

BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS DE INTERÉS EN BIOTRANSFORMACIONES EN EL ÁMBITO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Dra. Rosa M. Blanco. Instituto de Catalisis CSIC

1. ENZIMAS EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Los enzimas se han usado en la producción de alimentos desde los albores de la humanidad: pan, queso, cerveza. El fuerte incremento de la demanda de enzimas destinados a la industria alimentaria ha incentivado la promulgación de leyes, en las que se regula la clasificación, la autorización para alimentación de enzimas de determinados orígenes, los microorganismos enteros autorizados, o la utilización de enzimas procedentes de organismos modificados genéticamente. La legislación europea¹ está basada en muchos aspectos de la de EEUU, donde para la consideración de GRAS (Generally Recognized as Safe) de un enzima en alimentación se requiere 1.- Demostrar la seguridad del proceso, si no está ya establecida; 2.- Identificar el origen del enzima; 3.- Definir el método de preparación (composición completa del medio, condiciones de fermentación); 4.- Especificaciones del enzima: mono o multimérico o células enteras, impurezas (metales pesados, disolventes), datos comparativos de la composición de un mínimo de cinco procesos del enzima; 5.- Métodos de recuperación del enzima: tipos y niveles de los disolventes empleados, tipos de sistemas auxiliares del proceso (filtración, floculación); 6.- Datos toxicológicos del enzima o microorganismo: Los microorganismos no deben ser patógenos, no producir micotoxinas u otros compuestos químicos tóxicos, no debe producir antibióticos.

Además de las regulaciones que afectan al biocatalizador, las biotransformaciones del ámbito de la alimentación deben también cumplir todos aquellos requerimientos relacionados con la reacción química, donde el uso de algunos reactivos y disolventes es muy restringido. Las reacciones en las que los sustratos implicados son de naturaleza apolar, precisan de un medio de reacción no acuoso en los que se puedan disolver. Las reacciones de condensación catalizadas por enzimas hidrolíticos requieren también la eliminación de agua en el medio, para conseguir el desplazamiento de la constante de equilibrio de la reacción. En estos casos el agua se sustituye por un disolvente orgánico, pero solo unos pocos disolventes están admitidos para procesos de alimentación (por ejemplo acetona). Si al menos uno de los sustratos es líquido en las condiciones de reacción, y los demás sustratos son solubles en éste, las reacciones pueden transcurrir sin disolvente. Este es el caso de las transformaciones de aceites catalizada por lipasas.

Una alternativa de creciente interés es el uso de fluidos supercríticos (CO₂) como medio de reacción. Estos medios son muy hidrofóbicos, y realizan la misión del disolvente, pero su eliminación es total y muy fácil, simplemente modificando la presión del sistema. Esta es una tecnología muy relacionada con la industria alimentaria², especialmente para realizar extracciones de compuestos de interés, pero que también se está intentando aplicar como medio de reacción de las biotransformaciones enzimáticas.

Podemos distinguir dos grandes categorías de uso de enzimas en alimentación: una se refiere a las transformaciones en los alimentos, y la otra a la síntesis enzimática de compuestos que acompañan a los alimentos: aditivos como emulgentes, aromas, nutracéuticos, etc. Muchos de los procesos se realizan con preparados enzimáticos obtenidos a menudo por una sencilla semipurificación a partir de los caldos de fermentación, por lo que suelen contener una cantidad variable de otras enzimas. Estas preparaciones comerciales pueden presentarse en forma sólida o líquida (disoluciones o suspensiones) de los enzimas nativos. Las transformaciones a las que van destinadas abarcan una amplia gama de sectores, aunque el uso de enzimas inmovilizados se restringe prácticamente a los que se describen a continuación.

2. BIOTRANSFORMACIONES CON ENZIMAS INMOVILIZADOS

2.1. Transformaciones en alimentos

Industria láctea. La beta-galactosidasa o lactasa, rompe enlaces O-glicosídicos: hidroliza la lactosa en sus dos constituyentes: glucosa y galactosa. Esta es una reacción de especial interés no solo por su aplicación en nutrición, sino también como gestión de residuos y utilización de subproductos. El principal motivo para hidrolizar la lactosa en la leche es el problema de la intolerancia a la lactosa. La menor tendencia a la cristalización mejora las propiedades de los derivados de leche congelados o concentrados, además los monosacáridos por separado son más dulces. Por estas propiedades se utilizan en helados, cremas y demás productos de pastelería. Hay procesos comerciales que utilizan beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* adsorbida y entrecruzada sobre una resina en reactor en columna (Valio, Finlandia)³, o inmovilizada covalentemente sobre sílice porosa (Corning glass Co)⁴, y enzima de *Kluyveromyces lactis* atrapada en fibras de triacetato de celulosa⁵. Otros procesos de la industria láctea son la coagulación y maduración acelerada del queso:^{6,7} utilizando quimosina de estómagos de rumiantes. El gen de la quimosina de ternera se ha clonado en microorganismos: *Kluyveromyces marxianus* var. *Lactis* (Gist-Brocades), *Escherichia coli* (Pfizer) y *Aspergillus nidulans* (Hansens), aunque no todos los países permiten su uso. La utilización de rennets inmovilizados presenta más inconvenientes que ventajas debido a la dificultad para la accesibilidad de los sustratos macromoleculares y al papel que parece jugar el rennet residual en el cuajo durante la maduración⁸. Para la maduración del queso se suelen usar enzimas solubles o células enteras para aprovechar toda la maquinaria enzimática. Para desarrollar un aroma picante en el queso por liberación de ácidos grasos de cadena corta en el cuajo se añaden lipasas, que para esta aplicación se utilizan en estado nativo.

Beta-glucosidasas en la Industria de vinos y zumos de frutas^{9,10}: Los compuestos responsables de aromas en muchas plantas (terpenos) se encuentran glicosilados y se almacenan como glicoconjugados no volátiles e inodoros. La beta-glucosidasas catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico liberando los compuestos volátiles (monoterpenos) por lo que se utilizan en las industrias de zumos de frutas y sus derivados, principalmente vinos, para potenciar el aroma en ellos¹¹. Los aglicones (terpenoles, norisoprenoides) van unidos a un disacárido, por lo que ha de hacerse una hidrólisis secuencial: Primero con exoglucosidasas (arabinosidasas, ramnosidasas) para liberar un monosacárido, y luego con betaglucosidasas para

liberar el compuesto aromático. Las esterasas que acompañan a las beta-glucosidasas en los preparados enzimáticos comerciales liberan al medio compuestos responsables de aromas indeseables. Una manera de evitarlo es el uso de los enzimas (beta-glucosidasas y también exoglucosidasas) inmovilizados^{12,13}.

Obtención de jarabe de fructosa a partir de maíz. Es la mayor biotransformación a escala mundial con un enzima inmovilizado: glucosa isomerasa, en reactor de lecho fijo, y es el único proceso que se realiza solamente con enzima inmovilizado¹⁴. Esta reacción es la última de una serie de ellas que comienzan con la degradación del almidón por licuefacción de los gránulos molidos, seguida de dextrinización, (ambas con alfa-amilasas solubles), los oligosacáridos se hidrolizan en la etapa de sacarificación (con amiloglucosidasas solubles, y también pululanases) para dar lugar a glucosa. En la última etapa de isomerización, se utilizan reactores en columna con la glucosa isomerasa inmovilizada. Existen preparados comerciales de este enzima inmovilizados por distintos métodos¹⁵: Genecor inmoviliza el enzima sobre DEAE-celulosa aglomerada con poliestireno y TiO₂; Novo-Nordisk entrecruza el material celular con glutaraldehído y lo somete a extrusión; CPC adsorbe el enzima sobre un intercambiador iónico; UOP usa una alúmina tratada con polietilenimina como soporte sobre el que entrecruza el enzima con glutaraldehído.

2.2. Síntesis enzimática de aditivos alimentarios

En general todos los procesos de síntesis de aditivos, aromas y nutraceuticos, suelen utilizar enzimas inmovilizados. Los productos suelen tener un valor añadido mayor que el de los alimentos, a los que acompañan en pequeñas cantidades, lo que rentabiliza el precio del biocatalizador inmovilizado. La síntesis enzimática de estos compuestos permite al fabricante la denominación de "natural", y en muchas ocasiones permite también eliminar un buen número de subproductos indeseables en un alimento: bien por proporcionar sabores desagradables, o coloraciones inapropiadas o incluso por ser tóxicos en mayor o menor grado.

Síntesis de Aspartamo. Se usa Termolisina inmovilizada en un sistema bifásico para unir estereoespecíficamente aspartato N-protégido con D,L-fenilalanina metil éster para dar alfa-aspartamo tras la hidrogenólisis para eliminar el grupo protector. El proceso enzimático elimina la necesidad de proteger y desproteger el grupo beta-carboxilo del aspartato para evitar la formación del isómero sobre el grupo beta-carboxilo, de sabor amargo, y permite usar el racémico del metil éster de fenilalanina, mucho más barato que el isómero L aislado¹⁶.

Modificaciones de grasas y aceites: interesterificaciones catalizadas por lipasas inmovilizadas

La interesterificación catalizada químicamente produce un intercambio de ácidos grasos entre las tres posiciones del esqueleto del glicerol. Sin embargo la catálisis enzimática usando lipasas 1,3-específicas, reduce la migración del acilo a las posiciones 1 y 3, dando una mezcla de triacilgliceroles que no se puede obtener por otros medios. Los triglicéridos, aparte de ser una fuente de energía, son importantes por el aporte de ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles y antioxidantes. Determinan algunas características del producto como la facilidad

para untar, la textura o la liberación de aromas al ingerirlo. Los monoglicéridos tienen mejores propiedades como emulgentes que los diglicéridos. Se usan para estabilizar emulsiones en productos para untar y cremas. La obtención de monoglicéridos por vía química implica altas temperaturas y presiones con procesos de escasa selectividad, en los que se pueden formar subproductos tóxicos y sabores y coloraciones indeseables, por lo que se requieren posteriores tratamientos de separación. La utilización de lipasas ofrece, además de las ventajas comunes del uso de enzimas (condiciones suaves de operación), las relacionadas con su selectividad. La mayoría de las lipasas presentan regioespecificidad hacia las posiciones 1 y 3 del triglicérido, si bien algunas son específicas para la posición sn-1 (lipasa de *Rhizomucor miehe*)¹⁷. También presentan especificidad por el tipo de ácido graso (longitud de la cadena, presencia de dobles enlaces)¹⁸. Algunas lipasas presentan especificidad por acilglicerol: solo actúan sobre mono o diacilglicerol (lipasa de *Penicillium camemberti*).

Las excelentes propiedades de las lipasas han hecho de éstas unos de los enzimas más utilizados no sólo en el ámbito de la tecnología de alimentos. Su estereoespecificidad es una propiedad extremadamente valiosa en procesos de química fina: síntesis de fármacos en los que la quiralidad es de extraordinaria importancia. Por ello se ha trabajado mucho en su inmovilización y existe una enorme cantidad de trabajos en los que se describen diferentes técnicas de inmovilización de lipasas, y también están comercializados muchos preparados de lipasas inmovilizadas. Se han utilizado prácticamente todas las técnicas existentes de inmovilización de enzimas con lipasas^{19,20,21,22} pero sin duda la más extendida es la adsorción por interacciones hidrofóbicas sobre soportes porosos^{23,24,25,26}. La desorción es despreciable en los medios no acuosos de reacción en los que se suelen aplicar. Estos medios vienen impuestos por un lado por la naturaleza hidrofóbica (insoluble en agua) de los sustratos normalmente implicados en las reacciones catalizadas por lipasas. Y por otro lado, su aplicación en reacciones de condensación obliga a una extrema restricción de la presencia de agua.

3. NUTRACÉUTICOS

Es un término de reciente acuñación, y se refiere a compuestos que están a caballo entre los fármacos y los alimentos. Se trata de sustancias que acompañan a los alimentos bien como aditivos exógenos o bien resultan de la modificación de algunos componentes del alimento, que poseen efectos beneficiosos sobre la salud. El ejemplo más conocido es el de los productos lácteos enriquecidos en ácidos grasos omega-3 insaturados, que pueden actuar para reducir la hipocolesterolemia.

3.1. Triglicéridos estructurados

La composición en ácidos grasos, así como su posición en los triglicéridos tiene importantes repercusiones sobre la salud. Los lípidos estructurados están enriquecidos en triglicéridos de determinadas estructuras o en un tipo de ácidos grasos en particular. En esta área es especialmente interesante aprovechar la selectividad que presentan las lipasas. Los triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta en 1 y 3, y un ácido graso de cadena larga e insaturado en la posición 2 presentan un especial interés por su mejor digestibilidad, por lo que se utilizan para individuos con deficiencia pancreática o malabsorción de grasas. Si el triglicérido

presenta el ácido graso deseado en la posición 2, se somete a alcoholisis en las posiciones 1 y 3 para obtener el 2-monoglicérido, que a continuación se esterifica con los ácidos grasos deseados en estas posiciones. En estos procesos puede haber migración de acilos, que se puede evitar con el uso de preparaciones enzimáticas de muy alta actividad: el uso de catalizadores en los que la carga enzimática sea muy alta y que presenten alta eficiencia catalítica permite realizar estas modificaciones en tiempos de reacción muy cortos, lo que impide que tenga lugar la migración de acilos 27

Otro aspecto muy interesante es el **enriquecimiento de triglicéridos en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA)**: eicosapentanoico, docosahexanoico, presentes sobre todo en aceites de origen marino (pescados, microalgas)^{28, 29}. Estos ácidos grasos son importantes por sus propiedades nutricionales y sus efectos beneficiosos sobre la salud. Son muy sensibles a la oxidación, por lo que las biotransformaciones en las que están implicados son preferentemente enzimáticas. Al igual que las modificaciones de triglicéridos comentadas más arriba, los glicéridos enriquecidos en PUFA se pueden obtener por hidrólisis selectiva de los aceites (por ejemplo de pescado: atún, sardina, etc) con una lipasa selectiva por la longitud de la cadena del ácido graso pero no por la posición (*Candida rugosa*) para liberar los PUFA, con los que posteriormente se puede esterificar el glicerol para obtener los triglicéridos enriquecidos en estos ácidos grasos. Otros ácidos grasos interesantes por sus propiedades análogas a los PUFA son el linoleico conjugado, araquidónico y gamma-linoleico.

4. ASPECTOS GENERALES DE LOS BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS

El término biocatalizador puede referirse tanto a enzimas aislados como a células enteras, y cada uno de estos sistemas presenta ventajas e inconvenientes. El uso de células enteras evita las etapas de extracción y purificación necesarias en el caso de enzimas aislados, que acarrearán inactivación y aumento de los costes. En cambio con células puede haber formación de subproductos catalizada por otros enzimas presentes. Además, el paso de sustratos y productos desde la disolución a través de las membranas y paredes celulares puede estar dificultado.

Cuando se trata de enzimas inmovilizados hay que considerar las características generales de estos sistemas, así como aquellas particulares de la aplicación de destino. El principal factor en contra es el precio: al alto coste que supone el aislamiento y purificación del enzima (especialmente si se requiere un alto grado de purificación), hay que añadir el que supone el soporte y el proceso de inmovilización (no sólo los reactivos sino también la manipulación, sobre todo si implica un alto número de pasos o etapas). El grado de purificación depende de la actividad específica deseada. Purificaciones adicionales disparan los costes, aunque reducen las cantidades necesarias de preparados enzimáticos: se pueden alcanzar mayores cargas de enzima activo y mayores actividades del catalizador, lo que reduce el tamaño del biorreactor requerido para la misma velocidad de producción. Sin embargo, si el procedimiento de inmovilización es suficientemente selectivo, no se precisan altos grados de purificación. Ambos procesos de purificación e inmovilización pueden además implicar pérdidas de actividad catalítica. El otro

inconveniente generalizado del uso de biocatalizadores inmovilizados (enzimas y células) son las limitaciones difusionales, que pueden también crear problemas de ajuste de pH.

Las virtudes son, sin embargo, muchas y de gran relevancia. Entre las de índole económica, la principal está relacionada con la posibilidad de reutilización, que hace aumentar notablemente la productividad por unidad de enzima con respecto al uso de enzima soluble. La inmovilización sobre soportes insolubles permite un control más preciso de la reacción, lo que supone además poder trabajar en continuo y automatizar el proceso. Se pueden desarrollar estrategias de estabilización que protejan la actividad catalítica frente a determinadas condiciones adversas de reacción: Por ejemplo, en muchos procesos de alimentos conviene trabajar a altas temperaturas para evitar el crecimiento microbiano, y es necesario un aumento en la termorresistencia del enzima. En el caso de proteasas, la inmovilización evita su autólisis. Otras ventajas del uso de enzimas inmovilizados van dirigidas hacia las cualidades del producto de la reacción. Así, dado que el producto se puede separar fácilmente del biocatalizador, se elimina una la etapa posterior de inactivación del enzima necesaria para los solubles, ya sea para detener la reacción o para evitar la acción de otros enzimas presentes en la preparación comercial. Tanto la inactivación térmica del enzima como estas actividades secundarias, pueden deteriorar las cualidades del producto deseado. El diseño del biocatalizador debe realizarse teniendo en cuenta una serie de parámetros que permitan obtener una elevada actividad catalítica por unidad de peso o volumen, y por ende una elevada eficiencia catalítica. Se entiende por eficiencia catalítica la relación entre la actividad y la carga enzimática del biocatalizador. Por tanto, han de buscarse las condiciones en las que las pérdidas de actividad por efecto de la inmovilización sean mínimas. Para alcanzar cargas enzimáticas altas, el soporte debe presentar valores altos de superficie específica, capaz de albergar una gran cantidad de moléculas de enzima²⁶, y además una estructura interna porosa que haga accesible al enzima toda o al menos la mayor parte de esta superficie. Por ello es importante que el tamaño medio tenga un diámetro entre 5 y 10 veces superior al del enzima. De este modo se facilita la difusión a través de las partículas no sólo del enzima, sino también la de los sustratos^{30,31}. La inmovilización de agregados enzimáticos inactivos supone un notable descenso de la eficiencia catalítica, lo que hace necesario el estudio de las propiedades del sistema para favorecer que la inmovilización tenga lugar formando monocapas de enzima activo sobre la superficie del soporte. Al-Duri ha publicado interesantes estudios para determinar la capacidad de monocapa de soportes hidrofóbicos para inmovilización de distintas lipasas³². El conocimiento del valor de la capacidad de monocapa es crítico a la hora de optimizar la eficiencia catalítica del sistema, pues determina la máxima cantidad de enzima activa que se puede inmovilizar sobre un soporte. Las repercusiones económicas son evidentes, dada la importancia del factor precio en el uso de enzimas inmovilizados, como ya se ha mencionado. La obtención de biocatalizadores con altas cargas enzimáticas y altas eficiencias catalíticas permiten además facilitar el diseño del biorreactor (menor volumen) y del conjunto del proceso (menores tiempos de reacción).

5. PROCEDIMIENTOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Las grandes expectativas depositadas desde hace varias décadas sobre el uso de biocatalizadores inmovilizados han motivado el desarrollo de un gran número de sistemas de inmovilización de células y enzimas. No existe un método ni un soporte ideal aplicable universalmente: éstos han de seleccionarse en función de las características concretas del biocatalizador, de las necesidades particulares del medio de reacción, de los condicionantes de los sustratos y productos de la reacción y del biorreactor.

Se puede encontrar en la literatura abundante información sobre los distintos métodos de inmovilización de enzimas³³, por lo que aquí se presentan solamente algunos comentarios al respecto.

5.1. Inmovilización por unión covalente

Es el método que asegura la no-desorción del enzima. Puede haber pérdidas de actividad catalítica debidas a numerosos factores: la modificación de la superficie de la proteína puede distorsionar la estructura terciaria, la formación de un número de enlaces con el soporte suficientemente alto aumenta aún más esta distorsión, algunos reactivos pueden modificar los grupos del centro activo responsables de la catálisis. Sin embargo estas posibles pérdidas de actividad catalítica se pueden compensar con importantes estabilizaciones que vienen sobre todo de la rigidez de la estructura proteica que proporciona el establecimiento de un alto número de enlaces entre ambas especies: enzima y soporte. La unión del enzima se puede efectuar directamente, sobre el soporte activado con diferentes grupos activos, o bien utilizando agentes entrecruzantes. Los grupos activos pueden estar localizados sobre cadenas largas que constituyen brazos espaciadores, de modo que al alejar el enzima se pueda limitar la extensión de las distorsiones de su estructura tridimensional y mantener así mayores niveles de actividad.

Se pueden usar soportes de muy distintas naturalezas y propiedades, y la activación del soporte se diseña en función de su capacidad de reacción con los grupos del enzima que suelen abundar en su superficie, como se recoge en la tabla:

Grupo del enzima	Método de activación (grupos) del soporte
amino	Aldehidos Glutaraldehido Carboxilos Epóxidos bromuro de cianógeno ésteres de N-hidroxisuccinimida cloruros de tosilo o de tresilo
carboxilos	aminos activados con EDC hidrazida
sulfhidrilos	yodoacetil o bromoacetil, maleimida, disulfuro de piridilo, epóxido
hidroxilos	bis-epóxidos divinil sulfona

En cuanto a la naturaleza de la matriz, como en los otros casos puede ser muy diversa y se tratará en otro apartado.

Entrecruzamiento. Se utilizan agentes entrecruzantes bifuncionales o multifuncionales con los que el enzima puede establecer enlaces intermoleculares covalentemente con grupos del soporte y del propio enzima, o intramoleculares entre dos grupos de la misma molécula de enzima, lo que contribuye a una estabilización adicional del mismo. Entre los agentes entrecruzantes más utilizados están el glutaraldehído y la polietilenimina.

5.2. Inmovilización No covalente:

5.2.1. Adsorción

En general se trata de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas. Este tipo de uniones no suele implicar pérdidas importantes de actividad catalítica. Además, la inmovilización transcurre en un solo paso y una vez inactivado el enzima se puede recuperar el soporte, lo que hace menos gravoso el coste del proceso. Sin embargo, a lo largo de repetidos ciclos de reacción el enzima se puede ir desorbiendo del soporte: La disolución de producto se contamina y además puede haber reacción después de separar el biocatalizador. Es preferible en estos casos el uso de medios de reacción no acuosos, en los que los enlaces entre el enzima y el soporte son más estables.

Interacciones iónicas. Se utilizan soportes con una carga neta definida al pH de la reacción. Es importante conocer el punto isoeléctrico del enzima a inmovilizar, para asegurar que su carga neta al pH de reacción sea la correcta.

Interacciones hidrofóbicas. La interacción tiene lugar por este tipo de interacciones que se establecen a través de zonas de la superficie del enzima ricas en aminoácidos hidrofóbicos. Es la metodología usada más frecuentemente para inmovilizar lipasas, dada la peculiaridad de esta familia de enzimas de presentar zonas altamente hidrofóbicas.

5.2.1.1. Inmovilización por atrapamiento

La técnica más frecuente de atrapamiento pasa por la utilización de fibras. También se puede inmovilizar por atrapamiento enzimas por el procedimiento de sol-gel, por polimerización de la sílice en presencia del enzima²⁰.

5.3. Reactores de membrana

Los enzimas solubles atrapados por una membrana de ultrafiltración dentro de un reactor también se pueden considerar enzimas inmovilizados. Hay dos posibilidades³⁴: Una es el enzima circulando en la luz interior de una fibra hueca o entre dos láminas planas de membrana, y la otra es el enzima adsorbido o unido a la superficie de la membrana de filtración o atrapada físicamente dentro de la membrana.

A diferencia de los sistemas de inmovilización sobre soportes, los reactores de membrana pueden operar en condiciones estériles, importante para la estabilidad

de algunos procesos. Mientras que con el uso de soportes el protocolo de inmovilización puede ser diferente, prácticamente cualquier enzima puede ser retenido por la misma membrana de ultrafiltración.

6. PROPIEDADES DEL BIOCATALIZADOR Y DEL REACTOR

Como ya se ha comentado anteriormente, los condicionantes higiénicos y económicos son primordiales cuando las reacciones tienen lugar en el ámbito de la tecnología de alimentos. Por lo demás, las características y requerimientos del biocatalizador son comunes a los de otras aplicaciones de los enzimas inmovilizados.

6.1. Efectos microambientales

Cuando el enzima está inmovilizado, ya no se encuentra simplemente rodeado del medio externo en el que se disuelven los sustratos, activadores u otros componentes en unas determinadas condiciones (pH, fuerza iónica). Es difícil distinguir si las condiciones reales de las cercanías del enzima son las mismas en la disolución externa, y se suelen apreciar cambios en las propiedades del enzima que no son reales sino aparentes. Las propiedades físico-químicas de la matriz o la presencia de cargas en ésta pueden hacer variar las condiciones en el entorno del enzima³⁵. Así, el pH óptimo aparente de un enzima inmovilizado puede aumentar o disminuir con respecto al del soluble por la presencia de cargas en el soporte, debido a que las cargas del entorno al enzima se neutralizan antes de que el pH en esta zona alcance el pH de la disolución externa. Con lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos se puede también observar un fenómeno de aumento local en la concentración de sustrato, si éste es también hidrofóbico, lo que hace aumentar la eficiencia catalítica del enzima.

6.2. Cambios en las constantes cinéticas

Los cambios de condiciones microambientales pueden condicionar las concentraciones de sustratos, inhibidores o activadores, lo que puede llevar a cambios en las constantes cinéticas (cambios aparentes en la constante de Michaelis), y también a cambios en la velocidad de reacción observada. Es difícil distinguir si estos cambios se deben a la influencia del microambiente o son cambios reales de la K_M intrínseca. Este es el caso cuando la catálisis implica un cambio conformacional del enzima que esté restringido por su inmovilización, y también por impedimentos estéricos en el centro activo del enzima.

Para un enzima soluble la velocidad es función combinada de una serie de parámetros: la temperatura, la concentración de enzima, pH, fuerza iónica, y las concentraciones de productos, inhibidores y por supuesto sustratos. La inmovilización puede afectar a todos ellos, y por tanto a la velocidad de reacción.

Concentración de enzima. La concentración efectiva de enzima es el parámetro que realmente cuenta, y es la cantidad de enzima que está disponible para la reacción. En el interior de los poros la concentración efectiva puede variar por ejemplo debido al tamaño molecular del sustrato: la misma cantidad de enzima puede ser efectiva para sustratos pequeños y no serlo para sustratos

macromoleculares que no puedan acceder al centro activo. En efecto, estos sustratos pueden ser inaccesibles por dos causas: Si el tamaño de los poros no es lo suficientemente grande, el sustrato encontrará una gran dificultad para alcanzar la molécula de enzima. Aun en el caso de que el entramado poroso permita difundir fácilmente al sustrato, el centro activo puede estar orientado hacia el soporte, de manera que un sustrato macromolecular hallaría importantes impedimentos estéricos que podrían no afectar a sustratos pequeños. La presencia de cargas puede repeler sustratos de la misma carga y reducir así también la concentración efectiva de enzima.

Temperatura. Aunque no necesariamente, la propia técnica de inmovilización a menudo puede influir sobre la estabilidad térmica. El mismo soporte puede a veces ser sensible a la temperatura y por tanto podría ser un problema que limitaría el rango operacional de temperaturas del sistema. Este es el caso del uso de fibras huecas, encapsulaciones o sistemas de atrapamiento en gel.

pH. En todos los sistemas de inmovilización se introducen cargas: bien por la técnica de inmovilización o por el material del soporte. Como ya se ha comentado más arriba, la presencia de cargas puede producir cambios microambientales de pH. Esto es especialmente apreciable con enzimas inmovilizados por interacciones iónicas. Además, la presencia de sustancias tamponadoras, como por ejemplo proteínas, también puede cambiar el pH microambiental. En definitiva, al no tener la certeza de que la reacción transcurra en las condiciones de pH definidas por la disolución externa, puede haber pérdidas significativas de actividad por trabajar a un pH distinto del óptimo. Es importante, por tanto, conocer el desplazamiento que experimenta el pH óptimo del enzima inmovilizado.

Fuerza iónica. Tampoco es seguro que la fuerza iónica en el microambiente del enzima sea la misma que la de la disolución circundante.

Concentración de productos, sustratos o inhibidores. Los efectos de carga y difusionales pueden dar lugar a altas concentraciones locales de producto, que a su vez podrían alterar la constante de equilibrio de la reacción, haciendo detenerse la reacción por establecerse concentraciones de equilibrio, o incluso revirtiendo el sentido de la reacción. También puede haber inhibición por producto, disminuyendo la velocidad de reacción. Los cambios en la concentración efectiva de sustratos debidos a cargas o a otros factores ya se han comentado. Más adelante se abordan los factores difusionales. La concentración de inhibidor está sujeta a los mismos efectos que los sustratos y productos de repulsión iónica o atracción, ya sea iónica o de otra índole, aumentando o disminuyendo notablemente sus concentraciones locales.

Velocidad máxima (V_{max}). Como este parámetro depende de la concentración de enzima, todo lo que afecte la concentración efectiva de enzima afectará a la V_{max} .

Constante de Michaelis Todos los factores expuestos (excepto la concentración de enzima) pueden dar lugar a cambios en la K_M observada para el enzima inmovilizado, y este cambio puede ser real o aparente.

6.3. Inactivación y Estabilización

La inmovilización puede hacer disminuir la actividad catalítica del enzima por diversas causas. El caso más drástico es que los residuos del sitio catalítico se vean afectados por algunos reactivos necesarios para la inmovilización por enlace covalente, sufriendo modificación química. El grado de inactivación depende entonces de la población de moléculas de enzima con el centro activo alterado. Es más frecuente y común a todos los métodos de inmovilización, el descenso de actividad se deba a distorsión de la molécula de enzima debida a las interacciones que se establecen con el soporte. En general, una mayor intensidad de unión (es decir, el establecimiento de un mayor número de uniones enzima-soporte) puede acarrear una mayor distorsión, pero también implica una mayor rigidez de la estructura del enzima³⁶, especialmente cuando la unión es covalente. Una de las causas primarias de inactivación térmica de enzimas es la ruptura de las relativamente débiles fuerzas intramoleculares, que dan lugar al desplegamiento de la cadena proteica. Esta mayor rigidez de la estructura terciaria protege a la proteína de estos cambios conformacionales, aumentando así su estabilidad térmica.

6.4. Limitaciones difusionales

El proceso de inmovilización, especialmente cuando el enzima está atrapado en un gel, copolimerizado o adsorbido o unido covalentemente dentro de los poros de una matriz, puede ocasionar problemas difusionales que han de ser considerados. Para que el sustrato pueda actuar, debe difundir desde la disolución externa hasta la capa de líquido más bien estático que rodea la partícula, y luego dentro del poro donde se localiza el enzima, y donde la disolución es casi estancada. El producto debe difundir en el sentido inverso. Estos efectos de transferencia de masa pueden crear problemas en el ensayo y en el uso del sistema de enzima inmovilizado: las velocidades de difusión de sustratos y productos suelen ser menores que la velocidad de reacción, y constituyen el factor limitante de estos procesos, alterando en muchos casos las expresiones cinéticas.

La difusión externa es el transporte de sustratos hasta la superficie del catalizador, y la liberación de los productos desde éste, y tiene lugar en los procesos con poca o ninguna agitación. La constante de velocidad de difusión depende de la naturaleza del componente que se difunde, de las condiciones de turbulencia en la vecindad de la partícula del catalizador y de las propiedades de toda la mezcla. La difusión interna es el transporte de los sustratos desde la superficie de la partícula del catalizador a través de los poros del soporte hasta el centro activo del enzima, y el recorrido contrario de los productos. La velocidad de difusión depende en este caso de la superficie activa del catalizador, su tamaño de partícula y el diámetro de los poros. F. Gòdia analiza y describe la interacción entre la transferencia de materia y la cinética de los biocatalizadores inmovilizados³⁷

6.5. El Reactor

En principio los reactores destinados a realizar biotransformaciones relacionadas con alimentos no tienen por qué diferir de los que se utilizan con enzimas inmovilizados en otras industrias. En general, la optimización del biocatalizador en los términos de eficiencia catalítica descritos en el apartado 4, permite aprovechar las ventajas del uso de enzimas en reactores de todo tipo. Los polisacáridos constituyen soportes resistentes a la agitación, por sus propiedades elásticas, mientras que su compresibilidad es una limitación para su uso en reactores en columna. Por el contrario los soportes de naturaleza inorgánica o los basados en resinas acrílicas son frágiles en agitación y producen gran cantidad de finos que dificultan la filtración, pero son muy resistentes a presiones en los reactores de lecho fijo.

No obstante, como ya se ha apuntado con anterioridad, la necesidad de trabajar en unas condiciones de higiene muy estrictas impone algunas restricciones relacionadas sobre todo con la limitación de crecimiento microbiano. Esto puede significar en algunos casos trabajar a temperaturas relativamente altas, lo que puede ser incompatible con algunos tipos de soportes, y puede acelerar la inactivación de los enzimas. En este sentido, es interesante que al diseñar el biocatalizador además de la inmovilización del enzima, se tenga en cuenta su estabilización y se desarrollen estrategias como la descrita en el apartado 6.3 para aumentar su termorresistencia.

El número de ciclos de reacción en los que un mismo biocatalizador pueda mantener niveles de actividad suficientemente altos (la vida del catalizador) es quizá el parámetro más importante para lograr la implantación industrial de los procesos enzimáticos. Por ello, junto con una elevada eficiencia catalítica, es necesaria también una estabilización del enzima especialmente en procesos destinados a producir alimentos o aditivos alimentarios de no demasiado alto valor añadido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Handbook of food enzymology. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S. Eds. Marcell Dekker, Inc. Nueva York, 59-76 (2003)
2. Turner, C., Persson, M., Mathiasson, L., Adlercreutz, P., King, J.W. Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 111-121 (2001)
3. M Harju. Lactose hydrolysis. *Bull Int Dairy Fed* 212, 50-55, 1987)
4. RA Messing, HH Weethall. US Patent No 3.519.538 (1970)
5. Y Honda, M Kako, K Abiko, Y Sogo. Hydrolysis of lactose in milk. In: A Tanaka, T Tosa, T Kobayashi, eds. *Industrial application of Immobilized Biocatalyst*. Marcel Dekker, New York 1991, 339-362
6. DG Dalgleish. Enzymatic coagulation of milk. PF Fox Editor. *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins*. London Elsevier Science, 1992, 369-404
7. DG Dalgleish. The enzymatic coagulation of milk, PF Fox Editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. London: Elsevier Applied Science, 1987, 63-96
8. A. Carlson, GC Hill, NF Olson. The coagulation of milk with immobilized enzymes: a critical review. *Enz Microbiol Technol* 8:642-650, 1986
9. PJ Williams, CR Strauss, B Wilson, RA Massy-Westropp, Novel monoterpene disaccharide glycosides of vitis vinifera grapes and wines,. *Phytochemistry* 21: 2013-2020, 1982
10. Z Günata, I Dugelay, JC Sapis, R Baumes, C Bayonove. Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In: P Schreier, P Winterhalter, eds. *Progress in Flavour Precursor studies*. Carol Stream IL Allured Publ 1993, 219-234
11. Y Gueguen, P. Chemardin, S Pien, A Arnaud, P Galzy. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized beta-glucosidase. *J. Biotechnol* 55: 151-156, 1997
12. G Spagna, R. Barbagallo, D. Casarini, P.G. Pifferi. A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme and Microbial Technol* 28 (2001) 427-438
13. G. Spagna, RNBarbagallo, PG Pifferi, RM Blanco, JM Guisán Stabilization of a beta-glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2000) 63-69
14. H Uhlig, EM Linsmaier-Bednar. *Industrial Enzymes and Their Applications*. New York: John Wiley & Sons, 1998, 203-223
15. O Misset en Handbook of food enzymology. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S. Eds. Marcell Dekker, Ink. Pg 1059 Nueva York 2003
16. K Oyama, S Irino, N Hagi. Production of aspartame by immobilized thermoase. *Methods Enzymol* 136:503-516, 1987
17. IC Chandler, PT Quinlan, GP McNeill. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides. *J. Am. Oil Chem Soc* 75: 1513-1518, 1988
18. E Charton, AR Macrae. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC335426 lipase A and B in hydrolysis and ester synthesis in organic solvents. *Enz Microbiol Technol* 15: 489-493, 1993
19. AE Ivanov, MP Schneider. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 3, 303-309, 1997

20. IV Chernukhin, EM Klenova. A Method of immobilization on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity. *Analytical Biochemistry* 280, 178-181, 2000
21. JMS Rocha, MH Gil, FAP García. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. *Journal of Biotechnology* 66, 61-67, 1998
22. M Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp. Efficient immobilization of lipase by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 527-534, 1995
23. JA Bosley, JC Clayton. Blueprint for a lipase support: use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnol Bioeng* 43: 934-938, 1994
24. JA Bosley, AD Peilow. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. *J. Am. Oil Chem Soc* 74: 107-111, 1997
25. M. Persson, E Wehtje, P Adlercreutz. Immobilization of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum
26. Blanco, R.M., Terreros, P. Fernández-Pérez, M., Otero, C., Díaz-González, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* 30: 83-93, 2004
27. Torres, C.F., Munir, Blanco, R.M., Otero, C., Hill CG Jr. Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *thermomyces lanuginosa*. *J. American Oil Chem. Soc.* 79:775-781, 2002.
28. I Gill, R Valivety. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Tibtech* 15:401-409, 1997.
29. I.Gill, R. Valivety. Polyunsaturated fatty acids, part 2: Biotransformations and biological applications. *Tibtech* 15: 470-478, 1997.
30. M.J.J. Litjens, K Quyenle, AJJ Straathof, JA Jongejar, JJ Heijnen. Diffusion limitation causes decreased enantioselectivity of esterification of 2-butanol by immobilized *Candida antarctica* B Lipase. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 1-19, 2001.
31. Y Mei, L Miller, W Gao, RA Gross. Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. *Biomacromolecules* 4, 70-74, 2003.
32. B Al-Duri, YP Yong. Characterisation of the equilibrium behaviour of Lipase PS (from *Pseudomonas*) and lipolase 100L (from *Humicola*) onto Accurel EP 100. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 3,177-188, 1997.
33. G.F. Bickerstaff Ed. *Immobilization of Enzymes and Cells* Humana Press. New Jersey 1997.
34. U Kragl in Godfrey & West Eds. *Industrial Enzymology*. Macmillan Press Ltd. Londres 1996, pg 275-283
35. D.J. Lartigue en R.A. Meshing Ed. *Immobilized enzymes for industrial reactors*. Academic Press New York 1975. 125-133
36. Blanco, R.M., Calvete, J.J. y Guisán, J.M. Immobilisation-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme Microbial Technology* 11: 353-359, 1989
37. F. Gòdia en Gòdia Casablanca, f. Y López Santín, J. Editores. *Ingeniería Bioquímica*. Editorial Síntesis. Madrid, 117-126