

# Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones

Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications

DR. MIGUEL ARROYO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid

Tfno: 34-1-3944150 Fax: 34-1-3944672 e-mail: arroyo@solea.quim.ucm.es

## RESUMEN

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones. En esta revisión se analizan los diferentes métodos de inmovilización de enzimas, y el efecto sobre las propiedades catalíticas y la estabilidad de los biocatalizadores obtenidos.

**Palabras clave:** Inmovilización de enzimas. Estabilidad de enzimas.

## ABSTRACT

Immobilization of enzymes can dramatically improve their stability, and the biocatalysts available for the industrial production of chemicals, drugs and foods; waste treatment; clinical analyses and disease treatment and many other applications. In this review, different methods of immobilization of enzymes and the effect on catalytic properties and the stability of biocatalysts are considered.

**Key words:** Enzyme immobilization. Enzyme stability.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

Presentan una gran actividad catalítica;

Muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad);

Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

## II. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y

que pueden ser reutilizadas repetidamente (1). Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (2).

Como **ventajas** del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar (3):

1. El aumento de la estabilidad de la enzima;
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos aparecen en la Figura 1. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales **inconvenientes** del proceso de inmovilización son (4):

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

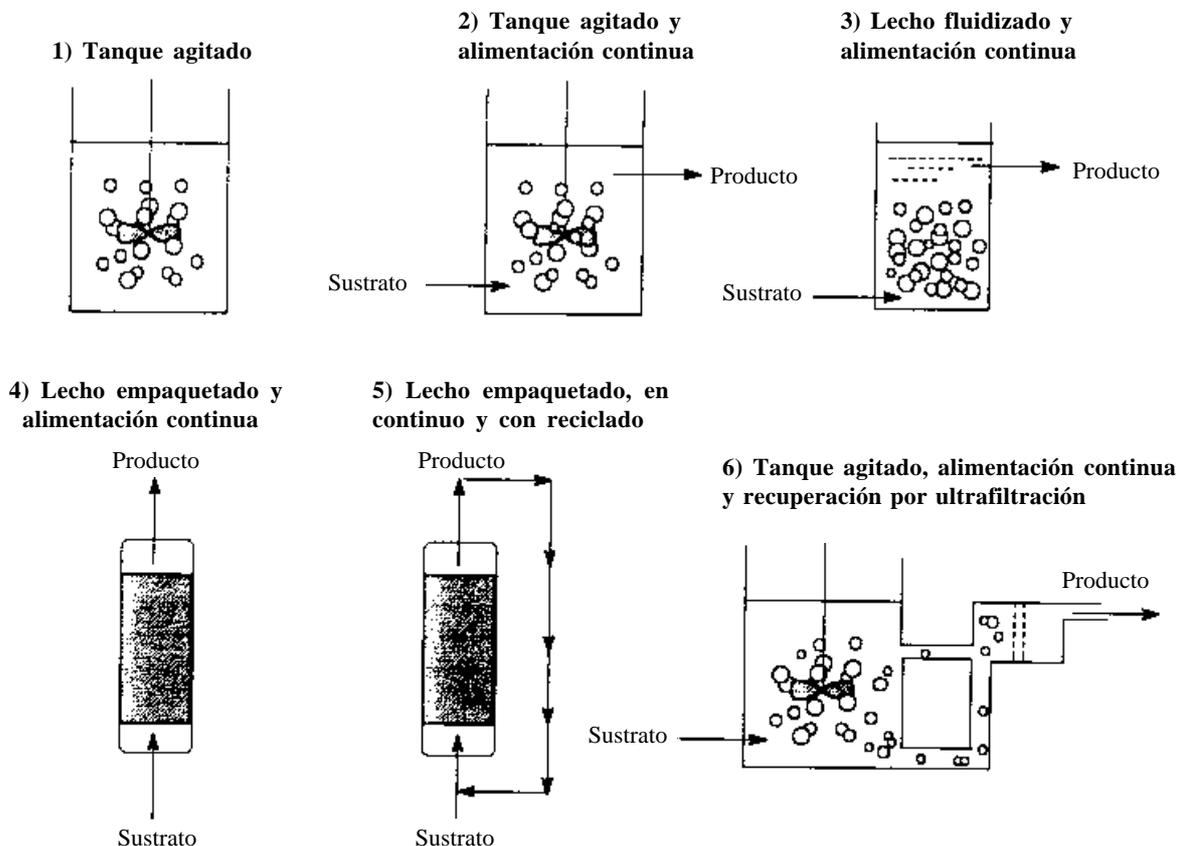


FIGURA 1.- Reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas.

En general, los **métodos de inmovilización** (5) se suelen clasificar en dos grandes categorías: 1) *Retención física* (Figura 2) y 2) *Unión química* (Figura 3).

### III. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS POR RETENCIÓN FÍSICA

#### III.1. Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

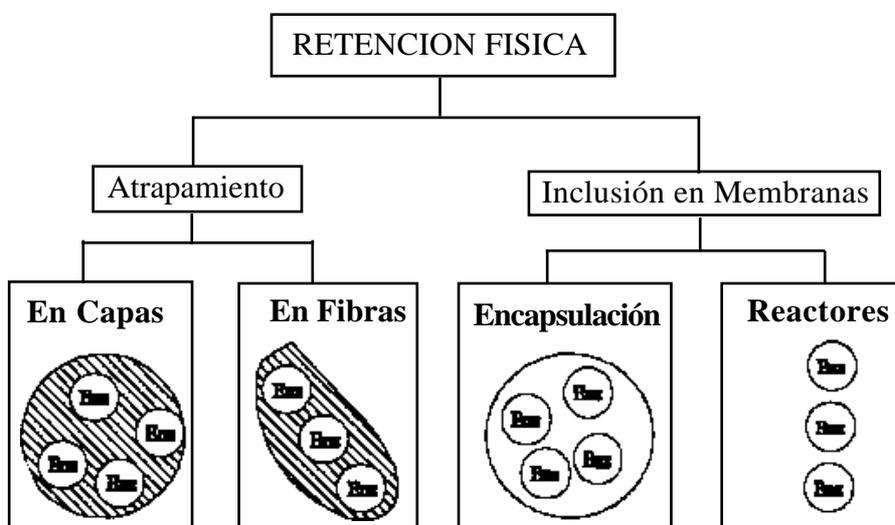


FIGURA 2. Métodos de inmovilización mediante retención física.

#### III.2. Inclusión en membranas: Dividida en dos tipos:

1) **Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos (6).

2) **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la

membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

1. mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana;
2. por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

#### IV. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS POR UNIÓN QUÍMICA

##### IV.1. Unión a soportes

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca 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. Se han utilizado una gran variedad de materiales como **soportes** para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1. Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, 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.)
2. Soportes orgánicos. Se pueden clasificar en:
  - Polímeros naturales*: a su vez divididos en:
    - polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc).
    - proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
  - Polímeros sintéticos*: divididos en:
    - Poliolenfinas (como el poliestireno)
    - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliácridamidas, polimetacrilatos, etc.)
    - Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente (Figura 3).

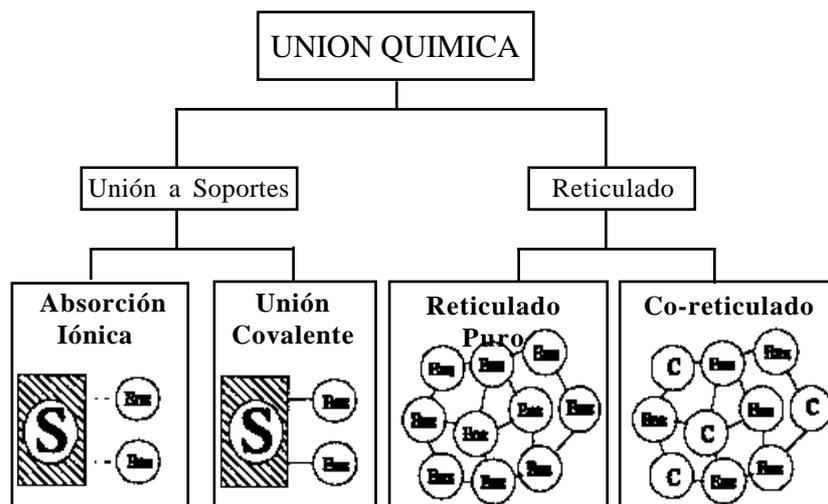


FIGURA 3.- Métodos de inmovilización mediante unión química.

#### IV.1.1. Adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción, son:

1. *el pH del medio*: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
2. *la fuerza iónica*: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
3. *el diámetro de poro*: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
4. *la presencia de iones* que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales *ventajas* de este método destacan:

1. su preparación sencilla,
2. su bajo coste,
3. no hay cambios de especificidad enzimática,
4. los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los *inconvenientes* de la adsorción son principalmente:

1. la optimización de las variables que controlan la adsorción,
2. los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico,
3. la unión al soporte es débil.

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear *resinas de intercambio iónico*, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble.

#### IV.1.2. Unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas (Tabla 1). De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes *ventajas*:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
2. La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
3. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
4. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*:

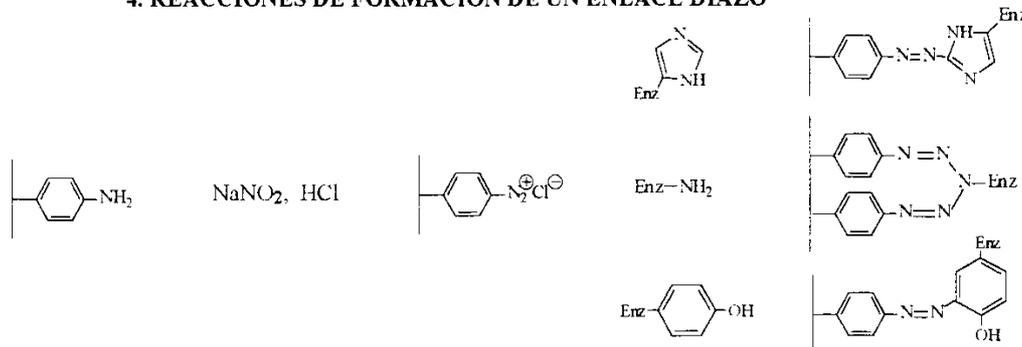
1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
2. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.

3. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

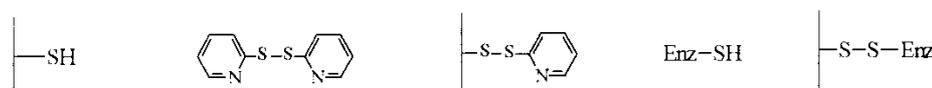
**Tabla I.** Métodos de inmovilización por unión covalente.

Grupo del soporte	Reactivo	Grupo activado del soporte	Grupo reactivo de la enzima	Enlace covalente resultante enzima-soporte
<b>1. REACCIONES DE FORMACIÓN DE ENLACE PEPTIDICO</b>				
	CNBr		Enz-NH <sub>2</sub>	
	ClCO <sub>2</sub> CaCl <sub>2</sub>		Enz-NH <sub>2</sub>	
	BrCOCH <sub>2</sub> ir		Enz-NH <sub>2</sub>	
	Cl <sub>2</sub> CS	NCS	Enz-NH <sub>2</sub>	
	Cl <sub>2</sub> CO		Enz-NH <sub>2</sub>	
	$R-N^+C(=S)-K^+$ $  $ $O^-$		Enz-NH <sub>2</sub>	
	N <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	CO-N <sub>2</sub>	Enz-NH <sub>2</sub> Enz-SH Enz-OH	
<b>2. REACCIONES DE ARIILACION</b>				
			Enz-NH <sub>2</sub>	
			Enz-NH <sub>2</sub> Enz-SH Enz-OH	
<b>3. REACCIONES DE ALQUILACION</b>				
	Cl-CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		Enz-NH <sub>2</sub> Enz-SH Enz-OH	
	CO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Cl		Enz-NH <sub>2</sub> Enz-SH Enz-OH	

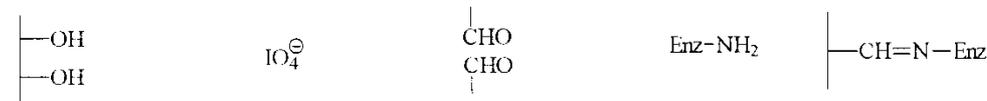
**4. REACCIONES DE FORMACIÓN DE UN ENLACE DIAZO**



**5. REACCIONES DE INTERCAMBIO TIOL-DISULFURO**



**6. REACCIONES DE FORMACIÓN DE UNA BASE DE SCHIFF**



*IV.2. Reticulado*

También denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (7). El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El **co-reticulado**, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente el método más novedoso de *cross-linking* consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes (8), las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos.

**V. EFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN**

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema

heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno.

### V.1. Efectos en la estabilidad

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones (9):

1. Una *estabilización conformacional* de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados (Figura 4). La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

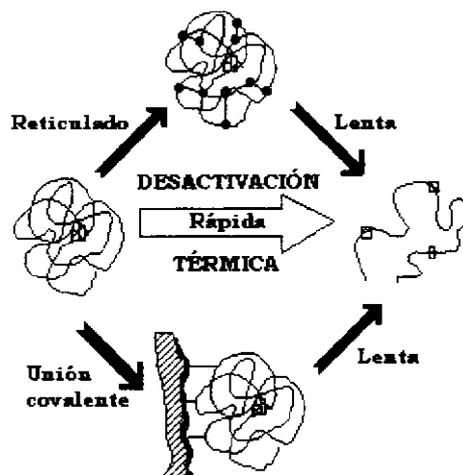


FIGURA 4. La inmovilización estabiliza a la enzima.

2. Una *protección frente a las proteasas* en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.

3. Se *evita la agregación intermolecular* al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

4. Existe una *alteración del microentorno* del enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción (10). En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la "acuofilia" del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima (11). Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

### V.2. Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,
2. los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima,
3. la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva,

4. las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

1) *Efectos difusionales*: Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

a) *resistencias difusionales externas*: si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de  $k_m$  para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes ( $k_m'$ );

b) *resistencias difusionales internas*: debida a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales (12) como por ejemplo: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de  $k_m'$  disminuye.

2) *Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte*, de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de  $k_m'$  aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución. Hornby y cols. (13) desarrollaron una expresión matemática que permite calcular la actividad de las enzimas inmovilizadas, teniendo en cuenta tanto los factores de difusión como los electrostáticos. La expresión de Michaelis-Menten en este caso es:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} \cdot [S]}{k'_m + [S]} \quad \text{donde} \quad k'_m = \underbrace{\left( k_m + \frac{x \cdot v_{\text{máx}}}{D} \right)}_{\text{término de difusión}} \underbrace{\frac{R \cdot T}{R \cdot T - x \cdot z \cdot F \cdot V}}_{\text{término electrostático}}$$

donde  $x$ =espesor de la capa de Nernst;  $D$ =coeficiente de difusión;  $T$ =temperatura (°K);  $z$ =valencia del sustrato;  $F$ =constante de Faraday;  $R$ =constante universal de los gases y  $V$ =gradiente de potencial en el soporte. Se puede disminuir el valor de  $k_m'$ , variando tanto el término de difusión como el término electrostático. En el primer caso, la disminución del valor de  $k_m'$  se consigue al disminuir el tamaño del soporte (con lo que disminuye el término "x") o al aumentar el flujo o la agitación. En el término electrostático, si "z" y "V" tienen el mismo signo, es decir si el soporte y el sustrato tienen la misma carga, el término electrostático es menor de 1 y  $k_m'$  aumenta. Si tienen cargas opuestas, la  $k_m'$  disminuye. Si no poseen carga,  $k_m'$  sólo dependerá del término de difusión.

3) *Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato*. En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Por ejemplo, muchas hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, a pesar de que son muy activas frente a sustratos pequeños, muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (14). Este "efecto estérico" se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.

4) *Efectos en el microentorno* (15): La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. Por ejemplo, una enzima unida a un soporte cargado negativamente (v.g. CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de hidrogeniones que en el medio de reacción. Como resultado, la enzima inmovilizada será más activa a un pH más alcalino. La enzima sería más activa a pH más ácidos si estuviera unida a un soporte cargado positivamente (v.g. DEAE-sephadex).

## VI. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todos los enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización (Tabla 2) y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores.

**Tabla 2.** Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

METODO	Inclusión en membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción química	Unión
covalente					
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste proceso	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Sí	Sí	Sí	No	No

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor coste proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente. Una vez elegido el método más conveniente, los derivados que preparemos deben estar caracterizados según las indicaciones establecidas por el *Working Party on Immobilized Biocatalysts* (16):

<b>CARACTERIZACIÓN DE UN DERIVADO INMOVILIZADO</b>	<b>Descripción general</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esquema de reacción</li> <li>2. Enzimas a insolubilizar</li> <li>3. Tipo de soporte empleado</li> <li>4. Método de inmovilización</li> </ol>
	<b>Preparación</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Condiciones de reacción</li> <li>2. Rendimiento en peso seco</li> <li>3. Actividad residual del sobrenadante</li> </ol>
	<b>Caracterización fisico-química</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Configuración del biocatalizador</li> <li>2. Grado de hinchamiento</li> <li>3. Grado de compresibilidad en columna</li> <li>4. Abrasión en sistemas de agitación</li> <li>5. Velocidad mínima de fluidización</li> </ol>
	<b>Cinética</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estabilidad de la enzima almacenada</li> <li>2. Estabilidad operacional</li> <li>3. Posibilidad de reutilización</li> <li>4. Grado de conversión</li> <li>5. Limitaciones difusionales</li> </ol>

**VII. APLICACIONES DE LA ENZIMAS INMOVILIZADAS**

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas
3. Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.

*VII.1. Biosensores*

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. Generalmente, el biosensor (Figura 5) contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.)(17).

El empleo de los biosensores presenta las siguientes ventajas:

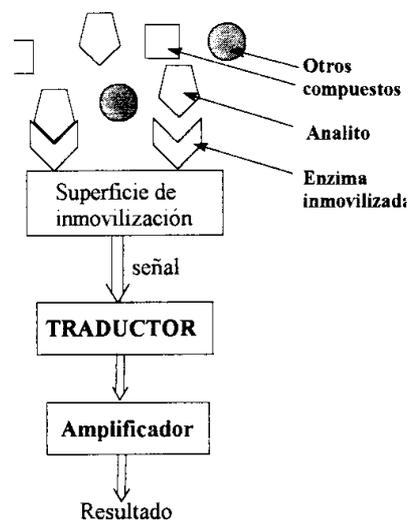


FIGURA 5. Componentes de un biosensor.

1. la instrumentación requerida es barata y sencilla,
2. el análisis es muy sensible,
3. permite el uso de muestras con color o turbias que no se podrían medir con métodos espectroscópicos.

Los métodos de inmovilización más utilizados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo (18).

#### *Aplicaciones de los biosensores:*

- Como se indicó anteriormente, los biosensores son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico. Los niveles séricos de glucosa, lactato y ácido úrico se pueden detectar mediante electrodos enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va dirigido a la detección de fármacos, células y virus patógenos.
- En el caso del control de calidad en las industrias alimentarias, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o por ejemplo, cuantificar el azúcar presente en bebidas.
- Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente. Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

#### *VII.2. Aplicaciones médicas*

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistente a la acción de las proteasas. Por ejemplo, la L-asparaginasa se utiliza en el tratamiento de leucemias y cánceres diseminados que requieren asparagina para desarrollarse. En la actualidad se ha diseñado un hemodializador de fibra hueca que contiene asparaginasa inmovilizada (19). La tripsina o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel, y también para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Este tipo de enzimas se pueden inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de apósitos y vendas (20).

#### *VII. 3. Aplicaciones en la Industria Farmacéutica*

La Industria Farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa seria a la síntesis química en pasos clave, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Los enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

##### *1) Obtención de antibióticos $\beta$ -lactámicos*

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos, se sintetizan a partir del ácido 6-amino penicilánico (6-APA) y del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA) o el ácido 7-amino desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA). El 6-APA, precursor de las penicilinas semisintéticas (amoxicilina, ampicilina, etc.), se obtiene industrialmente mediante la hidrólisis de la penicilina G catalizada por las penicilina G acilasas

inmovilizadas de *E. coli* o *Bacillus megaterium* (Figura 6).

Se calcula que la producción anual mundial de 6-APA mediante este método fue de 7500 toneladas en 1992 (21). La producción industrial de 7-ACA o 7-ADCA a partir de la cefalosporina C es más

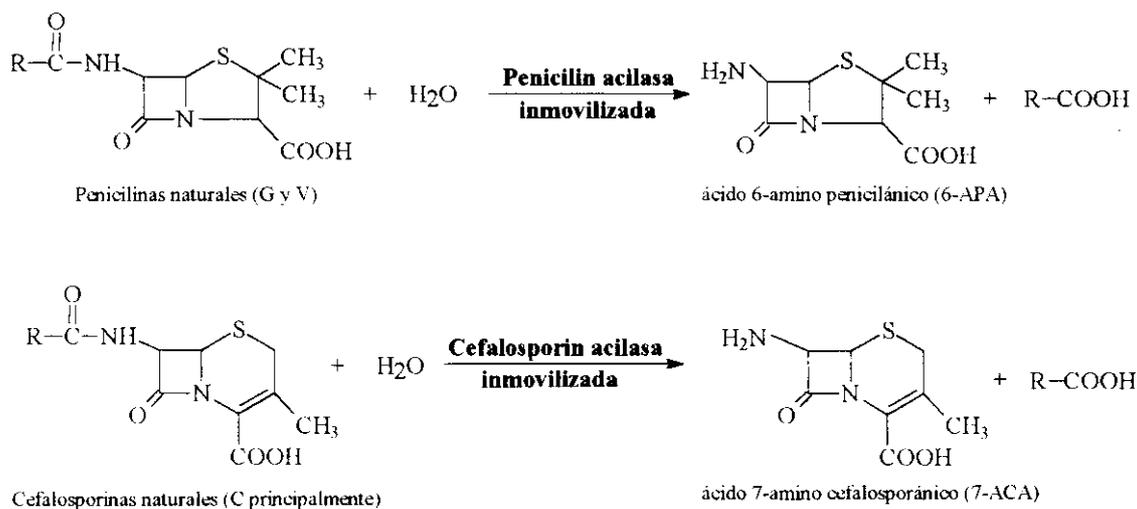


FIGURA 6. Obtención de los precursores de antibióticos semisintéticos mediante enzimas inmovilizadas

compleja, aunque ya se han desarrollado procesos enzimáticos para su producción (22).

### 2) Obtención de fármacos ópticamente puros

La actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependen en gran medida de su estereoquímica (23). Hay muchos ejemplos que ilustran el diferente comportamiento farmacológico de los enantiómeros de una mezcla racémica. En algunos casos, un enantiómero presenta actividad mientras que el otro no tiene efecto farmacológico; uno es tóxico frente al otro que demuestra ser seguro y activo; e incluso hay casos en los que uno es agonista frente al otro que se comporta como antagonista (24). A pesar de todo, la mayoría de estos fármacos se han vendido como mezclas racémicas hasta hace poco al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de enantiómeros. La Industria Farmacéutica ha empezado a superar este último problema introduciendo métodos enzimáticos en la obtención de fármacos ópticamente puros (25). Un ejemplo es el empleo de lipasas microbianas inmovilizadas (26) en la obtención de antiinflamatorios no esteroídicos (Figura 7). El isómero S de estos ácidos (ibuprofeno, naproxeno o ketoprofeno) es el que posee actividad terapéutica, y también se ha obtenido con una gran pureza óptica empleando cristales reticulados de lipasa de *Candida rugosa* (CLEC-CR®) (27).

### VII. 4. Aplicaciones en la Industria Alimentaria

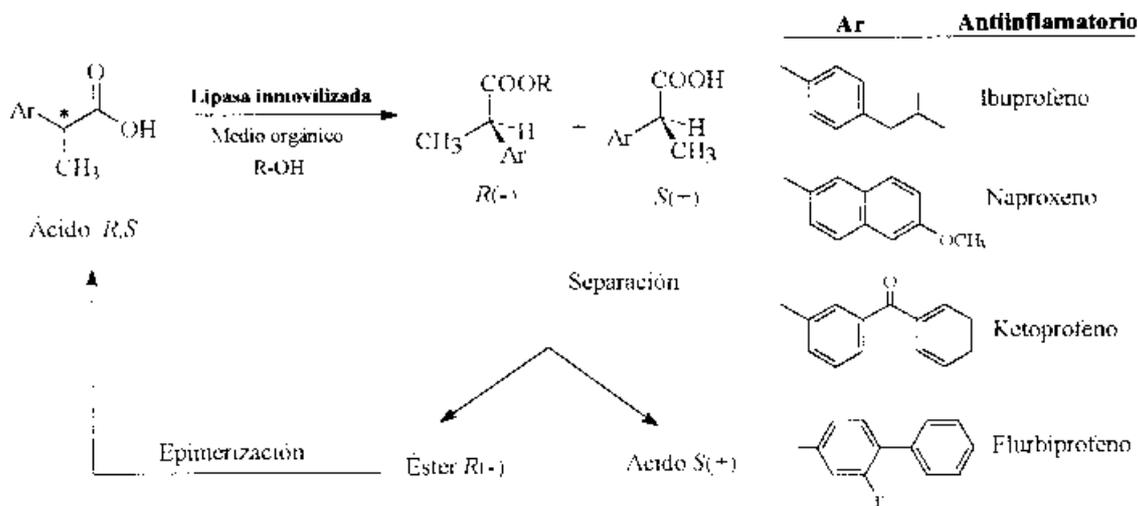


FIGURA 7. Proceso biotecnológico de obtención de antiinflamatorios no esteroídicos ópticamente puros mediante el empleo de lipasas inmovilizadas.

Son muchas las enzimas que se emplean en el procesado, la preparación y la conservación de los alimentos. Normalmente, las enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una vez que el tratamiento ha concluido. En ocasiones se permite que continúe su actividad para que los alimentos desarrollen el aroma y la textura deseados, pero nunca se reutilizan. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas. De todas maneras, existen limitaciones a su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos (28). A continuación se resumen algunas de las aplicaciones conocidas de las enzimas inmovilizadas en la industria alimentaria:

### 1) En la hidrólisis de proteínas:

Las enzimas proteolíticas se emplean en la modificación del contenido proteico de los alimentos. De esta forma se han conseguido hidrolizados de proteínas de trigo mediante el uso de pepsina y proteasa coimmobilizadas en quitosan (21). Otras proteasas inmovilizadas han sido empleadas en la disminución del contenido de lactoglobulina en la leche (29), en la industria quesera y en la solubilización de concentrados proteínicos de pescado.

### 2) En la hidrólisis de hidratos de carbono:

La presencia de lactosa en la leche (4,3-4,5%) y en algunos derivados lácteos es perjudicial para aquellas personas que carecen de lactasa intestinal, y su ingesta provoca diarreas y diversos trastornos intestinales. La eliminación de este azúcar se puede conseguir tratando la leche con  $\beta$ -galactosidasa de levaduras inmovilizada en fibras de acetato de celulosa (30) y es de gran importancia en la preparación de productos lácteos dietéticos. Su eliminación también es interesante en la preparación de helados, ya que la lactosa tiende a cristalizar a temperaturas bajas.

El proceso de degradación del almidón, procedente de diversas fuentes vegetales como el maíz, se realiza mediante la utilización de amilasa, glucoamilasa y glucoisomerasa inmovilizadas (31). De esta manera, se consigue un jarabe enriquecido en fructosa, que sirve de edulcorante en bebidas refrescantes como la Coca-Cola o Pepsi.

La pectinasa se emplea para hidrolizar la pectina, componente estructural de frutas y verduras. Esto permite la obtención de un zumo menos viscoso y más concentrado. La pectinasa se emplea inmovilizada sobre diferentes soportes (PVC, poliéteres, poliacrilamidas, alúmina, etc.) (32).

### 3) En la mejora de las características organolépticas de ciertos alimentos (21).

Así el empleo de células de *Arthobacter globilis* atrapadas en poliacrilamida permite eliminar el

*Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39', 1998

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. Endo-β-glucosidasas inmovilizadas en esferas acrílicas permiten incrementar el aroma de vinos y zumos. Finalmente ciertas lipasas y proteasas encapsuladas se están aplicando en la maduración de quesos (33).

4) *En la obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios (21):*

En la obtención industrial del ácido L-málico interviene la fumarasa de *Brevibacterium flavum* atrapada en k-carragenato. Este es un aditivo importante para zumos de frutas, refrescos, mermeladas y dulces. También, las enzimas inmovilizadas permiten la obtención industrial de edulcorantes alimentarios como el aspartamo, fructooligosacáridos, diversos dipéptidos, etc.

5) *Otras aplicaciones:*

Las lipasas inmovilizadas de diversos microorganismos se han empleado en la interesterificación de aceites y grasas. Este método permite transformar el aceite de palma en un sucedaneo de la manteca de coco, componente principal del chocolate (34). El chocolate contiene aproximadamente un 30% de manteca de coco, por lo que este proceso es potencialmente muy interesante en la industria. Mediante el empleo de la lipasa inmovilizada adecuada, se puede sustituir el ácido palmítico de las posiciones 1 y 3 del aceite de palma por ácido esteárico (Figura 8).

VII. 5. *Aplicaciones en la Industria Química*

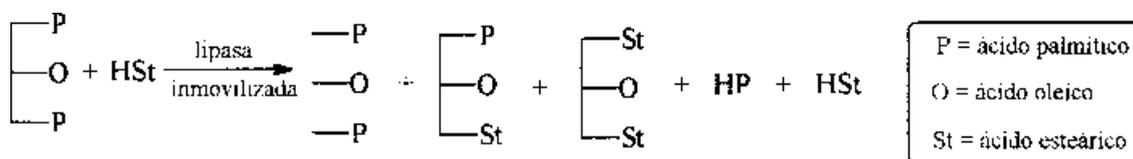


FIGURA 8. Transformación del aceite de palma en manteca de coco.

Un ejemplo lo protagoniza la obtención industrial de acrilamida, compuesto ampliamente utilizado en la preparación de diferentes polímeros, aditivos y en el tratamiento del petróleo. Para ello se emplean células de *R. rhodochrous* inmovilizadas en un gel de poliacrilamida. Este microorganismo es rico en nitrilo hidratasa (35), una enzima que es capaz de convertir el acrilonitrilo en acrilamida (Figura 9).

La obtención de productos de alto valor añadido es también un campo importante para la síntesis catalizada por enzimas inmovilizadas. Como ejemplos podríamos citar la síntesis de péptidos, fragancias e insecticidas.

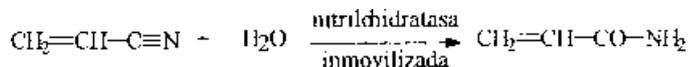


FIGURA 9. Obtención biotecnológica de la acrilamida.

VII. 6. *Tratamientos de aguas residuales*

Recientemente, se ha desarrollado un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas (36). El benceno es otro compuesto muy tóxico que puede ser degradado mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poliacrilamida (37).

**BIBLIOGRAFÍA:**

(1) Wingard, L.B. (1972) Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.

- (2) Taylor, R.F. (1991) Protein Immobilization: fundamentals and applications, Marcel Dekker, New York.
- (3) Hartmeier, W. (1985) Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 149-153.
- (4) Martinek, K.; Mozhaev, V.V. (1987) Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Adv. Enzymol.* **57**: 179-249.
- (5) Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. (1983) Solid Phase Biochemistry. Schouten, W.H. (ed.) Wiley Pub., New York.
- (6) Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. (1985) Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press, pág. 49-54.
- (7) Wong, S.S.; Wong, L.J.C. (1992) Chemical cross-linking for the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 866-874.
- (8) Margolin, A.L. (1996) Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.* **14**: 223-230.
- (9) Klibanov, A.M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* **219**: 722-727.
- (10) Klibanov, A.M.; Kaplan, N.O.; Kamen, M.D. (1978) A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: application to a clostridial hydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**: 3640-3643.
- (11) Reslow, M. Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1988) On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-proof reaction media. *Eur. J. Biochem.* **172**: 573-578.
- (12) Goldstein, L. (1976) Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol.* **44**: 397-443.
- (13) Hornby, W.E.; Lilley, M.D.; Crook, E.M. (1968) Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochem. J.* **107**: 669-674.
- (14) Berezin, I.V.; Klibanov, A.M.; Martinek, K. (1975) Kinetic-thermodynamic aspects of catalysis by immobilized enzymes. *Russ. Chem. Rev.* **44**: 17-47.
- (15) Katchalski, E.; Silman, I.; Goldman, R. (1971) Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. *Adv. Enzymol.* **34**: 445-536.
- (16) Working Party on Immobilized Biocatalysts (1983) Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 304-307.
- (17) Griffiths, D.; Hall, G. (1993) Biosensors: what real progress is being made? *Trends Biotechnol.* **11**: 122-130.
- (18) Scouten, W.H.; Luong, J.H.T.; Brown, R.S. (1995) Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends Biotechnol.* **13**: 178-185.
- (19) Callegaro, L.; Denti, E. (1983) Applications of bioreactors in medicine. *Int. J. Artif. Organs* **6**: 107-110.
- (20) Vlasov, L.G.; Tlstykh, P.I.; Ignatiuk, T.E. Razzakok, O.N. (1988) Preparation of lysozyme immobilized in textile carriers and its use in treating suppurative wounds. *Antibiot. Khimioter.* **33**: 304-307.
- (21) Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* **11**: 471-478.
- (22) Abbot, B.J. (1976) Preparation of pharmaceutical compounds by immobilized enzymes and cells. *Adv. Appl. Microbiol.* **20**: 203-257.
- (23) Ariens, E.J. (1984) Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **26**: 663-668.
- (24) Ariens, E.J. (1989) Stereoselectivity in the action of drugs. *Pharmacol. Toxicol.* **37**: 319-320.
- (25) Margolin, A.L. (1993) Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 266-280.
- (26) Arroyo, M.; Sinisterra, J.V. (1994) High enantioselective esterification of 2-aryl propionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. *J. Org. Chem.* **59**: 4410-4417.
- (27) Lalonde, J.J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martínez, A.G.; Visuri, K.; Margolin, A.L. (1995) Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 6845-6852.
- (28) Roland, J.F. (1980) Requirements unique to the food and beverage industry en Pitcher, W.H. et al. (eds.) *Immobilized enzymes for food processing*, CRC Press, Boca Raton, pp. 55-80.
- (29) Vuilleumard, J.C.; Goulet, J.; Amiot, J.; Vijayalakshmi, M.A. (1988) Continuous production of small peptides from milk proteins by extracellular proteases of free and immobilized *Serratia marcescens* cells. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 2-8.
- (30) Honda, Y.; Kako, M.; Abiko, K.; Sogo, Y. (1993) *Industrial Application of immobilized enzymes*, Tanaka, A. et al. eds. Marcel Dekker, pág. 209-234.
- (31) Germain, P.; Crichton, R. (1988) Characterization of a chemically modified  $\alpha$ -amilase immobilized on porous silica. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **41**: 297-315.
- (32) Piffer, P.G.; Spagna, G.; Bustetto, L. (1987) Immobilization of endo-polygalacturonase on  $\gamma$ -alumina for the treatment of fruit juices. *J. Mol. Catal.* **42**: 137-149.
- (33) Magee, E.L.; Olson, N.F.; Linslay, R.C. (1981) Microencapsulation of cheese ripening systems: production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell free extract. *J. Dairy Sci.* **64**: 616-621.
- (34) Posorke, L.H.; Lefebvre, G.K.; Miller, C.A.; Hansen, T.T.; Glenvig, B.L. (1988) Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 922-926.
- (35) Nagasawa, T.; Yamada, H. (1989) Microbial transformations of nitriles. *Trends Biotechnol.* **7**: 153-158.
- (36) Mellor, R.B.; Ronnenberg, J.; Campbell, W.M.; Diekmann, S. (1992) Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature* **355**: 717-719.
- (37) Chibata, I.; Tosa, T. (1980) Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.* **5**: 88-90.

