



Programa de la asignatura:

Ingeniería de biorreactores II

U2

Reactores enzimáticos



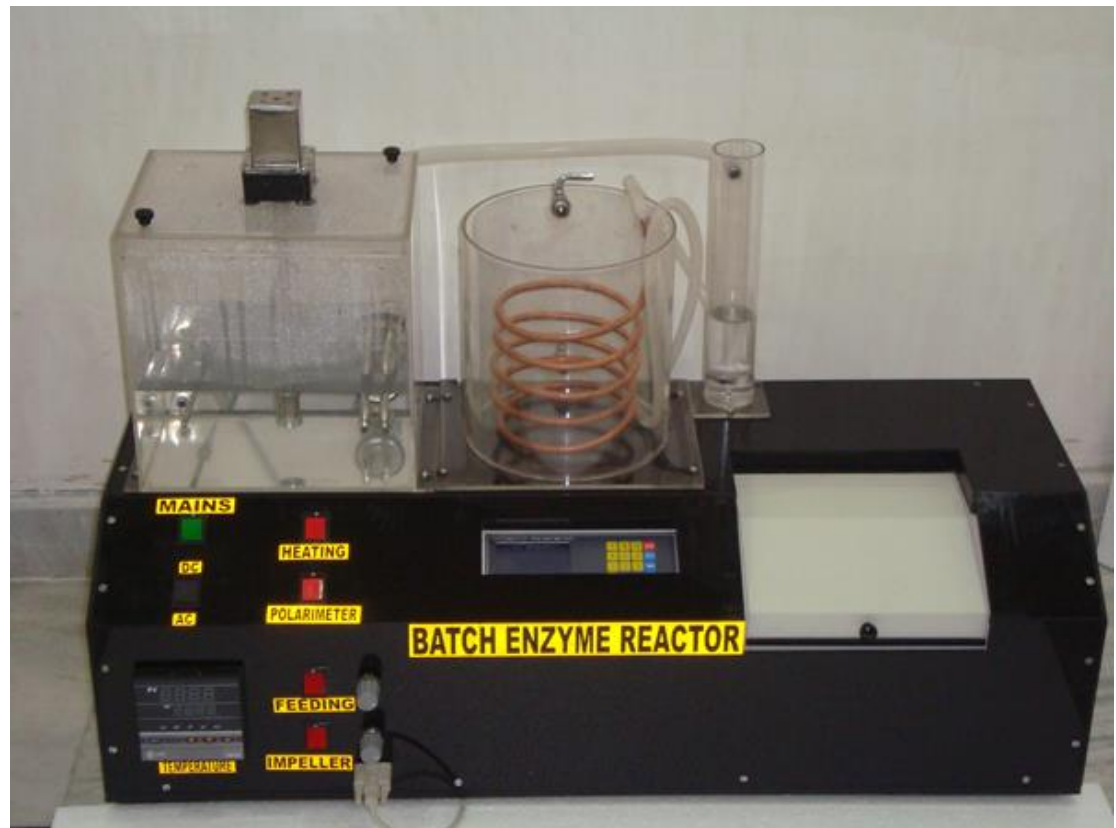
DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Reactores enzimáticos



Reactor enzimático. Tomado de:
<http://www.aiishil.com/laboratory-equipments.html>



Índice

.....	1
Índice	3
Presentación.....	4
Propósitos de la unidad.....	5
Competencia específica a desarrollar	6
2.1 Inmovilización enzimática	8
2.1.1 Características de los reactores enzimáticos.....	10
2.1.2 Ventajas e inconvenientes de la inmovilización enzimática	12
2.2 Métodos de inmovilización enzimática	16
2.2.1 Retención física	17
2.2.2 Unión química	22
2.3 Aplicaciones y efectos de la inmovilización enzimática	24
2.3.1 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.....	24
2.3.2 Elección del método de inmovilización.....	25
2.3.3 Efectos en la estabilidad y en la actividad enzimática.....	27
2.4. Biorreactores enzimáticos.....	30
2.4.1 Biorreactores homogéneos.....	30
2.4.2 Biorreactores heterogéneos.....	31
Cierre de la unidad.....	32
Para saber más	33
Fuentes de consulta.....	35



Presentación

Ahora en esta segunda unidad nos adentraremos en los fenómenos que se suceden en los biorreactores enzimáticos, como hemos revisado el modelado de los bioprocesos es una tarea muy compleja debido a que las reacciones biológicas son influenciadas por el ambiente químico (tales como los niveles de concentración de nutrientes y productos) y por las condiciones físicas del proceso. El metabolismo y los mecanismos de regulación de muchos de estos sistemas biológicos aún no son totalmente comprendidos, por lo cual las descripciones matemáticas de los mismos deben ser simplificadas sin que se pierda información y que permitan el desarrollo de modelos adecuados para la simulación, diseño y optimización de los bioprocesos.



Propósitos de la unidad



- 1 Identificar las características de los reactores enzimáticos
- 2 Diferenciar los métodos de inmovilización enzimática.
- 3 Distinguir los biorreactores homogéneos y heterogéneos



Competencia específica a desarrollar



Distinguir los biorreactores homogéneos y heterogéneos, para identificar la velocidad en que las enzimas afectan al producto industrial, mediante la revisión de los métodos de inmovilización enzimática



Ruta de aprendizaje: ¿Qué debo aprender en esta unidad ?

Unidad 2: Reactores enzimáticos

#1

Reconocer las principales características de los biorreactores enzimáticos.

#2

Identificar los modelos de inmovilización enzimática.

#4

Analizar las aplicaciones y efectos de la inmovilización enzimática.

#3

Describir las ventajas y desventajas de la inmovilización enzimática.

#5

Identificar los diferentes tipos de biorreactores enzimáticos.



powered by





2.1 Inmovilización enzimática

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.

Inmovilización enzimática

Método que permite limitar la movilidad de una enzima en un medio, debido a que se encuentra unida a un soporte (Montes, 2006).

Enlaces

Considera que durante la asignatura de Ingeniería de Biorreactores I, se realizó la revisión del proceso de inmovilización enzimática, así como los diferentes tipos que pueden ser utilizados para este fin.

Para comprender este proceso el análisis de un caso relacionado con la inmovilización enzimática que puedes observar en tu vida cotidiana. Este ejemplo, es la hidrólisis de proteínas, en esta 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 coinmovilizadas en chitosan. Otras proteasas inmovilizadas han sido empleadas en la disminución del contenido de



lactoglobulina en la leche, en la industria quesera y en la solubilización de concentrados proteínicos de pescado.

Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis proteolítica no es una sola reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos. Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/ o de adultos enfermos. (Guadix *et al.*, 2000)

Chitosan o quitosan

El Quitosano o Quitosana es un biopolímero natural que se obtiene de la Quitina por métodos químicos, electroquímicos o enzimáticos. Químicamente es una Poli(D-glucosamina), por ello se considera un polisacárido Biodegradable. El tamaño molecular depende de la especie y de la edad de los individuos dado que se obtienen desde un polímero biosintético. (Quitoquímica, 2016)

Durante esta unidad se analizará la importancia de la inmovilización enzimática, sus ventajas y desventajas, así como su utilización en los biorreactores con enzimas inmovilizadas.

Biorreactores enzimáticos

Son los depósitos y las instalaciones donde se realizan las transformaciones deseadas mediante reacciones catalizadas enzimáticamente (Castillo, 2005)



2.1.1 Características de los reactores enzimáticos

Ahora realizaremos una revisión general de los reactores enzimáticos, estos presentan un diseño que permite que se lleven a cabo procesos catalizados por enzimas, el cual se fundamenta en el diseño tradicional de reactores para procesos químicos con catalizadores heterogéneos. Muchos procesos de producción de sustancias de interés alimentario, clínico o industrial o de biodegradación de contaminantes y depuración de residuos utilizan enzimas específicas, ya sean libres o inmovilizadas, (Castillo, 2005).

Por ejemplo, los reactores enzimáticos pueden operar en lotes durante un proceso discontinuo o también funcionar en **procesos de flujo continuo**, en este último caso se distinguen dos variantes extremas: el **reactor de tanque agitado continuo (RTAC)** y el **reactor de flujo pistón (RFP)**.

Enlaces

Considera que durante la asignatura de Ingeniería de Biorreactores I, se realizó la revisión de diferentes tipos de biorreactores, considerando su estructura y los modelos aplicables a los procesos que se llevan a cabo en estos, así como la revisión del concepto de enzima y los procesos de inmovilización.

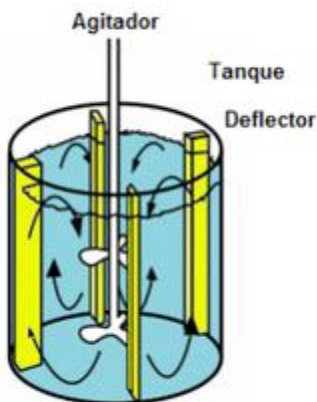


Figura 2. Reactor de tanque agitado continuo (RTAC).

Tomado de:
http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612008000200005&lng=es&nrm=



Existen diversos tipos de reactores (Figura 3) cuya utilidad depende de los procesos considerados, los costes de instalación y funcionamiento, el tipo de enzima utilizada, su forma de presentación (libre o inmovilizada) y de los factores ambientales como el pH, la temperatura, el aporte de oxígeno, entre otros (Castillo, 2005).



Figura 3. Reactores que emplean enzimas inmovilizadas.

Los **reactores de tanque agitado y alimentación continua continuos (flujo continuo)**, trabajan en condiciones isotérmicas y en ausencia de efectos de partición; mientras que en los **reactores de flujo pistón** las enzimas se hayan inmovilizadas en la columna empacada.

Los **reactores de alimentación continua (flujo continuo)** suelen utilizarse con enzimas inmovilizadas, que pueden estar empaquetadas en una fase sólida (*packed bed flow reactor*) o mantenerse en un estado fluido



(*fluidised bed flow reactor*) y son empleados en procesos a gran escala, ya que son productivos y económicos en su funcionamiento, las pérdidas de enzima son menores, la producción es continua y no hay necesidad de vaciarlos y rellenarlos periódicamente.

Todos los reactores mencionados anteriormente pueden contener dispositivos de agitación o de enfriamiento o calentamiento para aumentar la eficiencia de los procesos enzimáticos que tienen lugar en ellos (Castillo, 2005).

2.1.2 Ventajas e inconvenientes de la inmovilización enzimática

Las **enzimas** son los biocatalizadores por excelencia. Poseen propiedades que convierten los procesos enzimáticos en excelentes competidores de los catalizadores químicos tradicionales (Figura 4).



Figura 4. Principales propiedades de las enzimas (Montes, 2006; López, 2006).

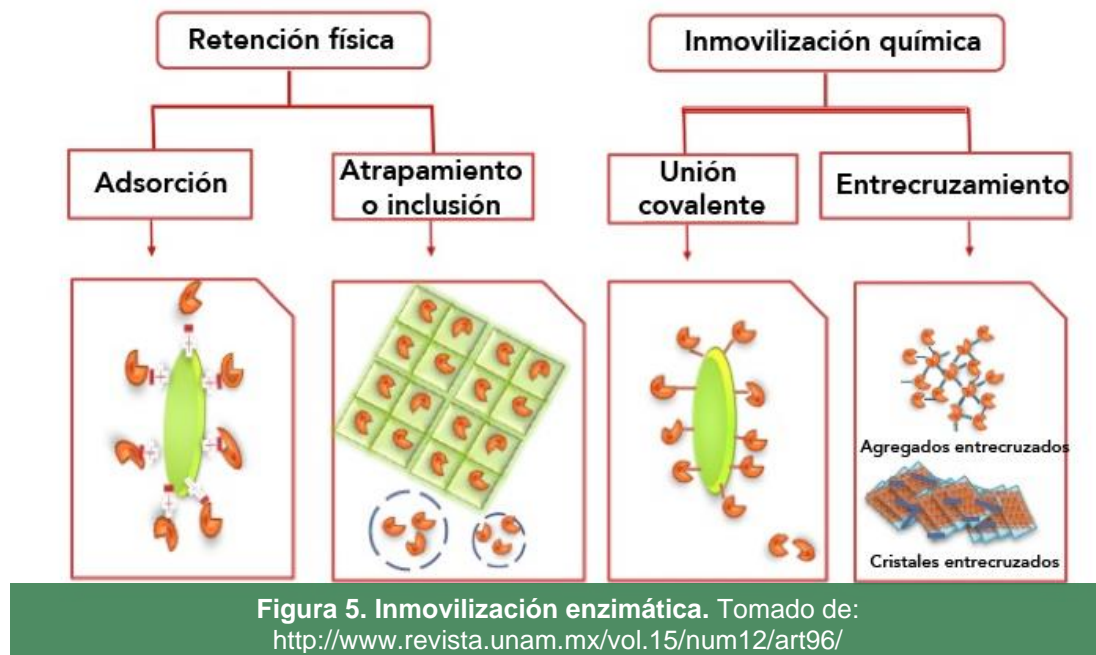
Enlaces

Recuerda que ya has revisado el concepto y los tipos de enzimas en las asignaturas de Bioquímica e Ingeniería de Biorreactores I, donde te introdujiste al estudio de las proteínas y su función, así como el papel que tienen en los procesos biotecnológicos. Asimismo, realizaste una revisión de los diferentes tipos de enzimas, de su cinética, sus modelos y su utilización en diversos campos industriales.

En la actualidad se conocen más de 2000 enzimas, pero a pesar de las excelentes propiedades catalíticas que presentan, se explotan solamente unas 400 y en su mayoría se trata de enzimas extracelulares y de origen



microbiano. Esto es debido a que las enzimas se han optimizado a lo largo de la evolución en función de su papel fisiológico y no en función de las necesidades de la industria. Por ello, muchas enzimas no son suficientemente estables bajo las condiciones de reacción deseadas; la agitación mecánica, los disolventes, las altas temperaturas, pH extremos, la necesidad de cofactores así como su inhibición por elevadas concentraciones de sustratos y productos, provocan la pérdida de su actividad y selectividad óptimas. El papel de la **biotecnología** tiene como objetivo superar todos aquellos inconvenientes que impidan la aplicación de las enzimas en los procesos industriales. Esto puede resolverse por medio de la **inmovilización** de la enzima (Figura 5) como paso previo a su aplicación industrial (Montes, 2006).



Cuando una enzima tiene interés industrial para una determinada reacción, su aplicación está normalmente limitada por la falta de estabilidad operacional en las condiciones del proceso y por la dificultad de recuperar y reciclar el biocatalizador (Montes, 2006).



Una vez la enzima está **inmovilizada** pasa de ser un catalizador soluble a presentar las siguientes ventajas y desventajas (Tabla 1) como **catalizador heterogéneo** (Arroyo, 1998; Montes, 2006):

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la inmovilización enzimática (Arroyo, 1998; Montes, 2006)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Reutilización o uso continuado, por lo que disminuyen los costes del proceso. • Posibilidad de modular las propiedades catalíticas. • Fácil separación de la mezcla de reacción • Prevención de la contaminación del producto con proteínas. • Prevención de una contaminación microbiana. • Posible estabilización de la estructura tridimensional de la enzima. • La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control. • El uso de reactores con enzimas inmovilizadas permite el reciclado. • El uso de reactores con inmovilización enzimática permite el empleo de cargas elevadas de enzima. 	<ul style="list-style-type: none"> • La alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo. • La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte. • Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización. • El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.



Por tanto, ante un proceso de inmovilización, los parámetros cinéticos K_m y V_{max} cambian en relación a la enzima libre, ya que influyen los efectos estéricos y los fenómenos disfuncionales.

Enlaces

El significado de las constantes cinéticas ya los revisaste en la asignatura de Ingeniería de Biorreactores I, el tema *Teoría de la catálisis enzimática*.

Las propiedades de los derivados enzimáticos (enzima inmovilizada) están determinadas tanto por las características de la enzima y por las del soporte sobre el que se inmoviliza. La interacción entre ambos dará lugar a un derivado enzimático con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas específicas (Montes, 2006).

La velocidad y el rendimiento de la inmovilización dependen de distintos parámetros, entre los que se encuentran: el tipo de soporte, el método elegido de inmovilización, la concentración de enzima y de grupos reactivos en el soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Montes, 2006).

2.2 Métodos de inmovilización enzimática

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 en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (Arroyo, 1998).

A pesar de ello, 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 (Arroyo, 1998). Con la inmovilización de las enzimas se



han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable (Arroyo, 1998).

Existe una gran cantidad de métodos para inmovilizar enzimas, de manera general, se clasifican en dos grandes grupos: los métodos de **retención física** y los **de unión química**.

A través del desarrollo de los contenidos del siguiente tema revisarás de manera más detallada los métodos de inmovilización enzimática (Figura 6). Se estudiarán los siguientes tópicos:

- Métodos de inmovilización por retención física.
- Métodos de inmovilización por unión química.

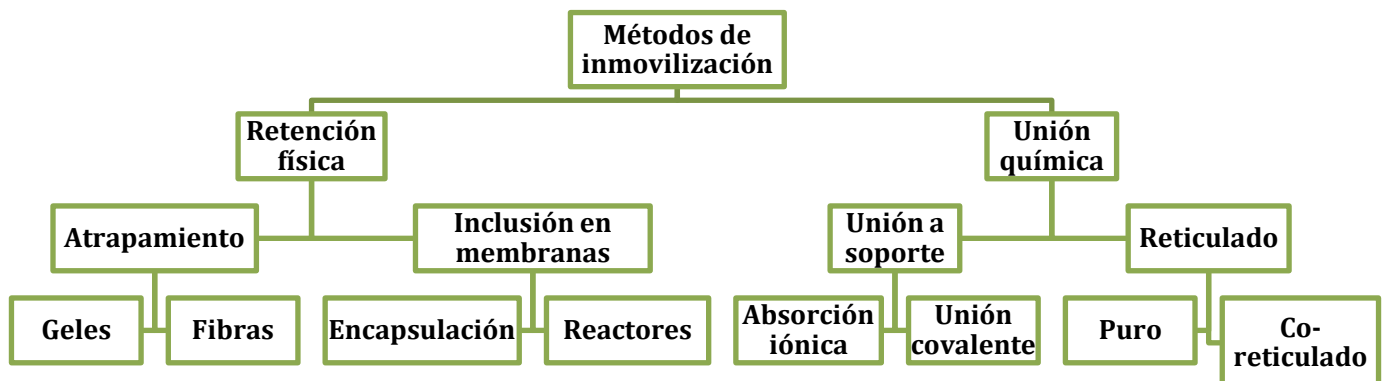


Figura 6. Métodos de inmovilización enzimática.

2.2.1 Retención física

Hace algún tiempo, se publicó un proyecto que consistía en la microencapsulación de enzimas en liposomas (Delgadillo, 2006). En dicho documento se expone que la principal propiedad de estas “cápsulas” radica en su capacidad para atrapar tanto compuestos polares como no



polares. Esto se debe, a que se forman a partir de moléculas anfipáticas (generalmente fosfolípidos), es decir, que tienen una región polar (cabeza hidrofílica) y una no polar (cola hidrofóbica).

Liposomas

Los liposomas son vesículas huecas que encapsulan parte del disolvente en el que se han preparado y cuya membrana está formada por una o varias bicapas lipídicas generalmente de fosfolípidos (depa.fquim.unam.mx, 2016).

Cuando dichas moléculas entran en contacto con el agua, las cabezas hidrofílicas son atraídas por esta, y las colas hidrofóbicas la rechazan, por lo que, tienden a juntarse, dando lugar a una bicapa lipídica, de modo que pueden ordenarse para formar esferas bicapa concéntricas que envuelven por completo la región interna acuosa, lo que da lugar a los liposomas.

Función estructural

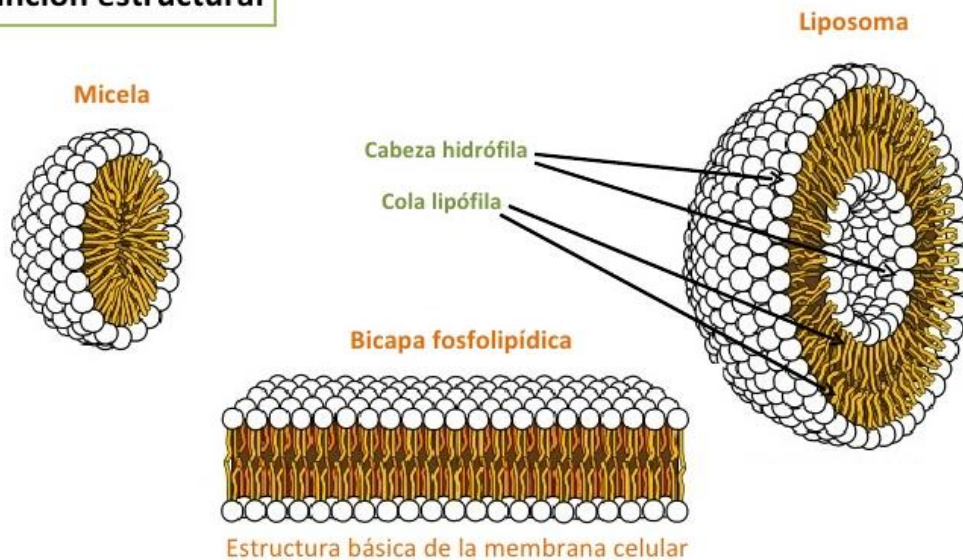


Figura 7. Representación de un liposoma. Tomado de: <http://es.slideshare.net/juanbuendia/tema-1c-presentation>



Los liposomas se clasifican según su tamaño en pequeños y grandes. Por el número de bicapas en uni, oligo o multilaminares, se pueden dividir en 4 categorías (Figuras 8 y 9).

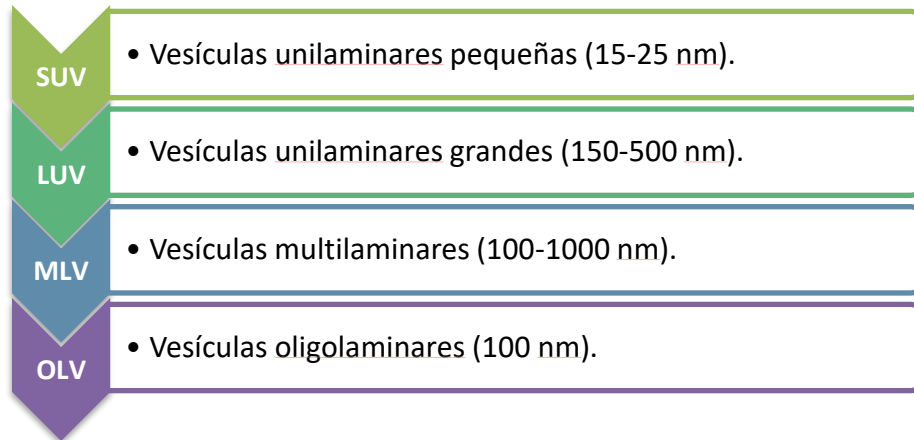


Figura 8. Categorías en que se dividen los liposomas de acuerdo al número de capas que presentan.

Los liposomas se pueden producir por el método de deshidratación-rehidratación (DRV), de acuerdo a la siguiente metodología (Delgadillo, 2006):



Método de deshidratación-rehidratación

1. Se elige la relación molar de los constituyentes (fosfatidilcolina y colesterol) de la cápsula, es decir, los materiales de que estará hecha y la cantidad de cada uno de ellos.
2. La mezcla de los lípidos se disuelve en cloroformo.
3. Una vez incorporados, se elimina el disolvente a través de un rotavapor a presión reducida y a 35°C.
4. La capa resultante se rehidrata con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.0, el cual debe contener 4% de sacarosa como agente crioconservador.
5. Las vesículas multilaminares formadas se someten a un proceso de ruptura a través de un sonicador de sonda a 150 W en un baño de hielo.
6. Se centrifuga a 1000 rpm durante 30 min a 4°C para eliminar los agregados lipídicos grandes y las partículas de titanio provenientes de la sonda.
7. A la dispersión de vesículas unilaminares pequeñas formada, se le adiciona una solución que contenga una enzima.
8. La mezcla se liofiliza durante 12 horas y se rehidrata con 5 mL de buffer.
9. Los liposomas formados se purifican dos veces por ultracentrifugación a 250,000 rpm por 2 horas a 10°C.

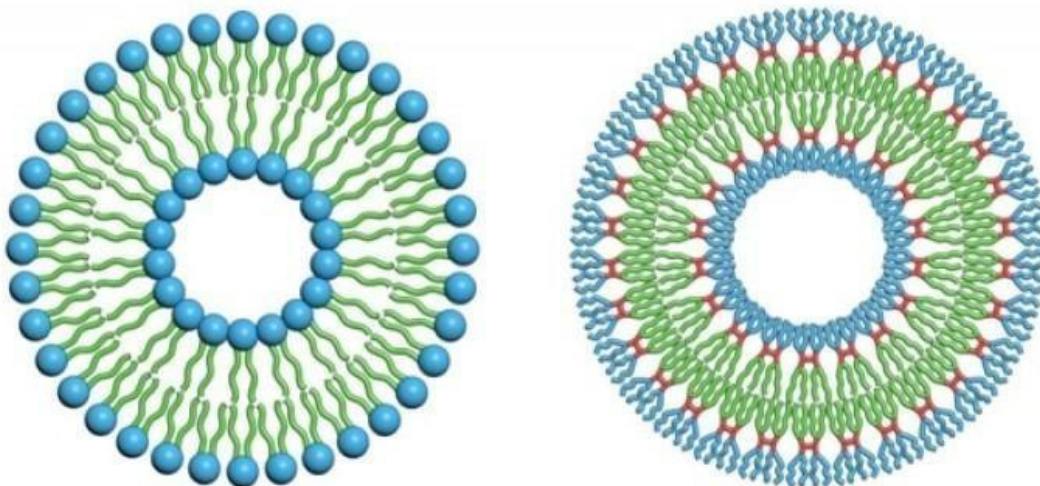


Figura 9. Representación de las posibles estructuras de los liposomas unilaminares y multilaminares. Tomado de:
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/1036/1/TFM-M%201.pdf>



Con este tipo de procedimientos se inmovilizan enzimas como la β -galactosidasa, con la finalidad de agregarla microencapsulada a la leche que toman las personas intolerantes a la lactosa. Ya que, dentro del estómago, los liposomas son destruidos por acción de los fluidos gástricos, con la consecuente liberación de la enzima, que actúa inmediatamente sobre la lactosa, produciéndose su hidrólisis; evitando así, las molestias generadas por este padecimiento.

Después de la inmovilización, se mide la actividad de la enzima libre y microencapsulada, para saber si el proceso de inmovilización afecta su actividad (Figura 10).

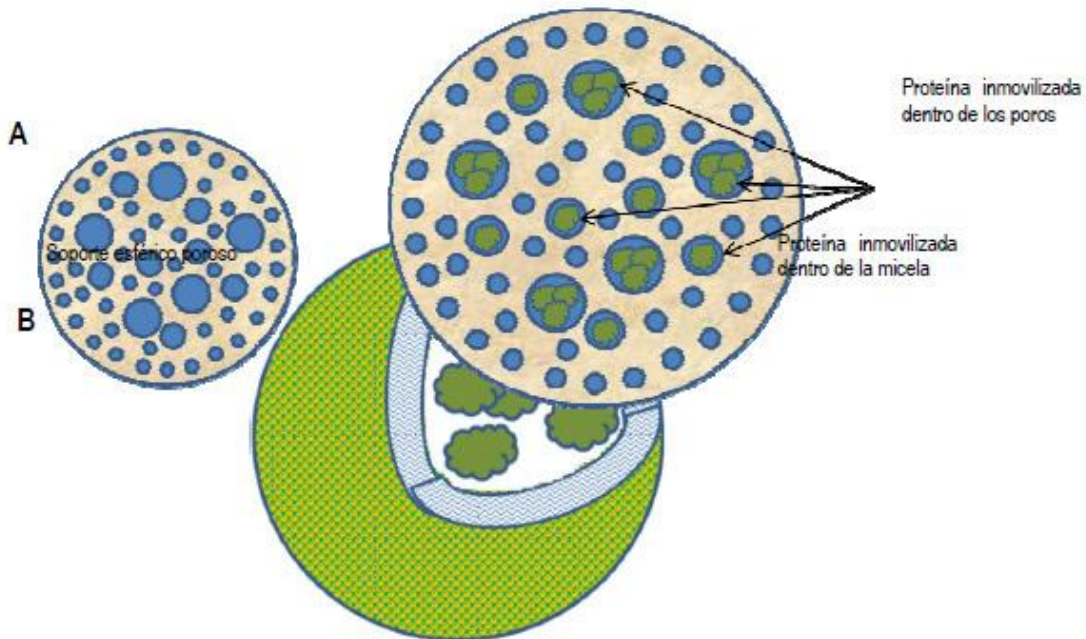


Figura 10. Enzimas inmovilizadas por encapsulación.
A) microencapsulación dentro de esferas porosas. B) Microemulsión en micelas.
Tomado de: Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011.

Además de la microencapsulación, existen otros métodos de inmovilización por retención física, tales como:

Método de atrapamiento en geles: la enzima queda atrapada físicamente en el seno del gel, mediante un proceso de polimerización. A través de este



método, la enzima no sufre alteraciones en su estructura. Se requiere de un control riguroso de las condiciones de polimerización y el empleo de monómeros que no alteren la composición o el sitio activo de la enzima.

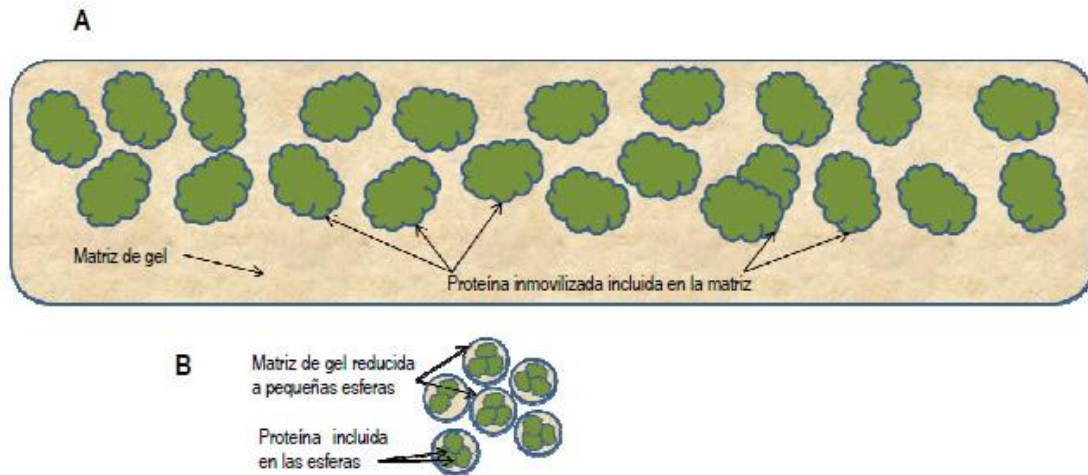


Figura 11. Enzimas inmovilizadas por inclusión dentro de una matriz de gel. A) gel húmedo. B) esferas del gel seco y triturado. Tomado de: Fajardo-Ochoa *et al.*, 2011.

Método de atrapamiento en fibras: la enzima queda atrapada en las cavidades de una fibra sintética. A través de este método, la enzima no sufre alteraciones en su estructura. Se requiere de un control riguroso de las condiciones de atrapamiento y el empleo de fibras que no alteren la composición o el sitio activo de la enzima.

Microencapsulación: la enzima queda absorbida en vesículas semipermeables, que permiten el paso del sustrato y del producto, formadas generalmente por fosfolípidos.

Reactores de membrana: estos dispositivos utilizan membranas permeables al producto final (permiten su salida), pero impermeables a la enzima, de tal manera que es retenida en un área específica del reactor.

2.2.2 Unión química

Los métodos de inmovilización de enzimas por unión química se clasifican en dos tipos: **unión a soportes** y **reticulado (entrecruzamiento)**.



Unión a soportes mediante absorción iónica: la enzima se une a un soporte no funcionalizado mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals o por puentes de hidrógeno.

Esta unión dependerá del pH del medio, de la fuerza iónica y de la presencia, en la enzima, de cofactores iónicos. A pesar de que el empleo de esta técnica no origina cambios en la especificidad de la enzima, presenta una unión débil al soporte.

Unión a soportes mediante enlace covalente: esta técnica se basa en la activación de los grupos químicos del soporte que pueden reaccionar con grupos nucleófilos de la enzima. A pesar de tener diversas ventajas, el proceso de inmovilización por este método, podría alterar la estructura del centro activo, perdiendo o nulificando la actividad enzimática.

Reticulado puro, entrecruzamiento o cross-linking: este método genera enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Se emplean reactivos bifuncionales activados con carbodiinida.

Co-reticulado: en este método se emplean proteínas sin actividad enzimática y ricas en residuos de lisina, para generar el entrecruzamiento de las enzimas.

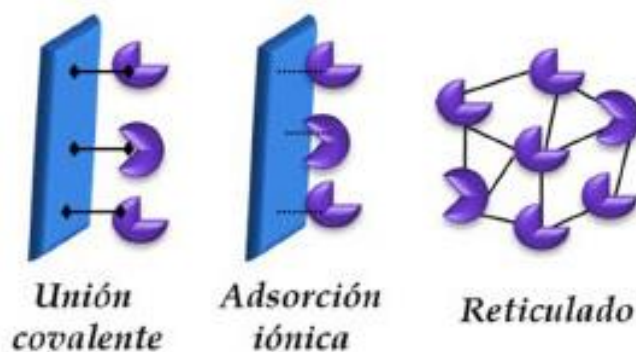


Figura 12. Métodos de inmovilización enzimática: Unión química. Tomado de: Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014.

Al finalizar este tema se han revisado de forma más amplia los diferentes métodos de inmovilización tanto física como química, así como las ventajas y desventajas de estos procesos, elementos que son básicos para



comprender el siguiente tema donde se analizará la aplicación de las enzimas inmovilizadas.

2.3 Aplicaciones y efectos de la inmovilización enzimática

2.3.1 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Ahora existen numerosas aplicaciones de las enzimas inmovilizadas, gracias a que esta tecnología permite el aumento de la estabilidad de la enzima, la reutilización del derivado y el reciclado de las enzimas, por lo que disminuyen los costes del proceso y el diseño de reactores enzimáticos es de fácil manejo, control y con cargas elevadas de enzima.

Este tipo de biorreactores pueden utilizarse en diversos campos industriales como son:

- a) La **industria farmacéutica**, para la obtención de antibióticos, de fármacos ópticamente puros y de vacunas.
- b) La **industria alimentaria**, para la hidrólisis de proteínas, carbohidratos, en la mejora de las características organolépticas de ciertos alimentos y en la obtención de edulcorantes y aditivos alimenticios.
- c) En el **tratamiento de aguas** residuales.
- d) En la **industria química**.

Después de que una enzima ha sido inmovilizada, se debe investigar si dicho proceso genera alguna alteración sobre la actividad enzimática. Entre los parámetros a monitorear para identificar los cambios (Figura 13), tanto en la enzima libre como microencapsulada, se encuentran (Delgadillo, 2005):

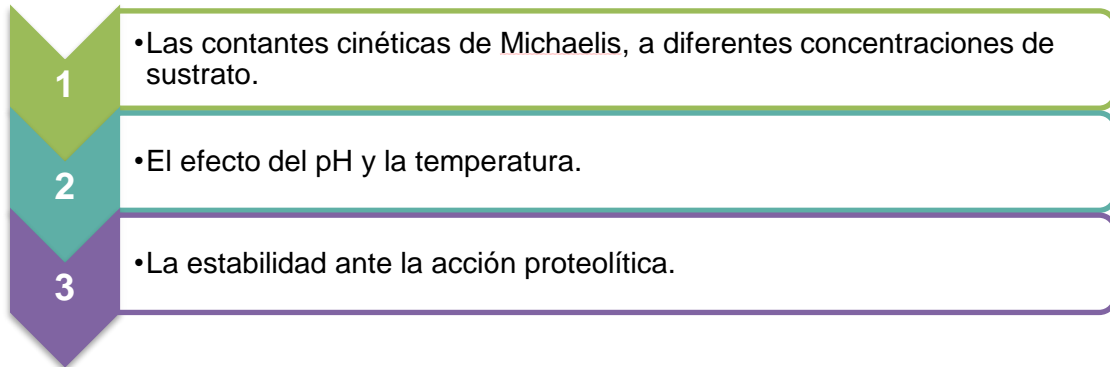


Figura 13. Parámetros a monitorear, tanto en la enzima libre como microencapsulada.

Asimismo, para enzimas inmovilizadas en liposomas, se ha observado que presentan algunas propias del proceso como son:

1. Las enzimas microencapsuladas tienen menos afinidad al sustrato que las enzimas libres, debido a los cambios químicos y conformacionales a causa de su asociación con los lípidos de la vesícula en el momento de realizar la inmovilización.
2. La microencapsulación afecta el pH óptimo de la enzima, desplazándolo hacia valores superiores o inferiores, debido a los cambios en la composición química.
3. La estabilidad térmica de la enzima microencapsulada se ve beneficiada, ya que se necesitan de mayores temperaturas para lograr la desnaturalización de la misma.
4. La encapsulación en liposomas es un método efectivo para la protección biocatalítica de la inactivación por enzimas proteolíticas.

Al final de este tema se ha hecho una revisión de los campos de aplicación de las enzimas inmovilizadas, los parámetros que mayor incidencia tienen sobre la enzima posteriormente a su inmovilización. Esta información te será de ayuda para poder discriminar los diferentes métodos y poder elegir apropiadamente el método de inmovilización que se ajuste mejor para tus objetivos.

2.3.2 Elección del método de inmovilización



Actualmente se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, no obstante, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas en todos los casos. Sin embargo, gracias a la información disponible, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción del biocatalizador, el tipo de reactor que se va a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores (Tabla 2). Es importante reconocer que los métodos de preparación compleja 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 (Arroyo, 1998).

Tabla 2. Comparación de los diferentes métodos de inmovilización (Arroyo, 1998)

Método	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 de soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste del 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



Podemos resumir en la siguiente figura, la caracterización de un derivado inmovilizado que de acuerdo con Arroyo (1998) incluye:



Figura 14. Propiedades caracterización de un derivado inmovilizado.

Este tema te brindó una síntesis de las características de las enzimas inmovilizadas, así como las diferentes características que se presentan en un derivado inmovilizado.

2.3.3 Efectos en la estabilidad y en la actividad enzimática

En este nuevo tema revisaremos como la actividad enzimática se ve influenciada por diversos factores, tales como: el pH, la temperatura y la



concentración de sustrato. En el caso particular de la inmovilización, podrían presentarse alteraciones en la estabilidad de la enzima. Es posible que se presenten cambios conformacionales, que haya desactivación por la unión del sitio activo con algún grupo del soporte o bien, que la orientación de la molécula de enzima unida al soporte pueda impedir el acceso de sustrato al sitio activo, o la liberación del producto. 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 (Alfaro, 2012).

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 (Arroyo, 1998; Alfaro, 2012).

- a) Las resistencias difusionales externas: Aparecen en enzimas inmovilizadas en soportes insolubles en el medio de reacción; en estos casos, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte (Figura 15). 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) Las resistencias difusionales internas: Son debidas a la dificultad de los sustratos para atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada (Figura 15).

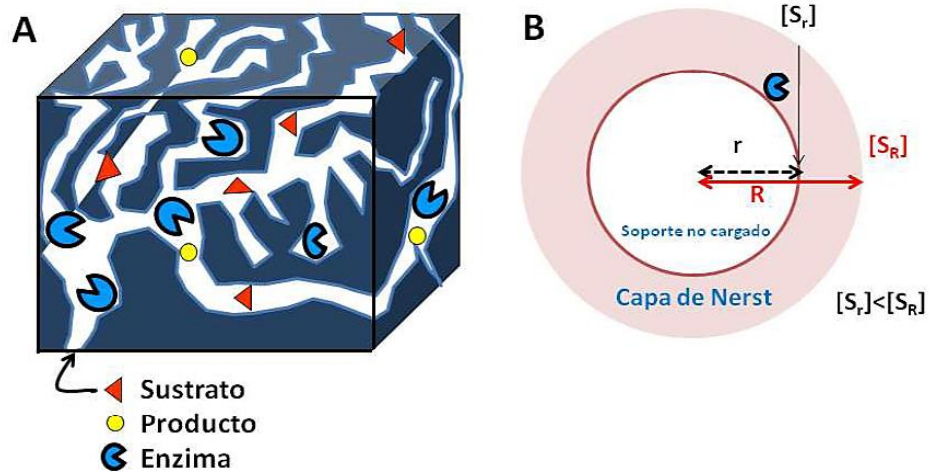


Figura 15. Propiedades caracterización de un derivado inmovilizado. (A) Efectos difusionales internos, (B) efectos difusionales internos. Tomado de: Alfaro, 2012.

Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte: Para el caso de enzimas inmovilizadas en soportes cargados negativamente, si el sustrato también está cargado negativamente, existirá una repulsión mutua, lo que se traducirá en una reducción de la concentración efectiva de sustrato y por tanto de actividad con respecto a la enzima libre. En este caso, el valor de K_m' aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución. Por el contrario, si el sustrato posee carga positiva, habrá una atracción del sustrato hacia el soporte, con lo que aumentará la concentración efectiva de sustrato y por tanto aumentará la actividad enzimática con respecto a la enzima libre (Arroyo, 1998; Alfaro, 2012).

Impedimentos estéricos 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. Este "efecto estérico" se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo (Arroyo, 1998; Alfaro, 2012).

Efectos en el microentorno: Cuando una enzima se encuentra unida a un soporte con grupos cargados eléctricamente, la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual. El efecto observado suele



ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un mayor intervalo de pH en el cual la enzima presenta máxima actividad (Arroyo, 1998; Alfaro, 2012).

Si se encuentra unida a un soporte cargado positivamente, la enzima tendrá en su microentorno una concentración menor de hidrogeniones debido a una repulsión de cargas. Por tanto, el pH del microentorno será mayor que el pH del medio, y como resultado habrá un desplazamiento del pH óptimo de la enzima hacia valores más ácidos. Mientras que, por el contrario, una enzima unida a un soporte cargado negativamente (por ejemplo, CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de hidrogeniones que en el medio de reacción. En este caso, la enzima inmovilizada será más activa a un pH más alcalino (Alfaro, 2012).

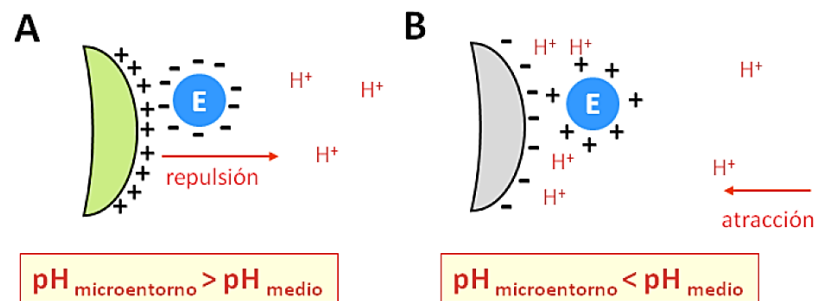


Figura 16. Efectos de la carga del soporte en el microentorno de la enzima inmovilizada. (A) Efectos en soportes cargados positivamente, (B) efectos en soportes cargados negativamente. Tomado de: Alfaro, 2012.

Al finalizar este tema puedes reconocer que tan estable es el enlace creado en una enzima inmovilizada, lo que te permitirá identificar las características en la velocidad de la reacción de las enzimas permitiendo reconocer cuales son los pros y los contras de la inmovilización considerando el tipo de enlace.

2.4. Biorreactores enzimáticos

2.4.1 Biorreactores homogéneos

Un reactor es homogéneo cuando todas las especies que se encuentran en él están en la misma fase (o solo hay una fase), y el reactor es heterogéneo si en él se encuentran presentes dos o más fases. Por ejemplo, un tubo lleno de gas o un TAC con una solución reactiva líquida.



2.4.2 Biorreactores heterogéneos

El diseño de reactores para procesos catalizados por enzimas se fundamenta en el tradicional de reactores para procesos químicos con catalizadores heterogéneos. Los reactores enzimáticos pueden operar en lotes durante un proceso discontinuo o también funcionar en procesos de flujo continuo; en este último caso se distinguen dos variantes: el **reactor de tanque agitado continuo** (RTAC) y el **reactor de flujo pistón** (RFP) (Solís y Durán, 2008).

El **reactor por lotes** tiene un uso limitado en los procesos con enzima inmovilizada, ya que, por lo general, se hacen necesarias operaciones adicionales para la recuperación de la enzima, lo que puede representar una pérdida o inactivación de la misma (Solís y Durán, 2008).

En los **RTAC** el mezclado se considera perfecto y en **RFP** el mezclado es nulo; como consecuencia de ello, se concluye que las condiciones, como la concentración de sustrato, en cualquier instante dentro del **RTAC** son las mismas que en la corriente de salida; mientras que las condiciones en el **RFP** varían con la distancia existente entre la entrada y la salida del flujo. Los reactores enzimáticos de lecho fluidizado se consideran intermedios entre las condiciones correspondientes a los tipos antes señalados (Solís y Durán, 2008).

Para la elección del tipo de reactor que debe de diseñarse en un proceso enzimático específico, habrán de tomarse en cuenta varias consideraciones de índole técnica y económica. Entre otras puede citarse la disponibilidad y precios de enzimas y soportes, y cuando se trata de enzimas inmovilizadas, la necesidad y posibilidad de recuperación del catalizador. Es evidente que con enzimas inmovilizadas se prefieran los reactores continuos. Entre éstos el análisis teórico para casos específicos puede mostrar algunas ventajas intrínsecas (Solís y Durán, 2008).

Otras consideraciones importantes se refieren a la forma y propiedades cinéticas y mecánicas de la preparación de enzima inmovilizada. Los esfuerzos cortantes provocados por la agitación pueden destruir o solubilizar la enzima. Por otro lado, la enzima inmovilizada preparada en pequeñas partículas puede ocasionar taponamientos o provocar altas



caídas de presión en reactores de flujo pistón. Para reacciones con altos requerimientos de oxígeno se recomienda más el uso de un RTAC (Solís y Durán, 2008).

En términos generales se puede decir que no hay reglas simples en la selección del tipo de reactor para un proceso con enzima inmovilizada específica, cada caso requiere se tomen en cuenta las particularidades que le son propias (Solís y Durán, 2008).

Cierre de la unidad

Has llegado al final de esta unidad donde has revisado más afondo los métodos de inmovilización enzimática, sus principales características, las ventajas y desventajas, los parámetros que debes considerar cuando se ha llevado a cabo la inmovilización, así como estudiar los biorreactores homogéneos que utilizan enzimas inmovilizadas.



Para saber más



Montiel Pacheco, C., Bustos Jaimes, I. (2014).
Procesos enzimáticos amigables con el ambiente.
Disponible en:
<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art92/art92.pdf>



Huerta Ochoa, S. (2013). Biotecnología de enzimas:
Inmovilización. Disponible en:
http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Tema_10_Biotec_Enzimas.pdf



Cuevas García, R. (2009). Introducción a los reactores químicos. Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IntroReactores_10564.pdf



Fuentes de consulta



- Alfaro, U. Y. (2012). Nueva nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa de desulfotalea psychrophila. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Pp. 17-35. Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/16635/1/T33994.pdf>
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2): 23-39. Recuperado de: <https://web.archive.org/web/20200711133030/https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- Castillo, R. F. (2005). *Biotecnología ambiental*. 1era. Edición. Editorial: Tebar S. L. Madrid. ISBN: 978-84-7360-211-2.
- depa.fquim.unam.mx. (2016). Recuperado de: <https://www.yumpu.com/es/document/read/44917081/liposomas-un-reto-en-tecnologia-farmaceutica>
- Delgadillo, L. A., Rodríguez-Nogales, J. M. (2006). A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. *International Dairy Journal*. 16:354-360.
- Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro J.A., VillaVelázquez-Mendoza C., Escalante-Minakata P. Ibarra-Junquera, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6): 42-56. Recuperado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art%205%20Fajardo-Ochoa%20y%20col.pdf>
- López, G. F. (2006). Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalospotina C. Universidad Autónoma de Madrid. Pp. 13-14.



- Montes, F. T. (2006). Ingeniería de la superficie de la penicilina G acilasa para el desarrollo de nuevos métodos de inmovilización y estabilización. Universidad Autónoma de Madrid. Pp. 2-4.
- Quiroquímica (2016). Recuperado de: <http://www.quitoquimica.cl/que-es-el-QUITOSANO/>
- Sánchez Montero, Y. Bouza A., MontBrun-Di Filippo, J. (2011). Modelaje y simulación de un biorreactor enzimático no isotérmico para una reacción serie-paralelo. Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela, 26(1): 149-164. Recuperado de: <file:///C:/Selene/Docencia/ESAD/Revisi%C3%B3n/2015/Diciembre%202015/Biorreactores%202/art15.pdf>
- 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. Quím. Nova 37(3): 504-512. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v37n3/v37n3a20.pdf>
- Solís-Fuentes, J.A., Durán-Domínguez, C. (1993). Reactores enzimáticos en el procesamiento de residuos agroindustriales. Residuos lácteos con β -galactosidasa inmovilizada. La Ciencia y El Hombre (Rev. Univ. Verac., México). (12-13): 85-113. Recuperado de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/5167/1/19921213P85.pdf>
- Atl (El portal del agua desde México). (2013). Los humedales artificiales: componentes y tipos. Fecha de última consulta: 30/mayo/2013. Recuperado de: http://www.atl.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=5954:los-humedales-artificiales-componentes-y-tipos&catid=119:investigacion-y-agua&Itemid=462
- Bebaman, J., Armstrong, N., Maidment, D. (1996). Modeling of Dissolved Oxygen in the Houston Ship Channel Using Wasp5 and Geographic Information Systems. Recuperado de: <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/6750>
- Behling, E.; Marín, J.C.; Gutiérrez, E.; Fernández, N. (2003). Tratamiento aeróbico de dos efluentes industriales utilizando reactores biológicos rotativos de contacto. Multiciencias, 3(2): 1-16. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/904/90430205.pdf>
- CONAGUA, (2013). Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001. Recuperado de: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-028-SCFI-2001.pdf>



- Echevarría, L.G. (2013). Técnicas y métodos de uso de las biopelículas en la búsqueda de procesos de biorremediación. *Scientific International Journal*, 10(3): 32-43. Disponible en <http://www.nperci.org/L.%20Echevarria-Biopeliculas-V10N3.pdf>
- Eguia, L. E. (1991). Capítulo 2: Estado actual de los conocimientos. Desarrollo de la biopelícula en medio soporte permeable. Escuela Superior de la Marina Civil. Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente. Universidad de Cantabria. 1: 14-209.
- Enrile de Rojas, F., Fuenmayor, F. V. (2009). Manual de higiene bucal. 1era. Edición. Editorial: Médica Panamericana. Buenos Aires. ISBN: 978-84-9835-137-8.
- Gómez, S. D. (2008). Ecuación general de diseño para procesos de biopelícula. *Foro del agua*. 12(48):29-34. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/236841522_Ecuacion_general_para_diseno_de_procesos_de_Biopelicula_Tratamiento_de_aguas_residuales
- Guadix, A., Guadix E. M., Páez-Dueñas M. P., González-Tello P., Camacho F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89. Recuperado de: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5735/13245>
- Hospital General de México. (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Recuperado de: https://web.archive.org/web/20150213063832/http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/noticias/programa_mercurio/marco/norma_001.pdf
- IMTA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua). (2013). Humedales artificiales: una alternativa al tratamiento de las aguas residuales para pequeñas localidades. Recuperado de: https://www.imta.gob.mx/biblioteca/libros_html/congreso-imta-2013/files/assets/basic-html/page116.html
- Iwai, S., Kitao, T. (1994). Wastewater treatment with microbial films. Technomic Publishing Company Inc. USA. Pp. 89-92.
- Millan, S.T.C. (2005). Filtración biológica aerada de aguas residuales en un lecho profundo. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 12-35. Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2005/0602309/Index.html>
- Moreno, B. L. D. (2011). Celdas microbianas de biocombustible: origen, avances y aplicaciones para la generación de energía. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 8-9.



- Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Vidal, G., Méndez, R. (2007). Efluentes líquidos de curtidos: parámetros de caracterización y de operación de las unidades de depuración. En: Méndez P.R. Vidal S.G. Lorber K.E., Márquez R.F. Producción limpia en la industria de curtiembre. Universidad de Santiago de Compostela, 21-42 pp. Recuperado de: http://www.eula.cl/giba/images/contenidos/educacionambiental/ProduccionLimpia_en_la_industria_de_curtiembre.pdf
- Nadal, A.A. (2010). Introducción. En: Estudio del estado del proceso de depuración de la EDAR de Cullera mediante técnicas de respirometría. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. 7-21 pp. Recuperado de: <https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/9164/ESTUDIO%20DEL%20ESTADO%20DEL%20PROCESO%20DE%20DEPURACION%20DE%20LA%20EDAR%20DE%20CULLERA%20MEDIANTE%20TECNICAS%20DE%20RESPIROMETRIA%20Anglica%20Nadal%20Alf-1.pdf>
- Pérez Aristizábal J.D. (2010). Aplicación y evaluación de un reactor de contactores biológicos rotativos (RBC o biodiscos) a escala laboratorio como tratamiento de los lixiviados generados en el relleno sanitario de la pradera. Tesis. 23-29 pp. Recuperado de: [http://repository.udem.edu.co/bitstream/handle/11407/44/AplicacionyEvaluaciondeunReactordeContactoresBiologicosRotativos\(RBCoBiodiscos\)aEscalaLaboratorioComoTratamientoDeLosLixiviadosGeneradosEnElRellenoSanitarioDeLaPradera.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repository.udem.edu.co/bitstream/handle/11407/44/AplicacionyEvaluaciondeunReactordeContactoresBiologicosRotativos(RBCoBiodiscos)aEscalaLaboratorioComoTratamientoDeLosLixiviadosGeneradosEnElRellenoSanitarioDeLaPradera.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Pérez, L. A. G. (2005). La biopelícula: una nueva visión de la placa dental. Rev. Estomatológica Herediana. 15(1):82-85. Recuperado de: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/articloe/view/1984/1981>
- Rojas, B. M. M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. Rev. Colomb. Biotecnol. 13(2):135-143. Recuperado de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/27959/28663>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. 9a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. ISBN: 978-950-06-0740-7.
- Zerón, A. 2011. Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿Qué biotipo tenemos? (Segunda parte). Revista Mexicana de Periodontología, 2(1): 22-33.



Recuperado de:

<http://www.medigraphic.com/pdfs/periodontologia/mp-2011/mp111g.pdf>

Yocum, D. (2007). Manual de diseño: humedal construido para el tratamiento de las aguas grises por biofiltración. Bren School of Environmental Science and Management. University of California. Santa Barbara. 1:1-16. Recuperado de:
http://www2.bren.ucsb.edu/~keller/courses/GP_reports/Diseno_Humedal_AguasGrises.pdf