

Licencia Creative Commons (CC BY-NC 4.0)

Artículos Científicos

DOI: <https://doi.org/10.25009/uvs.vi17.2962>

Estrategias de inmovilización enzimática

Enzyme immobilization strategies

Ghian Emir Sosa Parra ^a | Rodolfo Quintana-Castro ^b
Rosa María Oliart-Ros ^c | Alfonso Alexander-Aguilera ^d
María Guadalupe Sánchez-Otero ^e

Recibido: 12 de julio de 2023.

Aceptado: 23 de febrero de 2024.

^a Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Contacto: ghianemir@gmail.com | ORCID: [0009-0001-0469-6637](https://orcid.org/0009-0001-0469-6637)

^b Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Contacto: roquintana@uv.mx | ORCID: [0000-0001-5188-6110](https://orcid.org/0000-0001-5188-6110)

^c Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México. Contacto: rosa.or@veracruz.tecnm.mx | ORCID: [0000-0003-1204-8792](https://orcid.org/0000-0003-1204-8792)

^d Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Contacto: aalexander@uv.mx | ORCID: [0000-0001-8415-6923](https://orcid.org/0000-0001-8415-6923)

^e Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Contacto: guadsanchez@uv.mx | ORCID: [0000-0002-7916-7158](https://orcid.org/0000-0002-7916-7158) *Autora para correspondencia.

Cómo citar:

Sosa-Parra, G., Quintana-Castro, R., Oliart-Ros, R., Alexander-Aguilera, A. y Sánchez-Otero, M. G. (2024). Estrategias de inmovilización enzimática. *UVserva*, (17), 174-197. <https://doi.org/10.25009/uvs.vi17.2962>

Resumen: La biocatálisis es el uso de enzimas para acelerar las reacciones químicas y posee innegables ventajas sobre la catálisis convencional, ya que disminuye sensiblemente el uso de compuestos tóxicos y disolventes, genera menos residuos peligrosos, y permite trabajar en condiciones menos agresivas de temperatura y pH, a pesar de estas bondades, las enzimas, por su naturaleza proteica, pueden ser fácilmente desnaturalizadas y al ser solubles, no son recuperables del medio de reacción, por ello, la inmovilización enzimática es una especialidad de la biocatálisis en constante desarrollo y crecimiento ya que permite una mayor estabilidad, reuso y fácil recuperación del medio, su aplicación es ya generalizada y va en aumento en industrias tales como la farmacéutica, la de los biocombustibles, la alimentaria y de producción de sabores, fragancias y cosméticos. Las diferentes estrategias para obtener derivados inmovilizados se abordan en el presente documento.

Palabras clave: Biocatálisis; biotecnología; estabilidad de enzimas.

Abstract: *Biocatalysis is the use of enzymes to accelerate chemical reactions and has undeniable advantages over conventional catalysis, since it significantly reduces the use of toxic compounds and solvents, generates less hazardous waste, and allows working in less aggressive conditions of temperature and pH, Despite these benefits, enzymes due to their protein nature can be easily denatured and being soluble, they are not recoverable from the reaction medium, therefore, enzymatic immobilization in a specialty of biocatalysis in constant development and growth since it allows a greater stability, reuse and easy recovery of the medium, its use is already widespread and is increasing in industries such as pharmaceuticals, biofuels, the food industry and the production of flavors, fragrances and cosmetics. The different strategies to obtain immobilized derivatives are addressed in this document.*

Keywords: *Biocatalysis; Biotechnology; Enzyme Stability.*

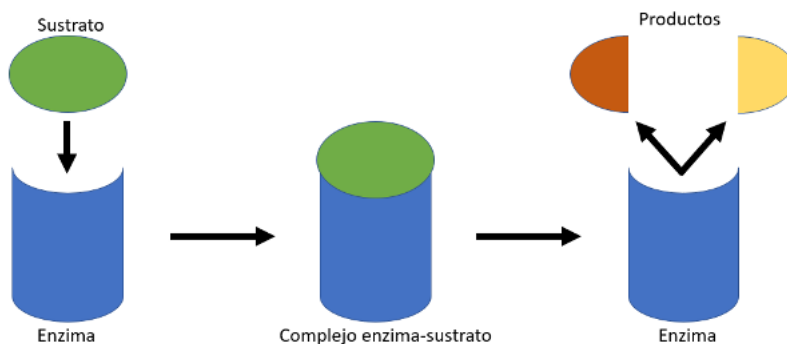
1. Enzimas: los catalizadores de la naturaleza

Las enzimas son moléculas tipo polimérico, es decir formados por unidades repetitivas llamadas aminoácidos que se unen mediante un enlace denominado peptídico y cuyo plegamiento en el espacio forma un ambiente químico óptimo para que una reacción determinada pueda realizarse a mayor velocidad y con un menor consumo de energía, este ambiente y la reacción misma ocurren en el llamado sitio activo de la enzima, donde se fija el sustrato específico (Nelson y Cox, 2014). En la **Figura 1** se esquematiza la conversión de sustratos a productos por las enzimas.

La estructura tridimensional de cada cadena depende de la secuencia de aminoácidos particular de cada enzima. Esta estructura tridimensional se compone de cuatro niveles de construcción, en el que el primero es la secuencia misma de aminoácidos, el segundo es el acomodo en estructuras repetitivas conocidas como alfa-hélices y hojas-beta plegadas; el tercer nivel es el plegamiento producto de la interacción de las estructuras secundarias y el medio donde se encuentra la enzima

inmersa. La estructura cuaternaria se presenta si dos o más subunidades proteicas se ensamblan entre sí para formar complejos globulares (Guzik *et al.*, 2014; Nelson y Cox, 2014).

Figura 1
Representación esquemática de un complejo enzima sustrato



Fuente: Elaboración propia.

Existen miles de enzimas y para su estudio se ha hecho uso de la sistematización, el sitio “ExplorEnz” contiene la lista de clasificación y nomenclatura de enzimas aprobada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). Creado por el Trinity College Dublín en el año 2005 (McDonald *et al.*, 2009; McDonald y Tipton, 2023).

En ese sitio existen más de 6000 entradas y cada una correspondiente a una enzima en particular. La clasificación se basa en un sistema de cuatro números que identifica cada enzima de acuerdo a la reacción que cataliza asociado al nombre aceptado de la enzima. Tradicionalmente había seis grupos (**Tabla 1**), pero a partir del año 2018 se integró un séptimo grupo: las Translocasas.

Tabla 1
Clasificación de las enzimas por reacción catalizada

Clase	Reacción que catalizan
Óxido-Reductasas	Transmisión o traslado de átomos de H.
Transferasas	Transfieren grupos funcionales
Hidrolasas	Ruptura de grupos funcionales inserción de molécula de agua (hidrólisis).
Liasas	Síntesis o ruptura de dobles enlaces por eliminación o adición de radicales.
Isomerasas	Reubicación de grupos funcionales en una misma molécula (interconversión de isómeros).
Ligasas	Catalizan la unión de dos moléculas por medio de enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono azufre y carbono-nitrógeno.
Translocasas	Catalizan el movimiento de iones o moléculas a través de membranas o su ruptura al interior de las membranas.

Fuente: Adaptada de McDonald y Tipton (2023).

Existen nombres genéricos aceptados relacionados al tipo de reacción que cada enzima cataliza tales como oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, racemasa,

epimerasa, isomerasa, mutasa o ligasa. Los nombres sistemáticos consisten de dos partes: una que contiene el nombre del sustrato o en algunos casos los sustratos, separados por dos puntos y la segunda parte a la que se agrega el sufijo -asa, que señala el tipo de reacción, por ejemplo lactato deshidrogenasa, glucosa oxidasa, etc. Estos nombres sistemáticos pueden ser complicados de usar y actualmente la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) trabaja junto con el Comité de nomenclatura de IUBMB para que los nombres utilizados sean prácticos y precisos (McDonald *et al.*, 2009; McDonald y Tipton, 2023).

2. Uso de las enzimas en la industria

Las reacciones catalizadas por enzimas ocurren naturalmente en todos los organismos y muchas de ellas son comunes en diversas clases de organismos (bacterias, vegetales, mamíferos, etc.). Aunque la función de una enzima en un organismo sea análoga a la de otras especies, pueden ser que la secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional tengan diferencias. Con la biodiversidad del planeta, esto genera un abanico de reacciones distintas catalizadas por miles de enzimas (Basso y Serban, 2019; Fasim *et al.*, 2021).

Estas capacidades catalíticas en donde se conjuntan una velocidad de reacción muy elevada y una variedad de reacciones, condiciones y sustratos posibles, hacen que las enzimas sean conocidas como los biocatalizadores más eficientes y diversos, representando así una enorme potencialidad para ser aplicadas en diversas áreas industriales, tales como en la síntesis de fármacos, aromas y sabores, en la industria de los alimentos, de la peletería, en la producción de biocombustibles y detergentes e inclusive en la producción de biosensores y cosméticos (Basso y Serban, 2019; Fasim *et al.*, 2021).

En buscadores científicos y de bases de datos de patentes, es evidente que cada vez más procesos cambian de la química convencional que usa catalizadores químicos convencionales a la biocatálisis cuya eficiencia radica fundamentalmente en el uso de enzimas. La biocatálisis mejora el porcentaje de conversión, la selectividad y especificidad en la reacción, también incrementa los beneficios económicos y ecológicos ya que las condiciones de reacción pueden hacerse más “suaves”, invirtiendo menos energía, menos solventes orgánicos potencialmente tóxicos, generando menor huella de carbono, y maximizando la eficiencia atómica de la reacción, es decir usando todos los átomos disponibles para generar el producto deseado, generando así menos subproductos o desechos (Basso y Serban, 2019; Choi *et al.*, 2015).

El grupo de enzimas más abundantemente usado en diversas aplicaciones son las hidrolasas, se considera que, de todas las enzimas empleadas en la industria, alrededor de un 80 % pertenecen a esta categoría. Su amplio uso se debe a que no necesitan de cofactores, que son de costo relativamente bajo; existe un gran número de enzimas disponibles a precios no tan elevados; son altamente específicas al reconocer sustratos; y pueden ser empleadas en procedimientos y técnicas que usan disolventes no acuosos, como es el caso de las lipasas (Kocabaş *et al.*, 2022). La **Tabla 2** enlista algunas de las principales aplicaciones industriales de las enzimas.

Tabla 2
Algunas aplicaciones de las enzimas

Industria	Tipo	Aplicación
Alimentos	Proteasas	Coagulación de leche, fórmulas infantiles, producción de saborizantes
	Amilasas	Procesamiento de almidones, pectinas y celulosa
	Lipasas	Modificación de grasas y lácteos
Detergentes	Lipasas y proteasas	Eliminación de manchas
Alimentos de mascotas y agrícolas	Fitasas	Digestibilidad del fitato - liberación de fósforo
Bebidas y jugos	Pectinasas	Despectinización, maceración
Textiles	Celulasas	Acabado y suavizado de algodón
Industria farmacéutica y de síntesis orgánica	Lipasas	Resolución de compuestos quirales
	Proteasas	Síntesis de péptidos
Diagnóstico y salud	DNA polimerasas	Diagnóstico por PCR
	Deshidrogenasas y lipasas	Sensores

Fuente: Adaptada de Kirk *et al.* (2002) y Fasim *et al.* (2021).

La mayoría de las enzimas usadas en procesos industriales son de origen microbiano, mayoritariamente provenientes de bacterias y de hongos, esto es debido a que su producción tiene alto rendimiento, una buena relación uso/costo, buena reproducibilidad y rentabilidad; adicionalmente es fácil optimizar su producción. Por lo anterior, en todo el mundo, existen grupos de investigación que trabajan en el aislamiento de nuevas cepas microbianas, la identificación de las enzimas que producen, y su purificación, caracterización y aplicación. A estos esfuerzos se han sumado las nuevas técnicas moleculares tales como la metagenómica, en la que se analiza la secuencia de los ácidos nucleicos de una muestra, lo que permite identificar a una gran cantidad de genes presentes en un ambiente o comunidad microbiana y permite la identificación de nuevas especies, vías metabólicas y la caracterización filogenética y funcional de dichas comunidades (Ansorge, 2016). Esto ha permitido acceder a nuevas y numerosas enzimas para un mercado en constante crecimiento, se estima que la demanda global de enzimas genera un mercado de más de 7 000 millones de dólares anuales (Fasim *et al.*, 2021).

Existe un enfoque multidimensional utilizado en la mejora de los bioprocesos industriales, es decir, aquellos en los que se involucran biomoléculas o microorganismos, que incluye la búsqueda y mejoramiento de cepas microbianas, así como del uso de ingeniería metabólica y evolución dirigida; la bioprospección y el empleo de metagenómica; la optimización de medios de cultivo y sistemas de expresión, así como el diseño de biorreactores; el establecimiento de sistemas continuos de purificación mejora de sistemas secretores, el uso de células completas y la implementación de técnicas de inmovilización de enzimas. La **Figura 2** esquematiza los principales

aspectos de este enfoque multidimensional (Ansorge, 2016; Basso y Serban, 2019; Fasim *et al.*, 2021).

Figura 2

Enfoque multidimensional utilizado en la mejora de los bioprocesos industriales



Fuente: Elaboración propia adaptado de Fasim *et al.* (2021).

Uno de los principales inconvenientes para el uso de enzimas como biocatalizadores es la propia naturaleza proteica de las enzimas; estas biomoléculas son sensibles y propensas a desnaturalizarse en condiciones fisicoquímicas diferentes a las de su actividad óptima.

Tal es el caso de ciertas condiciones normales en procesos industriales, tales como: altas fuerzas iónicas, uso de solventes orgánicos, pHs y temperaturas extremas. Una de las principales estrategias para reducir la desnaturalización de las enzimas en estas condiciones es inmovilizarlas para así aumentar su resistencia estructural y por tanto su actividad catalítica (Maghraby *et al.*, 2023).

La información disponible acerca de los métodos para inmovilizar enzimas, los factores involucrados y las capacidades de dichas enzimas inmovilizadas es amplia, por lo que este documento pretende servir de introducción a los diferentes métodos para inmovilizar enzimas, así como a las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

3. Inmovilización de enzimas

Una vez que se ha decidido establecer un proceso que involucre el uso de al menos una enzima como biocatalizador, se debe determinar si se usará la enzima en forma libre (soluble) o en una forma sólida (insoluble), se le llama enzima inmovilizada, a todas aquellas que se encuentran restringidas en un espacio determinado de forma sólida (Arroyo, 1998). Producir la forma sólida de una enzima significa generar un

biocatalizador que combine estabilidad, selectividad y propiedades cinéticas de la enzima con las propiedades físicas y químicas de los vehículos o soportes sólidos, todo ello para maximizar la estabilidad y la actividad enzimática de interés en una forma final llamada enzima inmovilizada (Arroyo, 1998; Maghraby *et al.*, 2023; Mathews *et al.*, 2012).

Existen ventajas y desventajas en el confinar a las enzimas a estos espacios físicos: entre las ventajas se encuentran la posibilidad de recuperar el biocatalizador fácilmente del medio de reacción, la capacidad de reusarlo, el aumento de la estabilidad de las enzimas y los cambios favorables en la selectividad de la misma. La inmovilización mejora los procesos catalíticos ya que su uso disminuye, tiempos, costos y energía, haciendo más sostenible la actividad industrial y de otras áreas donde las enzimas sean usadas. Entre las desventajas se encuentran la posible disminución o pérdida de la actividad enzimática, las limitaciones en la difusión y transferencia de masa de sustratos y productos, el costo de la inmovilización y los cambios en la selectividad o aumentos de impedimentos estéricos (Basso y Serban, 2019; Brena *et al.*, 2013).

La elección del método de inmovilización es crucial ya que cada método pueda producir un biocatalizador con propiedades diferentes aun para una misma enzima, por ello es necesario conocer los diferentes métodos y aproximaciones para inmovilizarla. Cada estrategia de inmovilización presenta ventajas y desventajas ya que al inmovilizar a las enzimas estas pueden sufrir cambios como bloqueo del sitio activo, los problemas de difusión en el medio del sustrato o que los productos puedan alterar los rendimientos y provocar cambios en la estructura terciaria en la enzima, lo que afectaría la afinidad por el sustrato, o propiciar la desnaturalización de la enzima, algunas de estas ventajas y desventajas se muestran en la **Tabla 3** (García-Galán *et al.*, 2011; Maghraby *et al.*, 2023).

Tabla 3

Ventajas y desventajas de los métodos inmovilización enzimática comunes

Método	Ventajas	Desventajas
Encapsulación	Sin modificación química de la enzima La enzima debe retener la actividad catalítica en las condiciones de polimerización/transición del soporte	Fuga de enzimas Problemas de transferencia masiva
Atrapamiento	Sin modificación química de la enzima La enzima debe retener la actividad catalítica en las condiciones de polimerización/transición del soporte	Fuga de enzimas Problemas de transferencia masiva
Inclusión en membranas	Resistencia a microorganismos Actividad enzimática media-alta	Fuerza de unión débil
Adsorción	Sin modificación química de la enzima Fácil y barato de realizar	Fuga de enzimas Baja especificidad de la reacción (es decir, la adsorción y el intercambio iónico podrían superponerse)

Entrecruzamiento	Alta estabilidad Buen almacenamiento Buena reutilización	Disminución en actividad enzimática
Unión covalente	Resistencia de la encuadernación Minimización de fugas de catalizadores Estabilización de la enzima	Posibilidad de modificaciones estéricas de la enzima. Pérdida de actividad. Son necesarias modificaciones químicas del soporte. La fijación es irreversible, lo que impide la reutilización del soporte.

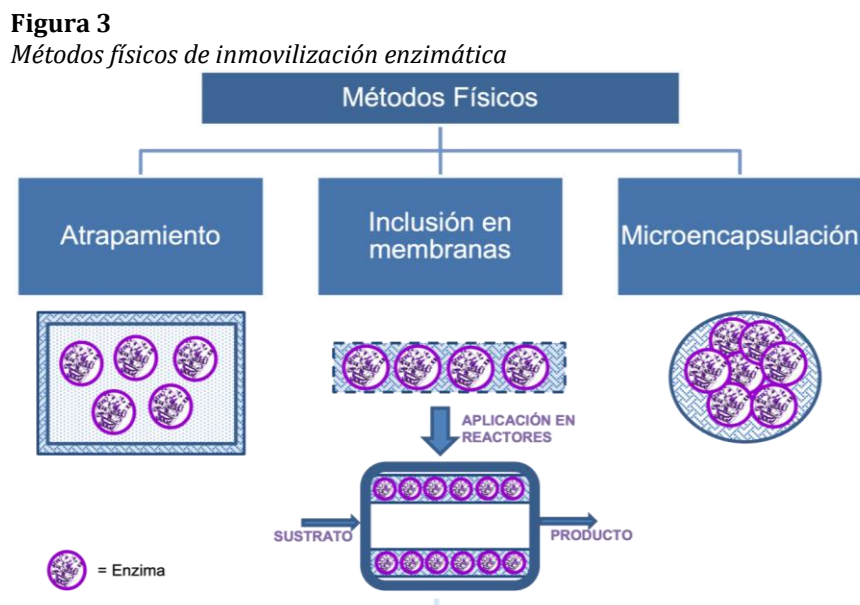
Fuente: Elaboración propia adaptado de Maghraby *et al.* (2023) y de Zucca y Sanjust (2014).

Los métodos para la inmovilización enzimática se pueden agrupar principalmente de dos formas: una, de acuerdo a la reversibilidad de la unión, es decir, si la unión entre la enzima y el soporte es reversible o irreversible; y la segunda, dependiendo de la naturaleza de la unión con el soporte, ya sea por unión física o por unión química (Maghraby *et al.*, 2023; Mathews *et al.*, 2012).

3.1. Inmovilización por métodos de retención física

Los métodos de inmovilización física son aquellos donde ninguna parte de la enzima reacciona con el material donde estará inmovilizada (soporte), solo se encuentra fija al mediante fuerzas físicas; las diferentes estrategias están enfocadas en “atrapar” a la enzima en algún medio o adsorberla al mismo (Arroyo, 1998; Maghraby *et al.*, 2023; Mathews *et al.*, 2012).

En la **Figura 3** están esquematizadas las principales estrategias de inmovilización física:



Fuente: Elaboración propia adaptada de Maghraby *et al.* (2023).

3.1.1. Atrapamiento

Se conoce como atrapamiento al confinamiento de un biocatalizador dentro de una matriz sólida y porosa que pueden geles o fibras normalmente de tipo polimérico tal como los alginatos, los carragenatos, resinas de poliuretano o polímeros del tipo poliacrilamida. Para inmovilizar una enzima por esta técnica se debe obtener una suspensión del biocatalizador de interés en una solución, donde ocurre una reacción de polimerización por causa de un cambio en la temperatura o por la interacción de diversos reactivos (Arroyo, 1998; Salazar-Leyva *et al.*, 2014).

Una vez que la enzima se confina en la matriz polimérica, ya puede incorporarse el medio de reacción, donde de manera ideal el flujo de productos y sustratos es libre. Con este método se logra mantener la actividad enzimática y, por lo general, no se ve afectada la estructura del biocatalizador, aunque las condiciones de polimerización necesitan de una rigurosa inspección y observación (Salazar-Leyva *et al.*, 2014)

Entre las enzimas inmovilizadas por atrapamiento se encuentran diversas proteasas que gozan de amplia popularidad en la industria alimentaria; ejemplo de ello es la inmovilización por atrapamiento en perlas de alginato de calcio de la proteasa alcalina de *Bacillus brevis*, el derivado enzimático mostró 100 % de actividad enzimática en pHs alcalinos de 9 y 10, y en temperatura de 65 °C, comparando estas características con la forma libre de la enzima, cuyo pH y temperatura óptimos son de 8 y 45 °C, el atrapamiento representa un claro aumento de estabilidad (Qamar *et al.*, 2020).

3.1.2. Inclusión en membranas o fibras

En este método el soporte forma una barrera que contiene el biocatalizador en su interior facilitando la difusión de los sustratos y productos, el soporte puede ser de distintos materiales naturales o sintéticos, de forma común se emplean polímeros como poliacrilamida, sílica-gel, agarosa o carragenatos. Una de las ventajas de incluir en membranas o fibras a las enzimas es que además de impedir que ocurran cambios la estructura de la enzima, esta puede emplearse para establecer sistemas de liberación controlada del biocatalizador. Para lograr esta inclusión las enzimas se colocan en una solución conformada por el material que será usado para confinar el biocatalizador, después se somete a un cambio de temperatura o se añaden catalizadores para gelificar el soporte, posteriormente se deshidratan y se pulverizan para ser almacenados (Cen *et al.*, 2019; Mureseanu *et al.*, 2005).

Uno de los principales usos de las enzimas inmovilizadas en membranas es su aplicación en reactores, estos reactores son sistemas que contienen en el interior a las enzimas inmovilizadas en membranas, por medio de una bomba se establece un flujo de sustrato en el disolvente adecuado y éste se hace pasar a través del reactor, además tienen una capa permeable al sustrato líquido e impermeable al biocatalizador (Arroyo, 1998). La membrana puede tener forma de lámina plana, o ser un módulo enrollado en espiral, o de forma tubular, o cualquiera que sea requerida para el proceso (Luo *et al.*, 2020).

La necesidad de establecer tecnologías sostenibles hace que estos reactores de membrana sean especialmente atractivos porque no requieren aditivos, pueden

funcionar a temperatura y presión moderadas y reducen la formación de subproductos. Una de las desventajas que puede tener esta técnica son los problemas de difusión del sustrato que debe transportarse a través de la membrana hasta el catalizador y el producto debe transportarse desde el sitio de reacción hasta el otro lado de la membrana por ello los problemas relacionados al transporte de masa son los que limitan los rendimientos en este tipo de dispositivo (Basso y Serban, 2019; Luo *et al.*, 2020).

En contraste, entre las ventajas de la inmovilización en membranas está el aumento de la estabilidad en ensayos a largo plazo y con ciclos repetidos; esto fue observado en la inmovilización de la lipasa pancreática porcina en membranas de cerámica silanizada, lo que permitió una retención de más del 60 % de su actividad inicial después 7 ciclos de reutilización (Gao *et al.*, 2023).

El uso integrado de reactores es especialmente importante para productos obtenidos por procesos de fermentación, tales como en los que producen ácidos orgánicos y antibióticos; o aquellos involucrados en el procesamiento de alimentos y bebidas; por ejemplo, en reacciones de hidrólisis de lactosa (presente en la leche entera o suero de queso) donde la inmovilización en reactores de membrana es una técnica eficaz ya que permite utilizar las β -galactosidasas de manera repetida y con gran eficiencia (Basso y Serban, 2019; Luo *et al.*, 2020; Maghraby *et al.*, 2023).

3.1.3. Microencapsulamiento

Esta técnica consiste en emplear una matriz polimérica que forma una membrana semipermeable para proporcionar un medio que sea capaz de regular la interacción de la enzima con el exterior. Las microcápsulas tienen recubrimientos pueden ser homogéneos o heterogéneos, liberan las enzimas contenidas cuando se someten a condiciones determinadas, por lo que se aumenta la vida útil de las enzimas al retrasar las reacciones químicas con el exterior (Pasin *et al.*, 2012).

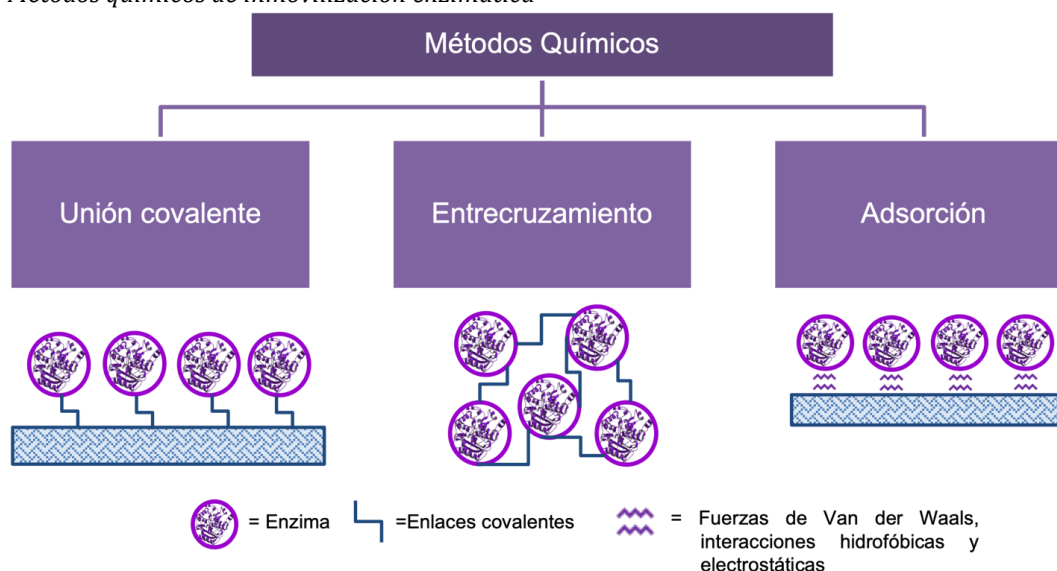
Entre las enzimas que han sido microencapsuladas con excelentes resultados se encuentran las lacasas, estas enzimas son una clase de oxidasas que catalizan la reducción de oxígeno molecular sin la formación de peróxido de hidrógeno, lo que las ha hecho atractivas para su uso en biosensores, síntesis orgánica, e inmunoensayos, las lacasas microencapsuladas en quitosano, sílica mesoporosa y otros materiales mantienen su capacidad de reuso y actividad intacta hasta por cuatro semanas (Ren *et al.*, 2020).

3.2. Inmovilización por unión química

Los métodos de inmovilización en los que la enzima se fija al soporte a través de una reacción química son los más usados; las reacciones utilizadas pueden ser directas entre la proteína y el sólido o indirectas, con la ayuda de reactivos que sirven de “puentes”. Hay muchos materiales orgánicos e inorgánicos que sirven como soportes y la elección debe considerar las características específicas que se quieren obtener, teniendo en cuenta la unión eficiente de la enzima y el que conserve su capacidad catalítica, así como el tamaño de partícula, densidad, porosidad y forma (Basso y Serban, 2019; DiCosimo *et al.*, 2013).

A nivel químico, factores como la existencia de ciertos grupos funcionales específicos en la enzima y el soporte, así como el tipo de enlace que se quiere establecer, son variables que se deben tener presentes para elegir el tipo de enlace y el soporte adecuado; estas uniones pueden ser a través de uniones covalentes directas, entrecruzamiento y adsorción, en la **Figura 4** se representan los métodos de inmovilización química con las interacciones entre el soporte y la enzima. Los derivados enzimáticos obtenidos por esta vía normalmente tienen una gran capacidad de reúso, y sólo se requiere que pueda separarse de manera fácil del medio de reacción y ofrecer la resistencia mecánica para las condiciones de trabajo requeridas por el reactor durante varios ciclos (Arroyo, 1998; Maghraby *et al.*, 2023).

Figura 4
Métodos químicos de inmovilización enzimática



Fuente: Elaboración propia adaptada de Maghraby *et al.* (2023).

3.2.1. Unión Covalente

La inmovilización de enzimas por unión covalente permite incorporar el biocatalizador al soporte de manera irreversible y asegura la mayor resistencia de la unión entre el soporte y la enzima, esto minimiza los problemas de fuga o “lavado” del biocatalizador; adicionalmente, la unión covalente no dificulta la transferencia de masa de reactivos y productos, aumenta la estabilidad de la enzima hacia el calor, el pH y los disolventes orgánicos, y la unión puede ser en varios puntos de la molécula logrando con ello una unión fuerte (Sannino *et al.*, 2020) El principal problema de inmovilizar a las enzimas a través de este método es que hay la posibilidad de que la unión química altere la conformación activa de la enzima si las reacciones necesarias para unir la proteína al soporte modifican de forma no deseada su estructura tridimensional (Sánchez-Otero *et al.*, 2022; Sannino *et al.*, 2020; Zucca y Sanjust, 2014).

Adicionalmente, la inmovilización por unión covalente requiere funcionalizar (procedimiento por el cual se introduce una nueva función química en un soporte) los

soportes inorgánicos, insertando grupos funcionales como $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$, $-SH$, de modo que el soporte se vuelva capaz de reaccionar con las enzimas; los soportes también requieren ser activados (proceso donde la función química recién introducida se hace reactiva hacia la enzima) con agentes tales como haluros orgánicos e inorgánicos, glutaraldehído, carbodiimidas, entre otros (Sannino *et al.*, 2020; Zucca y Sanjust, 2014).

Es importante que el área cercana al sitio activo del biocatalizador no se vea comprometida o modificada por el establecimiento de enlaces covalentes con el soporte, esto es necesario para que la enzima conserve toda su capacidad catalítica, debido a la relevancia de este aspecto, se han desarrollado una amplia variedad de reacciones para maximizar el aprovechamiento de los grupos funcionales disponibles en el biocatalizador (Liebana y Drago, 2016).

La inmovilización por unión covalente se ha empleado en el desarrollo de biosensores selectivos, por ejemplo, para el análisis de galactosa, mediante la unión covalente de galactosa oxidasa (sustrato importante para la fermentación y la producción de alimentos) a películas de colágeno altamente polimerizadas (Kanyong *et al.*, 2017).

3.2.2. Entrecruzamiento para la Producción de CLEAs (Cross-linked enzyme aggregates)

La producción de agregados reticulados CLEAs (Cross-linked enzyme aggregates) es un método de inmovilización que goza de aceptación ya que no requiere el uso de soportes, permite usar enzimas no purificadas, e inclusive puede aplicarse para co-immobilizar diferentes enzimas (Yamaguchi *et al.*, 2018).

Para obtenerlos hay que enlazar químicamente a las moléculas de enzima entre sí mediante reactivos enlazadores seguidos de procesos de precipitación con polímeros, sales inorgánicas y solventes orgánicos, sumando reticulados tridimensionales que poseen una elevada fuerza de interacción, disminuyendo la pérdida de actividad enzimática y aumentando la estabilidad.

Las uniones intermoleculares mantienen la red de entrecruzamiento estable con el uso de reactivos bifuncionales, como diiminoésteres, dihidrinas, diaminas y tripolifosfato de sodio, esto después de la precipitación, entre ellos el glutaraldehído es el reactivo más usado para el entrecruzamiento ya que es económico y tiene alta afinidad a grupos ϵ -amino que se encuentran en lisinas (Oliart-Ros *et al.*, 2021; Sheldon, 2011). A pesar de la popularidad del glutaraldehído como agente de entrecruzamiento, su uso no es siempre recomendado, ya que algunas enzimas pierden su actividad o su estabilidad frente a él; por ello, en lugar del glutaraldehído se han implementado técnicas que utilizan moléculas bifuncionales alternas para sintetizar CLEAs tales como el agar, el quitosano, el dextrano, la pectina y la goma arábiga (Nadar *et al.*, 2017).

Aunque una desventaja en la síntesis de CLEAs estriba en que los agentes y las condiciones del proceso pueden modificar la estructura de las enzimas o incluso provocar la pérdida de la actividad, la producción de CLEAs goza de popularidad, esto debido a que los CLEAs tienen una considerablemente mayor resistencia a la desnaturalización térmica y al almacenamiento. La actividad catalítica de los CLEAs de la lipasa termoalcalófila de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 se mantuvo al 100 %

durante un periodo de almacenamiento de 30 días a 4° C y 25° C, esto representa cuatro veces más de resistencia al almacenamiento que la forma soluble (Oliart-Ros *et al.*, 2021).

3.2.3. Adsorción

La inmovilización de enzimas por adsorción es el método más directo para permitir la interacción de la molécula biológica con el soporte, la enzima permanece unida al sólido por medio de fuerzas de Van Der Waals, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas; este tipo de enlaces son de naturaleza débil y por ello la enzima puede desprenderse por variaciones en el pH y en la fuerza iónica del medio, o por simple difusión al medio, aunque por otra parte tiene la ventaja de que generalmente la actividad enzimática no se ve modificada (Badillo-Zeferino *et al.*, 2017). La enzima se disuelve en una solución que suele ser un amortiguador de fosfatos y se ponen en contacto con el soporte de elección, posteriormente las moléculas no absorbidas deben eliminarse de la superficie lavándolas con una solución amortiguadora. Este método es uno de los más fáciles y económicos, ya que no se utilizan ingredientes adicionales para la funcionalización y el procedimiento no es complicado (Sánchez-Otero *et al.*, 2022).

Las enzimas inmovilizadas por adsorción pueden presentar una mayor eficiencia catalítica por cada gramo de proteína inmovilizada (hiperactivación) y por gramo de soporte que las enzimas inmovilizadas por otros métodos; esto es común en el caso de enzimas lipolíticas, cuya estructura es compatible con los soportes hidrofóbicos, lo que favorece mayor interacción con este tipo de enzimas que con el resto de las proteínas del medio durante la inmovilización; hay en la literatura reportes de informes de lipasas inmovilizadas por adsorción en soportes hidrofóbicos, como las de *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae* y *Geobacillus thermoleovorans* que presentan grados de hiperactivación que van desde el 300 % al 1000 % de la actividad original y buen desempeño en la síntesis de ésteres de cadena corta (Badillo-Zeferino *et al.*, 2017; Madalozzo *et al.*, 2014; Nordblad y Adlercreutz, 2013).

4. Nuevas tendencias en inmovilización

Actualmente la inmovilización enzimática es un área del desarrollo científico enfocado en generar biocatalizadores en presentaciones cada vez más novedosas y que ofrezcan mayor estabilidad y funcionalidad junto con una mayor capacidad de reuso. Por un lado, se busca utilizar materiales ya conocidos que no habían sido usados como soportes para inmovilización enzimática, y por el otro se están incorporando materiales especializados como las nanoestructuras y otros ensamblajes supramoleculares (Federsel *et al.*, 2021).

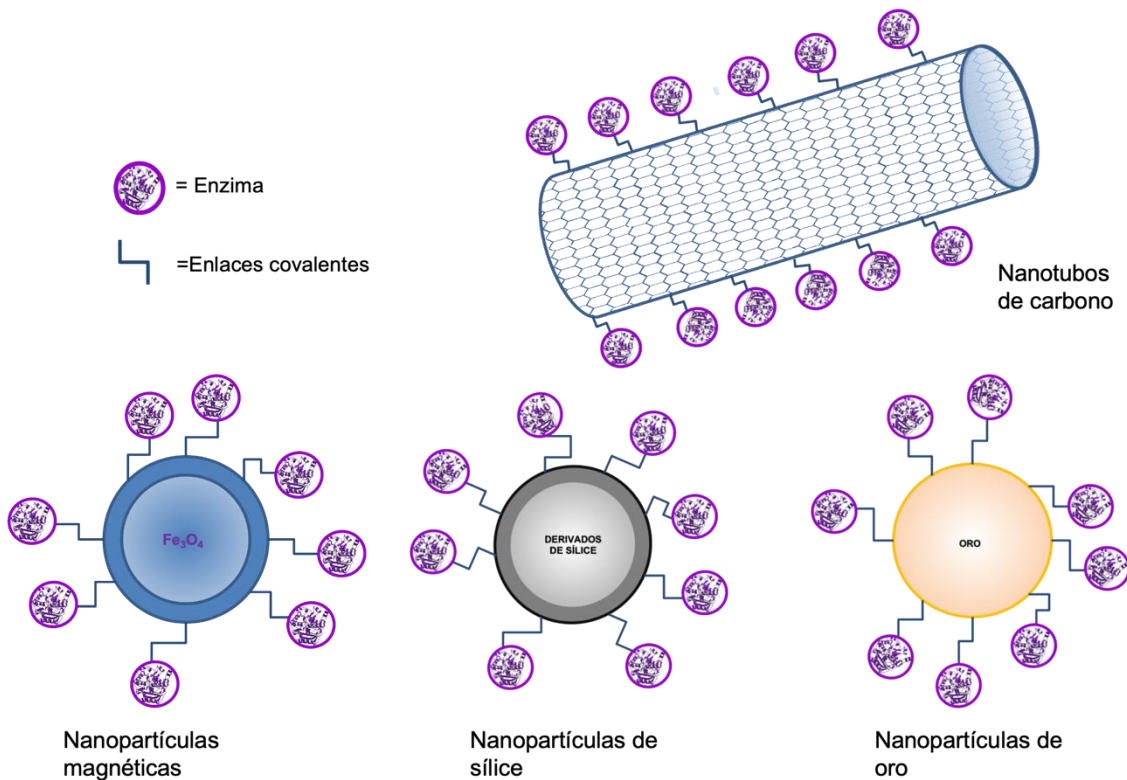
4.1. Uso de nanoestructuras y nanopartículas

Los avances en nanotecnología también han beneficiado al desarrollo de nuevos derivados enzimáticos, lo que a su vez ha favorecido al establecimiento de bioprocesos más eficientes, lo anterior a través de cambios fundamentales tales como la disminución del tamaño de los reactores y el aumento de la relación superficie/volumen de los biocatalizadores haciendo más eficiente la actividad enzimática por gramo de inmovilizado; adicionalmente, las propiedades ópticas y magnéticas de algunos nanomateriales y nuevos soportes hacen más fácil la separación del medio de reacción y los rangos de trabajo de pH y temperatura se han visto ampliados (Meena *et al.*, 2021).

Entre los tipos de nanoestructuras usadas para inmovilizar enzimas están nanopartículas de diferentes materiales incluido el grupo de las nanopartículas magnéticas y diferentes arreglos de nanotubos. Estas estructuras se esquematizan en la **Figura 5**.

Figura 5

Representación esquemática de las principales nanoestructuras utilizadas para la inmovilización de enzimas



Fuente: Elaboración propia adaptada de Federsel *et al.* (2021) y de Neupane *et al.* (2019).

4.1.1. Nanotubos de Carbono

Los nanotubos de carbono son estructuras alótropas del carbono de forma cilíndrica, que se descubrieron por primera vez en 1993, desde entonces, los nanotubos de

carbono juegan un papel central en la nanotecnología y el desarrollo sostenible, ya que se aplican en biocatálisis, suministro y diversas aplicaciones que implican transporte de moléculas y uso de biosensores. Estos nanotubos pueden ser de diferentes grados de complejidad que van desde una capa sencilla enrollada, hasta múltiples capas enrolladas sobre ellas mismas. Los nanotubos generalmente son funcionalizados con diferentes reactivos, para poder unir posteriormente la enzima (Neupane *et al.*, 2019; Singh y Chauhan, 2020).

4.1.2. Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de oro son atractivas para la construcción de dispositivos tales como biosensores electroquímicos, biosensores ópticos y biosensores piezoeléctricos (Putzbach y Ronkainen, 2013). Las nanopartículas de oro pueden modificarse en su forma, tamaño y estado de agregación haciéndolas reaccionar con varios tipos de moléculas, estas modificaciones proporcionan diversas propiedades para su aplicación en la industria farmacéutica, y en la detección de ácido nucleicos bacterias y virus. También se ha usado en sistemas bimetalicos en la fabricación de sensores que usan enzimas específicas para la medición de glucosa (Lipińska *et al.*, 2021; Putzbach y Ronkainen, 2013).

4.1.3. Nanopartículas de Sílice

Los materiales a base de sílice son soportes atractivos para la inmovilización de enzimas debido a su carácter amable con el medio ambiente, su excelente estabilidad estructural y su buena resistencia química a solventes orgánicos y ataques microbianos, así como su alta biocompatibilidad y baja citotoxicidad (Meena *et al.*, 2021).

Las nanopartículas de sílice mesoporosas han demostrado ser un tipo de soporte eficaz para la inmovilización de enzimas, ya que estas conservan sus propiedades, lo que les brinda un mayor potencial para distintas aplicaciones biotecnológicas. Al ser estructuras porosas, exhiben grandes áreas superficiales lo cual hace más eficiente el proceso de inmovilización al permitir una mayor carga de biomoléculas, un mejor control sobre la cinética de carga y liberación y una mayor biocompatibilidad. Las partículas de sílice pueden ser funcionalizadas con diversos reactivos para mejorar aún más su función como soportes y en general las enzimas inmovilizadas en sílice mesoporosa presentan una actividad más elevada en comparación con las enzimas libres (Popat *et al.*, 2011; Meena *et al.*, 2021).

4.1.4. Nanopartículas Magnéticas

Las nanopartículas magnéticas tienen propiedades tales como alta estabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad; adicionalmente, el magnetismo les permite ser fácilmente recuperadas del medio de reacción usando un campo magnético externo por lo que su uso como soportes de inmovilización se ha incrementado en años recientes, Estas nanopartículas contienen una sustancia con propiedades magnéticas tales como la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita (Fe_2O_3) y otros minerales (Meena *et al.*, 2021).

Algunas aplicaciones de nanoestructuras para inmovilizar enzimas capaces de ser aplicadas a catálisis o en la manufactura de biosensores, así como la mejoría en la actividad se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4
Ejemplos de uso de nanoestructuras para inmovilización enzimática

Tipo de nanopartícula	Enzima inmovilizada	Ventajas/ aplicaciones
Nanopartículas de quitosano	Glucosamilasa	Aumento de la estabilidad al pH y al almacenamiento por 4 meses, alta capacidad de reúso/ Producción más eficiente de glucosa a partir de almidón.
Nanocompuesto de quitosano-TiO2	Acetilcolinesterasa	Mayor sensibilidad a la detección de pesticidas (nM). Estabilidad total tras 30 días e almacenamiento/ Uso en biosensores de alta sensibilidad.
Nanopartículas de oro	Glucosa oxidasa α-Amilasa	Mejora de sensibilidad aumento de actividad/ Uso en sensores electroquímicos para medir glucosa Mayor eficiencia catalítica, aumento de estabilidad en almacenamiento/ Uso en lavado de textiles y en remoción de adhesivos
Nanotubos de silicatos	Glucosa oxidasa	Resistencia a la desnaturalización/ Uso en biosensores
Nanotubos funcionalizados	Lipasa	Aumento en la actividad enzimática/ Uso en síntesis de compuestos quirales

Fuente: Elaboración propia adaptado de Lee y Au-Duong (2018) y de Meena *et al.* (2021).

4.2. Uso de Marcos Orgánicos Covalentes (COF)

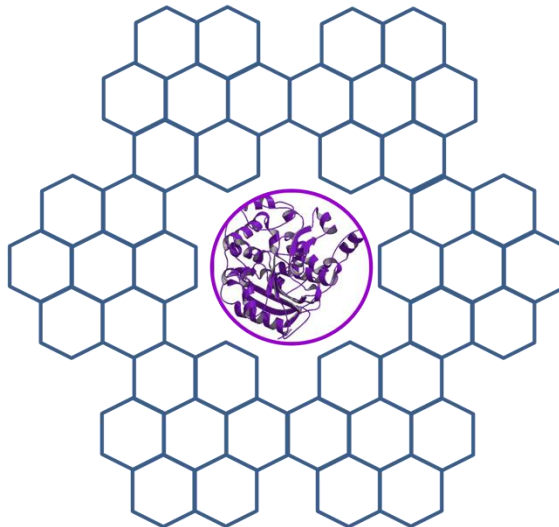
Los Marcos Orgánicos Covalentes –(COF) por sus siglas en inglés: Covalent organic frameworks– son materiales poliméricos orgánicos porosos de compuestos orgánicos unidos entre sí por enlaces covalentes, esto les ofrece una estabilidad termodinámica, baja densidad, gran superficie de contacto, multidimensionalidad, y una estructura cristalina de alto orden expandida que los ha hecho sujetos de interés en diversas aplicaciones biotecnológicas. Estos pueden funcionalizarse de diferentes maneras lo que amplía las posibilidades en geometría y afinidad a diferentes enzimas (Esrafil *et al.*, 2021). En la **Figura 6** se muestra una representación de un COF con una enzima inmovilizada en él.

Las enzimas se pueden integrar en los COF a través de diferentes técnicas, incluida la adsorción física o la unión covalente entre las moléculas de enzima y los COF o mediante un agente de entrecruzamiento y generalmente este método de

inmovilización provee resistencia a las enzimas inclusive a disolventes orgánicos (Oliveira *et al.*, 2019).

Figura 6

Representación esquemática de una enzima inmovilizada en COF



Fuente: Elaboración propia adaptada de Esrafil *et al.* (2021).

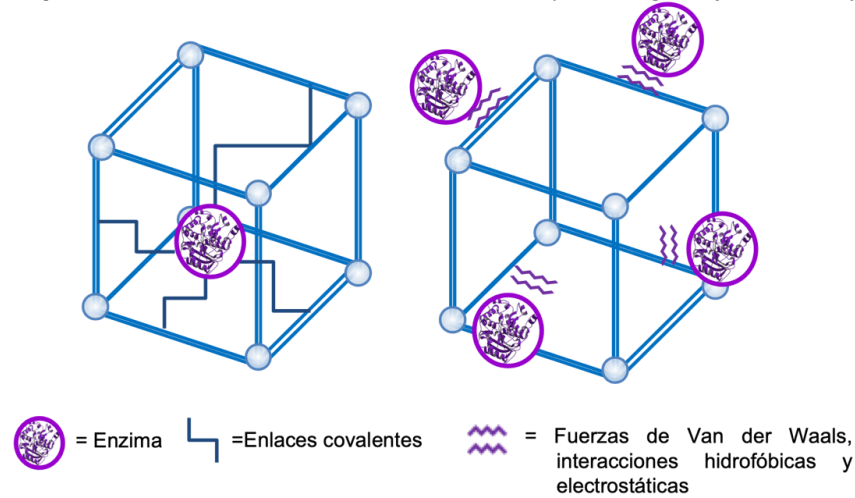
4.3. Marcos Orgánicos Metálicos (MOF)

Los marcos orgánicos metálicos, llamados –(MOF) por sus siglas en inglés: Metal Organic Frameworks– son estructuras compuestas por iones metálicos o agrupaciones de ellos unidas por ligandos orgánicos, en la **Figura 7** se esquematiza un MOF unido por enlaces covalentes o por fuerzas intermoleculares a moléculas de enzimas.

Los MOF son un tipo de materiales porosos con un orden cristalino, que han captado gran atención como una reciente matriz de soporte poroso para la inmovilización de enzimas, ya que ofrece mejoras en la estabilidad química y térmica de las enzimas sin comprometer el acceso al sitio activo, una buena difusión de los sustratos, fácil acceso a los sitios activos, y alta carga enzimática, además de ser fácilmente reciclables.

Se les usa para inmovilizar enzimas mediante inmovilización superficial, ya sea por enlaces covalentes o por medio de fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. Si se aumentan los tamaños de poro, las enzimas se pueden “infiltrar” en el MOF aumentando su estabilidad, el enlazarlas covalentemente permite su encapsulación in situ 46 (Federsel *et al.*, 2021; Shomal *et al.*, 2021).

Figura 7
 Esquema de inmovilización enzimática en MOFs (metal organic frameworks)



Fuente: Elaboración propia adaptada de Shomal *et al.* (2021).

5. Conclusiones

El uso de enzimas para aplicaciones industriales, farmacológicas y alimentarias es un área en constante desarrollo que requiere de la implementación de técnicas y estrategias que permitan un uso cada vez más eficiente de esos biocatalizadores. La inmovilización por diferentes vías y usando diversos soportes permite generar derivados catalíticos cada vez más resistentes a las condiciones de proceso, con mayor capacidad de reuso, con una mayor eficiencia en la actividad de la enzima por cada gramo de biocatalizador, y la fácil recuperación del mismo del medio de reacción, y todo ello contribuyendo a tener cada vez más procesos sostenibles, económicos y amables con el medio ambiente.

La tendencia general es seguir reemplazando a los procesos químicos convencionales por estrategias basadas en enzima en todos los niveles y áreas del desarrollo, la inmovilización enzimática evoluciona a pasos agigantados para satisfacerla, surgiendo nuevos métodos y nuevos materiales, y cómo aprovecharlos como soportes enzimáticos deben estudiarse para hacer la industria competitiva y sostenible.

Referencias

- Ansorge, W.** (2016). Next generation DNA sequencing (II): techniques, applications. *Journal of Next Generation Sequencing & Applications* S1(0005). <https://doi.org/10.4172/2469-9853.S1-005>
- Arroyo, D.** (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39. <https://tinyurl.com/dbmx9d7y>
- Badillo-Zeferino, G., Ruiz-López, I., Oliart-Ros, R. y Sánchez-Otero, M.** (2017). Improved

- expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(1), 62-69. <https://doi.org/10.1002/bab.1444>
- Basso, A.** y Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Brena, B.**, González-Pombo, P. y Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. En J. Guisan, (Ed.) *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology*, (3ra ed., vol 1051, pp. 15-31). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Cen, Y. K.**, Liu, Y. X., Xue, Y. y Zheng, Y. (2019). Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 361(24), 5500-5515. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900439>
- Choi, J.**, Han, S. y Kim, H. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- DiCosimo, R.**, McAuliffe, J., Poulouse, A. J. y Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Esrafil, A.**, Wagner, A., Inamdar, S. y Acharya, A. (2021). Covalent organic frameworks for biomedical applications. *Advanced Healthcare Materials*, 10(6), 2002090. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002090>
- Fasim, A.**, More, V. y More, S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current opinion in biotechnology*, 69, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>
- Federsel, H.**, Moody, T. y Taylor, S. (2021). Recent trends in enzyme immobilization—concepts for expanding the biocatalysis toolbox. *Molecules*, 26(9), 2822. <https://doi.org/10.3390/molecules26092822>
- Gao, N.**, Liu, J., Wang, X. y Zhang, Y. (2023). Lipase immobilized on MTMS-modified ceramic membrane for enhanced activity and stability. *Journal of Materials Science*, 58(39), 15352-15366. <https://doi.org/10.1007/s10853-023-09000->
- García-Galan, C.**, Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. y Rodrigues, R. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- Guzik, U.**, Hupert-Kocurek, K. y Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. *Molecules*, 19(7), 8995-9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
- Kanyong, P.**, Krampa, F., Aniweh, Y. y Awandare, G. (2017). Enzyme-based amperometric galactose biosensors: a review. *Microchimica Acta*, 184, 3663-3671. <https://doi.org/10.1007%2Fs00604-017-2465-z>
- Kirk, O.**, Borchert, T. y Fuglsang, C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00328-2)
- Kocabaş, D.**, Lyne, J. y Ustunol, Z. (2022). Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*,

- 119, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>
- Lee, C.** y Au-Duong, A. (2018). Enzyme immobilization on nanoparticles: recent applications. *Emerging areas in Bioengineering*, 1, 67-80. <https://doi.org/10.1002/9783527803293.ch4>
- Liebana, S.** y Drago, G. (2016). Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 59-68. <https://doi.org/10.1042/EBC20150007>
- Lipińska, W.,** Grochowska, K. y Siuzdak, K. (2021). Enzyme immobilization on gold nanoparticles for electrochemical glucose biosensors. *Nanomaterials*, 11(5), 1156. <https://doi.org/10.3390/nano11051156>
- Luo, J.,** Song, S., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, J. y Wan, Y. (2020). Biocatalytic membrane: Go far beyond enzyme immobilization. *Engineering in life sciences*, 20(11), 441-450. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000018>
- Madalozzo, A. D.,** Muniz, L., Baron, A., Piovan, L., Mitchell, D. y Krieger, N. (2014). Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: synthesis of ethyl-oleate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.005>
- Maghraby, Y.,** El-Shabasy, R., Ibrahim, A. y Azzazy, H. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Mathews, C.,** Van Holde, K. y Appling, D. (2012). *Biochemistry*. Prentice Hall.
- McDonald, A.,** Boyce, S. y Tipton, K. (2009). ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D593-D597. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn582>
- McDonald, A.** y Tipton, K. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>
- Meena, J.,** Gupta, A., Ahuja, R., Singh, M. y Panda, A. (2021). Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity. *Journal of Molecular Liquids*, 338, 116602. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116602>
- Mureseanu, M.,** Galarneau, A., Renard, G. y Fajula, F. (2005). A new mesoporous micelle-templated silica route for enzyme encapsulation. *Langmuir*, 21(10), 4648-4655. <https://doi.org/10.1021/la0502241>
- Nadar, S.,** Pawar, R. y Rathod, V. (2017). Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*, 101, 931-957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>
- Nelson, D.** y Cox, M. (2014). *Lehninger: Principios de bioquímica*. Omega.
- Neupane, S.,** Patnode, K., Li, H., Baryeh, K., Liu, G., Hu, J., Chen, B., Pan, Y. y Yang, Z. (2019). Enhancing enzyme immobilization on carbon nanotubes via metal-organic frameworks for large-substrate biocatalysis. *ACS applied materials & interfaces*, 11(12), 12133-12141. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b01077>
- Nordblad, M.** y Adlercreutz, P. (2013). Immobilization procedure and reaction conditions for optimal performance of *Candida antarctica* lipase B in transesterification and hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(5), 237-245. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.837240>

- Oliart-Ros, R.,** Badillo-Zeferino, G., Quintana-Castro, R., Ruíz-López, I., Alexander-Aguilera, A., Domínguez-Chávez, J. G., Azmat, A. K., Nguyen, D. D., Nadda, A. K. y Sánchez-Otero, M. G. (2021). Production and characterization of cross-linked aggregates of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic recombinant lipase. *Molecules*, 26(24), 7569. <https://doi.org/10.3390/molecules26247569>
- Oliveira, F.,** de Souza, S., Bassut, J., Álvarez, H., Garcia-Basabe, Y., Alves de Souza, R., Esteves, P. y Gonçalves, R. (2019). Enzyme-decorated covalent organic frameworks as nanoporous platforms for heterogeneous biocatalysis. *Chemistry—A European Journal*, 25(69), 15863-15870. <https://doi.org/10.1002/chem.201903807>
- Pasin, B.,** Azón, C. y Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151. <https://oaji.net/articles/2017/4924-1495374245.pdf>
- Popat, A.,** Hartono, S., Stahr, F., Liu, J., Qiao, S. y Lu, G. (2011). Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*, 3(7), 2801-2818. <https://doi.org/10.1039/c1nr10224a>
- Putzbach, W.** y Ronkainen, N. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors*, 13(4), 4811-4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>
- Qamar, S.,** Asgher, M. y Bilal, M. (2020). Immobilization of alkaline protease from *Bacillus brevis* using Ca-alginate entrapment strategy for improved catalytic stability, silver recovery, and dehairing potentialities. *Catalysis Letters*, 150, 3572-3583. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03268-y>
- Ren, D.,** Wang, Z., Jiang, S., Yu, H., Zhang, S. y Zhang, X. (2020). Recent environmental applications of and development prospects for immobilized laccase: a review. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 36(2), 81-131. <https://doi.org/10.1080/02648725.2020.1864187>
- Salazar-Leyva, J.,** Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J., Valenzuela-Soto, E., Carvallo-Ruiz, M., Lugo-Sánchez, M. y Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(1), 129-150. <https://tinyurl.com/3b5ep97m>
- Sánchez-Otero, M.,** Quintana-Castro, R., Rojas-Vázquez, A., Badillo-Zeferino, G., Mondragón-Vázquez, K., Espinosa-Luna, G., Kumar A. y Oliart-Ros, R. (2022). Polypropylene as a selective support for the immobilization of lipolytic enzymes: hyper - activation, purification and biotechnological applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(2), 436-445. <https://doi.org/10.1002/jctb.6876>
- Sannino, F.,** Costantini, A., Ruffo, F., Aronne, A., Venezia, V. y Califano, V. (2020). Covalent immobilization of β -glucosidase into mesoporous silica nanoparticles from anhydrous acetone enhances its catalytic performance. *Nanomaterials*, 10(1), 108. <https://doi.org/10.3390/nano10010108>
- Sheldon, R.** (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3), 467-477. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3554-2>
- Shomal, R.,** Ogubadejo, B., Shittu, T., Mahmoud, E., Du, W. y Al-Zuhair, S. (2021).

Advances in enzyme and ionic liquid immobilization for enhanced in MOFs for biodiesel production. *Molecules*, 26(12), 3512.

<https://doi.org/10.3390/molecules26123512>

Singh, R. y Chauhan, K. (2020). Functionalization of multiwalled carbon nanotubes for enzyme immobilization. *In Methods in Enzymology*, 630, 25-38.

<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.014>

Yamaguchi, H., Kiyota, Y. y Miyazaki, M. (2018). Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions. *Catalysts*, 8(5), 174. <https://doi.org/10.3390/catal8050174>

Zucca, P. y Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139-14194.

<https://doi.org/10.3390/molecules190914139>