



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN QUÍMICA DE  
LIPASA DE *Rhizopus arrizus* EN SOPORTES DE QUITOSANO**

**Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología**

**Profesor Guía**

**Ing. Rommel Granja, M.Sc.**

**Autor**

**Edgar Andrés Velastegui González**

**Año**

**2014**

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

---

**Rommel Granja**  
**Ing. En Biotecnología**  
**CI: 171370730-3**

### **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

---

**Edgar Andrés Velastegui González**

**CI: 172135338-9**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia, mi razón de vivir, que pese a mis errores me brindaron todo su amor, apoyo y confianza.

A Rommel Granja, Emilia Vázquez y Santiago Zárate, por brindarme su amistad, orientarme en mi vocación y confiar en mis capacidades.

A la Universidad de las Américas, por permitirme ser parte de tan noble institución.

## **DEDICATORIA**

Con todo mi cariño y amor para esas personas que han caminado a mi lado durante una vida entera, que me enseñaron a ver lo mejor de las simples cosas, de las que aprendí que las batallas se luchan hasta el final y que inclusive en las derrotas se aprende y se gana, este trabajo se lo dedico a ustedes.

**Mamá y Papá**

## RESUMEN

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica poco aprovechados en la industria debido a impedimentos como su elevado costo y la complejidad de su producción, purificación y estabilización, es por esto que surge la necesidad de poder reusarlos. Una alternativa para su reuso es la inmovilización enzimática, definida como la confinación de la enzima en un espacio físico determinado.

Una forma de inmovilizar enzimas es la unión de esta a un soporte, generalmente polimérico, mediante un enlace covalente. Esta forma de inmovilizar se lleva a cabo básicamente en dos etapas: activación del soporte y una posterior inmovilización de la enzima en el soporte activado. Las condiciones de inmovilización como la concentración de glutaraldehído y el tiempo empleado en la activación del soporte tienen una gran influencia sobre la actividad y estabilidad de la enzima. El objetivo de este trabajo fue diseñar un protocolo de inmovilización de lipasas que favorezca a la actividad y estabilidad enzimática.

Se elaboró microesferas mediante goteo de quitosano de bajo peso molecular al 5% v/v en NaOH 1.2M, las microesferas fueron activadas con glutaraldehído de concentración 0.2-2.3% v/v durante 18-102 minutos. Posteriormente se inmovilizó en las microesferas lipasa de *Rhizopus arrhizus* (Sigma-Aldrich®), usando una solución de concentración 2 mg/ml de la misma. Para el análisis de datos se aplicó un diseño factorial  $2^k$  de superficie de respuesta.

El modelo matemático generado por la superficie de respuesta permitió deducir que a una concentración de 0.62% v/v de glutaraldehído y 70 minutos de activación del soporte, la actividad enzimática calculada fue máxima y tomó un valor de 1.01 U/mgP. Experimentalmente, usando estas condiciones de operación, se obtuvieron actividades de entre 0.89 y 1.2 U/mgP, lo cual indica que el modelo matemático obtenido es una interpretación aproximada de la

influencia de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación del soporte.

Se evaluó la estabilidad enzimática bajo estas condiciones y se observó una mejora considerable en esta propiedad. La actividad de la lipasa inmovilizada se mantuvo invariable durante 8 días a 60°C.

## ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts of protein nature underutilized in industry due to impediments such as high cost and complexity of production, purification and stabilization, for this reason it's necessary to reuse it. An alternative for the reuse of the enzymes is the enzyme immobilization, which is defined as the confinement of the enzyme in a physic space.

One of the methods to immobilize enzymes is the formation of a covalent linkage between the enzyme and a matrix, generally of polymeric nature. This kind of immobilization is performed basically in two steps: Support activation followed by the enzyme immobilization in the activated support. Conditions for the activation of the support like glutaraldehyde concentration and activation time of the support have a big influence over the enzyme activity and stability. The objective of this work was the design of a protocol for the lipase immobilization that favors the enzyme activity and stability.

Microspheres was developed by dropping a 5% v/v chitosan low molecular weight solution into a NaOH 1.2 M solution, the microspheres were activated by using a glutaraldehyde solution with a concentration of 0.2-2.3% v/v during 18-102 minutes. Later, the immobilization was developed using a lipase of *Rhizopus arrhizus* (Sigma-Aldrich®) solution with a concentration of 2 mg/ml. For data analysis, factorial  $2^k$  design with response surface was used.

A mathematical model was generated form the surface response and allowed the deduction of ideal immobilization conditions: 0.62 % v/v of glutaraldehyde and 70 minutes of activation time are the values that generate the maximum activity value, the calculated enzyme activity using the model was 1.01 U/mgP. Experimentally, using the calculates operational conditions, values from 0.8 to 1.2 U/mgP were obtained, this means that the mathematical model is an approximate interpretation of the influence of the glutaraldehyde concentration and the activation time over the enzyme activity and stability.



Enzyme stability was evaluated using these operational conditions and a considerable improvement of enzyme stability was observed. The activity of the immobilized enzyme was remained unchanged for 8 days under a temperature of 60°C.

## ÍNDICE

<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Formulación del Problema .....	2
1.3 Justificación .....	4
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo General.....	5
1.4.2 Objetivos específicos .....	5
<b>Capítulo II. Marco Teórico</b> .....	7
2.1 Lipasas .....	7
2.1.1 Generalidades .....	7
2.1.2 Mecanismo de reacción .....	9
2.1.3 Propiedades de las lipasas .....	10
2.2 Inmovilización enzimática .....	11
2.2.1 Generalidades .....	11
2.2.2 Métodos de inmovilización .....	12
2.2.2.1 Retención Física.....	13
2.2.2.2 Inmovilización química.....	16
2.3 Actividad y estabilidad enzimática .....	29
2.3.1 Actividad enzimática .....	29
2.2.1.1 Significado de la actividad enzimática .....	29
2.2.1.2 Determinación experimental de la actividad enzimática .....	31
2.3.2 Estabilidad enzimática .....	33
2.4 Diseño experimental.....	35
2.4.1 Diseño de superficie de respuesta .....	35
<b>Capítulo III. Metodología</b> .....	38
3.1 Esquema de la experimentación.....	38
3.2 Detalle de experimentos .....	38
3.3 Producción de microesferas de quitosano .....	40

3.4 Activación de microesferas de quitosano .....	41
3.5 Inmovilización de lipasa de Rhizopus arrhizus.....	42
3.6 Determinación del rendimiento de inmovilización .....	42
3.7 Medición de la actividad de la lipasa de Rhizopus arrhizus....	42
3.8 Medición de la estabilidad enzimática .....	44
Capítulo IV. Resultados y discusión .....	45
4.1 Resumen .....	45
4.2 Actividad enzimática.....	45
4.3 Estabilidad enzimática .....	55
CONCLUSIONES .....	60
RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS .....	64

## **Capítulo I. Introducción**

### **1.1 Antecedentes**

Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), son hidrosolubles, las reacciones que catalizan generan como productos de reacción ácidos grasos y glicerol, y se las ha aislado y purificado de hongos, bacterias, levaduras, plantas y tejido animal. Debido a la diversidad de reacciones que catalizan (Hidrólisis, esterificación, transesterificación, entre otras), han sido empleadas en numerosas aplicaciones por lo que constituyen el grupo de enzimas de mayor importancia en el campo de la biotecnología. Entre las aplicaciones que se les ha dado a las lipasas, se destaca su potencial en la industria alimenticia para hidrolizar la grasa de la leche, obtención de nuevos sabores, maduración del queso, disminución de grasa en mantequilla y crema, en la industria de detergentes las lipasas constituyen un aditivo para formulaciones de removedores de grasa, en la industria textil confiere mayor absorción a las telas, también se las ha empleado en la producción de biopolímeros y otros compuestos donde se requiere de reacciones de transesterificación. Adicionalmente las lipasas son empleadas como biocatalizadores en procesos para la obtención de productos que son utilizados en la industria cosmética, remoción de brea de la madera para la producción de pulpa de celulosa y papel, en la síntesis de biodiesel a partir de aceite, se la ha empleado para desengrasar el cuero y en la industria farmacéutica específicamente en resolución de mezclas racémicas (Sirisha et al., 2010).

Las lipasas obtenidas de la fermentación de *Rhizopus arrhizus* poseen regioselectividad 1,3 lo cual asegura que los productos de hidrólisis de los triglicéridos únicamente serán los monoglicéridos correspondientes. Este tipo de lipasas evidencian su mayor actividad cuando cataliza la hidrólisis de triglicéridos de cadena mediana (de 8 a 10 carbonos) y su peso molecular varía desde 40 a 45 kDa. Estas lipasas han sido usadas especialmente en formulaciones de detergentes y, debido a su elevada actividad en la hidrólisis

de triglicéridos, se las han considerado especialistas para la producción de biodiesel a partir de cualquier tipo de aceite (Dobrev et al., 2011).

El poder catalítico de las enzimas justifica los esfuerzos dedicados al desarrollo de tecnologías que permitan un mayor aprovechamiento de estas y el establecimiento de procesos rentables. Los elevados costos de producción, purificación y estabilización de la enzima obligan a crear metodologías dirigidas al rehúso de la misma. La inmovilización enzimática es una tecnología necesaria para llevar a cabo a gran escala procesos donde se emplee biocatalizadores ya que permite el uso reiterado o continuo de la enzima, abaratando así costos de su producción y purificación, confiere estabilidad a la enzima, permite el control de tiempos de reacción, flujos y modo de operación, facilita la construcción de variadas configuraciones de bioreactores que favorezcan al contacto enzima-sustrato (Spahn et al., 2008).

## **1.2 Formulación del Problema**

Muchos procesos de transformaciones químicas usados en el sector industrial tienen algunas limitantes. Los procesos suelen ser llevados a cabo a altas presiones y temperaturas, lo cual puede representar limitantes tales como el alto costo por el uso de mucha energía y la imposibilidad de usar productos térmicamente sensibles. Generalmente se emplea inmensas cantidades de agua destinadas al enfriamiento, las reacciones se llevan a cabo con condiciones extremas de acidez o alcalinidad lo cual requiere de un gran costo en insumos, la sistematización del proceso es la mayoría de veces inalcanzable, debido a que representa valores muy altos (Binod et al., 2013).

Las lipasas representan el grupo de enzimas más importante debido a la variedad de procesos que pueden llevar a cabo, mantienen su actividad en amplios rangos de temperatura y pH; poseen especificidad por un sustrato y la gama de sustratos que cataliza es amplia debido a su enantioselectividad, por lo que su uso es cada vez más difundido en la industria. A pesar de esto, la explotación de las lipasas para su uso comercial es muy limitada debido al alto

costo de su producción y purificación, adicionalmente a esto las enzimas presentan una notable labilidad en condiciones agresivas de reacción lo cual afecta sus características más importantes como su actividad y estabilidad. Sin embargo, la demanda de lipasas ha crecido sostenidamente, por lo que es necesario el desarrollo de tecnologías con una buena relación costo beneficio, que permitan el escalamiento de procesos de biocatálisis enzimática (Gupta et al., 2004).

Por razones técnicas y económicas previamente mencionadas, los estudios se han enfocado en el reúso o el uso continuo de las enzimas por tiempos extensos, debido a que las enzimas adquieren características especiales que les permiten mantener su actividad y estabilidad. Para estos fines, la inmovilización enzimática es quizás la mejor propuesta que se ha descrito para la recuperación y la estabilización de la enzima (Illanes, 2008, p.156).

Se ha propuesto una variedad de métodos de inmovilización enzimática y su elección dependerá de la realidad de cada caso. La inmovilización enzimática por enlace covalente a soportes poliméricos usando glutaraldehído es una alternativa muy atractiva por su funcionalidad, versatilidad y bajo costo. Esta metodología puede llevarse a cabo en dos etapas: activación del soporte polimérico e inmovilización de la enzima. Según Migneault y otros (2004) el éxito de la inmovilización depende de la correcta elección de las condiciones de reacción usadas en la activación y la inmovilización. Varios estudios han llegado a la conclusión de que existe una fuerte dependencia entre propiedades de la enzima como la actividad y estabilidad con condiciones de inmovilización como la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación; sin embargo, investigaciones que han abordado el tema no definen cuantitativamente las condiciones exactas de concentración de glutaraldehído y tiempo de activación a las cuales se vean beneficiadas la actividad y estabilidad.

### **1.3 Justificación**

La industria química representa uno de los sectores económicos más importantes en todo el mundo. Esta industria está en continuo desarrollo incorporando tecnologías que provean mejores rendimientos comparados con los obtenidos por procesos tradicionales lo cual permite el acceso de nuevos segmentos y productos al mercado. La aplicación de las enzimas ha tomado fuerza en sectores importantes de la industria como en procesos relacionados con la industria de alimentos, farmacéuticas, producción de polímeros, jabones y cosméticos, industria textil, obtención de pulpa y papel, remediación de aguas residuales y formulación de herbicidas (Schmid et al., 2002).

La sustentabilidad de un proceso tiene que ver con la energía y la materia prima empleada, producción de contaminantes, estabilidad y seguridad del proceso y calidad del producto final. La mejora en estos parámetros encaminará a la disminución de los costos de producción y la efectividad de los procesos, lo cual enriquece la competitividad de un producto en el mercado. La mejora de procesos destinada al aumento en su rendimiento, reducción en el uso de materia prima y la disminución en la producción de contaminantes confiere a los bioprocesos muchas ventajas sobre procesos químicos tradicionales (Schmid et al., 2002).

Las enzimas son los biocatalizadores por excelencia, aceleran el tiempo de una reacción y da lugar a la obtención de productos más puros y de mejor calidad, procesos con mayores rendimientos y más amigables con el ambiente. La biocatálisis enzimática ha evidenciado muchas ventajas sobre tecnologías convencionales, es por esto que el mercado global de enzimas para uso industrial en el año 2010 fue de \$3.3 billones de dólares, y se estima que para el 2015 el mercado global de enzimas alcanzará los \$4.4 billones de dólares (Binod et al., 2013). En el Ecuador el uso de enzimas en la industria es escaso debido al desconocimiento de su aplicabilidad; si bien es cierto, se tiene las capacidades para desarrollar inmovilización enzimática, pero la falta de

personal capacitado que lleve a cabo estos procesos ha desembocado en el escaso uso de las enzimas en nuestra industria.

El costo de producción, purificación y estabilización de las enzimas hacen necesario emplear tecnologías que permitan el reuso de una enzima. Con la inmovilización enzimática se ha logrado este objetivo. Una de las formas de inmovilizar enzimas es la formación de un enlace covalente enzima-soporte polimérico mediante la activación del soporte seguida de la inmovilización de la enzima. Las condiciones de operación con las que se lleva a cabo la reacción influyen directamente sobre la actividad y la estabilidad enzimática.

La concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación del soporte pueden ejercer un efecto positivo o negativo en la actividad y estabilidad enzimática. Según Migneault y otros (2004), altas concentraciones de glutaraldehído y grandes tiempos de activación causan una disminución considerable en la actividad enzimática; mismo efecto tienen concentraciones de glutaraldehído y tiempos de activación muy bajos, es por esta razón que es necesario estudiar estos parámetros y definir valores óptimos en donde la enzima inmovilizada sea lo más activa posible y así definir un protocolo de inmovilización enzimática que permita el reuso de la enzima y el escalamiento de procesos de biocatálisis enzimática.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Optimizar un método de inmovilización química por enlace covalente de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en soportes de quitosano.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

Desarrollar un método químico para la elaboración de soportes a base de quitosano.



Establecer un diseño experimental que permita la generación de un modelo matemático en función de la concentración de glutaraldehído y del tiempo de activación.

Determinar la actividad de la enzima lipasa de *Rhizopus arrhizus* inmovilizada en soportes de quitosano.

## **Capítulo II. Marco Teórico**

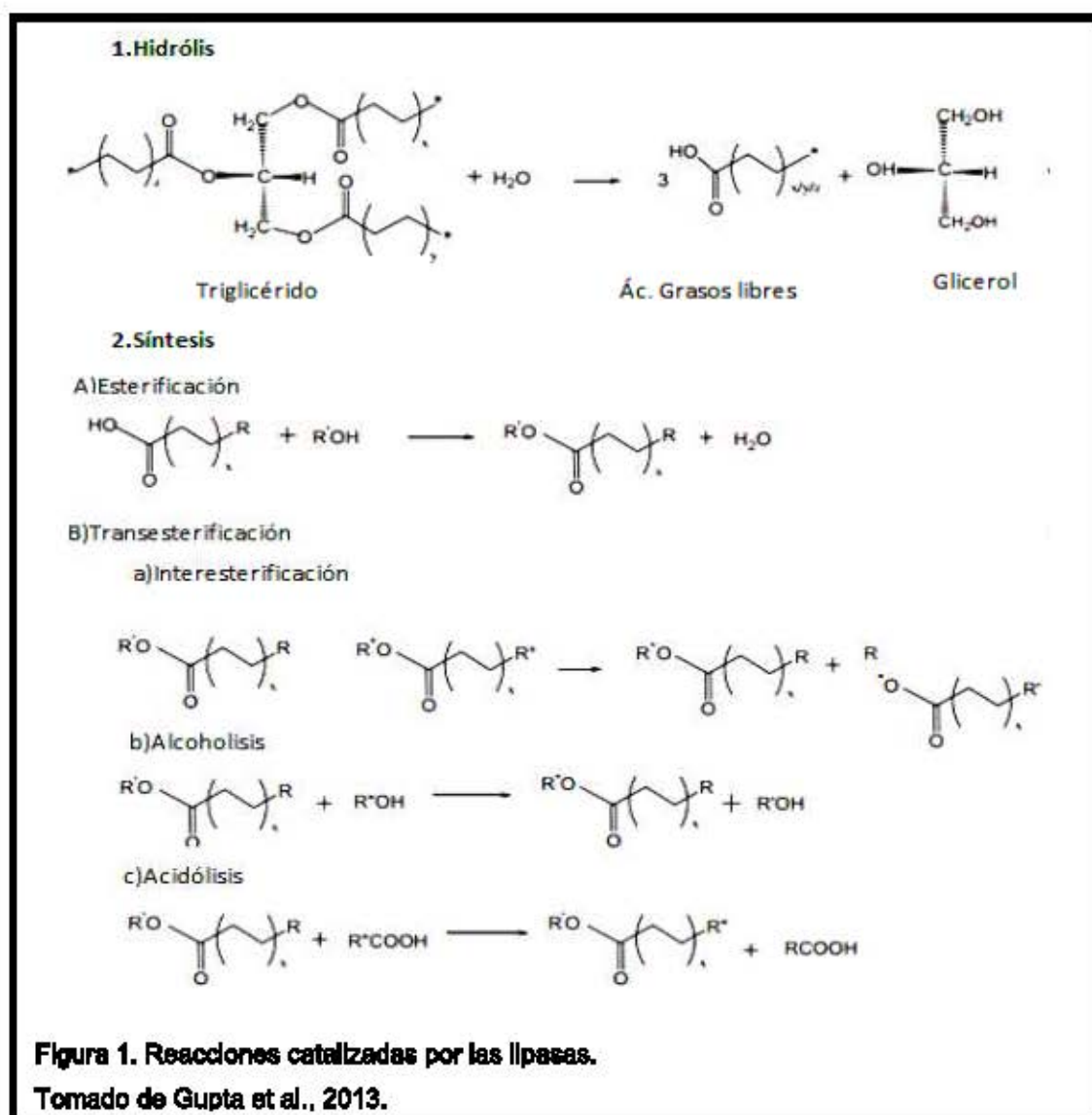
### **2.1 Lipasas**

#### **2.1.1 Generalidades**

Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) que catalizan la conversión de lípidos en glicerol y ácidos grasos libres, a menudo actúan como fosfolipasas, isofosfolipasas, colesterol estearasas, cutinasas, amidasas y otras estearasas. Las lipasas de origen microbiano se han convertido en las más importantes a nivel industrial porque trabajan a condiciones agresivas de pH, temperatura, tienen alta quimio, enantio y regioselectividad lo cual les confiere versatilidad para llevar a cabo numerosos procesos industriales. Las lipasas son ubicuas y se las ha obtenido a partir de plantas, tejidos animales, bacterias de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*, hongos de géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Candida*, y levaduras de géneros como *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* y *Torulaspota* (Verma et al., 2012).

La mayoría de lipasas de origen microbiano se las produce por fermentación sumergida, por lo que los esfuerzos se centran en definir el medio de cultivo y las condiciones de operación adecuadas para obtener lipasas útiles en la industria. Muchas aplicaciones no requieren de preparados de lipasa completamente puros como la industria detergentes, pero si se requiere de un nivel determinado de pureza para evitar la formación de productos de reacción ajenos a la reacción de la enzima. La purificación de la enzima es muy compleja y costosa, en muchos casos la mayor parte del costo de la enzima corresponde a los procesos de purificación. Los métodos de purificación conocidos hoy en día no son del todo eficientes ya que pueden causar el daño de la enzima y la pérdida de sus características más importantes como su actividad y estabilidad debido a la fragilidad que las caracteriza (Illanes, 2008, pp. 294-295).

La extensa gama de aplicaciones que se ha designado a las lipasas se debe a las numerosas clases de reacciones que pueden catalizar. Entre estas reacciones tenemos a la hidrólisis, esterificación, interesterificación, transesterificación, alcoholisis y acidólisis (Figura 1) (Gupta et al., 2013).

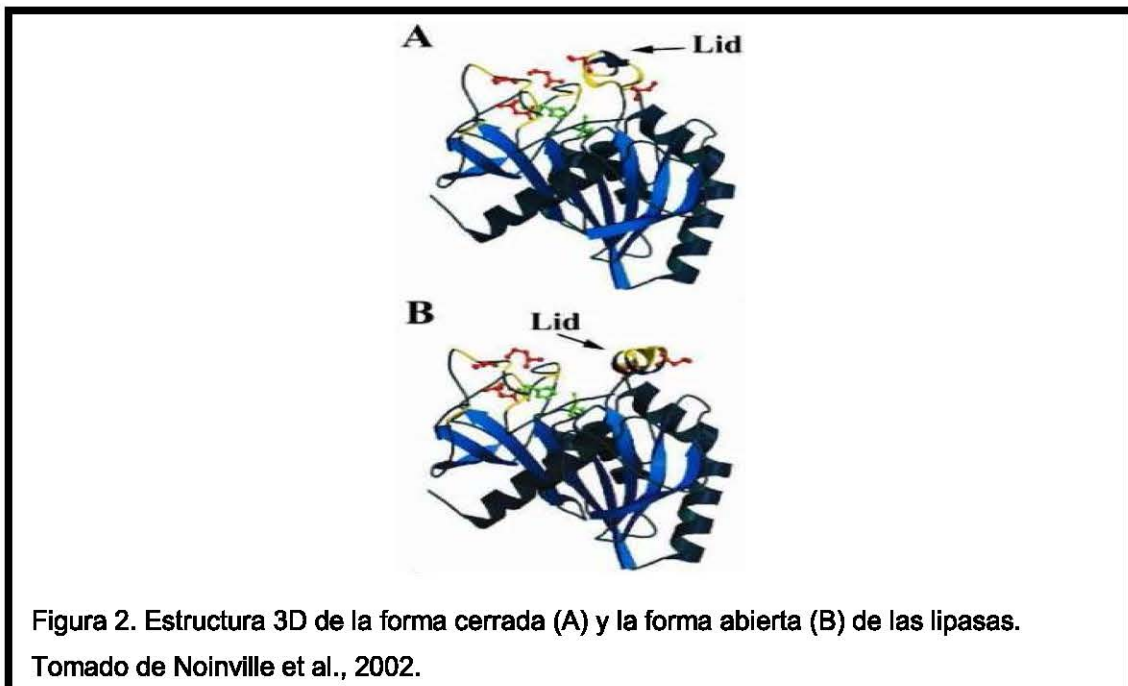


Las lipasas son activas en solventes orgánicos y pueden catalizar síntesis (reacciones de esterificación) así como la reacción reversible a la síntesis (reacciones de hidrólisis). Las lipasas hidrolizan el enlace éster entre las cadenas laterales acil-graso y la cadena principal lipídica de la grasa o el aceite para dar lugar a glicerol y ácidos grasos. En reacciones de esterificación, se

obtiene como productos de reacción ésteres y agua. La reacción de transesterificación vía alcoholisis, acidólisis o interesterificación da lugar a un alcohol y un ácido o un éster respectivamente. (Gupta et al., 2013).

### 2.1.2 Mecanismo de reacción

Todas las lipasas son miembros de la superfamilia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, difieren en sus pesos moleculares que pueden ir de los 20 a 60 kDa, la región más conservada donde las lipasas guardan mucha homología es la tradicional triada del sitio activo Ser-Hys-Asp (o Glu) y los residuos involucrados en él (Sayariet al., 2005).



Las reacciones lipolíticas se llevan a cabo únicamente en la interfase agua/lípido presente en un sistema bifásico formado por el sustrato lipolítico y el medio acuoso. La factibilidad de la reacción se debe a la facultad que tiene el sitio activo de someterse a reareglos. En ausencia de esta interfase el sitio activo es cubierto por un polipéptido que, en contacto con una interfase, se desplaza dando paso a la forma "abierta" de la enzima, exhibiendo una superficie hidrofóbica en el sitio activo donde el sustrato reaccionará. El

polipéptido que cubre el sitio activo y lo hace inaccesible es formado por una o más láminas plegadas en su superficie o por hélices y toma el nombre de lid (Figura 2), que interviene en la regulación de la actividad catalítica de la enzima. El residuo de serina está localizado en un pentapéptido conservado el cual forma un codo nucleofílico donde se produce el ataque nucleofílico del oxígeno de la serina sobre el átomo de carbono del carbonilo del enlace éster del sustrato lo cual da lugar a un intermediario acil-enzima estabilizado por puentes de hidrógeno que expone al sitio activo al sustrato debido a interacciones con micelas o moléculas de sustrato halladas en la interfase (Illanes, 2008, p. 298).

### **2.1.3 Propiedades de las lipasas**

Se han estudiado a profundidad lipasas de varios microorganismos considerando sobre todo propiedades críticas en la integridad, estabilidad y actividad de la enzima como temperatura, pH de reacción, peso molecular y especificidad por el sustrato. Las lipasas de origen bacteriano son estables en un amplio rango de pH que va de 4 a 11 y generalmente su temperatura óptima de reacción se halla entre los 30°C y 60°C. Esta enzima no requiere de cofactores, pero se ha reportado que el uso de cationes como el calcio potencia la actividad de la enzima pero, otros cationes como  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  la inhiben considerablemente (Illanes, 2008, p. 299).

La selectividad de la lipasa es la propiedad que nos permite obtener más de un producto de reacción derivados de un solo sustrato, por lo que han sido empleadas en un sin número de transformaciones químico, regio y estereoselectivas (Illanes, 2008, p. 298). Según la especificidad por un sustrato las lipasas se han dividido en tres grupos: Lipasas no específicas, regioespecíficas y ácido-graso específicas. Las lipasas no específicas actúan en cualquier sitio de la cadena de un triacilglicérido lo cual resulta en una hidrólisis completa del mismo y la liberación de ácidos grasos libres y glicerol, por su parte las lipasas regio-específicas son 1,3 específicas que hidrolizan enlaces éster dando lugar a la formación de glicerol, 1,2(2,3) diacilglicéridos y

2-monoglicéridos, por último las ácido-grasos específicas únicamente hidrolizan moléculas de ácidos grasos. La lipasa de *Rhizopus arrizus* pertenece al segundo grupo, es decir, hidroliza triglicéridos y los productos de esta reacción son el glicerol, monoglicéridos y diglicéridos (Gupta et al., 2004). Una estereoespecificidad parcial en la hidrólisis de triglicéridos se ha encontrado en lipasas de *Rhizopus arrizus*, *Rhizopus delemar* y *Candida cylindracea*, propiedad que las convierte de gran utilidad en el aislamiento de ésteres y alcoholes ópticamente puros. Las lipasas del tercer grupo tienen preferencia de hidrólisis sobre triacilglicéridos de cadena larga. Las lipasas enantioespecíficas tienen la capacidad de discriminar entre enantiómeros de mezclas racémicas; estas lipasas tienen un gran valor biotecnológico ya que pueden ser usadas para la producción de compuestos enantioméricamente puros, los cuales ganan cada vez más importancia en industrias como la farmacéutica, cosmética, agroindustrial, síntesis orgánica y compuestos naturales (Illanes, 2008, p. 299).

## **2.2 Inmovilización enzimática**

### **2.2.1 Generalidades**

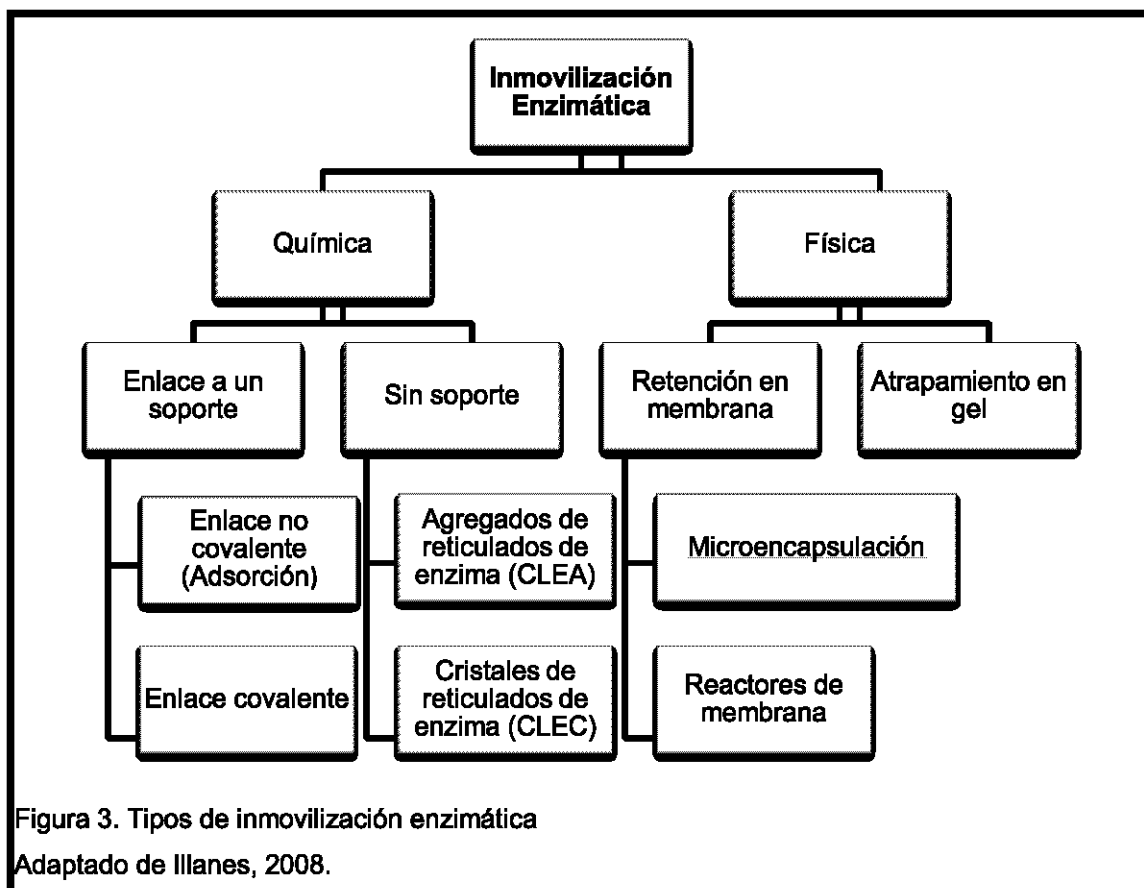
Debido a la complejidad y el alto costo de producción, purificación y formulación de un extracto enzimático, ha surgido la necesidad de implementar tecnologías que permitan explotar todas las capacidades de las enzimas en procesos industriales. La inmovilización enzimática particularmente ha demostrado ser de gran valor y utilidad ya que permite reusar a la enzima muchas veces para la misma reacción manteniendo la integridad de la enzima, confiere un mayor tiempo de vida media a esta, convierte al proceso en cuestión más controlable de principio a fin y evita que el producto se contamine con enzimas, proteínas u otros compuestos, lo cual abarata costos de purificación del producto y le otorga mayor competitividad en el mercado (Spahn et al., 2008).

Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos químicos donde se usa enzimas como catalizadores requiere el reuso o el uso continuo de la enzima. Para la industria es fundamental que se pueda emplear una técnica fácilmente llevada a cabo y que represente una buena relación costo beneficio. Debido a esto se ha propuesto a la inmovilización enzimática como una buena alternativa (Illanes, 2008, p.156).

La inmovilización enzimática se refiere a la confinación de la enzima en un espacio físico determinado que tiene dos objetivos fundamentales: La recuperación de la enzima del producto de reacción y el reuso de la misma. Hay varios métodos para inmovilizar enzimas y su elección dependerá de las propiedades y características de la enzima y del soporte que se va a emplear para inmovilizar la enzima (Tischeret al., 1999).

### **2.2.2 Métodos de inmovilización**

Hay muchos métodos de inmovilización enzimática (Figura 3):



Se los ha dividido en dos grandes grupos: la inmovilización física que se refiere a los métodos donde se confina a la enzima en un espacio en particular únicamente por métodos físicos, y la inmovilización química donde la insolubilización se lleva a cabo mediante la formación de enlaces o interacciones químicas (Illanes, 2008, p.156).

### 2.2.2.1 Retención Física

Comprende aquellos métodos donde se confina a la enzima en un espacio dentro de geles derivados de polímeros o en membranas semipermeables que permitan la libre circulación del sustrato y el producto formado pero se retiene a la enzima al mismo tiempo. Los métodos físicos más importantes descritos son los siguientes:



### **2.2.2.1.1 Atrapamiento**

Consisten en la retención física de las enzimas en el interior de una matriz sólida constituida generalmente por prepolímerosfotoentrecruzantes y otros tipos de polímeros (Tabla 1). A la enzima se la suspende en una solución de monómeros para posteriormente polimerizarlos por medio de un cambio de temperatura o un tratamiento químico. También se ha usado fibras donde la enzima queda atrapada dentro de las microcavidades de la fibra. El atrapamiento es un método de inmovilización enzimática de bajo costo, requiere poca cantidad de enzima para ser funcional y no altera la estructura de la enzima. La desventaja es que se debe seguir un riguroso control en la polimerización y controlar las condiciones de reacción bajo las cuales la enzima puede inactivarse fácilmente (Arroyo, 1998).

### **2.2.2.1.2 Retención en membrana**

Se subdivide en dos:

#### **2.2.2.1.2.1 Microencapsulación**

Esta técnica consiste en rodear a la enzima por una membrana semipermeable de tal manera que el tráfico de sustrato y producto se lleve a cabo libremente a través de la membrana, pero la enzima no pueda salir de ella. Las membranas en cuestión pueden ser permanentes y generadas por polimerización interfacial, o no permanentes y generadas por un tratamiento con surfactantes, llamadas también micelas reversas. Las microcápsulas generadas suelen tener un diámetro comprendido entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta técnica ha sido llevada a cabo para una amplia variedad de aplicaciones como la retención de otro tipo de biomoléculas o microorganismos (Arroyo, 1998).

Tabla 1. Tipos de polímeros usados en inmovilización enzimática

<b>Polímeros Orgánicos</b>	Polímeros Naturales Polisacáridos: Celulosas, dextranos, agar, agarosa, quitina, alginato Proteínas: Colágeno, albumina Carbono
	Polímeros Sintéticos Poliestireno Otros polímeros: Poliacrilato, polimetilacrilato, poliacrilamida, poliamidas
<b>Polímeros Inorgánicos</b>	Minerales Naturales: Bentonita, sílica
	Materiales Procesados: Cristal, metales, óxidos metálicos con poros de diámetro controlado

Adaptado de Brena et al., 2006.

#### 2.2.2.1.2.2 Reactores de membrana

Los reactores de membrana han sido diseñados de tal forma que la membrana sea permeable al producto, semipermeable o permeable al sustrato e impermeable a la enzima. El paso de sustrato por la membrana se lleva a cabo con el uso de bombas que establezcan un flujo líquido a través de la membrana. Lógicamente, antes de ser usado el reactor, la enzima debe ser previamente adsorbida en la membrana. La adsorción se logra principalmente de dos formas: Aplicando un flujo de solución tamponada de enzima a través de la membrana del reactor y contactando exhaustivamente a la membrana con una solución enzimática (Arroyo, 1998).

Sin duda los métodos físicos de inmovilización son buenos, muy útiles y convenientes desde el punto de vista económico, razones por las cuales son los preferidos a la hora de inmovilizar células para procesos de fermentación. Sin embargo, para enzimas, la inmovilización física conlleva muchos problemas críticos principalmente de transferencia de masa que generan restricciones difusionales impidiendo así que el sustrato o analito tome contacto con el sitio activo y se pueda llevar a cabo la reacción (Spahn et al., 2008).

### **2.2.2.2 Inmovilización química**

Se refiere a los métodos donde se forma un enlace químico entre un soporte inerte y la enzima o en ausencia de este soporte formando agregados entre las enzimas mediante el tratamiento con reactivos bifuncionales. Los enlaces químicos formados pueden ser covalentes o no covalentes.

#### **2.2.2.2.1 Inmovilización en ausencia de soporte**

La inmovilización química enzimática ha sido una tecnología en continuo mejoramiento. Por un lado el uso de soportes insolubles permite recuperar la enzima para su reuso pero, si aplicamos esta metodología en bioreactores para el escalamiento de procesos a nivel industrial, notaremos que de la masa neta enzima-soporte, únicamente el 10% o menos corresponden al biocatalizador. Este particular podría afectar la reacción en cuestión en el caso de que la afinidad enzima-sustrato sea muy alta. Por estas razones ha surgido la necesidad de poder inmovilizar la enzima sin la necesidad de usar un soporte (Roessl et al., 2010).

##### **2.2.2.2.1.1 Cristales de reticulados de enzima (CLEs)**

Los agregados proteicos son la forma insoluble de la enzima, estos agregados pueden obtenerse por medio de precipitación o cristalización. Para lograr este objetivo se ha empleado reactivos bifuncionales que induzcan a las moléculas a generar uniones entre ellas, lo cual confiere estabilidad a la forma insoluble

de la enzima. Los cristales de reticulados de enzima (CLECs) presentan ventajas como la resistencia a desnaturalización por temperatura, contacto con solventes orgánicos o por la acción de proteasas. La forma, tamaño y demás características que tome el agregado serán determinados por las condiciones con las que se lleve a cabo la cristalización. Las desventajas de este proceso es que la cristalización demanda un alto grado de pureza de la enzima o extracto enzimático, adicionalmente, el proceso de cristalización requiere de una técnica muy fina que puede conllevar a la formación de cristales inestables (Roessl et al., 2010).

#### **2.2.2.2.1.2 Agregados de reticulados de enzima (CLEAs)**

Debido a las limitaciones de los CLECs, hubo la necesidad de desarrollar los agregados de reticulados de enzima (CLEAs), obtenidos de un proceso general de agregación usando sales o solventes orgánicos seguido de un proceso de entrecruzamiento, obteniéndose así precipitados proteicos estables. En este proceso no se necesita cristalizar lo cual es muy ventajoso, pero la desventaja de este método de inmovilización es que se necesita establecer un protocolo de precipitación exclusivo para cada enzima (Roessl et al., 2010).

#### **2.2.2.2.2 Inmovilización mediante enlace a un soporte**

Se han usado diversos materiales de origen orgánico e inorgánico como matrices para la inmovilización química de enzimas. La elección de un soporte adecuado depende mucho de ciertas características fundamentales que influirán en el éxito de la inmovilización química. Tales propiedades son la relación área de contacto/volumen generada, alta capacidad de formación de enlaces de tipo proteico, compatibilidad e insolubilidad en el medio de reacción, alta estabilidad química y mecánica, fácil recuperación de la enzima inmovilizada del medio de reacción y flexibilidad conformacional. No se cuenta con un material que cumpla enteramente con las expectativas que pudiéramos tener, es por esto que cada material posee características propias que lo hacen

bueno o malo dependiendo del proceso que se tenga en mente. Lamentablemente la mayoría de los materiales que se han probado para la inmovilización química de enzimas no se han podido usar en procesos a gran escala debido a problemas referidos a sus propiedades intrínsecas o porque su uso representa altos costos que no favorece a la relación costo beneficio. En definitiva, el costo y la disponibilidad de los materiales será determinante en la factibilidad de un proceso (Adlercreutz, 1996).

#### **2.2.2.2.1 Enlace no covalente**

Se refiere a todo tipo de interacciones entre la enzima y el soporte que no involucra un enlace covalente. Estas interacciones pueden ser fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos que generan un fenómeno de adsorción (Brena et al., 2006).

##### **2.2.2.2.1.1 Adsorción no específica**

Es el método más simple de inmovilización y se fundamenta en la adsorción física. Cuando se presentan interacciones físicas, las enzimas se unen a la matriz mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones hidrofóbicas. La naturaleza de las uniones no covalentes da como resultado un proceso reversible cambiando las condiciones que favorecen a la fuerza de enlace (ej: pH, fuerza iónica, temperatura, polaridad del solvente). Este método es muy útil desde el punto de vista económico, pero tiene sus limitantes como la ruptura de las interacciones físicas derivando en la pérdida de la enzima (Brena et al., 2006).

##### **2.2.2.2.1.2 Enlace iónico**

Este método de inmovilización puede lograrse mediante un tratamiento salino del soporte y la enzima para así dar lugar a la formación de un enlace iónico. Este fundamento se usa en muchas aplicaciones incluida la purificación

proteica usando intercambiadores iónicos. Es un método que brinda una mayor estabilidad que la adsorción, pero nunca se ha logrado tener una buena actividad y estabilidad a la vez. Estos problemas surgen por la carga excesiva que toma el soporte cuando el sustrato o el producto se hallan cargados; estas condiciones derivan en problemas como la alteración de la cinética de la enzima y la aparición de fenómenos de partición y restricciones difusionales por lo que las condiciones óptimas a las que se debe llevar la reacción cambian (Brena et al., 2006).

#### **2.2.2.2.1.3 Adsorción hidrofóbica**

En este método no se produce la formación de un enlace, sino la aparición de interacciones hidrofóbicas basadas en la entropía del soporte y la enzima. Este método ha sido usado ampliamente en la cromatografía y las variables que se manipulan son temperatura, concentración de sal y pH (Brena et al., 2006).

#### **2.2.2.2.2 Enlace covalente**

Son los métodos que requieren de la formación de un enlace covalente entre el soporte y la enzima. Los soportes que han sido usados para este tipo de inmovilización son variados, de naturaleza orgánica e inorgánica (Tabla 1). Entre las propiedades de los soportes que se prioriza al momento de elegir un soporte en particular para la inmovilización de enzimas se encuentran la mayor relación área/volumen, alta capacidad de enlace con la enzima, compatibilidad e insolubilidad en el medio de reacción, alta estabilidad química y mecánica, capacidad de rehúso después de la reacción y flexibilidad conformacional (Adlercreutz, 2006).

##### **2.2.2.2.2.1 Inmovilización covalente a soportes sólidos**

El enlace covalente se forma entre los grupos funcionales (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub> y -COOH) del soporte activado y los residuos de aminoácidos de la enzima. La

tasa de inmovilización de la enzima después de un contacto exhaustivo con el soporte es relativamente baja y muchas veces el cambio en la cinética de la enzima es brusco, pero la estabilidad operacional que se obtiene con este método es muy buena lo cual es importante en procesos continuos donde se considere el reuso de la enzima. De los métodos de inmovilización enzimática que involucran la formación de enlaces covalente, el de mejor resultados es la inmovilización covalente multipunto, donde intervienen más de un residuo de aminoácido para formar enlaces covalentes con el soporte a usarse. Muchos materiales se han usado para este tipo de inmovilización enzimática como vidrio poroso, poliacrilamida, celulosa y partículas magnéticas pero, el soporte que ha generado los mejores resultados en cuanto a inmovilización covalente multipunto es la glioxil agarosa (Illanes, 2008, pp.157-158).

La inmovilización covalente multipunto incrementa la estabilidad y esto dependerá mucho del número de enlaces covalentes que unan a la enzima con el soporte. Cuando los enlaces entre la enzima y el soporte son muy pequeños y el soporte es rígido, se puede asumir que todas las posiciones relativas de los residuos de aminoácidos de la enzima involucrados en la inmovilización covalente multipunto con respecto al soporte, permanecen inalterables en el caso de existir algún cambio conformacional debido a agentes deformantes, como temperatura y cosolventes orgánicos. Adicionalmente, considerando la naturaleza de este tipo de inmovilización, se asume que este tipo de cambios conformacionales se ven reducidos al mínimo, por lo que la estabilidad enzimática se mantiene, salvo casos en los que la enzima inmovilizada se haya expuesto a condiciones bruscas (Illanes, 2008, p.158).

El glutaraldehído es un reactivo bifuncional muy usado en la inmovilización covalente a soportes sólidos, es el método más simple en este tipo de inmovilización. Los soportes con grupos aminos activados con glutaraldehído son muy estables y pueden almacenarse a 4°C durante grandes rangos de tiempo y su activación es simple. Adicionalmente el glutaraldehído es un reactivo considerado como GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que

no genera toxicidad en contacto con el humano y permite la aplicación de esta tecnología en la industria alimenticia. Sin embargo, este método presenta algunas dificultades: La unión covalente multipunto no es muy fuerte, la estabilidad química no es la mejor, la reactividad de los grupos de lisina no es óptima y en reacciones llevadas a pH alcalino aumenta la inestabilidad (Illanes, 2008, p.160).

#### **2.2.2.2.2.1.1 Inmovilización enzimática por enlace covalente de lipasas**

A este proceso se lo ha subdividido a su vez en 3 partes: Producción del soporte sólido, activación del soporte e inmovilización de la enzima al soporte sólido (Silva et al., 2012).

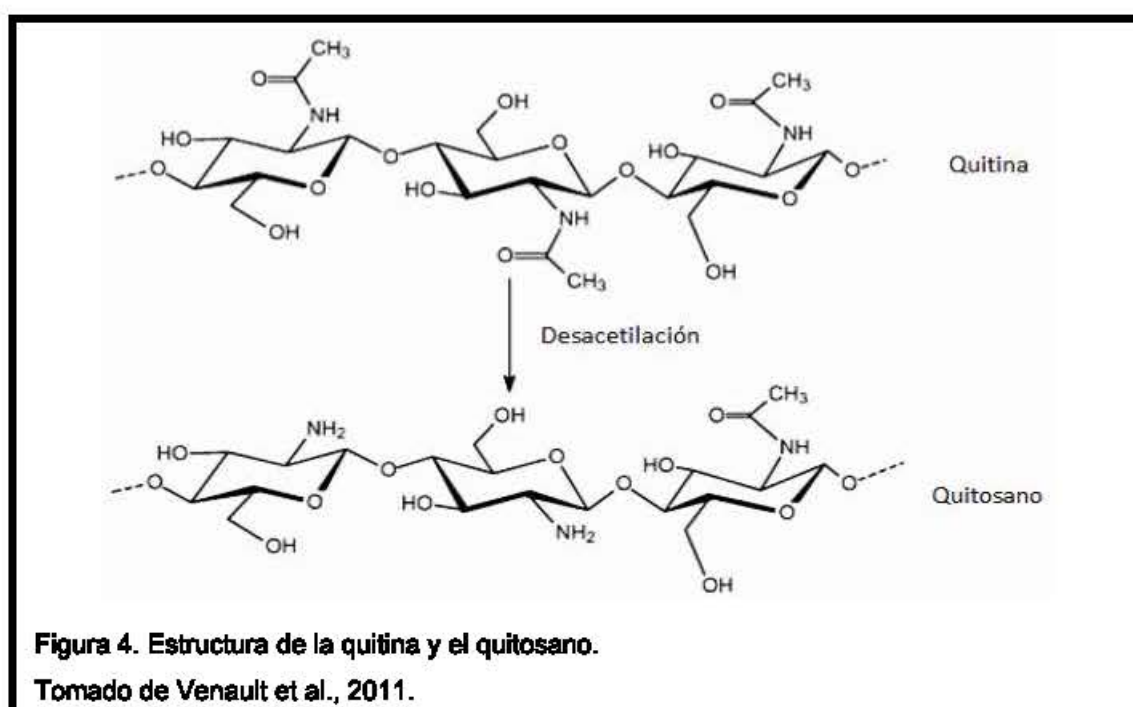
#### **2.2.2.2.2.1.2 Quitosano como soporte para inmovilización covalente de lipasas**

La quitina (Poli-N-acetil-glucosamina) es un polímero muy abundante en el planeta, se la encuentra en su mayoría formando parte de exoesqueletos de crustáceos, también forma parte de paredes celulares de hongos y algunos microorganismos. El quitosano es un derivado de la quitina y se lo obtiene por una hidrólisis alcalina de ésta, lo cual da lugar a una N-desacetilación y a una despolimerización. El quitosano tiene innumerables aplicaciones en muchas áreas de la ciencia y la industria debido a su versatilidad y las ventajas de su naturaleza. Una de las desventajas del quitosano, es que comercialmente a éste se lo encuentra en un amplio rango de pesos moleculares, grados de desacetilación y fuentes de donde se lo obtuvo. Estos parámetros influyen directamente sobre las propiedades del quitosano por lo que estandarizar la metodología para cualquier aplicación resulta complicado (Alsarra et al., 2002).

La principal diferencia entre la quitina y el quitosano es la proporción de grupos amino presentes a lo largo de sus cadenas, caracterizadas por el grado de desacetilación (Figura 4), el cual interviene en muchas propiedades físico



químicas, sobre todo en la solubilidad; la quitina es soluble en solventes orgánicos mientras que el quitosano es soluble en soluciones ácidas (Alsarra et al., 2002). El grado de N-acetilación se mide calculando la tasa de presencia de unidades estructurales 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosas sobre unidades estructurales 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosas. Esta tasa tiene un efecto vital sobre la solubilidad de la quitina. En virtud de esto, se ha establecido que el quitosano es la forma más soluble de la quitina (Venault et al., 2011). El quitosano se comporta como un polielectrolito en medio ácido. Las propiedades reológicas de cada disolución de quitosano dependen del peso molecular del quitosano, grado de desacetilación, distribución de los grupos acetil a lo largo de su estructura, pH de la solución y fuerza iónica (Alsarra et al., 2004).



El momento en que el quitosano solubilizado entra en contacto con una solución alcalina, se produce instantáneamente la gelificación debido a interacciones electrostáticas entre el quitosano que se encuentra cargado positivamente y los grupos  $\text{OH}^-$  cargados negativamente, hallados en la solución de hidróxido de sodio. Este proceso involucra a tres fenómenos: El

primero se refiere al transporte de masa de las moléculas alcalinas (amonio o hidróxido de sodio) hacia la superficie de la solución de quitosano; esta etapa es controlada principalmente por la hidrodinámica local de la solución de quitosano. El segundo fenómeno se refiere a la difusión del  $\text{OH}^-$  de la molécula alcalina a través de las cadenas poliméricas del quitosano desde afuera hacia adentro, y el tercero se refiere a la reacción química entre la molécula alcalina y las cadenas poliméricas del quitosano, las cuales originalmente se encuentran en su forma protonada y previo a la reacción con la molécula alcalina se desprotona. La gelación de quitosano se produce seguido de la formación de dos tipos de interfase dependiendo del estado de agregación de la solución alcalina: Interfase líquido/líquido e interfase gas/líquido. En presencia de la primera interfase, el proceso se denomina gelación húmeda, en el segundo caso en presencia de una interfase gas/líquido, el proceso se denomina Inducción de separación de fases por vapor (VIPS), usado sobre todo para la gelación de polímeros sintéticos (Venault et al., 2011).

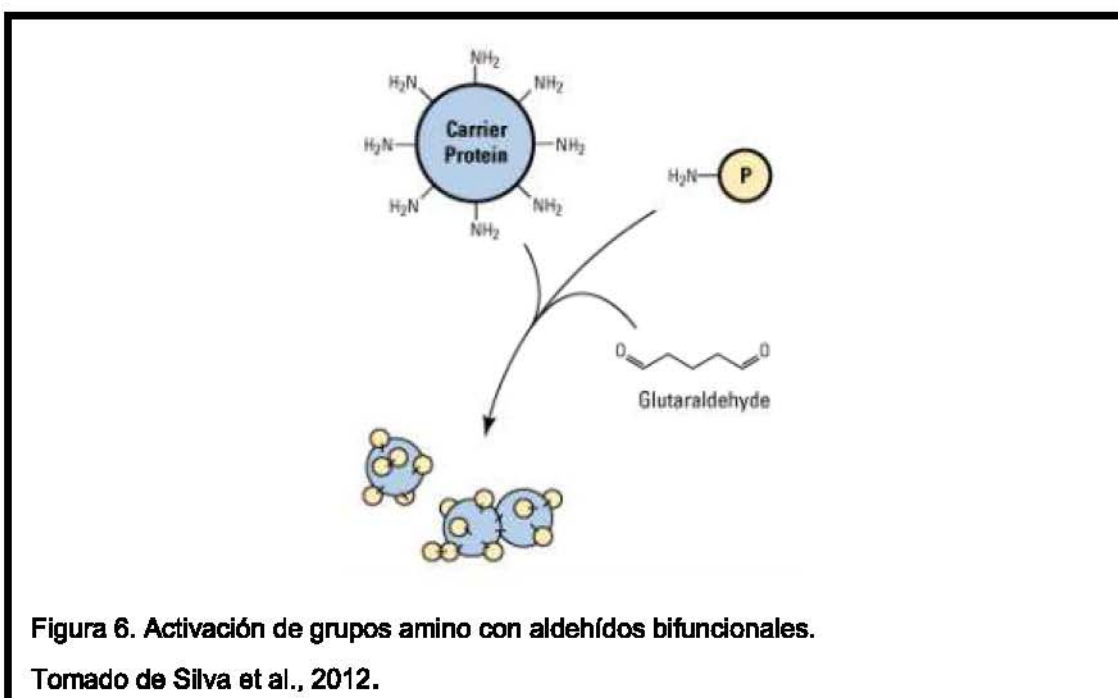
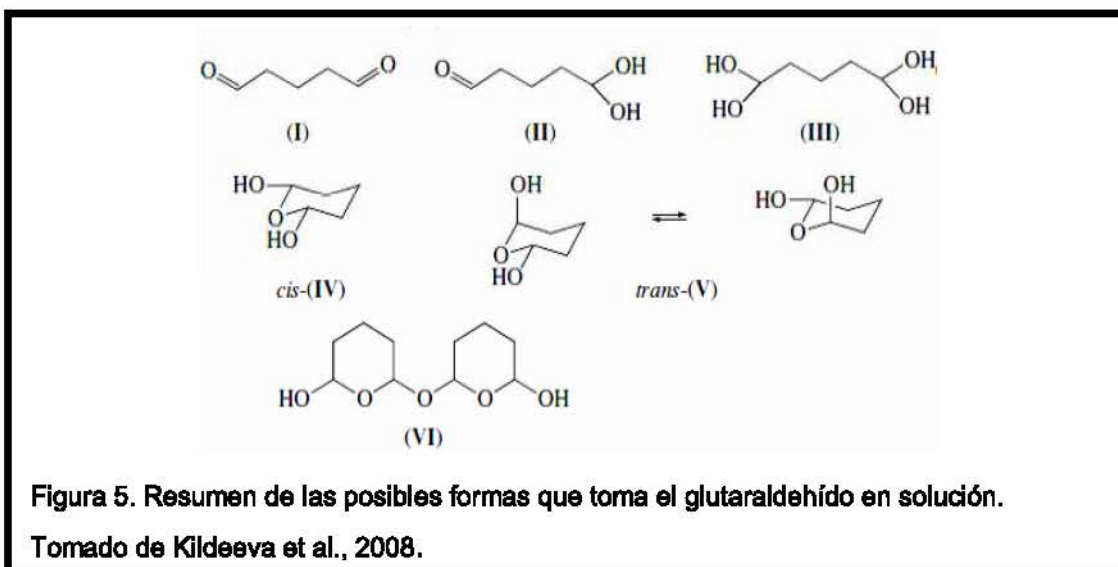
Uno de los obstáculos a sortear en el uso del quitosano es el hinchamiento por sobrehidratación en su forma de hidrogel. Este factor es muy importante al momento de decidir el tipo de soporte que se quiere emplear ya que puede afectar sobre la estabilidad mecánica del soporte y la presencia de agua en el mismo puede alterar la reacción química que se lleve a cabo. La forma más común de quitosano polimerizado son las microesferas. Las microesferas son partículas esféricas que varían en tamaño desde los 50 nm hasta los 2 mm de diámetro, a diferencia de las microcápsulas, las microesferas no contienen nada en su interior. Tanto microcápsulas como microesferas presenta un grado de porosidad variable, lo cual es importante considerar en caso de que se analice la relación área/volumen de los soportes. El quitosano se usa mucho en procesos de inmovilización enzimática ya que posee grupos reactivos que permiten la formación de un enlace covalente entre la superficie de las microesferas de quitosano con los residuos de aminoácidos de muchas enzimas (Venault et al., 2011).

### **2.2.2.2.2.1.3 Glutaraldehído: Reactividad y comportamiento en la inmovilización enzimática**

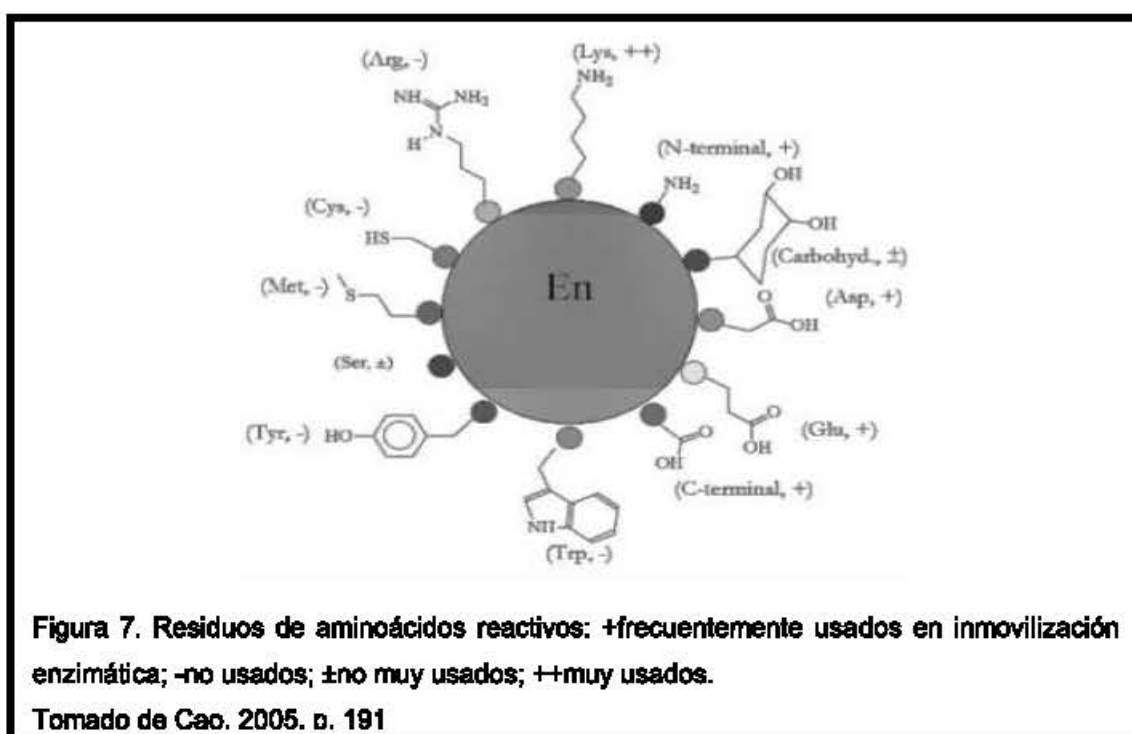
Uno de los reactivos más usados para la inmovilización enzimática por su efectividad y bajo costo es el glutaraldehído. El glutaraldehído es un dialdehído lineal de 5 carbonos, de color claro, aceitoso y pungente, soluble en toda proporción en agua, alcohol y solventes orgánicos. Se encuentra disponible en soluciones ácidas de pH 3-4, en una concentración desde el 2% al 70%. Este reacciona rápidamente con los grupos amino a pH cercano a 7 y es más eficiente que otros aldehídos en cuanto a generación de entrecruzamientos (crosslinks) termo y químicamente estables. El crosslinking se refiere a una interacción física o química que deriva en la unión de dos tipos de moléculas; en nuestro caso el crosslinking se produce entre la enzima lipasa y el quitosano. Estudios sobre el crosslinking de colágeno con monoaldehídos (formaldehído) y dialdehídos de 2 a 6 carbonos (glioxal, malonaldehído, succinilaldehído, glutaraldehído y adipaldehído) demostraron que la reactividad en el proceso se incrementa usando un aldehído de 5 carbonos, consecuentemente se concluyó que el glutaraldehído es el mejor agente de crosslinking. A pesar de la importancia y utilidad de este reactivo, su química es muy controversial; la estructura simple del glutaraldehído no es un indicativo de la complejidad de su entorno y su reactividad en medio acuoso (Migneault et al., 2004).

Es muy importante conocer la estructura y el mecanismo de crosslinking del glutaraldehído para su uso ya que en solución, el glutaraldehído no se limita a su forma monomérica (Figura 5, estructura I). En una solución de concentración del 25% al 50% de glutaraldehído existe una mezcla en equilibrio del aldehído libre lineal (Figura 5, estructura I), aldehído monohidratado (Figura 5, estructura II), aldehído dihidratado (Figura 5, estructura III), aldehído cíclico cis (Figura 5, estructura IV) y trans (Figura 5, estructura V). También se ha reportado que la abundancia de una de las formas depende de la concentración de glutaraldehído en la solución y la temperatura de esta; un incremento en la

temperatura favorece al aumento sustancial del aldehído lineal (Figura 5, estructura I). También se ha reportado que a una concentración mayor al 70%, se da paso a la formación de estructuras poliméricas con la presencia de ciclos hemiacetal (Figura 5, estructura VI). Diluyendo esta solución, el glutaraldehído polimerizado se convierte lentamente en su forma monomérica en pH ácido, lo cual induce a una gran variación en las abundancias relativas de las especies monoméricas y poliméricas (Kildeeva et al., 2008).



Como ya se mencionó antes, el glutaraldehído es muy usado en la inmovilización enzimática como agente de crosslinking enzima-soporte (Figura 6). Se lo ha empleado con muchas enzimas y en un amplio rango de condiciones de reacción. Estas condiciones se han determinado bajo experimentación a prueba y error, ya que la inmovilización es críticamente dependiente de un delicado balance de factores tales como la concentración de la enzima, concentración de glutaraldehído, naturaleza de la enzima (cantidad y tipo de residuos de aminoácidos reactivos para inmovilización, Figura 7) y el glutaraldehído, el pH y la fuerza iónica de la solución, la temperatura y el tiempo de reacción (Migneault et al., 2004).



Para el caso de procedimientos donde la activación del soporte e inmovilización enzimática se lleven a cabo en un solo paso, bajas concentraciones de enzima y glutaraldehído pueden inducir a uniones intramoleculares que pueden causar reacciones entre los residuos de lisina de la misma enzima, lo cual conduciría a una deformación que puede inactivar o desactivar a la enzima. Por esta razón deben determinarse las condiciones de reacción cuidadosamente que favorezcan a la formación de uniones intermoleculares y disminuyan las

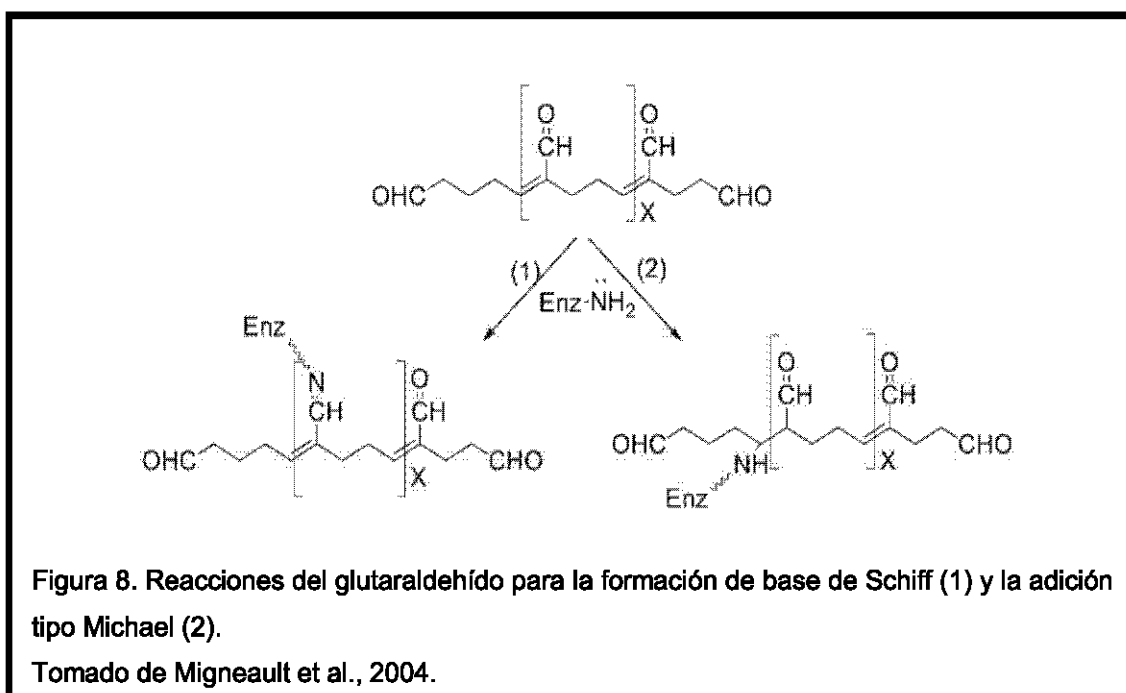
interacciones intramoleculares. Muy bajas concentraciones de glutaraldehído provocan la formación de pocos e insuficientes enlaces en el crosslinking y, por el contrario, altas concentraciones de glutaraldehído conllevan a estructura comprimida debido al exceso de enlaces formados, lo cual puede conducir a la deformación de la enzima conjuntamente con el sitio activo de esta, la actividad enzimática es inversamente proporcional a la cantidad de glutaraldehído usado (Migneault et al., 2004). De acuerdo con Adriano y otros (2005), un aumento en la concentración de glutaraldehído en la activación de las cápsulas de quitosano decrece la tasa de inmovilización de la enzima, tan solo el 1% de glutaraldehído provee de suficientes grupos de aldehído activos en la superficie de las esferas de quitosano, sin embargo, altas tasas de inmovilización de enzima conducen a una inactivación de la enzima ya que se puede favorecer la aparición de restricciones difusionales. Concentraciones muy altas (>5%) de glutaraldehído conducen a una pérdida considerable de actividad debido al exceso de uniones covalentes multipunto que pueden llevar a deficiencias conformacionales.

La reacción de crosslinking con glutaraldehído también es pH-dependiente, el pH óptimo de reacción varía de enzima a enzima, pero como referencia se tiene que el pH óptimo se halla próximo al punto isoeléctrico de la enzima. La existencia de una pH-dependencia indica una fuerte influencia de la carga de la enzima sobre el crosslinking con el soporte; la carga de la enzima regula la reacción de crosslinking, la cual es máxima cuando las cargas repulsivas son mínimas. La inmovilización enzimática se lleva a cabo en un medio de reacción con pH neutro o medianamente alcalino (Migneault et al., 2004).

La temperatura y el tiempo de reacción también influyen en la inmovilización enzimática. Anteriormente las reacciones se llevaban a cabo a temperaturas bajo los 4°C con el fin de preservar la integridad de la enzima, pero el tiempo de reacción se alargaba demasiado (18 horas); hoy en día las reacciones se llevan a temperatura ambiente por lo que el tiempo de reacción se disminuye hasta 4 horas o menos (Migneault et al., 2004).

La cinética de la enzima inmovilizada difiere mucho de la cinética de la enzima soluble, esto se debe a que cada enzima ha cambiado en su estructura y sus propiedades catalíticas, por lo que en inmovilización enzimática se habla de un valor de constante cinética ( $K_m$ ) aparente, propio de cada enzima inmovilizada (Migneault et al., 2004).

La reacción entre la enzima y el glutaraldehído implica la adición conjugada de los grupos aminos de la enzima al doble enlace etilénico (Adición tipo Michael) de los oligómeros  $\alpha$ - $\beta$  insaturados presentes en la solución acuosa de glutaraldehído disponible comercialmente (Figura 8, reacción 1). También se ha propuesto un mecanismo de reacción levemente diferente donde la reacción de adición ocurre en la parte aldehídica de los oligómeros  $\alpha$ - $\beta$  insaturados (y poliglutaraldehído) para dar paso a una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación (Figura 8, reacción 2). Sin embargo, se ha observado que el mecanismo de reacción difiere a diferentes valores de pH (Gupta et al., 2013).



Tanto en medio ácido, neutro o alcalino, la variedad de mecanismos de reacción se debe a la cantidad de formas químicas presentes en equilibrio en

soluciones acuosas de glutaraldehído. Sin embargo, todos los mecanismos se basan en la formación de una base de Schiff que en medio ácido es muy inestable, es por esto que la inmovilización en medio ácido requiere de la adición de agentes reductores como  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{NaBCNH}_3$  con el fin de conferir estabilidad a la base de Schiff dando lugar a una amina secundaria. Este no ocurre en condiciones alcalinas, donde la base de Schiff es muy estable (Barbosa et al., 2013).

El mecanismo de reacción del glutaraldehído en condiciones ácidas o neutras involucra la formación de una base de Schiff. Esta reacción involucra a las especies monoméricas y poliméricas que contienen ciclos hemiacetal. Este ciclo hemiacetal del glutaraldehído reacciona mediante sustitución nucleofílica de los grupos amino de la lisina con el grupo hidroxilo del aldehído. Bajo condiciones alcalinas, el glutaraldehído brevemente sufre una condensación aldólicaintramolecular, dando lugar a las formas poliméricas del glutaraldehído. Estas especies, al igual que las monoméricas, también presentan reactividad y capacidad de llevar a cabo el crosslinking. Las especies poliméricas en medio alcalino reaccionan con los grupos amino mediante dos mecanismos: Primeramente se da la formación de una base de Schiff entre los grupos aldehídos internos del polímero de glutaraldehído, con los grupos amino primarios. En este caso el producto se estabiliza por resonancia de los dobles enlaces conjugados  $\text{C}=\text{C}$ . El segundo mecanismo involucra una adición tipo Michael al doble enlace  $\text{C}=\text{C}$ , sin embargo, este mecanismo es menos estable que la base de Schiff debido a una pérdida de resonancia del enlace doble conjugado, más aún en condiciones de acidez (Barbosa et al., 2013).

## **2.3 Actividad y estabilidad enzimática**

### **2.3.1 Actividad enzimática**

#### **2.2.1.1 Significado de la actividad enzimática**

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica que disminuyen la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación en reacciones termodinámicamente favorables. El aumento en la velocidad de reacción puede



considerarse un concepto de la actividad enzimática (Figura 9). La medición de la velocidad de reacción es un método muy efectivo para cuantificar la actividad enzimática en la reacción de conversión de sustrato en producto mediante la acción catalítica de una enzima (Illanes, 2008, p. 9).

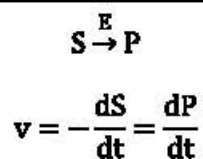


Figura 9. Expresión de la velocidad de reacción (actividad enzimática).

Adaptado de Illanes, 2008, p.9.

Si se sigue el curso de la reacción completa, se obtendrá la gráfica siguiente:

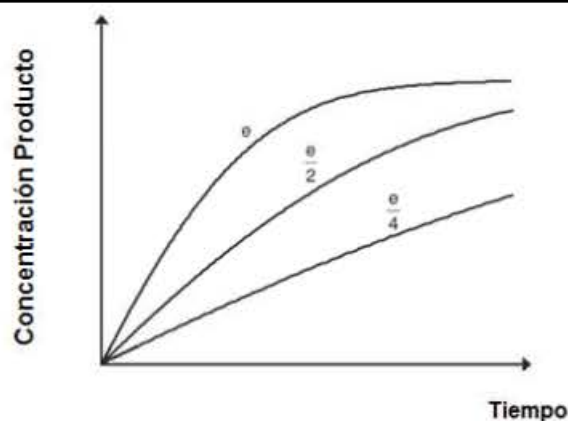


Figura 10. Gráfica concentración de producto vs. Tiempo de reacción con diferentes concentraciones de enzima.

Tomado de Illanes, 2008, p. 9.

La figura 10 sugiere que la velocidad de reacción (pendiente de la gráfica P vs t) disminuye en el transcurso de la reacción por lo que usar la ecuación de velocidad de reacción antes descrita no nos llevaría a un resultado de actividad confiable. La reducción en la velocidad de reacción puede deberse a una desnaturalización de la enzima causada por la transformación del sustrato en producto, inactivación enzimática por exposición a condiciones de reacción

desfavorables, inhibición enzimática por la formación de producto y el desplazamiento del equilibrio como consecuencia de la ley de acción de masas o simplemente concentraciones muy bajas de sustrato o enzima en la reacción. Estos fenómenos varían significativamente la velocidad de reacción con respecto al tiempo de transcurso de reacción, es por esto que para evitar la influencia de ellos en la velocidad de reacción, se mide una velocidad inicial de reacción donde los fenómenos mencionados se vuelven insignificantes. Por consiguiente, la actividad enzimática se define como el máximo potencial catalítico de la reacción en tiempos iniciales (Figura 11). En el caso de enzimas inmovilizadas, la medición de la velocidad en tiempos iniciales es nula, puesto que la difusión del sustrato hacia la enzima se vuelve más compleja. En este caso, la actividad enzimática es representada por el máximo potencial catalítico (Illanes, 2008, pp. 9-10).

$$a = v_{t \rightarrow 0} = - \left( \frac{dS}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = \left( \frac{dP}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}$$

Figura 11. Expresión de la máxima actividad catalítica, medida cuando t tiende a 0.

Tomado de Illanes, 2008, p. 11.

### 2.2.1.2 Determinación experimental de la actividad enzimática

Se basa en la medición o determinación de la cantidad de sustrato consumida en la reacción durante un tiempo determinado. Esta cuantificación se la puede llevar a cabo únicamente cuando se tiene una estequiometría de la reacción determinada que permita saber la cantidad exacta de sustrato empleada en la reacción. Si este no fuera el caso, se debe diseñar un sistema de reacciones acopladas (Figura 12) que permitan predecir la cantidad de cualquier producto formado, independientemente de que sea el producto buscado con la reacción ,y que este producto formado sea cuantificable mediante algún método analítico de medición, el más usado es la espectrofotometría (Illanes, 2008, p. 10).

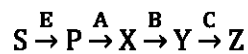


Figura 12. Sistema de reacciones acopladas.

Tomado de Illanes, 2008, p.10.

Unidades tales como miligramos (mg), micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) y unidades (U) son usadas para medir cantidades. La concentración es la cantidad por volumen, así que molaridad (M), micromolaridad ( $\mu\text{M}$ ), miligramos por mililitro (mg/ml) y unidades por mililitro (U/ml) se refieren a concentraciones. La concentración de producto y sustrato invariablemente se expresan en unidades molares (M, mM y  $\mu\text{M}$ ), pero las concentraciones de enzima pueden expresarse en M, mg/ml o U/ml. La cantidad de enzima que se tiene puede ser expresada en moléculas, miligramos, nanomoles o unidades. Una unidad de una enzima es la cantidad de enzima que catalizará la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto bajo condiciones determinadas de reacción. Una unidad (U) es una cantidad, mas no una concentración. Estos cálculos son convenientes cuando la pureza de la enzima es casi total o se sabe la cantidad de enzima que se está añadiendo a la reacción, sin embargo, en el caso de no conocer con exactitud la cantidad de enzima usada, lo más conveniente es manejar los cálculos en términos de cantidad de proteína (Gilbert, 2000, p.97).

Muchos son los métodos descritos para determinar la actividad enzimática, entre los que se puede mencionar los métodos volumétricos, espectrométricos, ensayos con radioactividad, conductivimetría, cromatografía, uso de biosensores y fluorescencia. Para la medición de actividad enzimática de lipasas, uno de los métodos más sencillos y confiables es la espectrofotometría para la cuantificación de una reacción colorimétrica visible. La lipólisis de los ésteres de p-nitrofenil (laureatos, butiratos, oleatos, palmitatos) da como resultado la liberación de un producto de color amarillo llamado p-nitrofenol, susceptible de medición a 405-410 nm. La deficiencia de este método se relaciona con la pH-dependencia del coeficiente de absorbancia de p-nitrofenol, ya que a pH ácido, la absorbancia del p-nitrofenol es nula, adicionalmente se

favorece a reacciones alternativas que desfavorecen la formación del p-nitrofenol (Stoytcheva et al., 2012).

Para la medida de actividad enzimática usando métodos espectrofotométricos, es necesario el planteamiento de un modelo matemático llamado función de transferencia que relacione dos variables, una de entrada y una de salida. En nuestro caso, estas variables son la absorbancia y la concentración. Esta función de transferencia es conocida, en este caso, como la curva de calibración. La curva de calibración es una curva lineal que relaciona a la absorbancia con la concentración de p-nitrofenol, que representa el producto formado en la reacción de hidrólisis de los ésteres de p-nitrofenil. El coeficiente de correlación generado de la gráfica absorbancia vs. Concentración es usado para evaluar el grado de asociación lineal entre estas dos variables (Van Loco et al., 2002).

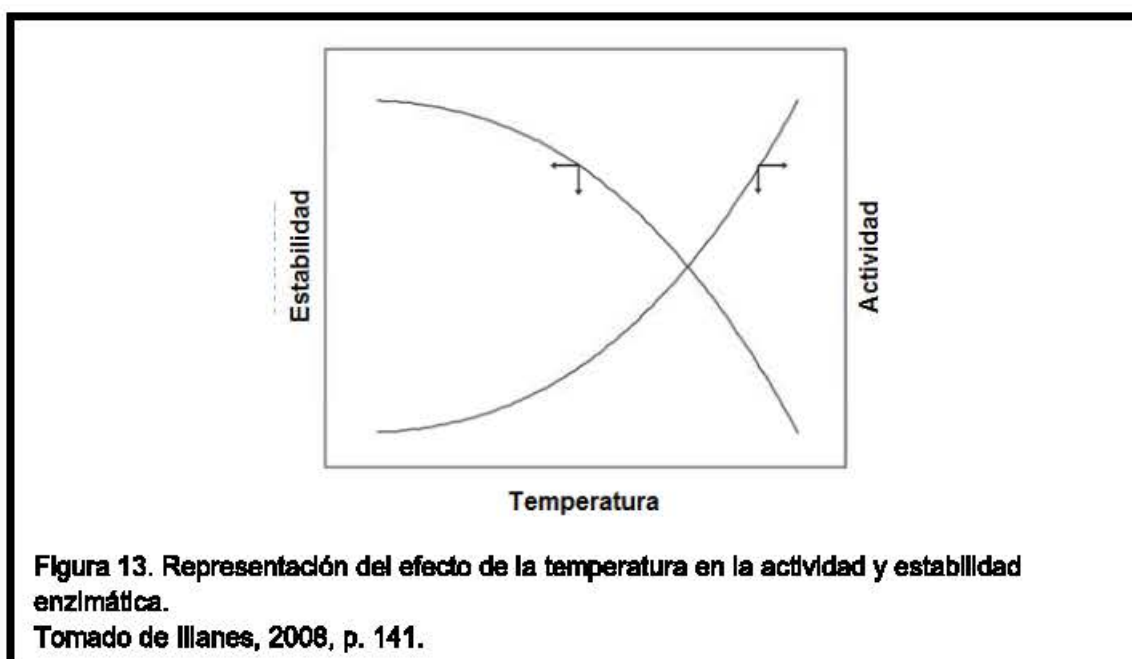
La pendiente resultante de la curva, asumiendo que se mantiene la relación de Lambert y Beer, corresponde al coeficiente de extinción molar, el cual representa la intensidad de absorción de luz por parte de la muestra a una determinada longitud de onda (Bansal, 2003, p.135).

### **2.3.2 Estabilidad enzimática**

Factores críticos en la reacción como la temperatura y el pH no solo afectan a la actividad enzimática, también influyen sobre la estabilidad. Se conoce como estabilidad enzimática a la capacidad que tiene la enzima de retener su actividad. La desnaturalización de la proteína es el factor más influyente en la pérdida de la actividad y estabilidad de la enzima. La desnaturalización implica un cambio estructural de la proteína si alterar la estructura primaria de ella, pero que puede derivar en la pérdida de muchas funciones y propiedades características de la enzima (Illanes, 2008, p.133).

La temperatura es la variable más crítica de cualquier sistema biológico que tiene un efecto profundo sobre la actividad y estabilidad enzimática. A mayor

temperatura la actividad enzimática (velocidad de reacción) aumenta considerablemente ya que afecta la cinética de la reacción sin alterar su grado de reacción. Contrario a esto, a medida que la temperatura aumenta la estabilidad de la enzima disminuye, es por esto que la elección de las condiciones de operación es muy crítica determinando así la temperatura óptima que permita aumentar la actividad enzimática y conservar su estabilidad, con el fin de que la inactivación enzimática sea nula o muy tardía (Figura 13) (Illanes, 2008, p. 141).

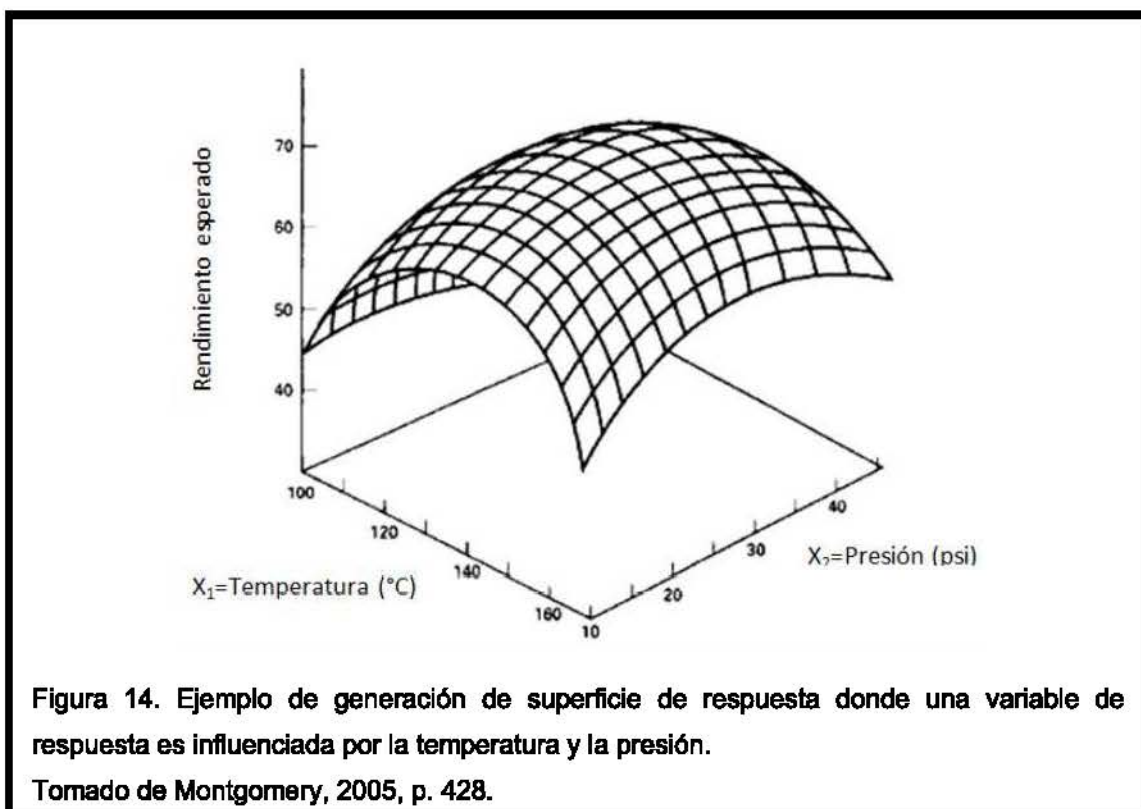


La inmovilización enzimática por enlace a un soporte tiene una gran influencia sobre la estabilidad enzimática. Cuando los brazos espaciadores (entre la enzima y el soporte) son muy pequeños y el soporte es rígido, puede asumirse que todas las posiciones relativas de los residuos de aminoácidos de la enzima envueltos en el enlace permanecen invariables durante cambios conformacionales generados por agentes deformantes como temperatura, pH, solventes orgánicos. Debido a esta conservación de las posiciones relativas de los aminoácidos involucrados en la inmovilización, el cambio conformacional es severamente disminuido (Illanes, 2008, p. 158).

## 2.4 Diseño experimental

### 2.4.1 Diseño de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta comprende un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas con las cuales podemos inferir la influencia de dos o más variables sobre una respuesta, con el objetivo de poder optimizar una respuesta. La finalidad de la metodología de superficie de respuesta es generar una expresión matemática que permita predecir la variable de respuesta en función de las variables analizadas de estudio (Montgomery, 2005, p. 427).



Cada problema analizado tiene un comportamiento en particular, por lo que el éxito del método de superficie de respuesta es elegir el comportamiento adecuado que se acople a nuestra problemática. En muchos de los casos, la función de aproximación es bien representada por una función lineal de las variables independientes, en ese caso la función de aproximación es el modelo de primer orden. En el caso de existir una curvatura, entonces es necesaria la

aplicación de un modelo de orden superior como el modelo de segundo orden (Figura 14) (Kuehl, 2000, p. 424).

Tabla 2. Ecuaciones de los modelos de primer orden y segundo orden para el diseño de experimentos de superficie de respuesta

Modelo Primer orden	Modelo Segundo orden
$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$	$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$

Adaptado de Kuehl, 2000, p. 424.

El diseño central compuesto son diseños factoriales con  $2^k$  combinaciones adicionales correspondientes a puntos axiales. Los puntos más críticos del diseño son los puntos axiales y el punto central del experimento. Este punto central simboliza un óptimo aparente del experimento desprendido de la bibliografía. Los puntos axiales representados como  $\alpha$ , confieren propiedades al diseño experimental como ortogonalidad, rotabilidad y uniformidad. En el caso de considerar que la varianza de los valores estimados sea constante y los puntos axiales sean equidistantes del punto central, encajamos al diseño en una sola característica de las anteriormente mencionadas, la rotabilidad. La rotabilidad se establece infiriendo en un valor de  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ , por lo que el valor de  $\alpha$  para un diseño de superficie de respuestas con dos variables ( $k=2$ ) es de  $\alpha = 1.4$ . Este valor de  $\alpha$  representa a un valor codificado que dará lugar a un valor real para la experimentación que se llevará a cabo. El presente diseño trabaja con valores codificados que, luego de generar la superficie de respuesta, deberán ser descodificados para obtener las respuestas reales correspondientes al comportamiento del fenómeno en estudio (Figuroa, 2003). Para poder encontrar los niveles que optimizan a la respuesta, es decir las condiciones de operación que, según el modelo, generaran la respuesta óptima, se deberá calcular realizando derivadas parciales con respecto a cada variable que, en puntos máximos, mínimos o puntos silla,  $\frac{\partial y}{\partial X_k} = 0$ , donde

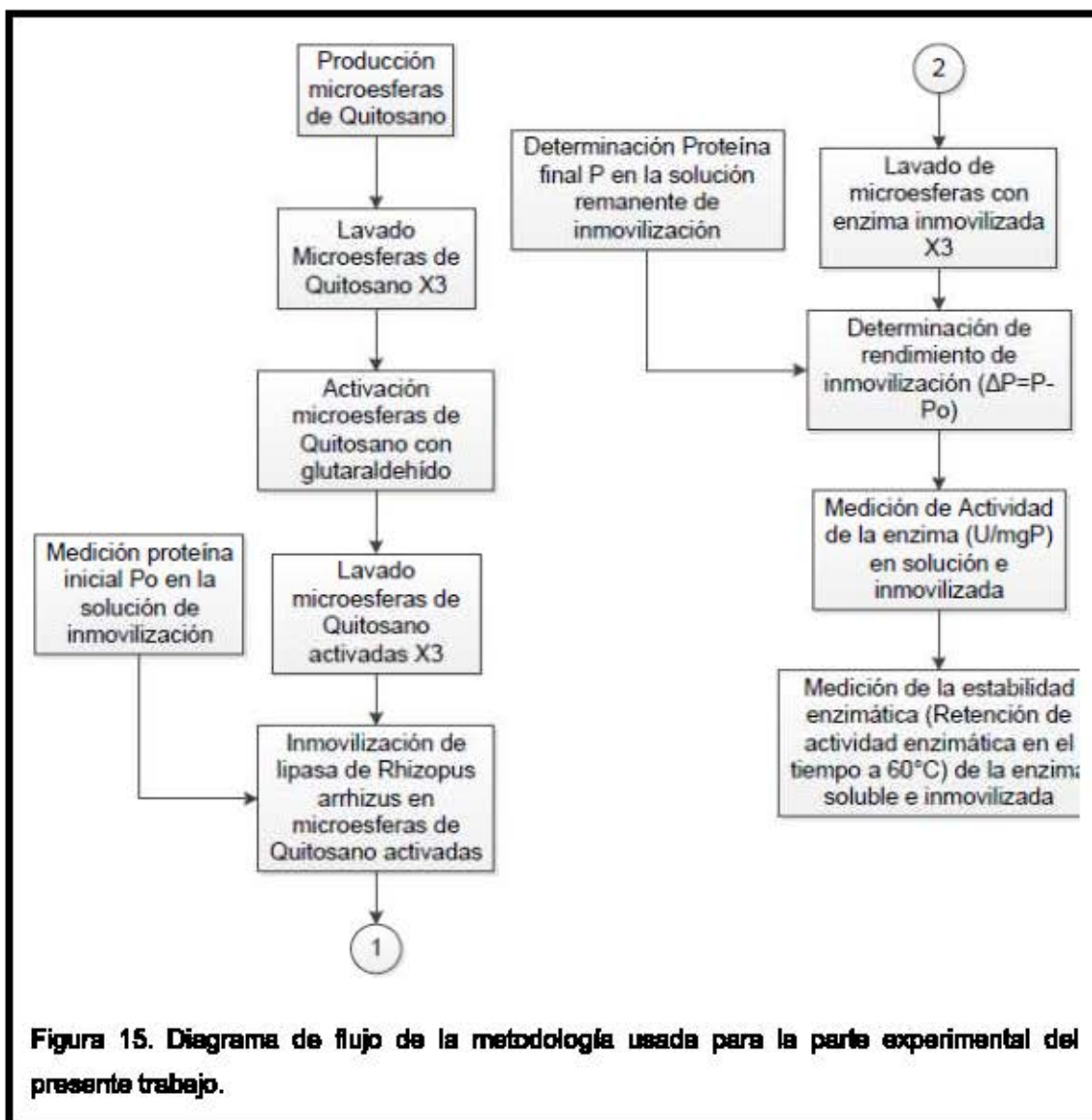
$y = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  representa a la ecuación de comportamiento de las variables de estudio desprendida de una regresión multivariable. Cabe mencionar que las respuestas obtenidas de la derivación corresponden a los valores codificados de las variables de estudio, por lo cual es necesario descodificarlas para obtener los valores reales correspondientes a las condiciones de operación que generarán el óptimo sugerido por el modelo (Montgomery, 2005, p. 436).



## Capítulo III. Metodología

### 3.1 Esquema de la experimentación

El diagrama de flujo propuesto para la presente investigación fue el siguiente:



### 3.2 Detalle de experimentos

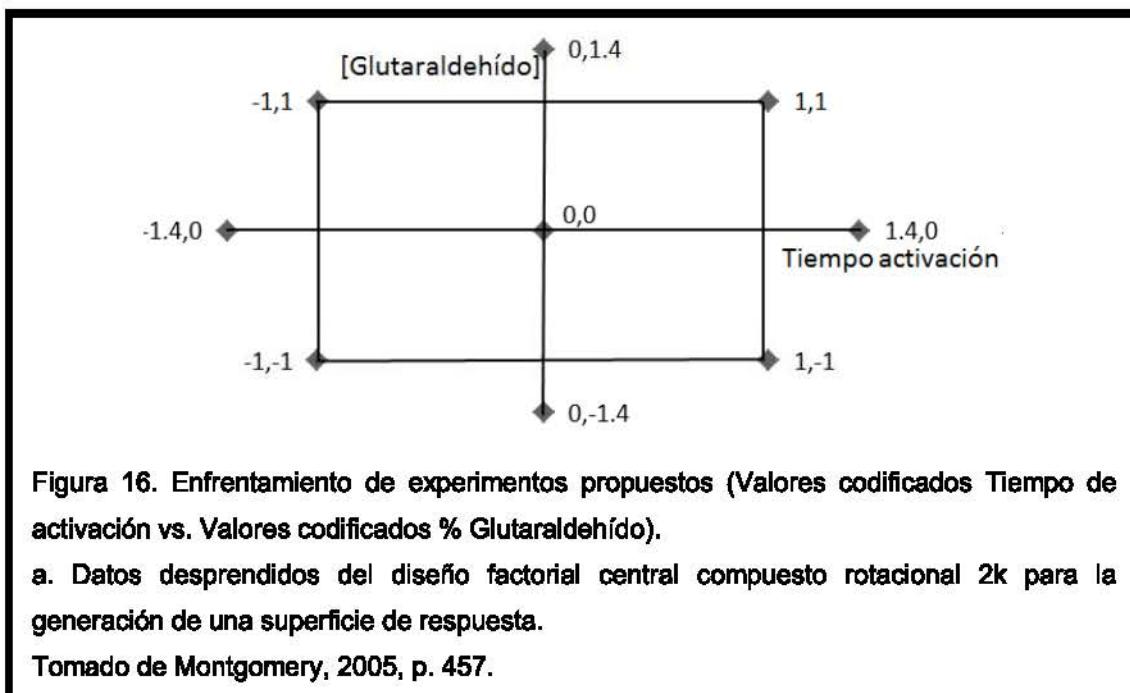
Las variables de estudio fueron la concentración de glutaraldehído empleada en la activación de las microesferas de quitosano y el tiempo de activación. Se

estableció los niveles de medición a evaluarse en la experimentación de la siguiente manera:

Tabla 3. Descripción de los niveles de medición de las variables propuestas

Nivel	Glutaraldehído (%)	Tiempo de activación (min)
+1.4	2.3	102
+1	2	90
0	1.3	60
-1	0.5	30
-1.4	0.2	18

Aplicando los fundamentos del diseño experimental empleado, se cotejó los niveles de medición de las variables de estudio así:



Lo cual, en el presente trabajo, se reflejó en los experimentos citados en la tabla 4. Las combinaciones propuestas se desprenden del diseño experimental

que se usó (Factorial rotacional compuesto  $2^k$  con generación de superficie de respuesta).

Tabla 4. Combinaciones de las variables  $X_1$  y  $X_2$  llevadas a cabo experimentalmente

Experimento	Niveles (Codificación)		%Glutaraldehído	Tiempo activación (min)
	%Glutaraldehído ( $X_1$ )	Tiempo activación (min) ( $X_2$ )		
1	+1	+1	2	90
2	-1	+1	0.5	90
3	+1.4	0	2.3	60
4	-1.4	0	0.2	60
5	0	+1.4	1.25	102
6	0	-1.4	1.25	18
7	-1	-1	0.5	30
8	+1	-1	2	30
9	0	0	1.25	60

### 3.3 Producción de microesferas de quitosano

Se obtuvo microesferas de quitosano mediante la técnica descrita por Gonçalves y otros (2005), goteando una solución de quitosano al 4-5% w/v sobre una solución de hidróxido de sodio 1 M (mol/L). Se usó quitosano de bajo peso molecular de la casa comercial Sigma-Aldrich®. A la solución de hidróxido de sodio que contenía las microesferas se la dejó en agitación a 30 rpm overnight. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Hay que mencionar que el quitosano es un polímero insoluble en agua, por lo que la única forma de solubilizar fue en una solución 1.6 M de ácido acético.

La solución de quitosano fue goteada en la solución de hidróxido de sodio con una jeringa con capacidad de 5 ml y 0.8 mm de diámetro de aguja (Figura 17). Posteriormente a esto se efectuó 3 lavados exhaustivos con agua destilada para retirar el hidróxido de sodio presente en las microesfera y se contabilizó el número de microesferas formadas, con el fin de obtener un estimado de la cantidad de proteína inmovilizada por cápsula. Las microesferas formadas presentaron un diámetro de 1 a 2 mm.

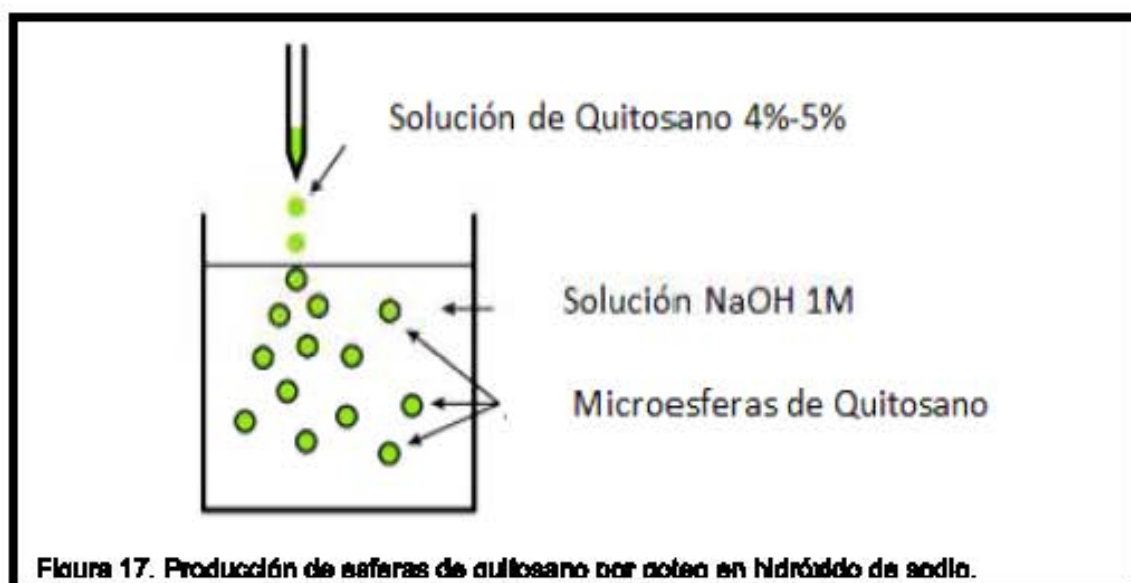


Figura 17. Producción de esferas de quitosano por gota en hidróxido de sodio.

### 3.4 Activación de microesferas de quitosano

Para la activación de las microesferas de quitosano se modificó el método de Silva y otros (2012). Las microesferas de quitosano (0.8 gramos de microesferas) se sumergieron en una solución de buffer bicarbonato pH 10, la cual contenía desde 0.2% hasta 2.3% v/v de glutaraldehído (variable de estudio). La reacción fue llevada a cabo a 25°C y con agitación en un rotor orbital de tubos falcon a 35 rpm durante tiempos que oscilaban entre los 18 y 102 minutos (variable de estudio). En seguida de esto las microesferas activadas fueron sometidas a 3 lavados con agua destilada para eliminar el reactivo de activación sobrante.

### **3.5 Inmovilización de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en microesferas de quitosanopreactivadas**

Para la inmovilización de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en las microesferas de quitosano activadas en el tratamiento químico previo, se las contactó con la lipasa de *Rhizopus arrhizus* adquirida de la casa comercial Sigma Aldrich®, en una solución de búffer bicarbonato de pH 10. Se empleó 10 ml de medio de reacción con una concentración de enzima de 2.5 mg de proteína/gramo de soporte activado. Del medio de reacción se recuperó 1 ml con el fin de cuantificar la cantidad de proteína (Proteína inicial  $P_o$ ) en el medio usando el equipo Qubit® de la casa comercial Invitrogen™.

Seguido de esto, la reacción fue concebida en un rotor orbital de tubos falcon a 35 rpm durante 3 horas. Luego de este tiempo se tomó 1 ml del medio de reacción y se cuantificó con Qubit® para obtener la cantidad de proteína remanente en el medio de reacción (Proteína final  $P_f$ ). Por último, se lavó 3 veces las microesferas inmovilizadas con lipasa de *Rhizopus arrhizus* para eliminar la enzima sobrante la cual, se asume, no se inmovilizó en el soporte.

### **3.6 Determinación del rendimiento de inmovilización**

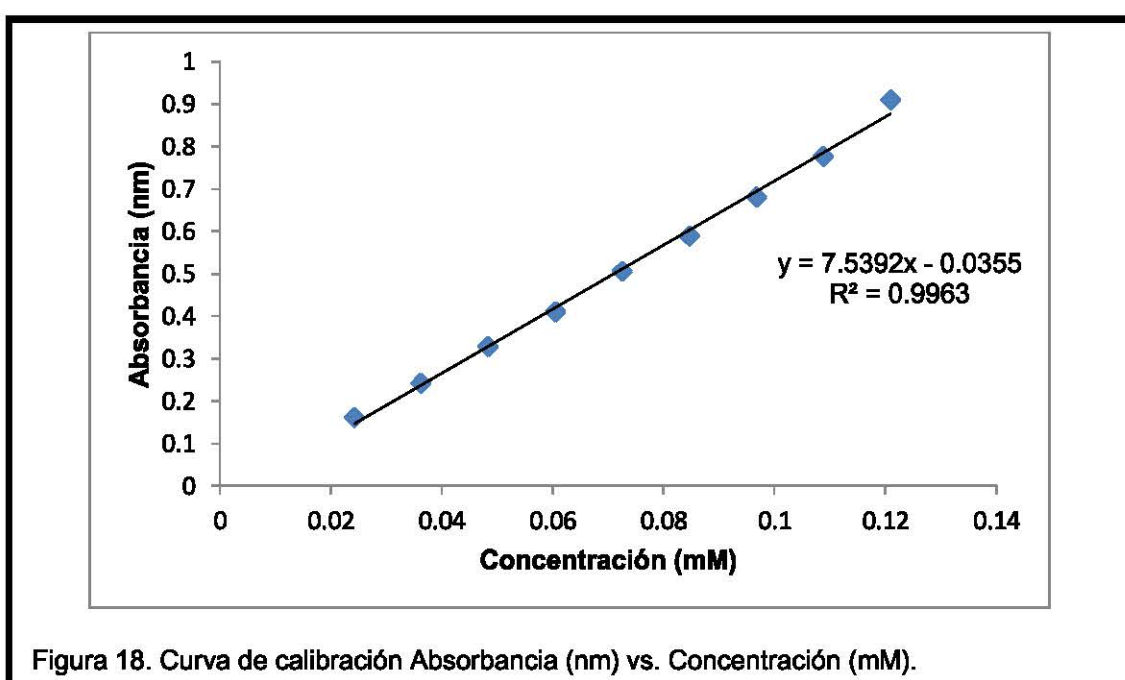
Se define al rendimiento de inmovilización ( $\Delta P$ ) como la cantidad de proteína inmovilizada en las microesferas de quitosano. Para cada experimento se midió la cantidad de proteína inmovilizada antes de la reacción de inmovilización ( $P_o$ ) y después de la reacción de inmovilización ( $P_f$ ) y se procedió a calcular la diferencia  $\Delta P = P_o - P_f$ , donde asumimos que  $\Delta P$  es la cantidad de proteína inmovilizada en las microesferas de quitosano sometidas a inmovilización.

### **3.7 Medición de la actividad enzimática de la lipasa de *Rhizopus arrhizus***

Como ya se mencionó en el marco teórico, el método espectrofotométrico requiere de una reacción directa o acoplada que permita la cuantificación de la aparición de un producto o la desaparición de sustrato en el tiempo. La reacción lipolítica del reactivo p-nitrofenil palmitato da lugar a la aparición de un

producto de tonalidad amarilla llamado p-nitrofenol, lo cual nos permitió cuantificar la actividad de la lipasa (U/mgP).

Se preparó una curva de calibración que relaciona a la absorbancia con la concentración de p-nitrofenol. Esto debido a que a mayor concentración de p-nitrofenol, mayor tonalidad amarilla y por consiguiente mayor absorbancia. El coeficiente de extinción molar de la curva de calibración medida con una longitud de onda de 410 nm fue de 7.5392 (Figura 18).



Para la medición de actividad de lipasas se modificó la metodología de Sung y otros (2006). El p-nitrofenil palmitato es sólido e insoluble en agua, se lo disolvió en una solución con una composición 4:1 de etanol:acetonitrilo hasta llegar a una concentración 6.2 mM.

La reacción fue llevada a cabo de la siguiente manera: En una celda espectrofotométrica de vidrio se añadió 2980  $\mu$ l de búffer Tris-HCl de pH7, seguido de esto se añadió 20  $\mu$ l de una solución de concentración de 2 mgP/ml de la lipasa de *Rhizopus arrhizus* y finalmente se añadió 100  $\mu$ l de la solución 6.2 mM de p-nitrofenil palmitato. En el caso de las lipasas inmovilizadas, la

reacción fue llevada a cabo con 2700  $\mu\text{l}$  de búffer Tris HCl a pH 7, 30 microesferas con la enzima inmovilizada y 200  $\mu\text{l}$  de p-nitrofenil palmitato 6.2 mM. El espectrofotómetro usado fue un Evolution <sup>TM</sup>Thermo Scientific 210 UV-Vis.

La medición se llevó a cabo en la opción "Tasa" presente en el software Thermo Insight<sup>TM</sup>, a una longitud de 410 nm, durante 3 minutos con un intervalo de medición de 3 segundos. Para la medición del blanco se realizó un encerado, lo cual implica la medición a un tiempo cero de la misma muestra, dato que representa a la absorbancia del blanco requerido por la metodología. La pendiente de la curva obtenida representa el valor de velocidad de reacción o actividad enzimática en unidades de mM/min. Para poder trabajar con unidades de actividad enzimática, este valor se debió transformar a U/L, donde 1U (Unidad de actividad enzimática) es equivalente a 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

### **3.8 Medición de la estabilidad enzimática**

La estabilidad enzimática se refiere al tiempo en el cual la enzima es capaz de retener la actividad enzimática. Sometimos a la enzima soluble e inmovilizada a una temperatura de 60°C en baño seco. La actividad enzimática fue medida cada 30 minutos durante las primeras 2 horas y posteriormente cada 24 horas en el caso de la enzima inmovilizada y cada 3 minutos durante 30 minutos en el caso de la enzima soluble.

## Capítulo IV. Resultados y discusión

### 4.1 Resumen

Usando modelos estadísticos pudimos inferir en una ecuación que describe la dinámica de inmovilización de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en soportes de quitosano usando glutaraldehído como agente de crosslinking. Este modelo nos permitió calcular las condiciones óptimas (concentración de glutaraldehído y tiempo en la activación del soporte) con las que se pudo alcanzar la mayor actividad posible. También se estudió la estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada y se la comparó con la estabilidad de la enzima en solución.

### 4.2 Actividad enzimática

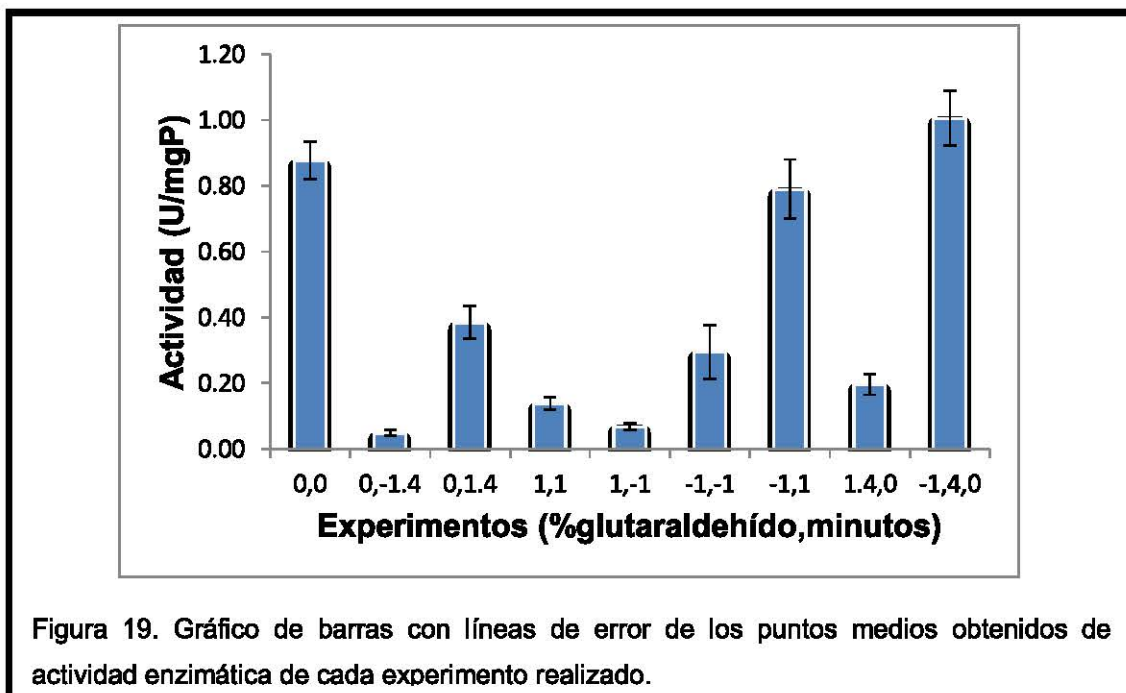
Los experimentos llevados a cabo, detallados en la sección de metodología del presente documento, tuvieron los siguientes resultados de actividad:

Tabla 5. Resultados de actividad enzimática obtenidos en la experimentación

$X_1$	$X_2$	Media	Desviación Media	Desviación Estándar
0	0	0.88	0.06	0.08
0	-1.4	0.05	0.01	0.01
0	1.4	0.39	0.05	0.07
1	1	0.14	0.02	0.03
1	-1	0.07	0.01	0.01
-1	-1	0.3	0.08	0.12
-1	1	0.79	0.09	0.13
1.4	0	0.2	0.03	0.04
-1.4	0	1.01	0.08	0.12

Para visualizar de mejor manera, se ha representado estos datos en un gráfico de barras de la siguiente manera:





Cada experimento se replicó dos veces y de una forma aleatoria. La desviación standard del punto central fue de 0.08, lo que sugiere una buena reproducibilidad de los ensayos.

Como se puede observar en la figura 19, los valores de actividad más altos se obtuvieron mayormente en los experimentos con los niveles -1.4, -1 y 0 de la variable  $X_1$  correspondiente a concentraciones bajas de glutaraldehído; también se puede notar en la figura 19 que no hay una tendencia específica acerca de la relación entre la concentración de glutaraldehído y la actividad enzimática, razón por la cual se puede considerar la posibilidad de que exista un efecto combinado de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación. A pesar de esto, se tiene la certeza de que las actividades enzimáticas más altas se obtienen cuando se usa las concentraciones de glutaraldehído correspondientes a los niveles -1.4, -1 y 0, correspondientes a concentraciones de glutaraldehído bajas. Posiblemente la lógica nos lleve a pensar que al añadir más glutaraldehído a la reacción de activación del soporte, la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada se verá favorecida, sin embargo numerosa bibliografía y los resultados obtenidos sugieren que la

máxima actividad de enzimas inmovilizadas se alcanza usando concentraciones bajas de glutaraldehído.

Según Hayat (2012, p.351), la concentración de aldehídos ejerce un efecto muy importante sobre la actividad enzimática en la inmovilización de enzimas. Altas concentraciones de aldehídos provocan un exceso en la activación de grupos reactivos en el crosslinking enzima-soporte, lo cual conduce a una inhibición de la actividad enzimática debido a que causa un efecto negativo sobre la preservación de la morfología de la enzima. Estos daños en la enzima se refieren a la deformación de la enzima debido al excesivo crosslinking, evitando así la libre entrada del sustrato al sitio activo de la enzima, lo cual sugiere el apareamiento de restricciones difusionales que impiden la retención de la actividad biológica de la enzima (Migneault et al., 2004).

Según Marty (1985), el decremento en la actividad enzimática debido al excesivo crosslinking enzima-soporte, también puede llevar a la desnaturalización parcial de la enzima debido a la aparición de cambios conformacionales y la rigidificación excesiva de la molécula debido al incremento en la formación de enlaces covalentes.

El tiempo de activación también es importante en la inmovilización enzimática. Según los resultados obtenidos (Figura 19), la mayor actividad se encuentra en los experimentos llevados a cabo durante el tiempo de activación correspondiente al nivel 0 del diseño (60 minutos). Tiempos insuficientes en la activación del soporte generan insuficientes grupos activados para que se lleve a cabo el crosslinking, lo cual afecta negativamente en la actividad; por el contrario, tiempos excesivos de activación causan un crosslinking excesivo, lo cual causa, como se mencionó anteriormente, daños conformacionales de la enzima y su desnaturalización lo cual inactiva a la enzima (Chen et al., 2013).

Lamentablemente, en el gráfico analizado no se puede inferir sobre una tendencia en particular debido a la influencia combinada de la cantidad de

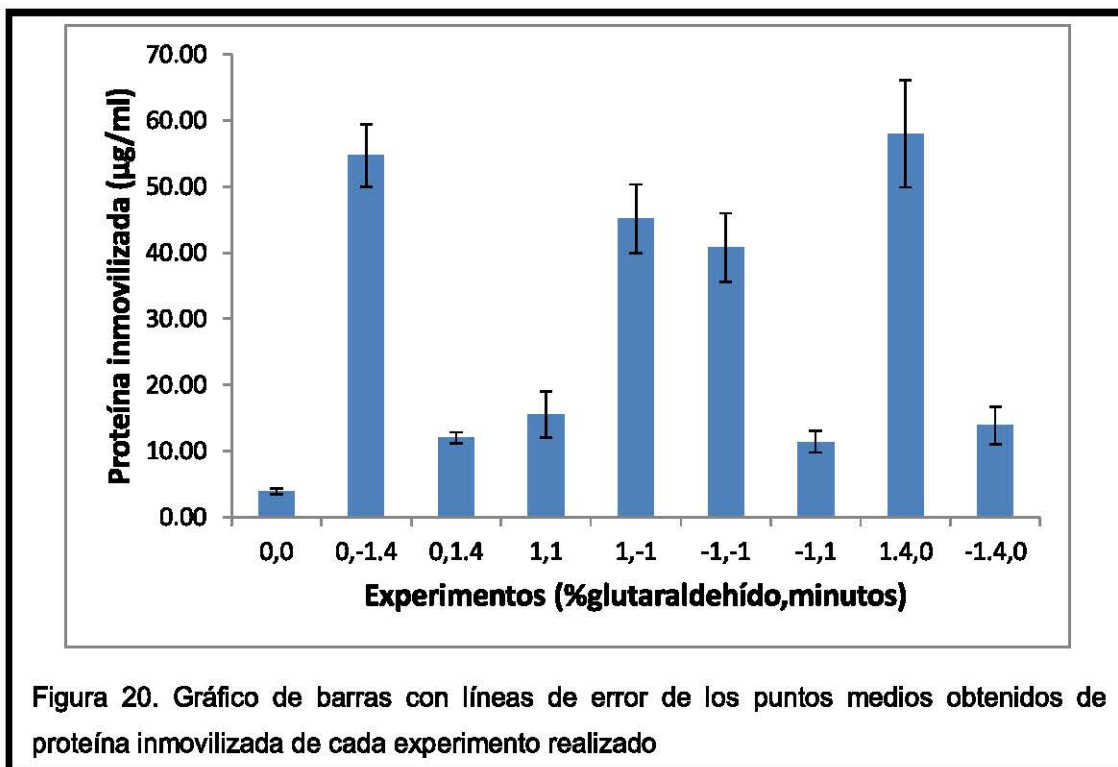
glutaraldehído usado y el tiempo de activación del soporte es compleja, por lo que es conveniente analizar estas relaciones mediante herramientas estadísticas más robustas.

Adicionalmente se midió indirectamente la proteína inmovilizada ( $\mu\text{g/ml}$ ) en las microesferas de quitosano (ver metodología), obteniendo así los siguientes resultados

Tabla 6. Resultados de proteína inmovilizada en 30 cápsulas, obtenidos en la experimentación

$X_1$	$X_2$	Media	Desviación media	Desviación estándar
0	0	3.9	0.4	0.57
0	-1.4	54.71	4.7	6.66
0	1.4	12	0.83	1.18
1	1	15.47	3.46	4.91
1	-1	45.17	5.17	7.31
-1	-1	40.71	5.21	7.37
-1	1	11.38	1.62	2.29
1.4	0	58.02	8.12	11.49
-1.4	0	13.82	2.82	3.99

Igualmente, se representó a los resultados de proteína inmovilizada en un gráfico de barras de la siguiente manera donde se pudo relacionar a la cantidad de proteína inmovilizada con cada uno de los experimentos llevados a cabo, con la finalidad de inferir en una tendencia que complemente a la presente investigación:



Relacionando la actividad enzimática con la cantidad de proteína inmovilizada, podemos observar que en los experimentos donde se obtuvo las actividades enzimáticas más grandes, la cantidad de proteína inmovilizada es muy pequeña. Esto es concordante con lo anteriormente discutido: La mayor actividad enzimática se consigue usando condiciones de inmovilización de tal manera que el crosslinking no sea excesivo o insuficiente, razón por la cual, para la inmovilización enzimática se debe establecer un equilibrio entre todas las condiciones de operación del proceso de tal manera que todas aporten al éxito de la insolubilización (inmovilización) de la enzima. Sin embargo, es necesario definir cuantitativamente la concentración de glutaraldehído y el tiempo donde la actividad enzimática es óptima, es por esto que se ha desarrollado un modelo estadístico de superficie de respuesta (ver metodología).

Con los datos obtenidos de actividad, y los niveles de experimentación correspondientes a porcentaje de glutaraldehído empleado en la activación de las microesferas de quitosano ( $X_1$ ) y el tiempo de activación del soporte ( $X_2$ ),

se generó un gráfico de superficie de respuesta, usando una regresión multivariable (Figura 21).

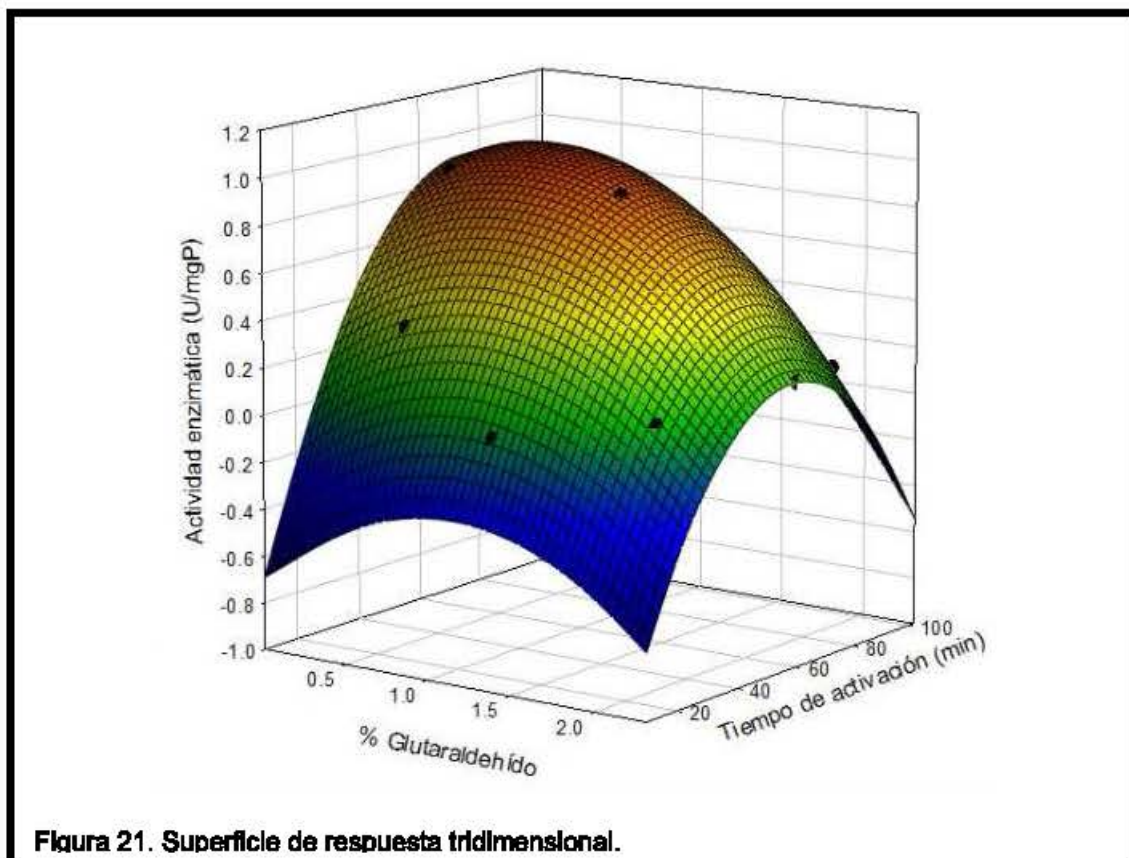


Figura 21. Superficie de respuesta tridimensional.

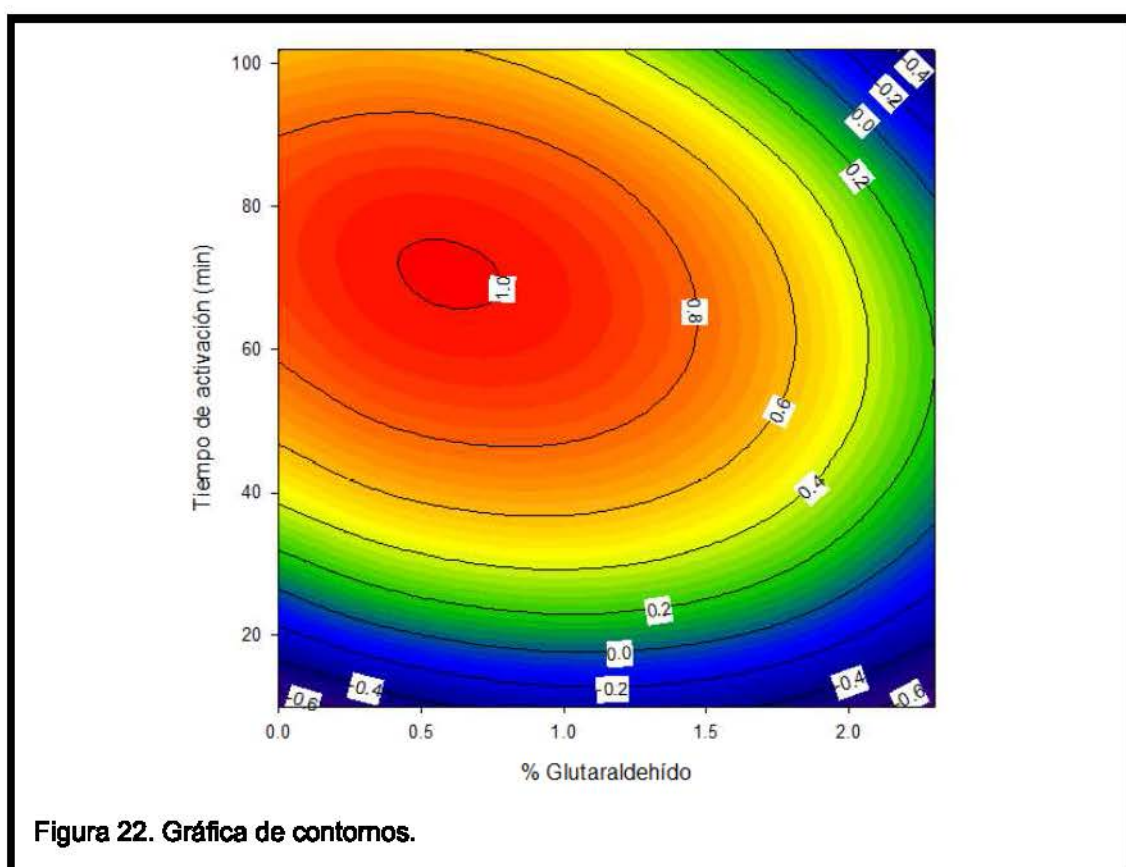
La figura 21 muestra la aparición de una región óptima, la cual está formada por un número infinito de combinaciones que generan la máxima actividad enzimática (U/mgP). También podemos observar que los tratamientos realizados, representados por los puntos superpuestos a la gráfica, se ajustan a la superficie de respuesta generada.

Se obtuvo un valor de  $R^2$  de 0.96, lo cual sugiere que la influencia de las variables  $X_1$  y  $X_2$  sobre la actividad enzimática puede ser descrita con la ecuación generada en la regresión multivariable. Dado que el valor F crítico es mucho menor que el valor F ( $F_{crítica} \leq F$ ), se puede aducir que los tratamientos llevados a cabo son diferentes y su influencia sobre la actividad enzimática varía entre ellos.



Tabla 7. Parámetros estadísticos generados de la regresión multivariable

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.98
Coefficiente de determinación $R^2$	0.96
$R^2$ ajustado	0.93
Error típico	0.08
F	34.67
Valor crítico de F (95%)	8.53E-05



Para mejor comprensión del gráfico tridimensional de superficie de respuesta, se ha generado una gráfica de contornos (Figura 22). En la figura se muestra

las líneas de contorno generadas por las infinitas combinaciones de tratamientos correspondientes a diferentes actividades enzimáticas generadas. La regresión multivariable llevada a cabo para crear la superficie de respuesta, generó una ecuación que describe la influencia de las variables  $X_1$  y  $X_2$  sobre la actividad enzimática estudiada. La ecuación obtenida es la siguiente (Ecuación 1):

$$y = aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 + eX_1X_2 + f \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $a=-0.25$ ,  $b=0.13$ ,  $c=-0.17$ ,  $d=-0.35$ ,  $e=-0.12$  y  $f=0.88$ . y representa a la actividad enzimática (U/mgP),  $X_1$  es el valor codificado de la concentración de glutaraldehído (%) y  $X_2$  es el valor codificado del tiempo de activación del soporte (min). El significado de los valores codificados se aclara más adelante. Es muy conocido que el cálculo de puntos críticos (Máximos, mínimos, regiones de silla) se lleva a cabo mediante derivadas parciales. En puntos críticos esta derivada parcial toma el valor de cero con lo cual se puede proceder a la resolución de la ecuación (James, 1992, p.265). Partiendo de la ecuación 1, derivamos con respecto a cada variable de estudio para así obtener 2 ecuaciones con dos incógnitas de la siguiente manera:

$$\frac{\partial y}{\partial X_1} = -0.25 - 0.34X_1 - 0.12X_2 = 0 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\frac{\partial y}{\partial X_2} = 0.13 - 0.7X_2 - 0.12X_1 = 0 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Del sistema de ecuaciones anterior, se obtuvo valores codificados de  $X_1=-0.84$  y  $X_2=0.33$ . Un valor codificado hace referencia al nivel experimental al que corresponde un valor real de la variable de estudio. Es por esto que a continuación se explicita la manera de convertir el valor codificado en un valor real para cada variable de estudio. Cabe mencionar que los cálculos a continuación aplican para el presente trabajo, no se ha comprobado su efectividad en otros estudios.

$$X_{1\text{Real}} = (X_{1\text{Codificado}} * 3 + 5) * 0.25 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$X_{2\text{Real}} = X_{2\text{Codificado}} * 30 + 60 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Usando las ecuaciones 4 y 5, se obtuvo valores de  $X_1=0.62\%$  de glutaraldehído y  $X_2=70$  minutos de activación. Reemplazando los valores codificados de  $X_1$  y  $X_2$  en la Ecuación 1, tenemos que el valor de actividad máxima generado por el modelo fue de  $y=1.01$  U/mgP. Experimentalmente, bajo las condiciones especificadas en el modelo, se obtuvo actividades entre 0.89 y 1.2 U/mgP, lo cual indica que la ecuación generada es una representación muy aproximada de la influencia de  $X_1$  y  $X_2$  sobre la actividad de la enzima inmovilizada.

La actividad medida de la enzima soluble fue de 8.35 U/mgP, mientras que de la enzima inmovilizada fue de 1.01 U/mgP, lo cual indica que la pérdida de actividad enzimática después de un proceso de inmovilización es considerable, sin embargo, más adelante se analizará la mejora sustancial de la estabilidad (conservación de la actividad) en enzimas inmovilizadas, propiedad que en procesos a escala industrial es la más importante a considerar.

Según Broun (1976) a concentraciones demasiado bajas de glutaraldehído, la activación de grupos reactivos resulta ser insuficiente para dar lugar a la inmovilización enzimática, y a concentraciones muy altas de glutaraldehído, se produce una inmovilización excesiva de enzima, lo cual deriva en problemas como daños conformacionales o desnaturalización de la enzima, produciendo así una pérdida de actividad enzimática.

A nivel molecular, muchas teorías se han propuesto para explicar el mecanismo de reacción del glutaraldehído, sin embargo, la complejidad de la química del glutaraldehído en medio acuoso no ha permitido hasta el momento llegar a un consenso sobre como el glutaraldehído activa los grupos reactivos del quitosano y en general de todos los soportes usados para en inmovilización enzimática.



El glutaraldehído en solución contiene, en equilibrio, una mezcla de varias especies de naturaleza monomérica y polimérica, lo que no se conoce aún es que constitución química del glutaraldehído favorece a la activación de los grupos reactivos del quitosano (grupos amino).

La proporción de cada especie química del glutaraldehído depende sobre todo de la temperatura, pH y concentración de glutaraldehído. Tal es la influencia de la concentración que se ha encontrado la predominancia de especies poliméricas en soluciones concentradas de glutaraldehído, mientras que en soluciones diluidas de glutaraldehído la presencia de especies monoméricas de glutaraldehído predomina (Kildeeva et al., 2008).

Boucher (1972) propuso que las especies monoméricas son las especies activas involucradas en el crosslinking de soportes con proteínas y que la facilidad que presentan las especies poliméricas de revertir la polimerización y regresar a las formas monoméricas depende del pH de la solución, de manera que las soluciones de pH alcalino dan lugar a polímeros más irreversibles, lo cual impide la aparición paulatina de especies poliméricas; en soluciones ácidas ocurre lo contrario.

Según Barbosa y otros (2013) tanto especies monoméricas como poliméricas son reactivas en el crosslinking de proteínas, adicionalmente indica que en condiciones alcalinas las bases de Schiff formadas en el crosslinking son mucho más estables que en condiciones ácidas.

En definitiva, no se sabe la relación exacta entre el mecanismo de reacción del glutaraldehído, la versatilidad de su estructura química, la concentración de glutaraldehído, el pH, la temperatura y su influencia sobre la estabilidad y la actividad biológica de las enzimas inmovilizadas, pero cabe mencionar que la existencia de una gran influencia de la concentración de glutaraldehído sobre la química del glutaraldehído, por consiguiente el mecanismo de reacción, actividad y estabilidad enzimática, es incuestionable.

### 4.3 Estabilidad enzimática

Para analizar la estabilidad térmica estudiada en la enzima en solución, se presentan los siguientes resultados a continuación:

Tabla 8. Valores correspondientes a la actividad de la enzima en solución con respecto al tiempo

Tiempo(s)	Actividad (U/mgP)
0	8.35
60	5.53
120	0.67
180	0.58
240	0.4

La inactivación de las enzimas obedece a una cinética de primer orden, lo cual se representa de la siguiente manera:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * e \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde A representa a la actividad enzimática de la enzima en solución (U/mgP), t es el tiempo de exposición de la enzima en solución a una temperatura de 60°C, y  $k_d$  se refiere a la constante de desactivación (Illanes, 2008, p. 146).

Integrando la expresión anterior, se obtiene un comportamiento logarítmico, con lo cual se puede calcular la  $k_d$  de la siguiente manera:

$$\int \frac{dA}{A} = \int -k_d * dt$$

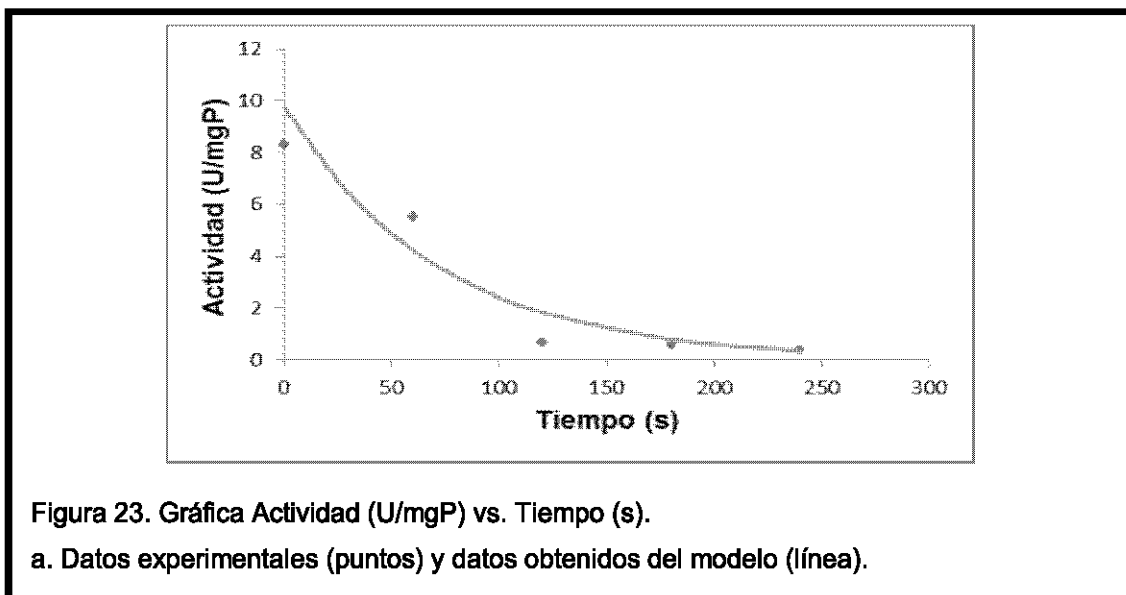
$$\ln \frac{A}{A_0} = -kd * t$$

$$A = A_0 * e^{-kd*t} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Por efectos de cálculo, la ecuación anterior debe ser expresada de manera que tome la forma de la ecuación de la recta  $y = mX + b$  así:

$$\ln A = -kd * t + \ln A_0 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Por consiguiente, en el gráfico  $\ln A$  vs.  $t$ , el valor correspondiente a la pendiente representa a  $-kd$ . De esta forma hemos inferido en un modelo matemático que explica el comportamiento, a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , de la actividad de la lipasa en solución. Con los datos anteriormente citados (Tabla 8), se obtuvo un  $kd$  equivalente a  $0.0139 \text{ s}^{-1}$ , y se pudo inferir sobre valores de actividad predichos por el modelo. Superponiendo los datos experimentales con la curva generada a partir del modelo se pudo crear la siguiente gráfica:



Como se puede notar, los datos experimentales tienen una tendencia muy similar a la del modelo, por lo que el  $kd$  obtenido es una buena representación

de la realidad del fenómeno. Por otra parte, el valor de  $k_d$  obtenido es muy bajo, lo cual sugiere que la inactivación total de la enzima en solución a 60°C es casi inmediata.

La estabilidad no tiene una relación de dependencia con la actividad, pero en la mayoría de los casos tienen una tendencia opuesta. La estabilidad está claramente relacionada a la rigidez molecular, mientras que la actividad tiene que ver con la flexibilidad conformacional. La inactivación enzimática debido a temperaturas altas es consecuencia de un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares responsables de la preservación de los motivos estructurales tridimensionales de la enzima, lo cual conlleva a un daño del sitio activo y en general del funcionamiento de la enzima (Illanes, 2008, p.145).

Para el análisis de la estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada, se empleó la misma metodología que para la enzima en solución.

Tabla 9. Valores correspondientes a la actividad de la enzima inmovilizada con respecto al tiempo

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad (U/mgP)</b>
0	1.01
0.5	1.03
1	1.45
2	2.17
3	2.89
4	2.9
22.75	3.2
26.1	3.2
50.1	3.2
170.1	3.2
194.1	0.21

Estos valores generan una curva que no obedece a un tipo de cinética química determinado, por lo que no es posible obtener un  $k_d$  específico. Sin embargo, cabe mencionar que la enzima inmovilizada a 60°C, permaneció activa cerca de 8 días, lo cual sugiere que la inmovilización enzimática aporta una mejora considerable sobre la estabilidad de la enzima.

Es evidente que la estabilidad de la enzima inmovilizada es muy superior que la enzima soluble. Cuando la enzima se halla en solución, presenta una flexibilidad considerable, dando lugar a cambios conformacionales cuando la temperatura es alta (60°C), esto afecta directamente a la conformación del sitio activo derivando en una inactivación enzimática. La inmovilización de la enzima a un soporte aporta mucho a la estabilidad de la misma debido a que la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte confiere una rigidez a la enzima que evita los daños conformacionales y mantiene la forma y funcionalidad del sitio activo, por lo que la actividad enzimática no varía en un tiempo considerable (Silva et al., 2012). Inclusive, para propósitos industriales, el objetivo principal de la inmovilización enzimática es el mejoramiento de la estabilidad de las enzimas, lo cual permite su uso en procesos prolongados continuos o en procesos de lotes secuenciales (Illanes, 2008, p.166).

Cabe mencionar que la rigidificación de la estructura terciaria de la enzima, generada por la inmovilización enzimática, se obtiene únicamente en los métodos de inmovilización como la formación de reticulados o la inmovilización a soportes pre-activados, donde se propicie la formación de enlaces de tipo covalente (Arroyo, 1998).

Según Illanes (2008, p.141) la temperatura es la variable más crítica en todo sistema biológico. A medida que aumenta la temperatura, la actividad enzimática aumenta considerablemente debido a que afecta la cinética de reacción sin alterar el orden de reacción, esto explica el crecimiento notable de la actividad enzimática obtenida en los datos iniciales de la tabla 9. Sin embargo, el aumento sustancial de la temperatura es inversamente

proporcional a la estabilidad de la enzima, es por esto que observamos un declive de actividad en los últimos datos de la tabla 9. Hay que mencionar que el experimento de estabilidad se llevó a cabo bajo el efecto de una temperatura considerada alta (60°C); a temperaturas óptimas de reacción de la lipasa (30-50°C), se esperaría que la actividad de la lipasa inmovilizada se mantenga por un mayor tiempo (Illanes, 2008, p.140).

## **CONCLUSIONES**

Se desarrolló un protocolo de inmovilización de lipasas relativamente sencillo y económico, que puede ser adaptable a todas las aplicaciones donde se ha empleado a la lipasa.

La concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación de las microesferas de quitosano ejercen un efecto muy marcado sobre la actividad de la lipasa inmovilizada.

El aumento de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación del soporte, afectan negativamente sobre la actividad posiblemente debido a un exceso de enlaces covalentes que pueden dar lugar a daños conformacionales que afecten el sitio activo de la lipasa.

Reducidas cantidades de glutaraldehído y minutos de activación serían las responsables de la generación de insuficientes enlaces covalentes, lo cual causa una actividad enzimática baja o nula.

Se logró establecer la mejor combinación entre concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación de las microesferas de quitosano que permitió llegar a la máxima actividad posible.

Debido a la relación inversa que existe entre la actividad y estabilidad enzimática, se debe conseguir un delicado equilibrio entre estas propiedades que confieran utilidad a la inmovilización enzimática en las diferentes aplicaciones.

La inmovilización enzimática favoreció a la estabilidad de la enzima, fenómeno atribuido a la rigidificación de la estructura terciaria de la enzima debido a la formación de enlaces covalentes entre el soporte pre-activado y la enzima.

Cabe mencionar que las dos variables de estudio son una pequeña parte de todos los factores que pueden influir en la inmovilización enzimática, es por esto que si el protocolo se lleva a cabo a condiciones diferentes a las especificadas en la sección metodología, los resultados indudablemente serán diferentes.

Este trabajo puede dar una nueva percepción sobre el uso de enzimas lo cual beneficia a la generación de una idea más clara sobre su gran aplicabilidad y potencial industrial.



## RECOMENDACIONES

Debido a la complejidad en todo sentido de las enzimas, este protocolo es comprobado para la inmovilización de lipasa de *Rhizopus arrhizus* en microesferas de quitosano de bajo peso molecular. Por la semejanza que existe entre la mayoría de las lipasas, creemos que este protocolo es funcional para una amplia gama de lipasas. Sin embargo, no se estudió su funcionamiento en otro tipo de lipasas y se recomienda plantear una variedad de estudios que determinen la versatilidad y alcance del protocolo.

Debido a los buenos resultados obtenidos, se recomienda estudiar este protocolo en enzimas diferentes a lipasas.

Son muchas las variables que afectan a la actividad y la estabilidad; según bibliografía revisada, las variables que ejercen más influencia en estas propiedades son la temperatura y el pH, es por esto que es importante realizar estudios sobre la influencia de estas propiedades en la inmovilización y enfrentar resultados.

Se recomienda que este trabajo se lo dirija a alguna aplicación o aplicaciones en particular mediante el diseño de bioreactores enzimáticos.

Se sugiere el estudio de la cinética heterogénea de la lipasa inmovilizada con el fin de crear modelos matemáticos que predigan su comportamiento y utilidad en las diferentes aplicaciones a las que se la destine.

Se debe estudiar profundamente el paso de escala laboratorio a escala piloto, y de escala piloto a escala industrial del proceso, con el fin de replicar de la mejor manera los resultados obtenidos en este estudio.

Se recomienda llevar a cabo una investigación más profunda sobre la dinámica del glutaraldehído en solución y su disposición molecular con el fin de

comprender la reactividad de cada forma molecular del glutaraldehído sobre el crosslinking de proteínas.

Es importante llevar a cabo estudios sobre la estabilidad de la lipasa inmovilizada bajo diferentes temperaturas con la finalidad de determinar el efecto de la temperatura en la enzima inmovilizada.

## REFERENCIAS

- Adlercreutz, P., Barros, R., y Wehtje, E. (1996). Immobilization of Enzymes for Use in Organic Media. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 799(1 Enzyme Engine), 197–200. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb33200.x.
- Adriano, W., Filho, E., Silva, J., Giordano, R., y Gonçalves, L. (2005). Stabilization of Penicillin G Acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22(4), 529–538.
- Alsarra, I., Betigeri, S., Zhang, H., Evans, B. a, &Neau, S. (2002). Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*, 23(17), 3637–44.
- Alsarra, I., Neau, S., y Howard, M. (2004). Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing *Candida rugosa* lipase. *Biomaterials*, 25(13), 2645–2655. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.051.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Universidad Complutense de Madrid. *ArsPharmaceutica*, 39(2), 23–39.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, R., Torres, R., Rodrigues, C., y Fernandez, R. (2013). GLUTARALDEHYDE IN BIO-CATALYST DESIGN: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*.doi:10.1039/C3RA45991H.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., y Nampoothiri, K. M. (2013). Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific y Industrial Research*, 72(Mayo), 271–286.
- Brena, B., González-Pombo, P., y Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1051, 15–31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7\_2.
- Broun, G. (1976). Chemically aggregated enzymes. *Methods in Enzymology*. 44, 263–280. doi: 10.1016/S0076-6879(76)44022-3.
- Cao, L. (2006). *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. WILEY-VCH.

- Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., y Shu, G. (2013). The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on the Enzyme Activity of Immobilized  $\beta$  - Galactosidase on Chitosan Bead. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(7), 932–935.
- Dobrev, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., y Krastanov, A. (2011). Characyerization of crude lipase from *Rhizopus arrizus* and purification of multiplicity forms of the enzyme. *BiotechnolyBiotechnol*, 7–12. doi:10.5504/bbeq.2011.0003.
- Figueroa, G. (2003). Optimización de una Superficie de Respuesta utilizando JMP IN. *Mosaicos Matemáticos*, (11), 17–23.
- Gilbert, H. (2000). *Basic Concepts in Biochemistry: A Student's Survival Guide* (2nd ed.). McGraw-Hill.
- Gonçalves, V., Laranjeira, M., y Fávere, V. (2005). Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Polímeros: Ciência E Tecnologia*, 15(1), 6–12.
- Gupta, R., Gupta, N., y Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–81. doi:10.1007/s00253-004-1568-8.
- Gupta, S., Bhattacharya, A., y Murthy, C. (2013). Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 171–190. doi:10.1016/j.bcab.2013.04.006.
- Hayat, M. (2012). *Fixation for Electron Microscopy*. Reino Unido. Londres: Elsevier.
- Ilanes, A. (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparaíso. Chile: Springer.
- James, R. (1992). *The Mathematics Dictionary*. (5ta ed). Estados Unidos. Nueva York: SpringerSciencey Business Media.
- Kildeeva, N., Perminov, P., Vladimirov, L., Novikov, V., y Mikhailov, S. (2009). About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde.

- Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 35(3), 360–369. doi:10.1134/S106816200903011X.
- Marty, J. (1985). Application of response surface methodology to optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22, 88–91.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M., y Waldron, K. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–6, 798–802.
- Noinville, S., Revault, M., Baron, M., Tiss, A., Yapoudjian, S., Ivanova, M., y Verger, R. (2002). Conformational changes and orientation of Humicolalanuginosa lipase on a solid hydrophobic surface: An in situ interface Fourier transforms infrared-attenuated total reflection study. *Biophysical Journal*, 82(5), 2709–19. doi:10.1016/S0006-3495(02)75612-9.
- Roessl, U., Nahálka, J., y Nidetzky, B. (2010). Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnology Letters*, 32(3), 341–50. doi:10.1007/s10529-009-0173-4
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ben Ali, Y., Verger, R., y Gargouri, Y. (2005). N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters*, 579(5), 976–82. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.068.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J., y Bühler, B. (2002). The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 359–366. doi:10.1016/S0958-1669(02)00336-1.
- Silva, J., Macedo, G., Rodrigues, D., Giordano, R., y Gonçalves, L. (2012). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 16–24. doi:10.1016/j.bej.2011.09.011.

- Sirisha, E., Rajasekar, N., y Narasu, M. (2010). Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*, 4(5), 249–252.
- Spahn, C., Minteer, S. (2008). Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, 2(3), 195–200. doi:10.2174/187221208786306333.
- Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., León, J., y Gochev, V. (2012). Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 8, 400–407.
- Sung, B., Lee, C., Yu, B., Lee, H., Lee, J., Kim, M., Kim, S. (2006). Development of a Biofilm Production-Deficient *Escherichia coli* Strain as a Host for Biotechnological Applications Development of a Biofilm Production-Deficient *Escherichia coli* Strain as a Host for Biotechnological Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3336–3342. doi:10.1128/AEM.72.5.3336.
- Tischer, W., y Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chemistry*, 200, 95–126.
- Van Loco, J., Elskens, M., Croux, C., y Beernaert, H. (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, 7, 281–285. doi:10.1007/s00769-002-0487-6.
- Venault, A., Bouyer, D., Pochat-Bohatier, C., Vachoud, L., y Faur, C. (2011). Investigation of Chitosan Gelation Mechanisms by a Modeling Approach Coupled to Local Experimental Measurement. *AIChE Journal*. doi:10.1002/aic.12737.
- Verma, N., Thakur, S., y Bhatt, A. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88–92.