cruces con una morfología irregular. El tamaño varía de 10nm a 100nm, ajustándose el tamaño durante su creación se crea la superficie con alta área específica para la inmovilización de las enzimas (El Mel *et al.*, 2015). El soporte inmovilizado no es oro puro, sino una aleación con un metal menos noble, como plata, cobre o estaño, el cual permite crear los poros y espacios de las fibras. La cantidad de metal noble se regula mediante la acidificación del medio. El porcentaje mínimo de oro para que el inmovilizado sea permanente debe ser del 50%, si no se cumple, el área superficial no será suficiente para albergar tantas enzimas y cumplir con su actividad enzimática (Sukeri *et al.*, 2015). Los tamaños de poro deben ser adecuados y uniformes debido a la morfología de las enzimas y a los medios de los productos. La inmovilización debe garantizar que las moléculas de los productos alcancen favorablemente los puntos activos de las enzimas y facilitar la reacción. Ejemplos de enzimas que se han inmovilizado exitosamente sobre nanopartículas de oro son la **glucosa oxidada (E.C.1.1.3.4)** (Sanzó *et al.*, 2016) y la **lacasa (E.C.1.10.3.2)** (Wu *et al.*, 2016).

#### 4.4.3 Inmovilización en nanopartículas magnéticas

Por su parte, la inmovilización de enzimas sobre nanopartículas magnéticas es una nueva técnica la cual ha despertado el interés gracias a su material del soporte. Los materiales magnéticos poseen propiedades físicas, químicas y estructurales que favorecen la recuperación. Esto facilita la retirada de la enzima una vez ésta ejerce su acción.

A las nanopartículas magnéticas se les puede inducir con un campo magnético externo, creado por un dipolo o momento magnético (Dussán, 2008) para recuperarlas, lo que facilita la reutilización del material, la prolongación de los ciclos de aplicaciones sucesivas y el tiempo de vida útil. La eficiencia de la separación depende de la calidad de las nanopartículas magnéticas,

de la unión con la enzima y de las interacciones con los materiales no magnéticos de la reacción (Rossi *et al.*, 2012).

En la **Figura 12** se puede apreciar el método de separación de las nanopartículas. Las partículas son atraídas por un imán para realizar la separación entre el producto y el inmovilizado. En el bote la izquierda las partículas están en solución con el producto y en el bote de la derecha han sufrido la interacción y se han separado.



Figura 12. Acción de las nanopartículas magnéticas sufriendo una interacción con el campo magnético.

Este tipo de inmovilización apto para una amplia gama de aplicaciones, ya que se asegura la completa eliminación del inmovilizado del producto final gracias a la aplicación del campo magnético (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014). Otro factor que facilita la recuperación es la insolubilidad del material, ya que son metales o sales metálicas. Los más utilizados son óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ); ferritas de cobalto, manganeso, níquel y magnesio, FePt,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , cobalto, hierro, níquel,  $\alpha\text{-Fe}$ , CoPt, y FeCo. Actualmente el óxido de hierro es el único material de nanopartículas que ha sido aprobado para las industrias alimentarias. La selección del método del tipo de inmovilizado magnético se necesita relacionar con las formas, grupos funcionales y estabilidad necesaria. Las características que se consideran para la elección son:

- Rango de tamaño. El pequeño tamaño de las nanopartículas les permite colocarse en una dimensión comparable a diversas entidades como las células (10-100  $\mu\text{m}$ ) virus (20-450 nm) o proteínas (5-50 nm) lo que facilita la capacidad de interaccionar con ellas (Gregorio-Jáurequi *et al.*, 2012).
- Transferencia de masa. Se caracterizan por baja resistencia.
- Geometría y área superficial. Presentan una alta área superficial específica, una apreciable fracción de sus átomos en la superficie y tienen estados de energía discretos.
- Coercitividad y magnetización. Nanopartículas con un tamaño menor a 30nm de diámetro tienen carga cero cuando no hay ningún campo inducido, lo que permite que no tengan aglomeración durante la reacción (Beveridge *et al.*, 2012). La cantidad de magnetización que se retiene cuando no hay un campo impulsor se llama remanencia y la cantidad para desmagnetizarlo se llama coercitividad.

Este método ofrece unas ventajas físicas en comparación a cualquier otro tipo de materiales utilizados para la inmovilización de enzimas. Estas son el pequeño tamaño, la elevada área superficial específica, la alta estabilidad y la baja resistencia a la transferencia de masas. Además permiten una menor contaminación de la enzima, facilitan la prevención del crecimiento microbiano y son de baja toxicidad, lo que les hace biocompatibles con los alimentos. Aunque la mayor ventaja que poseen es que son de muy rápida y eficaz separación del medio. El principal inconveniente es la gran área superficial de trabajo, ya que algunas son

susceptibles a la oxidación por el aire, lo que ocasiona una pérdida de estabilidad y propiedades magnéticas (Li *et al.*, 2007).

Un uso es la inmovilización de una **xilanasa (E.C.3.2.1.X)** y **celulasa (E.C.3.2.1.4)** en un soporte magnético de quitosano para la obtención de oligosacáridos a partir de un desecho agroindustrial (Hernández, 2019). Las enzimas utilizadas son las encargadas de acelerar los procesos de degradación de la materia en subproductos lignocelulosicos que son de alto valor. El diseño elegido por los autores para crear el sistema de inmovilización fue un soporte magnético de quitosano ( $Fe_3O_4$ Quitosano), al cual se anclaron las enzimas **endo- $\beta$ -1,4-xilanasa (E.C.3.2.1.8)** y **endo- $\beta$ -glucanasa (E.C.3.2.1.6)** y mediante el método de coprecipitación química. Tras la inmovilización, se confirmó la estabilidad térmica y resistencia a valores de pH ácidos, mayor estabilidad en la actividad catalítica.

Otro ejemplo de este tipo de soporte es el reportado por (Nicolás, 2017). Este autor estudió varias líneas de investigación paralelas y complementarias. Por un lado, la síntesis de partículas de magnetita mediante el método de co-precipitación en presencia de surfactantes y por otro lado el diseño de biocatalizadores a base de la **lipasa B (E.C.3.1.1.3.)** de *Candida Antarctica* y soportes magnéticos.

Como se ha comentado anteriormente, los zumos de frutas son productos de alto valor nutricional y muy susceptibles a cambios temperatura y pH. Una operación en la elaboración de los zumos es la clarificación. Esta operación hace susceptible el producto a la oxidación y degradación de compuestos como las vitaminas, por lo que se deben diseñar métodos que no las dañen. La enzima **papaína (E.C.3.4.22.2)** es inmovilizada con la nanopartículas magnéticas (Gahona *et al.*, 2015), debido a su especial recuperación, ya que el jugo posee fibras disueltas y obstruye el paso por un filtro de todo el producto. Con esta nueva técnica solo se precisaría de un campo magnético para poder eliminar las nanopartículas. La **papaína (E.C.3.4.22.2)** es unida covalentemente a las nanopartículas magnéticas, de este modo garantiza la unión y es resistente a temperaturas y pH. Las condiciones óptimas de funcionamiento de la papaína en las nanopartículas magnéticas son de temperatura de 27,3°C, pH de la solución por enzima de 7,1, concentración de papaína de 3,3 mg/ml y tiempo de actividad de 10 h. En comparación con la papaína libre, la papaína inmovilizada muestra mayor actividad enzimática, mejor tolerancia a las variaciones en el pH del medio y temperatura, mejor estabilidad de almacenamiento y buena reutilización.

#### 4.4.4 Otros soportes para la inmovilización

A parte de los métodos de nanopartículas de sílice, de oro o magnéticas, hay otros que también se basan en los pequeños tamaños de los soportes. El principal campo de investigación es el de los materiales de tamaños micro y nano, ya que cumplen mejor las funciones de contacto enzima/producto, debido a su gran área específica.

Como ejemplo, (Origone 2019) inmovilizó **asclepaína (E.C. 3.4.22.7)**, una fitoproteasa, sobre nanopartículas de poli(acrilamida) con el objetivo de sintetizar *in vitro* péptidos con actividad antihipertensiva. Con una aplicación diferente, (Betancur *et al.*, 2018) inmovilizaron **acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7)** sobre electrodos de diferente material de tipo pantalla impresa mediante el método de unión cruzada con el objetivo de crear un biosensor para el análisis cuantitativo de contaminantes de tipo *clorpirifos* en la leche cruda de vaca.

Un punto crítico de muchos alimentos es la detección de partículas metálicas en el producto, por este motivo se han creado nuevos biosensores que detecten y capten estas sustancias. En el desarrollo de sensores se están creando nuevos materiales para la inmovilización, los cuales puedan detectar todo tipo de sustancias. La enzima **papaína (E.C. 3.4.22.2)** inmovilizada en nanofibras poliméricas electrohiladas o sobre poli (alcohol vinílico) (PVA) (Alonso Gutierrez, 2016), son sintetizadas bajo la técnica de electrohilado. La distribución del diámetro de las fibras se encuentra en el rango de 80 a 170 nm. La inmovilización de la **papaína (E.C. 3.4.22.2)** en la membrana de nanofibras se logró mediante la reticulación (crosslinking). El funcionamiento de esta enzima es por la reacción del centro activo con la presencia de iones metálicos que están presentes en el medio de reacción.

El uso de las enzimas para la creación de materias primas y facilitar sus reacciones, es una función necesaria en la industria alimentaria. De lo contrario, no se tendría la eficiencia que se tiene en muchas reacciones.

En la producción de ácido pirúvico y gliceraldehido se utilizan enzimas inmovilizadas sobre la superficie celular (Lagos Susaeta, 2016), dónde el alginato es obtenido desde maroalgas las cuales son un alternativa por cuanto su producción evita la mayor parte de impactos negativos. Sin embargo, la utilización directa de alginato como fuente de carbono por parte de los microorganismos de uso industrial, se ve imposibilitada por cuanto estos precinden de la ruta metabólica necesaria para su degradación e incorporación al metabolismo central. La ruta de conversión consiste en cuatro enzimas de proceso. Se realizan las inmovilizaciones sobre las células de los diversos microorganismos para que estos capten mediante la enzima los compuestos del ácido pirúvico y puedan metabolizarlo.

#### 4.4.5 Conclusión a la inmovilización por nuevos métodos

Los nuevos métodos de inmovilización pero presentan numerosas ventajas frente a los tradicionales. Sin embargo, todavía quedan algunas desventajas que deben ser consideradas para su investigación y utilización en los productos de la industria alimentaria. Las ventajas e inconvenientes de estos nuevos métodos de inmovilización están representadas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de las enzimas inmovilizadas en nanopartículas en la industria alimentaria.

Ventajas	Desventajas
Resistencia a transferencia de masa	Coste de proceso de fabricación
Carga enzimática efectiva	Escala de aplicación reducida
Gran área superficial	Aplicaciones reducidas
Alta resistencia mecánica	

Algunos de los ejemplos más comunes de enzimas inmovilizados en nanopartículas son los expuestos en la **Tabla 7**, donde se representa la enzima, el material sobre la cual esta inmovilizada y la aplicación que tiene el conjunto.

Tabla 7. Ejemplos de enzimas inmovilizadas sobre nanopartículas.

Enzima	Nanopartículas	Aplicación
$\alpha$ -amilasa	Nanopartículas de sílice	Eliminación del almidón en subproductos
Lisozima	Nanofibras de quitosano	Antibacteriano
Peroxidasa (HRP)	Nanopartículas de sílice y magnetita	Inmunoensayos
Colesterol oxidasa	Nanopartículas de $Fe_3O_4$	Análisis del colesterol total en suero
Deshalogenasa	Nanopartículas de óxido de hierro recubierto de sílice	Producción de proteínas
Queratinasa	Nanopartículas de $Fe_3O_4$	Síntesis de queratina
$\alpha$ -amilasa	Nanopartículas magnetita recubierta de celulosa	Degradación del almidón
B-Galactosidasa	nanopartículas de ZnO en capas	Hidrólisis de lactosa
Glucosa oxidasa	Nanopartículas de oro	Estimación de glucosa hasta 300 mg/ml
Lipasa	Nanopartículas de poliestireno	Aminólisis y esterificación
$\alpha$ -quimotripsina	Nanopartículas de poliestireno	Proteólisis
Diastasa	Nanopartículas de níquel recubierto de sílice	Hidrólisis de almidón
Celulasa	Nanopartículas de $TiO_2$	Hidrólisis de carboximetilcelulosa
$\alpha$ -amilasa	Nanopartículas de $TiO_2$	Hidrólisis y replegamiento de almidón
Tripsina	Nanopartículas de $TiO_2$	Replegamiento de almidón
$\alpha$ -amilasa	Nanopartículas de plata	Hidrólisis de almidón

#### 4.5 Selección del tipo de soportes

Como se ha explicado en los apartados anteriores de tipos de inmovilización tradicional y moderna (**Apartados 4.3 y 4.4**), existen numerosos métodos para la inmovilización, empezando por métodos sin soporte, y siguiendo con métodos donde se utiliza retención física o química de un enzima sobre un soporte. En esta sección se dan pautas generales para la elección de estos métodos y soportes de entre todas las posibles opciones.

##### 4.5.1. Clasificación de los soportes

Antes de seleccionar un tipo de inmovilización se debe de estudiar la reacción y las condiciones en las que se va a desarrollar, sin olvidar que productos serán los iniciales y finales. Como se ha visto en las secciones anteriores, estos soportes se pueden clasificar atendiendo a su origen o a su tamaño.

##### 4.5.1.1 Origen

Dado el gran número de materiales que existen se pueden clasificar atendiendo a su origen en orgánicos e inorgánicos. En el grupo de los inorgánicos se encuentran las arenas, los minerales metálicos y los materiales plásticos. En lo referido al grupo de los orgánicos están los geles, las fibras naturales y colágenos. Los soportes inorgánicos presentan mayores ventajas frente a los orgánicos, como es la alta estabilidad ante las degradaciones químicas, físicas y microbiales, pero la gran mayoría de procesos industriales se realizan con soportes orgánicos debido a la afinidad con las enzimas.

En la actualidad (Peña-Gomez *et al.*, 2019), en la industria alimentaria, sobre todo en aquella que se utilizan productos líquidos se están implementando encimas a base de soportes inorgánicos. Estos son utilizados a modo de material filtrante con doble efecto, es decir, la partícula en sí funciona para contaminantes grandes y las enzimas actúan sobre material microscópico o haciéndolo reaccionar para anular su efecto. Estos materiales son la sílice amorfa y las partículas de oro.

#### 4.5.1.2 Tamaño

Los materiales de inmovilización poseen muchos tamaños los cuales son es un factor muy importante a la hora de diseñar una enzima inmovilizada para una reacción deseada. Son clasificados atendiendo al diámetro y se clasifican dependiendo del tamaño de este, en intervalos, ya que algunos materiales pueden erosionarse (sílice) o en su fabricación no ser todos uniformes (geles microencapsulados).

Los nanomateriales son aquellos que poseen un diámetro de 1 a 100 nm. En este grupo están incluidos los nanocristales, nanotubos de carbono, de sílice y partículas de metales como el oro (Gubin *et al.* 2005). Poseen mayor superficie funcional para aumentar la carga enzimática y no limitan la difusión del producto, aumentando su biodisponibilidad. Los nanomateriales se pueden clasificar atendiendo al tamaño de poro, microporosos tienen poros de menos de 2 nm, materiales macroporosos tienen poros mayores de 50 nm y materiales mesoporosos tienen un tamaño de poro entre 2-50 nm (Wang y Caruso, 2005).

Las fibras y gránulos de carbono son de un tamaño de partícula de 1 a 3 mm, siendo más grande que los anteriores.

#### 4.5.1.3 Tipos de soportes

Se deben evaluar alternativas y soportes que permitan una fácil y completa recuperación del preparado y que aumenten la efectividad de la enzima. Algunos ejemplos de materiales y enzimas que son más utilidades por su afinidad están resumidos en la **Tabla 8** en la cual también se informa de la reacción en la que son aplicados los compuestos inmovilizados. Otros ejemplos de materiales de inmovilización son los siguientes:

- Microesferas de quitosano colágeno, dextrano, queratina, agarosa, carragenatos, xerogeles o geles en aerosol, agar-agar, agarosa.
- Partículas de sílice no porosas, partículas de sílice nanoporosas, nanopartículas de sílice. Partículas magnéticas de sílice dopadas de oro (Cho *et al.*, 2012).
- Perlas de alcohol de polivinilo modificadas recubiertas con quitosán (Dinçer *et al.*, 2007).
- Liposomas de fosfatidilcolina con bandas de quitosán (Li *et al.*, 2007).
- Nanopartículas magnéticas (NPM) de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/polivinil alcohol (Liao *et al.*, 2010) nanoconjugados magnéticos, óxidos de hierro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>); ferritas de cobalto, manganeso, níquel y magnesio, FePt,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, cobalto, hierro, níquel,  $\alpha$ -Fe, CoPt, y FeCo.
- Carbón activado (Daoud *et al.*, 2010), Nanotubos de carbón (Abd *et al.*, 2012).
- RhC películas de poliestireno (Hirsh *et al.*, 2010).
- Perlas de alginato-Cu (Phetsom *et al.*, 2010), alginato, carragenato, Goma arábiga, Tween 80 y poliestireno40-b-poli
- Oro nanoporoso (Huajun *et al.*, 2009), vidrio, alúmina, cerámicas, monocapastiol, sales de titanio y circonio

- Membranas de polipropileno (Georgieva *et al.*, 2010).
- Prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, resinas de poliuretano, poliacrilamida, policloruro de dialilamonio, polihidrocloruro de alilamina o poliestirensulfonato
- Fibras, celulosa, almidón.

Tabla 8. Ejemplos de materiales y enzimas que poseen afinidad entre ellos. Reacción que desempeña la inmovilización.

Materiales aplicados como soporte sólido en inmovilización de enzimas		
Material de soporte	Enzima inmovilizada	Reacción de aplicación
Sílice	CALB	Esterificación
Zeolitas	Proteasa alcalina de <i>Solanum melongena</i>	Hidrólisis de caseína
Carbono activado Nanotubos de Carbono	Tirosinasa, Glucosa oxidasa, CALB	Oxidación D-glucosa y L-3,4dihidroxifenilalanina Hidrólisis de p-NO <sub>2</sub> Ph-palmitato
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cloroperoxidasa	Oxidación de dibenzotiofeno
ZrO <sub>2</sub>	α-amilasa	Hidrólisis de almidón
Dióxido de estaño	Lipasa de <i>Rhizopus delemar</i>	Esterificación
Magnetita	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	Hidrólisis de tributirina
Alginato	Xilanasa de levan	Hidrólisis de xilanos
Quitosano	Inulinasa de levadura	Hidrólisis de inulina
Colágeno	Catalasa	Descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Gelatina	α-amilasa	Hidrólisis de almidón
Poliestireno	Deshidrogenasa	Conversión de formaldehído a metanol
Variantes de Poliacrilato	<i>Thermomyces lanuginosa</i> , <i>Rizomucor mehieii</i> , CALB	Hidrólisis de tristearina, Esterificación
Poliamida	Lipasa de <i>Bacillus coagulans</i>	Hidrólisis de p-NO <sub>2</sub> Ph-palmitato
Fibra de coco verde	Lacasa	Degradación de colorantes textiles
Fibra de tallos de maíz	Amilasa, Lipasa	X
Membrana Interna De Cáscara De Huevo	Oxalato oxidasa, Glucosa oxidasa, Peroxidasa	X

#### 4.5.2 Selección de soportes

Una vez revisadas las diferentes opciones de soportes a utilizar se debe tener en cuenta una serie de características, tales como:

- Resistencia física a la compresión
- Hidrofilicidad
- Biocompatibilidad
- Resistencia la ataque microbiano
- Bajos coste
- Temperatura y pH



Las características físicas como la resistencia mecánica y estado físico son importantes para relacionarlas con el reactor y sus condiciones técnicas de temperatura y pH. El tamaño medio de partícula y tamaño medio de poro se relaciona para obtener el área superficial, lo cual establece la capacidad de enlace con las enzimas, factor muy importante para algunos métodos de inmovilización. Los materiales no porosos, como las fibras y geles, no tienen esta cualidad, pero presentan baja capacidad de carga. El carácter hidrofílico es el factor que se utiliza para determinar el nivel de actividad de las enzimas inmovilizadas.

Se deben controlar estas cualidades para optimizar la capacidad y las propiedades de flujo, ya que es un factor importante en el material inmovilizado, a mayor capacidad de flujo mayor reacción de la enzima con el sustrato y mayor eficiencia de la reacción.

Otro factor que se debe tener en cuenta para la selección es la legislación de cada país. Se debe consultar si está permitido el uso de un soporte o una enzima en una reacción de la industria alimentaria que se desee ([Moral et al., 2015](#)) y debe ser comprobado porque en cada país son distintas. En la Unión Europea las enzimas están sujetas a reglamentaciones que evalúan los procedimientos de fabricación, asegurando su uso y su aplicación en la industria alimentaria. Son consideradas como aditivos o coadyuvantes tecnológicos en los alimentos, siempre que se demuestre que no son tóxicos a las dosis utilizados.

#### 4.6 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

El uso de las enzimas ha demostrado durante años que son de gran utilidad para varios campos y sectores de la industria. Su eficacia está demostrada en la síntesis de fármacos, herbicidas, insecticidas de biocombustibles alternativos al petróleo, o en la industria textil y de detergentes, entre otros muchos ejemplos ([Arroyo et al., 2014](#)). En la **Tabla 9** se muestran ejemplos del uso de las enzimas según al sector de la industria que pertenecen.

Tabla 9. Distintos campos y sectores en los que son utilizados los enzimas en los procesos de fabricación a nivel industrial.

<b>SECTOR SANITARIO-FARMACÉUTICO</b>
Enzimas para diagnóstico
Enzimas de uso terapéutico
Síntesis de intermedios y compuestos químicos de interés farmacéutico
<b>SECTOR AGROALIMENTARIO</b>
Aromas, edulcorantes y aditivos alimentarios
Aminoácidos y otras moléculas nutritivas
Enzimas para queserías y productos lácteos dietéticos (sin lactosa)
Insecticidas y herbicidas
<b>SECTOR MEDIOAMBIENTAL</b>
Biorremediación
Obtención de plásticos biodegradables
Biocombustibles
<b>PROCESOS INDUSTRIALES</b>
Detergentes
Industria textil y peletera
Síntesis de compuestos químicos

A continuación, se explica algunos de los usos más importantes de la aplicación de las enzimas inmovilizadas en las distintas industrias como son los biosensores, medicina, farmacia, química, agua residual y alimentaria.

#### **4.6.1 Biosensores**

Son enzimas inmovilizadas que reaccionan ante un producto externo y emiten una señal de alarma para advertir de su ausencia o presencia. Son específicos para cada tipo compuesto que sea capaz de interactuar con la enzima seleccionada. Está compuesto por una enzima inmovilizada, un elemento de traducción de la interacción de la enzima con el producto y un material de soporte. Los métodos más empleados en inmovilizar son la inclusión en membranas y la unión covalente. Son utilizados en el control de calidad de los alimentos para garantizar que son aptos y aprobar denominaciones de origen o calidades superiores ([Mangrulkar et al., 2012](#)).

#### **4.6.2 Medicina y farmacia**

Muchas enfermedades son causadas por carencia o ausencia de enzimas, lo que ocasiona que muchas reacciones biológicas no se puedan llevar a cabo. Los motivos de la inmovilización de las enzimas es garantizar la prolongación de la acción de su funcionamiento y asegurarse que llevan al lugar adecuado para desarrollar su función dentro del cuerpo ([Sharifi et al., 2019](#)). Si las enzimas no alcanzan el órgano o el punto del cuerpo donde son necesarias no actúa correctamente, en el recorrido sufren muchos cambios en el entorno.

#### **4.6.3 Química**

En la industria química son utilizadas miles de enzimas las cuales facilitan el correcto desarrollo de las reacciones bajo condiciones más favorables. Se basan en la obtención de productos de alto valor como son péptidos, fragancias y olores, donde el valor de la temperatura es muy importante, ya que son sustancias volátiles ([Spycher et al., 2019](#)).

#### **4.6.4 Industria Alimentaria**

La inmovilización ha permitido que se puedan reutilizar las enzimas repetidamente en los procesos, ya sea de forma continua o discontinua. Las reutilizaciones no pueden ser infinitas, hay límites sanitarios y biológicos que no lo permiten ([Katzir-Katchalsky, 2013](#)). Algunos ejemplos de usos de enzimas inmovilizadas son:

- Hidrolisis de proteínas. Son utilizadas para modificar el contenido proteico de los alimentos, de esta forma se consigue obtener materias primas de mayor calidad a menor precio, por ejemplo en el trigo se emplean pepsina y proteasa inmovilizadas en quitosán y en el queso son empleadas lactoglobulina en la leche.
- Hidrolisis de hidratos de carbono. En la leche son empleadas para algunos derivados lácteos sin lactosa, para hacerlos aptos para consumidores que carecen de lactasa intestinal. Se consigue tratando la leche con  $\beta$ -galactosidasa de levaduras inmovilizada en fibras de acetato de celulosa ([Panesar et al., 2010](#)). Otra hidrolisis es la degradación del almidón de diversas fuentes vegetales para obtener los jarabes de fructosa y glucosa empleados en la fabricación de refrescos y bebidas azucaradas. Se trata el almidón con amilasa, glucoamilasa y glucoisomerasa inmovilizadas en sílica mesoporosa ([Yin et al., 2013](#)). En frutas y verduras son empleadas las pectinas para clarificar los zumos, hacerlos

menos viscosos y más concentrados. Son inmovilizadas sobre soportes como PVC, poliéteres, poliacrilamidas y alúmina.

- Mejora de las características organolépticas de algunos alimentos. El empleo de células de *Arthobacter globilis* atrapadas en poliacrilamida permite eliminar el sabor amargo del zumo de los cítricos. Por otra parte, las células de *Leuconostoc oenos* inmovilizadas en alginato se han utilizado en la desacidificación del vino y la Endo- $\beta$ -glucosidasas inmovilizadas en esferas acrílicas permiten incrementar el aroma de vinos y zumos (Reid et al., 2007).
- Obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios. En la fabricación de zumos, mermeladas y dulces es utilizado el ácido L-málico que es obtenido por la fumarasa de *Brevibacterium flavum* atrapada en k-carragenato. En este sector han surgido grandes avances para la obtención de azúcares bajos en calorías como son el aspartamo y la estivia (Katzir-Katchalsky, 2013).
- Aplicación en los envases. Las enzimas son inmovilizadas sobre los plásticos de los envases para preservar las cualidades de almacenamiento y reducir las reacciones de degradación (Pérez-Esteve et al., 2013). Los usos específicos son el uso de glucosa oxidasa sobre polímeros para la prevención del crecimiento de bacterias y mohos en quesos, y el uso de lipasa inmovilizada sobre el packaging plástico para prevención de la oxidación de las grasas (Moral et al., 2015).
- Otras aplicaciones. Con el uso de lipasa inmovilizada se puede sustituir el ácido palmítico de las posiciones 1 y 3 del aceite de palma por ácido esteárico y de ese modo poder emplear en la industria del chocolate. Los productos del chocolate tienen aproximadamente un 30% de grasa, lo cual es de interés que sea de gran valor y saludable.

## 5. CONCLUSIONES

Las enzimas se emplean en el procesado, la preparación, la conservación y el almacenaje, tanto de materias primas como de producto terminado. Éstas son incluidas durante el proceso o una vez finalizado, de forma libre o inmovilizada para que hagan su función y luego puedan ser retiradas o sigan haciendo su función una vez finalizado el proceso de fabricación. Sus principales usos son para el desarrollo de aromas característicos, cambios de textura, solubilización de compuestos, formación de estructuras y eliminación de oxidantes o preservación de antioxidantes. En el aspecto de control de calidad son utilizados biosensores.

El uso de las enzimas inmovilizadas es muy variado, desde el tratamiento del filtrado de un líquido con sílice amorfa con enzimas que retienen la oxidación de los compuestos, hasta partículas magnéticas con enzimas que ayudan a solubilizar proteínas en los alimentos. Los usos se están normalizando por el hecho de poder realizar una eliminación completa de las enzimas y la posible reutilización de las mismas. Esto favorece a un ahorro de materiales, de energía y de contaminación al medio ambiente, siendo beneficioso para cualquier industria alimentaria.

Los métodos que se emplean en la inmovilización de las enzimas de forma tradicional son la adsorción y el enlace covalente. Al tener propiedades de fijación permanente son utilizados como base para el desarrollo de nuevos métodos. La diferencia entre los tradicionales y los modernos radica principalmente en el tamaño de los sustratos. En los tradicionales se utilizan soportes macrométicos y en los modernos los nanométricos. Entre ellos destacan la sílice

amorfa, el oro y las nanopartículas magnéticas que responden a la presencia de un campo magnético o que son fáciles de dispersar en disoluciones. Este cambio supone un aumento en las propiedades de los materiales inmovilizados, debido al aumento del área específica, afinidad de las enzimas y la disposición de las partes activas de las enzimas.

Dada la gran versatilidad que ofrece la combinación de técnicas y soportes para la inmovilización presentados en este trabajo, esta técnica se podría extrapolar a otras sustancias con distintas funciones en los alimentos como por ejemplo moléculas con capacidad antimicrobiana o antioxidante, que no pueden ser añadidas directamente sobre los alimentos y precisan ser inmovilizadas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aehle, W. (ed.) (2007). *Enzymes in industry. Production and applications*. Weinheim: Wiley-VCH. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527617098>
2. Ache Manzione, G. (2018). *Nanosoportes de sílica biomimética para la inmovilización de enzimas*.
3. Aguilar-Zárate P., Aguilar-Zárate, M., Carrillo-Inungaray M.L., Portilla-Rivera OM. (2012). *Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila Acta Química Mexicana*. 4:1-17
4. Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). *Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix*. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1.
5. Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K., Rowat, A. C., Baret, J. C., ... & Weitz, D. A. (2010). *Ultra-high-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4004-4009.
6. Ali, M., & Winterer, M. (2010). *ZnO nanocrystals: surprisingly 'alive'*. *Chemistry of Materials*, 22(1), 85-91.
7. Alting, A.C., Van Der Velde, F., Kanning, M.W., Burgering, M., Mulleners, L., Sein, A., et al. (2009). *Improved creaminess of low-fat yoghurt: the impact of amyloamylase-treated starch domains*. *Food Hydrocolloid*, 23:980-987.
8. Arroyo, M.; Acebal, C. y Mata, I. de la (2014). *"Biocatálisis y biotecnología"*. *Arbor*, 190 (768): a156. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>
9. Bano S., Ul Kader S.A., Aman, A., Syed, M.N., Azhar, A. (2011). *Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from Bacillus subtilis*. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 12:255-271
10. Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. *Rsc Advances*, 4(4), 1583-1600.
11. Benjamin, S., Smitha R. B., Jisha V. N., Pradeep S., Sajith S., Sreedevi S. et al. (2013). *A monograph on amylases from Bacillus spp*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 227-241
12. Beisson F, Arondel V, Verger R (2000) *Assaying Arabidopsis lipase activity*". *Biochem. Soc. Trans.* 28: 773-775.
13. Betancur, J., Morales, D. F., Peñuela, G. A., & Cano, J. B. (2018). *Detección de Clorpirifos en Leche usando un Biosensor Enzimático Amperométrico basado en Acetilcolinesterasa*. *Información tecnológica*, 29(6), 113-122.
14. Beltrán, E. D., & Castrillón, M. T. V. (2016). *Inmovilización de proteasas en nanopartículas*. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 2(4).
15. Beveridge, J. S., Stephens, J. R., & Williams, M. E. (2011). *beveridge2011.pdf*. *Annu. Rev. Anal. Chem*, 4, 251-73.
16. Bonifert, G., Folkes, L., Gmeiner, C., Dachs, G., & Spadiut, O. (2016). *Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment*. *Cancer medicine*, 5(6), 1194-1203.
17. Carrera, J.E. (2003). *Producción y aplicación de enzimas industriales*. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1:15
18. Cao, L.; *Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Application and Design*, Wiley-VCH: Baden-Württemberg, 2005.
19. Castro Marques, A., Marostica, M.R. Jr, Pastore, G.M. (2010). *Some nutritional, technological and environmental advances in the use of enzymes in meat products*. *Enzyme Res*.
20. Cremosi, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p.
21. Daoud, F. B. O., Kaddour, S., & Sadoun, T. (2010). *Adsorption of cellulase Aspergillus niger on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 93-99.
22. Das, S., Berke-Schlessel, D., Ji, H. F., McDonough, J., & Wei, Y. (2011). *Enzymatic hydrolysis of biomass with recyclable use of cellobiase enzyme immobilized in sol-gel routed mesoporous silica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(1-2), 49-54.
23. Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S.; 3 *Biotech* 2012,
24. Davids, T., Schmidt, M., Boettcher, D. y Bornscheuer, U.T. (2013). *Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis*. *Current Opin-ion in Chemical Biology*, 17, pp. 215-220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.022>

25. de Lera Santín, A. (2011). *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa.* Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatearen Argitalpen Zerbitzua.
26. DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulou, A.J. y Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42, pp.6437-6474. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35506c>
27. Dussán, M. K.; Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia, 2008.
28. El Mel, A. A., Boukli-Hacene, F., Molina-Luna, L., Bouts, N., Chauvin, A., Thiry, D., ... & Tessier, P. Y. (2015). Unusual dealloying effect in gold/copper alloy thin films: the role of defects and column boundaries in the formation of nanoporous gold. *ACS applied materials & interfaces*, 7(4), 2310-2321.
29. Elnashar, M. M. (2010). Immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1(01), 61.
30. Escuin, P. C., García-Bennett, A., Ros-Lis, J. V., Foix, A. A., & Andrés, A. (2017). Application of mesoporous silica materials for the immobilization of polyphenol oxidase. *Food chemistry*, 217, 360-363.
31. Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., VillaVelázquez-Mendoza, C., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V., & Manzanillo, T. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 42-56.
32. Gahona, J. D. F., Montiel, A. C. G., Salamanca, C. E. G., Araque, Y. Y. H., & Barrera, C. M. (2015) enzima, principal precursor de bio-procesos: caracterización, inmovilización de la enzima papaína en la clarificación de jugo.
33. Gascón Pérez, V., Sastre, E., Márquez Álvarez, C., & Blanco Martín, R. M. (2014). Inmovilización no covalente de lacasa sobre sílice mesoporosa ordenada funcionalizada con grupos amino.
34. Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes: status and perspectives. In *Enzymes in human and animal nutrition* (pp. 487-514). Academic Press.
35. Gregorio-Jáuregui, K. M.; Rivera-Salinas, J. E.; Saade-Caballero, H.; López-Campos, R. G.; Martínez-Hernández, J. L.; Iliina, A. En *Química Hoy, tópicos selectos de investigación*, U. A. de C.: Coahuila, 2012.
36. Gubin, S. P., Koksharov, Y. A., Khomutov, G. B., & Yurkov, G. Y. (2005). Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chemical Reviews*, 74(6), 489.
37. Gupta MN, Kaloti M, Kapoor M, Solanki K (2011) Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 39: 98-109.
38. Gustavsson, N. O., Jönsson, M., Laakso, T., Reslow, M., Björn, S., & Drustrup, J. (2006). U.S. Patent No. 7,033,609. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
39. Hagopian, K., Tomilov, A. A., Tomilova, N., Kim, K., Taylor, S. L., Lam, A. K., ... & Ramsey, J. J. (2012). Shc proteins influence the activities of enzymes involved in fatty acid oxidation and ketogenesis. *Metabolism*, 61(12), 1703-1713.
40. Hartmann M. 2005. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chemistry of Materials*. 17,18: 4577-4593.
41. Hartmeier, W. (2012). *Immobilized biocatalysts: An introduction.* Springer Science & Business Media.
42. Hernández, A. D. (2019). Co-inmovilización de una xilanaso y celulasa en un soporte magnético de quitosano para la obtención de oligosacáridos a partir de un desecho agroindustrial.
43. Hirsh, S. L., Bilek, M. M. M., Nosworthy, N. J., Kondyurin, A., Dos Remedios, C. G., & McKenzie, D. R. (2010). A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir*, 26(17), 14380-14388.
44. Hutkins, R.W. (2007). Introduction, in *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. USA:Blackwell Publishing.
45. Illanes A. (1994). *Biología de enzimas. Serie de Monografías Científicas del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Organización de los Estados Americanos, Ediciones Universitarias de Valparaíso. USA.*
46. Jackson, E., Ferrari, M., Cuestas-Ayllon, C., Fernández-Pacheco, R., Perez-Carvajal, J., de la Fuente, J. M., ... & Betancor, L. (2015). Protein-templated biomimetic silica nanoparticles. *Langmuir*, 31(12), 3687-3695.
47. Katzir-Katchalsky, A. (2013). *Biophysics and other topics.* Academic Press.
48. Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., & Mojević, L. V. (2004). Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta periodica technologica*, (35), 151-164.
49. Kiyotani, K., Tasaka, H., Tsukiyama, F., Matsuo, Y. 1983. Lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor. *Hiroshima J Med Sci* 32 (3): 267-71.
50. Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature*, 409(6817), 241-246.
51. Kuiper S.M., Nallani M., Vriezema D.M., Cornelissen J.J.L.M., Van Hest J.C.M., Nolte R.J.M. y Rowan A.E. 2008. Enzymes containing porous polymersomes as nano reaction vessels for cascade reactions. *Org. Biomol. Chem.* 8: 4315-4318.
52. Kumar, V., Sangwan, P., Singh, D., & Gill, P. K. (2014). Global scenario of industrial enzyme market. *Industrial enzymes: trends, scope and relevance.* Nova Science Publishers, New York, 176-196. Actualización del artículo publicado en *nutriNews* por Dr. Joaquim Brufau, Dtor. Centro IRTA (2014) Informe Diciembre 2019 de Feed Enzymes Markets [MarketsandMarkets.com](http://MarketsandMarkets.com)

53. Lagos Susaeta, D. I. (2016). Producción de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato mediante inmovilización enzimática en superficie celular.
54. Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M., Principios de Bioquímica 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 190.
55. Llinàs, M. C., & Sánchez-García, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad*, 71(565).
56. Margolin, A. L. (1996). Novel crystalline catalysts. *Trends in Biotechnology*, 14(7), 223-230.
57. Matosevic, S., Szita, N., & Baganz, F. (2011). Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(3), 325-334.
58. Mitchell, D. T., Lee, S. B., Trofin, L., Li, N., Nevanen, T. K., Söderlund, H., & Martin, C. R. (2002). Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 124(40), 11864-11865.
59. Monteiro de Souza, P., Oliveira e Magalhães, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
60. Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. P., & de Jesús García-Gómez, M. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos.
61. Motoki, M., Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci Tech.*, 9:204-210.
62. Mureseanu M, Galarneae A, Renard G y Fajula F. 2005. A new micelle-templated silica route for enzyme encapsulation. *Langmuir* 21: 4648-4655.
63. Neelakantan, S., Mohanty, A.K., Kaushik, J.K. (1999). Production and use of microbial enzymes for dairy processing: A review. *Curr Sci India.*, 77:143-148.
64. Nicolás, P. (2017). Síntesis y caracterización de partículas magnéticas para su aplicación en biotecnología.
65. Origone, A. L. (2019). Síntesis de péptidos antihipertensivos de interés industrial, utilizando nuevas fitoproteasas autóctonas inmovilizadas.
66. Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernandez-Lorente, G., Pernas, M., Rúa, M. L., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. 2004. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog* 20: 630-5.
67. Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 2010.
68. Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C. (2010). High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnol Mol Biol Rev* 5:71-78
69. Peña-Gómez, N., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fernández-Segovia, I., & Barat, J. M. (2019). Novel antimicrobial filtering materials based on carvacrol, eugenol, thymol and vanillin immobilized on silica microparticles for water treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102228.
70. Pérez-Esteve, E., Bernardos, A., Martínez-Máñez, R., Barat, J. M. 2013. Nanotechnology in the development of novel functional foods or their package. An Overview Based in Patent Analysis. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 5:35-43.
71. Pérez Porto, J., & Gardey, A. (2016). Actualizado: 2012. Definición. de: Definición de plantas ornamentales. Recuperado mayo 22de.
72. Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1), M031-M037
73. Ramírez Tapias, Y. A. (2018). Desarrollo de biocatalizadores inmovilizados y su aplicación en la industria alimentaria y ambiental.
74. Rivera-Pérez, C., & García-Carreño, F. (2007). Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. *BioTecnología*, 11, 37-45.
75. Rodríguez-Couto, S., Toca-Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv*, 24:500-513.
76. Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307.
77. Rossi, L. M., Garcia, M. A., & Vono, L. L. (2012). Recent advances in the development of magnetically recoverable metal nanoparticle catalysts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(11), 1959-1971.
78. Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Contreras-Esquivel, J. C., Medina-Morales, M. A., Aguilar, C. N., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quim. Nova*, 37(3), 504-512.
79. Sanz, G., Taurino, I., Antiochia, R., Gorton, L., Favero, G., Mazzei, F., ... & Carrara, S. (2016). Bubble electrodeposition of gold porous nanocorals for the enzymatic and non-enzymatic detection of glucose. *Bioelectrochemistry*, 112, 125-131.
80. Seijás, J. M. G. (2012). PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
81. Sharifi, M., Sohrabi, M. J., Hosseinali, S. H., Kani, P. H., Talaei, A. J., Hasan, A.,... & Yan, B. (2019). Enzyme immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*.

82. Singh, P.; Gupta, N.; Anthwal, A.; Pandey, A. *En Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*; Singh, P.; Pandey, A., eds.; Springer: Dordrecht, 2009.
83. Silva, S. R.; González, A. E. B.; Villar, J. C. G.; Congreso Iberoamericano de Investigación de Celulosa y Papel, Universidad de Chile, 2002.
84. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech Advances*, 19:627–662
85. Sheldon, R. A. y van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Re-views*, 42, pp. 6223-6235. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60075k>
86. Spycher, P. R., Martin, B. E. H. E., Schibli, R., & Hurwitz, D. (2019). U.S. Patent Application No. 16/319,502.
87. Stine, K. J. (2017). Enzyme Immobilization on Nanoporous Gold: A Review. *Biochemistry insights*, 10, 1178626417748607.
88. Sukeri, A., Saravia, L. P. H., & Bertotti, M. (2015). A facile electrochemical approach to fabricate a nanoporous gold film electrode and its electrocatalytic activity towards dissolved oxygen reduction. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(43), 28510-28514.
89. Voet, D., Voet, J., Pratt, C. *Fundamentals of Biochemistry. Life at the Molecular Level*, 4<sup>a</sup>. Ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013, pp. 440, 493.
90. Volodkin D.V., Larianova N.I. y Sukhorukov G.B. 2004. Protein encapsulation via porous CaCO<sub>3</sub> microparticles templating. *Biomacromolecules*. 5: 1962-1972.
91. Wang Y y Caruso F. 2004. Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres. *Chem. Commun.* 1528 1529.
92. Wang Y y Caruso F. 2005. Mesoporous silica spheres as supports for an enzyme immobilization an encapsulation. *Chem. Mater.* 17: 953-961.
93. Wei, H-N., Wu, B. 2008. Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R,S)-methyl mandelate. *Appl Biochem Biotechnol* 149: 79-88.
94. Wiseman A (1995) *Introduction to principles*. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 3rd ed. Wiseman A (ed). Padstow, Cornwall, UK: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd., pp. 3-8.
95. Wu, C., Liu, Z., Sun, H., Wang, X., & Xu, P. (2016). Selective determination of phenols and aromatic amines based on horseradish peroxidase-nanoporous gold co-catalytic strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 843-849.
96. Yin, H., Su, Z. L., Shao, H., Cai, J., Wang, X., & Yin, H. (2013). Immobilization of cellulase on modified mesoporous silica shows improved thermal stability and reusability. *African Journal of. Microbiology Research*, 7, 3248-3253.