

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Ingeniería de biocatalizadores enzimáticos para la  
intensificación de bioprocesos oxidativos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Álvaro Lorente Arévalo**

**Director**

**Juan Manuel Bolívar Bolívar**

**Madrid**

**© Álvaro Lorente Arévalo, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**INGENIERÍA DE BIOCATALIZADORES  
ENZIMÁTICOS PARA LA  
INTENSIFICACIÓN DE BIOPROCESOS  
OXIDATIVOS**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID

REALIZADA POR:

**ÁLVARO LORENTE ARÉVALO**

DIRECTOR:

**JUAN MANUEL BOLÍVAR BOLÍVAR**

**MADRID, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA



**INGENIERÍA DE BIOCATALIZADORES  
ENZIMÁTICOS PARA LA  
INTENSIFICACIÓN DE BIOPROCESOS  
OXIDATIVOS**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID

REALIZADA POR:

**ÁLVARO LORENTE ARÉVALO**

DIRECTOR:

**JUAN MANUEL BOLÍVAR BOLÍVAR**

**MADRID, 2024**







# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a mi director de tesis, el Dr. Juan Manuel Bolívar, por darme la oportunidad de comenzar esta aventura, por confiar y apostar por mí desde el principio, y por la ayuda, el tiempo y la disponibilidad ofrecida cuándo así lo requería. Para hacer una Tesis de calidad, con motivación y disfrutando del camino, lo más importante es el apoyo y la guía del director, así que solo puedo dar las gracias por todo el aprendizaje y la experiencia en estos años.

También quiero, por supuesto, agradecer el apoyo y la ayuda de los líderes del grupo de Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA), la Dra. Victoria Santos y el Dr. Miguel Ladero, por darme la oportunidad de entrar en el grupo, por hacerme partícipe de varias colaboraciones en forma de revisiones, capítulos de libro, etc. y por todo a lo referido a la gestión del grupo y del laboratorio, para nada desdeñable.

Además, quería mencionar a mis compañeros de FQPIMA por su ayuda, tanto por la gestión de pedidos, como problemas con el HPLC, consejos con la tesis, cafés y demás gestiones varias...Alberto, Víctor, Jorge, Celia, Itziar y Lucija muchas gracias por todo.

Mención especial para los más recientes que han llegado al laboratorio y otro que lleva aquí un poco más de tiempo. Siempre recordaré a David González y sus conversaciones hablando de ciencia, sus invitaciones diarias a tomar café, los vídeos del bananero (el Pucela sapeeee) y su gran humor a diario...A Santiago Turnay, que lleva bastante poco, pero se hace notar por dónde va, fanático de las hamburguesas y las carnes como el que más y un bastante buen aficionado del Real Madrid como yo, aunque también me aconsejó de usar el MathType y varias opciones de formato con Word bastante útiles. Por último, a Tomás Pedregal, un tío optimista y alegre por naturaleza, con ganas de hacer una Tesis incluso estando de técnico de laboratorio y que va regalando saludos y conversaciones con el humor que le caracteriza. Muchas gracias por amenizarme el día a día, espero llevarme estas amistades para siempre.

No me puedo olvidar de todas las personas que han participado activamente, con sus colaboraciones en experimentos y memorias de fin de Grado o Máster, a esta Tesis doctoral. Muchas gracias a Marwane Bourqia por sus aportaciones en la inmovilización de lacasa, Pablo Huertas por su trabajo con la tirosinasa, Enrique Recasens por su gran

ayuda con el mecanismo de activación de la GalOx, Gema García por su investigación con la GOX y el suministro de oxígeno y Lucile Arnould con su apoyo en la inmovilización de GalOx y su aplicación a biorreactores.

En el desarrollo de una Tesis doctoral, la parte humana y social es fundamental. Por eso, quiero agradecer a los compañeros del grupo de Catálisis y Procesos de Separación (CyPS) por su apoyo continuado y por hacerme sentir parte de su grupo, sin ellos hubiese sido mucho más difícil el día a día en la facultad. Gracias a Diego Rodríguez por su gran humor y disponibilidad siempre para conversar, a Andrés Cañada por su apoyo y los partiditos de pádel, a Eva Sanz por su ayuda y determinación, a Pablo Gutiérrez por su apoyo y gran sentido del humor, a Laura y Eli por su amabilidad y disponibilidad, a Rubén Calero por su simpatía y buen rollo, a Naby Comte y su buen humor aunque sea del Barça, y a los últimos llegados, Eva Portillo por su naturalidad y sus geniales historias en Instagram y a Diego Huber y su competitividad aunque en el fondo me ama. A todos vosotros mil gracias por todo.

Tampoco me quiero olvidar de Lorena Wilson por su excepcional ayuda en la corrección de la Tesis y su gran esfuerzo y acogida para que pudiera hacer una cortita estancia en Chile en la que me sentí como en casa. Como durante una tesis doctoral se pasa mucho tiempo en el laboratorio, es normal conocer a personas de ese entorno. Yo tuve la suerte de conocer una persona muy especial en este trayecto, Belén Haydée.

Para terminar, quiero mencionar a las personas que más me han sufrido y ayudado durante todo este tiempo, sin vosotras obviamente hubiera sido imposible la consecución de esta Tesis y mucho más de lo que está por venir, muchas gracias por todo, os quiero mucho Raquel y mamá. Por último, mencionar a mi amado perrito Bruno por su incondicional compañía y por alegrarme día a día.



---

---

# ÍNDICES

---

---

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	35
ABSTRACT .....	38
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>43</b>
1.1. MEDIOAMBIENTE Y QUÍMICA SOSTENIBLE .....	43
1.2. EL PAPEL DE LA BIOCATÁLISIS EN LA QUÍMICA SOSTENIBLE .....	45
1.3. OXIDASAS .....	46
1.3.1. Las oxidorreductasas y sus generalidades .....	48
1.3.2. Carbohidrato oxidasas .....	51
1.3.3. Polifenol oxidasas.....	60
1.4. INTENSIFICACIÓN DE BIOTRANSFORMACIONES DEPENDIENTES DE OXÍGENO CATALIZADAS POR ENZIMAS INMOVILIZADAS .....	68
1.4.1. Desarrollo de catalizadores enzimáticos oxidativos: enfocado en la actividad .....	72
1.4.2. Desarrollo de catalizadores enzimáticos oxidativos: enfocado en la estabilidad.....	76
1.4.3. Limitaciones de las enzimas dependientes de oxígeno .....	78
1.4.4. Ingeniería de proteínas para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas.....	80
1.4.5. Ingeniería del medio de reacción para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas.....	82
1.4.6. Ingeniería de reactores para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas.....	84
1.5. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....	86
1.5.1. Métodos irreversibles: Inmovilización mediante enlace covalente .....	88
1.5.2. Métodos reversibles: Inmovilización por intercambio iónico .....	93
1.5.3. Materiales utilizados para la fabricación de soportes de inmovilización .	99

1.6. DETECCIÓN OPTOQUÍMICA DEL OXÍGENO Y SU APLICACIÓN EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS .....	104
1.6.1. Principios de la detección optoquímica del O <sub>2</sub> .....	104
1.6.2. Inmovilización de indicadores luminiscentes en soportes sólidos .....	106
1.6.3. Detección in situ de O <sub>2</sub> intrapartícula.....	107
<b>2. ALCANCE Y OBJETIVOS.....</b>	<b>112</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>114</b>
3.1. MATERIALES .....	114
3.1.1. Enzimas .....	114
3.1.2. Materiales de inmovilización.....	115
3.1.3. Reactivos .....	116
3.1.4. Datos.....	118
3.2. EQUIPOS.....	119
3.2.1. Equipos de reacción.....	119
3.2.2. Equipos de análisis .....	122
3.2.3. Equipos auxiliares .....	125
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	126
3.3.1. Medida de la actividad enzimática .....	126
3.3.2. Activación de materiales soportados .....	127
3.3.3. Inmovilización enzimática en los materiales activados.....	130
3.3.4. Caracterización de las enzimas inmovilizadas .....	131
3.3.5. Marco teórico del análisis cinético .....	131
3.3.6. Estudio de la estabilidad en los biocatalizadores de GalOx .....	133
3.3.7. Medida del oxígeno intrapartícula.....	134
3.3.8. Medida de transferencia de oxígeno en biorreactor.....	136
3.3.9. Reacciones de oxidación en biorreactor aireado .....	137
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	138

3.4.1.	Medida de la concentración de oxígeno con sensor óptico .....	138
3.4.2.	Métodos colorimétricos .....	140
3.4.3.	Cromatografía líquida de alta resolución.....	140
3.4.4.	Caracterización de indicadores luminiscentes mediante TCSPC .....	141
3.4.5.	Microscopía de fluorescencia .....	142
3.5.	RECURSOS INFORMÁTICOS.....	143
3.6.	MÉTODOS MATEMÁTICOS.....	144
3.6.1.	Métodos de cálculo.....	144
3.6.2.	Modelo de reacción-difusión.....	145
3.6.3.	Parámetros estadísticos.....	148
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS CINÉTICO EN FASE HOMOGÉNEA DE ENZIMAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub></b> .....	<b>152</b>
4.1.	ANÁLISIS DIFERENCIAL PARA DILUCIDAR LA DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CON EL SUSTRATO PRINCIPAL .....	155
4.2.	ANÁLISIS DIFERENCIAL PARA DILUCIDAR LA DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CON EL OXÍGENO .....	157
4.3.	ELUCIDACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA DEL O <sub>2</sub> : ANÁLISIS INTEGRAL .....	165
4.4.	APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO Y ANÁLISIS DE LOS CURSOS DE FORMACIÓN DE PRODUCTO CON EL TIEMPO.....	170
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS CINÉTICO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub></b> .....	<b>177</b>
5.1.	LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO COMO PRINCIPAL PARÁMETRO DE CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA OXIDASA..	178
5.2.	DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA OBSERVABLE DE LAS OXIDASAS INMOVILIZADAS .....	180
5.3.	SIMULACIÓN DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD EN FUNCIÓN DE LA CARGA ENZIMÁTICA EN ENZIMAS INMOVILIZADAS .....	183

5.4.	SIMPLIFICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO PARA LOS CASOS DE ALTA DEPENDENCIA DEL OXÍGENO .....	186
5.5.	EVALUACIÓN DE LAS CONSTANTES EXPERIMENTALES DE AFINIDAD OBSERVABLES EN FUNCIÓN LA CARGA ENZIMÁTICA .....	187
5.6.	ELUCIDACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA MEDIANTE ANÁLISIS INTEGRAL .....	192
5.7.	OPORTUNIDADES DE INTENSIFICACIÓN DE PROCESOS.....	194
<b>6.</b>	<b>ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA INMOVILIZADA.....</b>	<b>200</b>
6.1.	MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA.....	200
6.1.1.	Estudio de la actividad enzimática con distintos activadores.....	200
6.1.2.	Influencia del peróxido de hidrógeno en la activación de GalOx .....	203
6.1.3.	Estudio de activadores y condiciones de reacción a media escala .....	208
6.2.	DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR AUTOSUFICIENTE DE GALACTOSA OXIDASA.....	212
6.2.1.	Evaluación de la actividad enzimática y la eficacia de la inmovilización	213
6.2.2.	Estudio de la estabilidad enzimática.....	218
6.2.3.	Investigación y caracterización de los factores que limitan la actividad	221
6.2.4.	Caracterización de la coinmovilización del activador.....	229
6.2.5.	Aplicación de un biocatalizador sólido autosuficiente para la oxidación de galactosa en reactor aireado.....	231
<b>7.</b>	<b>CONTROL Y PREDICCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNA EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS POROSOS .....</b>	<b>237</b>
7.1.	EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN: TRANSFERENCIA DE MATERIA Y PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS .....	237
7.2.	VELOCIDAD APARENTE DE INMOVILIZACIÓN COMO PARÁMETRO PREDICTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CATALIZADOR EN LA PARTÍCULA.....	242

7.3. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y LA DIFUSIVIDAD EFECTIVA EN LA DISTRIBUCIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN LA PARTÍCULA.....	245
7.4. MÓDULO DE INMOVILIZACIÓN OBSERVABLE COMO MAGNITUD ÚTIL PARA PREDECIR LA DISTRIBUCIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN LA PARTÍCULA.....	247
<b>8. APLICACIÓN DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub> EN REACTORES AIREADOS .....</b>	<b>259</b>
8.1. PRUEBA DE CONCEPTO EN REACTORES NO INSTRUMENTADOS DE BAJO VOLUMEN .....	259
8.2. REACCIONES DE OXIDACIÓN EN REACTORES INSTRUMENTADOS DE MEDIA ESCALA .....	263
8.3. SIMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO A REACCIONES CON SUMINISTRO DE O <sub>2</sub> .....	270
8.3.1. Presentación del modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de O <sub>2</sub> .....	271
8.3.2. Simulación de cursos de reacción y análisis de sensibilidad.....	272
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>279</b>
9.1. ANÁLISIS CINÉTICO EN FASE HOMOGÉNEA DE ENZIMAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O <sub>2</sub> .....	279
9.2. ANÁLISIS CINÉTICO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O <sub>2</sub> .....	279
9.3. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA.....	280
9.4. DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR AUTOSUFICIENTE DE GALACTOSA OXIDASA .....	280
9.5. CONTROL Y PREDICCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNA EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS POROSOS .....	281
9.6. APLICACIÓN DE BIOCATALIZADORES ENZIMÁTICOS EN REACTORES CON SUMINISTRO DE O <sub>2</sub> .....	281

<b>10. REFERENCIAS</b> .....	285
<b>11. ANEXOS</b> .....	323
11.3. TABLAS .....	323
11.4. FIGURAS.....	330

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Propiedades de la glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i> . .....	52
<b>Tabla 1.2.</b> Propiedades de la galactosa oxidasa de <i>Fusarium graminearum</i> . .....	58
<b>Tabla 1.3.</b> Propiedades de la lacasa de <i>Agaricus bisporus</i> . .....	63
<b>Tabla 1.4.</b> Propiedades de la tirosinasa de <i>Agaricus bisporus</i> . .....	66
<b>Tabla 1.5.</b> Ventajas y desventajas o retos de la inmovilización de enzimas. ....	87
<b>Tabla 3.1.</b> Propiedades técnicas específicas de los materiales de inmovilización empleados, de acuerdo a los proveedores. ....	116
<b>Tabla 3.2.</b> Reactivos empleados en la Tesis, organizados por proveedor y principal aplicación. ....	116
<b>Tabla 3.2.</b> Reactivos empleados en la Tesis, organizados por proveedor y principal aplicación (continuación). ....	117
<b>Tabla 4.1.</b> Valores de $K_{O_2app}$ y $Act_{max\ app}$ para tirosinasa obtenidos a partir del análisis diferencial de los parámetros cinéticos aparentes dependientes del oxígeno frente al sustrato principal $[S]$ . $[E_{tirosinasa}] = 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . ....	164
<b>Tabla 4.2.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir del análisis diferencial para cada enzima, con su análisis estadístico. ....	165
<b>Tabla 4.3.</b> Parámetros cinéticos obtenidos del análisis integral por simple respuesta para cada enzima, con su análisis estadístico. ....	167
<b>Tabla 4.4.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste por respuesta múltiple del análisis integral en Aspen para cada enzima. ....	169
<b>Tabla 5.1.</b> Nomenclatura de las constantes de afinidad en función de la variación del sustrato principal, el oxígeno y la carga enzimática. ....	184
<b>Tabla 6.1.</b> Caracterización de los activadores utilizados para evaluar las velocidades iniciales de consumo de oxígeno con GalOx. ....	202
<b>Tabla 6.2.</b> Resumen de los resultados de la inmovilización de GalOx en diferentes soportes sólidos activados. ....	215
<b>Tabla 6.3.</b> Estabilidad de la galactosa oxidasa soluble e inmovilizada a temperatura ambiente y en condiciones de inactivación térmica (40 °C). La actividad ofrecida en todas las preparaciones fue de $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ . ....	219
<b>Tabla 6.4.</b> Estabilidad de la galactosa oxidasa soluble e inmovilizada a temperatura ambiente y variando el medio de incubación. La actividad ofrecida fue de $54\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ en ambos casos. ....	220

<b>Tabla 6.5.</b> Caracterización de la inmovilización de hemoglobina en DS-Ag. Se ofrecieron 5 mg·mL <sup>-1</sup> de hemoglobina a 100 mg de DS-Ag. ....	229
<b>Tabla 6.6.</b> Comparación de los resultados de actividad de GalOx inmovilizada con hemoglobina soluble y coinmovilizada. ....	230
<b>Tabla 7.1.</b> Parametrización del proceso de inmovilización de diversas proteínas mediante sus módulos de inmovilización ( <i>Imm<sub>Teo</sub></i> , <i>Imm<sub>Obs</sub></i> ). ....	253
<b>Tabla 8.1.</b> Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en reactor no instrumentado. ....	262
<b>Tabla 8.2.</b> Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en PEI-Ag con biorreactor de 500 mL. ....	264
<b>Tabla 8.3.</b> Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en PEI-Ag en biorreactor de 1.0 L. ....	266
<b>Tabla 8.4.</b> Resumen de las reacciones de oxidación de galactosa con GalOx en biorreactor de 500 mL. ....	269
<b>Tabla 11.1.</b> Caracterización de la inmovilización de GOX sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar. ....	323
<b>Tabla 11.2.</b> Caracterización de la inmovilización de GalOx sobre DS-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar. ....	323
<b>Tabla 11.3.</b> Caracterización de la inmovilización de lacasa sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de acetato sódico a pH 5. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar. ....	324
<b>Tabla 11.4.</b> Caracterización de la inmovilización de tirosinasa sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado (excepto las dos últimas), y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar. ....	324
<b>Tabla 11.5.</b> Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la GOX inmovilizada en PEI-Ag. ....	325
<b>Tabla 11.6.</b> Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la GalOx inmovilizada en DS-Ag. ....	325

<b>Tabla 11.7.</b> Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la lacasa inmovilizada en PEI-Ag.....	326
<b>Tabla 11.8.</b> Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la tirosinasa inmovilizada en PEI-Ag.....	326
<b>Tabla 11.9.</b> Tiempos de vida media del indicador luminiscente Ru(bpds) <sub>2</sub> en disolución (con NaPi 50 mM pH 7) en disolución con PEI (50% vol) e inmovilizado en PEI-Ag, en distintas condiciones de saturación con oxígeno.....	327
<b>Tabla 11.10.</b> Tiempos de vida media del indicador luminiscente Ru(pbbs) <sub>3</sub> en disolución (con NaPi 50 mM pH 7) e inmovilizado en PEI-Ag, en distintas condiciones de saturación con oxígeno. ....	328
<b>Tabla 11.11.</b> Condiciones de medida del equipo TCSPC empleadas en los ensayos..	328
<b>Tabla 11.12.</b> Velocidad de reacción analizada a distintos tiempos en la oxidación de galactosa en biorreactor aireado referente a la <b>Figura 6.11</b> .....	329

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Clasificación de las oxidorreductasas que poseen aplicaciones en química sintética o analítica [32].....	50
<b>Figura 1.2.</b> Glucosa oxidasa con sus dos subunidades representadas en azul claro, mientras que la coenzima FAD se representa en rosa. Imagen de Goodsell (2006), Instituto de Investigación Scripps. ....	53
<b>Figura 1.3.</b> El centro activo de la galactosa oxidasa.....	56
<b>Figura 1.4.</b> Ciclo catalítico simplificado de la GalOx, propuesto por Whittaker [75]. .	57
<b>Figura 1.5.</b> Oxidación de galactosa (20) para formar D-galactohexodialdosa (21) catalizada por la GalOx [32].....	59
<b>Figura 1.6.</b> Cascada enzimática conceptual para la síntesis de ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA) a partir de 5-hidroximetilfurfural (HMF) mediante 2,5-diformilfurano (DFF) utilizando galactosa oxidasa (GalOx) y <i>Candida antarctica</i> lipasa B (CalB), esquema obtenido de [102]. ....	60
<b>Figura 1.7.</b> Sitio activo de la lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre, esquema obtenido de [113].....	61
<b>Figura 1.8.</b> El centro activo de cobre en la "oxi-tirosinasa", esquema extraído de [32]. ....	64
<b>Figura 1.9.</b> Oxidación de L-tirosina a L-dopaquinona por la tirosinasa. Esquema obtenido de [139].....	65
<b>Figura 1.10.</b> Síntesis quimioenzimática de catecoles sustituidos. Esquema obtenido de [32]. ....	66
<b>Figura 1.11.</b> Cadena de desarrollo de una reacción dependiente de oxígeno catalizada por enzimas en soporte sólido.....	72
<b>Figura 1.12.</b> Características de un catalizador enzimático intensificado dependiente de oxígeno en soporte sólido. ....	73
<b>Figura 1.13.</b> Factores que modifican la eficacia catalítica de un catalizador enzimático en soporte sólido dependiente de oxígeno.....	75
<b>Figura 1.14.</b> Limitaciones/retos de las enzimas dependientes de oxígeno.....	79
<b>Figura 1.15.</b> Estrategias de ingeniería enzimática para la mejora del rendimiento catalítico industrial, adaptada de [234].....	81
<b>Figura 1.16.</b> Ventajas y desventajas/retos en de las oxidaciones enzimáticas en medios no convencionales.....	82

<b>Figura 1.17.</b> Ingeniería de reactores para la intensificación de oxidaciones dependientes del oxígeno. ....	85
<b>Figura 1.18.</b> Inmovilización covalente multipuntual sobre glioxil-agarosa. Figura adaptada de [279].....	91
<b>Figura 1.19.</b> Activación de la agarosa con DVS y posterior reacción del soporte activado con proteínas. Figura adaptada de [287].....	93
<b>Figura 1.20.</b> Estructura química de la polietilenimina ramificada. ....	95
<b>Figura 1.21.</b> Agarosa-epoxi recubierta con polietilenimina, que reacciona por intercambio iónico con los grupos de alta densidad negativa de la enzima. ....	96
<b>Figura 1.22.</b> Estructura química del polímero dextrán-sulfato.....	97
<b>Figura 1.23.</b> MANAE-agarosa recubierta con dextrán-sulfato, que reacciona por intercambio iónico con los grupos de alta densidad positiva de la enzima. ....	98
<b>Figura 1.24.</b> Principales características de los materiales de los soportes empleados para la inmovilización de enzimas. ....	100
<b>Figura 1.25.</b> Estructura vertebral de la agarosa. ....	102
<b>Figura 1.26.</b> Detección óptica de oxígeno en disolución. Se puede utilizar un sensor integrado de un punto (a) o un microsensar (b). Para determinar el pH o el O <sub>2</sub> suele utilizarse un electrodo convencional (c). Figura adaptada de [381].....	105
<b>Figura 1.27.</b> Etapas en la detección in situ del oxígeno intrapartícula. ....	108
<b>Figura 3.1.</b> Estructura química y análisis elemental del complejo de Rutenio [Ru(pbbs) <sub>3</sub> ] sintetizado por el grupo GSOLFA de la Universidad Complutense de Madrid.....	118
<b>Figura 3.2.</b> Estructura química de los ligandos quelantes bpds y F <sub>15ap</sub> del Ru(bpds) <sub>2</sub> [398]. ....	118
<b>Figura 3.3.</b> Sistema experimental de medición de actividad enzimática. Consta de una placa calefactora con termopar y agitación, junto con viales de vidrio de 7 mL de volumen total. ....	119
<b>Figura 3.4.</b> Representación de los biorreactores de Sartorius y Applikon empleados. ....	121
<b>Figura 3.5.</b> Sensor de oxígeno FireSting®-PRO de Pyroscience [403]. ....	123
<b>Figura 3.6.</b> Equipo de fibra óptica sensible a la fase (OPTOSEN®) con su sistema experimental. ....	124
<b>Figura 3.7.</b> Principio de la medición del tiempo de vida en el dominio de la frecuencia. ....	139

<b>Figura 3.8.</b> Decaimiento de la fluorescencia de la rodamina 6G obtenido mediante TCSPC.....	142
<b>Figura 3.9.</b> Microscopio confocal de barrido láser (TCS SP8 de Leica). Imagen obtenida del CAI de Técnicas Biológicas de la UCM.....	143
<b>Figura 4.1.</b> Eficacia de la enzima ( $\gamma$ ) en función de la cinética intrínseca respecto al oxígeno y la concentración de sustrato principal inicial.....	154
<b>Figura 4.2.</b> Determinación de actividad frente a $[S]$ para las diferentes enzimas, mostrando la constante de afinidad aparente respecto al sustrato principal, $K_{Sapp}$ .....	156
<b>Figura 4.3.</b> Pares de combinaciones de $K_S$ y $K_{O_2}$ que satisfacen los valores de $K_{Sapp}$ calculados previamente.....	157
<b>Figura 4.4.</b> Cursos de consumo de oxígeno simulados a diferentes valores de $K_{O_2}$ (mM) y $[S]/K_S$ .....	158
<b>Figura 4.5.</b> Relación entre actividad observable y actividad máxima, $\gamma$ , frente a $O_2$ a diferentes valores de $K_{O_2}$ (mM) y $S/K_S$ . ....	159
<b>Figura 4.6.</b> Datos experimentales de actividad ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) frente a concentración de oxígeno ( $\mu\text{M}$ ) a distintas $[S]$ . ....	161
<b>Figura 4.7.</b> Análisis diferencial de los parámetros cinéticos aparentes dependientes del oxígeno frente al sustrato principal $[S]$ para GOX, GalOx y lacasa.....	163
<b>Figura 4.8.</b> Ejemplo representativo del análisis integral de simple respuesta con BM para GOX. ....	166
<b>Figura 4.9.</b> Ejemplo representativo del análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX.....	168
<b>Figura 4.10.</b> Análisis de los límites de operación y los cursos temporales de conversión de cada enzima.....	171
<b>Figura 4.11.</b> Rendimiento de ácido glucónico frente a tiempo para GOX. ....	172
<b>Figura 4.12.</b> Conversión de galactosa frente a tiempo para GalOx variando la saturación de aire. ....	173
<b>Figura 5.1.</b> Ejemplo de una simulación del factor de eficacia y $\gamma$ con la carga enzimática y $K_{O_2}$ . ....	180
<b>Figura 5.2.</b> Valores experimentales y simulados del factor de eficacia frente a la actividad ofrecida. ....	181
<b>Figura 5.3.</b> Variación de las constantes observables del modelo cinético en función de la actividad máxima inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y del factor de eficacia a diferentes valores del $K_{O_2}$ intrínseco (mM).....	185

<b>Figura 5.4.</b> Justificación de la simplificación del modelo cinético para los casos de alta $K_{O_2}$ (GOX y GalOx).	187
<b>Figura 5.5.</b> Valores experimentales de las constantes cinéticas en función del factor de eficacia.	189
<b>Figura 5.6.</b> Análisis diferencial de la actividad de GOX ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la concentración de oxígeno (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel.	190
<b>Figura 5.7.</b> Ajuste de los datos integrales mediante múltiple respuesta en Aspen para la GOX.	193
<b>Figura 5.8.</b> Oportunidades de intensificación para enzimas inmovilizadas dependientes de oxígeno.	196
<b>Figura 6.1.</b> Velocidad de reacción inicial de GalOx variando las concentraciones de los distintos activadores.	201
<b>Figura 6.2.</b> Cursos temporales de oxígeno para diferentes compuestos activadores junto con la adición de catalasa o peróxido de hidrógeno.	205
<b>Figura 6.3.</b> Velocidad de reacción específica en función del tiempo para diferentes compuestos activadores junto con la adición de catalasa o peróxido de hidrógeno.	207
<b>Figura 6.4.</b> Reacciones de cribado para seleccionar las mejores condiciones de reacción para la oxidación de galactosa.	209
<b>Figura 6.5.</b> Estrategias empleadas para inmovilizar galactosa oxidasa (GalOx) en soportes activados.	214
<b>Figura 6.6.</b> Caracterización de las preparaciones inmovilizadas de GalOx al variar la actividad ofrecida sobre soporte sólido.	217
<b>Figura 6.7.</b> Rango dinámico de medida del $[\text{Ru}(\text{bpds})_2]$ y $[\text{Ru}(\text{pbbs})_3]$ en distintas condiciones de % oxígeno e incubados tanto en disolución como inmovilizados en PEI-Ag.	223
<b>Figura 6.8.</b> Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre VS-agarosa.	225
<b>Figura 6.9.</b> Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre VS-Purolite.	226
<b>Figura 6.10.</b> Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre dextrán sulfato-Purolita.	228
<b>Figura 6.11.</b> Reacción de oxidación de galactosa en biorreactor con biocatalizador/activador coinmovilizado.	232

<b>Figura 7.1.</b> Esquema de la nomenclatura de la distribución de proteína en la partícula. .....	239
<b>Figura 7.2.</b> Simulación de cursos de inmovilización a diferentes constantes cinéticas intrínsecas. ....	241
<b>Figura 7.3.</b> Relación entre las constantes de inmovilización intrínseca y aparente obtenidas a partir de simulaciones de varios procesos de inmovilización con diferentes difusividades efectivas de proteína. ....	243
<b>Figura 7.4.</b> Parametrización del gradiente de proteínas en cursos de inmovilización..	244
<b>Figura 7.5.</b> Influencia de la difusividad efectiva en la distribución de proteína en la partícula. ....	246
<b>Figura 7.6.</b> Influencia del tamaño de partícula en la distribución de proteína en la partícula.. ....	247
<b>Figura 7.7.</b> Parametrización del gradiente de proteína resultante de la simulación de diferentes cursos de inmovilización variando parámetros clave.. ....	248
<b>Figura 7.8.</b> Perfil de concentración de la proteína GlyDH en la partícula.. ....	250
<b>Figura 7.9.</b> Perfil de concentración de la proteína GFP en la partícula.....	251
<b>Figura 7.10.</b> Parametrización de la distribución de las proteínas GlyDH y GFP en la partícula utilizando los módulos de inmovilización teórico y observable.....	252
<b>Figura 7.11.</b> Parametrización de la distribución de diversas proteínas en la partícula utilizando los módulos de inmovilización teórico y observable.....	254
<b>Figura 8.1.</b> Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) en reacciones en el agitador rotativo.....	260
<b>Figura 8.2.</b> Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y $[O_2]$ en reacciones en reactor no instrumentado de 100 mL con GOX en PEI-Ag.....	261
<b>Figura 8.3.</b> Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y $[O_2]$ en reacciones en biorreactor de 500 mL con GOX en PEI-Ag.. ....	263
<b>Figura 8.4.</b> Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y $[O_2]$ en reacciones en biorreactor de 1.0 L con GOX en PEI-Ag.. ....	265
<b>Figura 8.5.</b> Cursos temporales de conversión de galactosa y $[O_2]$ en reacciones en biorreactor de 500 mL con GalOx en DS-Ag.....	268
<b>Figura 8.6.</b> Simulación de los cursos de reacción con el tiempo empleando el modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de oxígeno y variando $k_{La}$ ....	272
<b>Figura 8.7.</b> Simulación de los cursos de reacción con el tiempo empleando el modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de oxígeno y variando $K_M$ ....	273



---

---

# NOMENCLATURA

---

---

## *Nomenclatura*

<b>ABTS</b>	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>Act</b>	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
<b>Ag</b>	Agarosa
<b>AG</b>	Ácido glucónico
<b>AIC</b>	Criterio de Akaike
<b>BM</b>	Berkeley Madonna
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C</b>	Concentración de sustrato (mM)
<b>CAT</b>	Catalasa de hígado bovino
<b>DAD</b>	Detector de matriz de diodos
<b>Deff</b>	Coefficiente de difusión efectivo ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
<b>DES</b>	Disolventes eutécticos de bajo punto de fusión
<b>DFP</b>	2,5-diformilfurano
<b>DS</b>	Dextrán-sulfato
<b>DVS</b>	Divinil-sulfona
<b>E</b>	Concentración de enzima ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b>EDA</b>	Etilendiamina
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada
<b>F<sub>95</sub></b>	F de Fischer al 95% de confianza
<b>Fab</b>	Fragmentos de unión a antígenos
<b>f<sub>mod</sub></b>	Frecuencia de modulación (kHz)
<b>GalOx</b>	Galactosa oxidasa
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde

<b>GluDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>Gly</b>	Glioxil
<b>GlyDH</b>	Glicerol deshidrogenasa
<b>GOX</b>	Glucosa oxidasa
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HMF</b>	5-hidroximetilfurfural
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>j</b>	Flujo molar ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>K</b>	Número de parámetros del modelo cinético
<b>k</b>	Constante cinética de primer orden ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>k<sub>La</sub></b>	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante de afinidad del modelo simplificado (mM)
<b>K<sub>O2</sub></b>	Constante de afinidad del oxígeno (mM)
<b>K<sub>S</sub></b>	Constante de afinidad del sustrato principal (mM)
<b>K<sub>sv</sub></b>	Constante de proporcionalidad de Stern-Volmer
<b>LI</b>	Líquidos iónicos
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>MANAE</b>	Monoamino-N-aminoetil
<b>Mb</b>	Mioglobina
<b>m<sub>cat</sub></b>	Concentración de catalizador ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b>N</b>	Número de datos experimentales
<b>NaPi</b>	Tampón fosfato de sodio
<b>NOX</b>	NADH oxidasa

## *Nomenclatura*

<b>OTR</b>	Velocidad de transferencia de oxígeno ( $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>OUR</b>	Velocidad de consumo de oxígeno ( $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>PB</b>	Azul de Prussia
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PET</b>	Tereftalato de polietileno
<b>P<sub>i</sub></b>	Concentración local de proteína en el radio de partícula <i>i</i> en comparación con la concentración máxima
<b>PID</b>	Controlador proporcional, integral y derivativo
<b>Pur</b>	Purolite Lifetech™ (metacrilato epóxido)
<b>Q</b>	Caudal volumétrico ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>r</b>	Radio de partícula ( $\mu\text{m}$ )
<b>R</b>	Velocidad de reacción ( $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación estadística
<b>R<sub>i</sub></b>	Fracción de proteína acumulada desde el radio <i>i</i> hasta la superficie exterior (%)
<b>RID</b>	Detector de índice de refracción
<b>RMSE</b>	Error cuadrático medio
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>S</b>	Sustrato principal
<b>SSR</b>	Suma de residuos al cuadrado
<b>STY</b>	Rendimiento espacio-temporal
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tiempo de vida medio de la enzima (h)
<b>TCSPC</b>	Recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo
<b>TOF</b>	Frecuencia de recambio ( $\text{s}^{-1}$ )

<b>TtADH</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermus thermophilus</i>
<b>TTN</b>	Número total de recambio ( $\text{mol}_{\text{producto}}/\text{mol}_{\text{enzima}}$ )
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
<b>V<sub>s</sub></b>	Velocidad superficial del gas ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
<b>VS</b>	Vinil-sulfona (grupos químicos)
<b>2-LPS</b>	Sistemas de dos fases líquidas

### **LETRAS GRIEGAS**

$\gamma$	Cociente de actividad observada entre actividad máxima (gamma)
$\tau$	Tiempo de vida medio del luminóforo (ns)
$\phi$	Desplazamiento de fase (radianes)
$\lambda$	Longitud de onda (nm)
$\alpha$	Exponente de la velocidad superficial del gas
$\beta$	Exponente de la velocidad de agitación
$\varepsilon$	Porosidad de partícula
$\mu$	Viscosidad ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )

### **SUBÍNDICES**

<b>0</b>	En la fase líquida
<b>app</b>	Aparente
<b>calc</b>	Calculado
<b>exp</b>	Experimental
<b>ext</b>	Exterior
<b>i</b>	Número de capa en la proteína (1...n)
<b>Imm</b>	Inmovilizado
<b>ini</b>	Inicial
<b>max</b>	Máximo

*Nomenclatura*

<b>obs</b>	Observable
<b>sim</b>	Simulado
<b>sop</b>	Soporte
<b>standard</b>	Condiciones de medida en saturación de aire y [S] establecida, a 30°C
<b>Teo</b>	Teórico

---

---

# **RESUMEN/ABSTRACT**

---

---



## **RESUMEN**

Las transformaciones químicas basadas en procesos enzimáticos han ganado una enorme relevancia en los últimos años en el contexto del desarrollo sostenible. Las suaves condiciones de reacción necesarias unidas a la considerable reducción de subproductos y la baja toxicidad de los disolventes empleados y la eficiencia catalítica con exquisita selectividad han situado a la biocatálisis como referencia de futuro y sostenibilidad.

Dentro de la biocatálisis, las oxidasas son un grupo de enzimas muy atractivas por su capacidad para oxidar una amplia variedad de sustratos. Su potencial aplicación en campos como la remediación de contaminantes, la industria farmacéutica o la producción de compuestos de interés en biorrefinerías las ha convertido en claros objetivos de desarrollo en ingeniería de proteínas y bioprocesos. Sin embargo, su aplicación está fuertemente limitada por la baja solubilidad del O<sub>2</sub> en medio acuoso, siendo necesario un aporte continuado de éste durante la reacción. Tanto la ingeniería de catalizadores como la de reactores o del medio de reacción son habituales estrategias para la intensificación de procesos dependientes de oxígeno. Aquí es donde entra en juego la inmovilización de enzimas. Esta técnica permite la integración del catalizador en una matriz sólida para su uso en operaciones en continuo, así como una fácil separación del medio de reacción y una posible reutilización. Además, un buen diseño del biocatalizador inmovilizado le puede otorgar una mayor estabilidad frente a altas temperaturas, disolventes orgánicos y condiciones extremas de pH o esfuerzo mecánico, por tanto, aumentando su productividad.

En este contexto, en la presente Tesis se busca el diseño y la caracterización de catalizadores inmovilizados dependientes de oxígeno, así como la identificación de sus principales limitaciones y oportunidades de intensificación. También se estudia el efecto de la velocidad de inmovilización en la distribución de enzima en la partícula y la importancia de la velocidad de transferencia de oxígeno en los procesos catalizados por oxidasas.

En primer lugar, se realiza un análisis cinético en fase soluble de cuatro oxidasas de interés biotecnológico, glucosa oxidasa (GOX) galactosa oxidasa (GalOx), lacasa y tirosinasa. Estas enzimas siguen un modelo cinético hiperbólico tipo Ping-Pong dependiente de dos sustratos. Se adquieren datos de cursos completos de consumo de oxígeno disuelto y se analizan mediante la combinación de métodos diferenciales e

## *Resumen*

integrales. Con esto, se obtiene la dependencia de la velocidad cada enzima respecto a la concentración de sustrato principal y oxígeno, y se analizan sus oportunidades de intensificación. Los resultados muestran una elevada dependencia de la velocidad respecto al O<sub>2</sub> para GOX y GalOx, intermedia para la lacasa y baja para la tirosinasa. Para terminar, los parámetros cinéticos obtenidos se validan y aplican en reacciones de oxidación de azúcares en un reactor tipo tanque agitado instrumentado y con suministro de aire, con buenas predicciones para GOX y GalOx.

Posteriormente se aplica este mismo método de análisis, pero con las enzimas en fase heterogénea. Para eso, se estudia y caracteriza su inmovilización en soportes sólidos porosos de agarosa y metacrilato. Se exploran distintas químicas de inmovilización, aplicando finalmente una reversible por intercambio aniónico en GOX, lacasa y tirosinasa y por intercambio catiónico en GalOx. Además, se analiza el efecto de la carga enzimática en la eficacia observable del catalizador y en las constantes de afinidad observables. También, se realizan análisis diferenciales e integrales de los cursos de reacción para elucidar la cinética intrínseca de cada caso. Por otro lado, se desarrolla un modelo matemático de reacción-difusión para simular la eficacia de los catalizadores y analizar factores limitantes y oportunidades de intensificación.

Después, se analiza la GalOx en mayor profundidad debido a su interés más reciente de aplicación en biorrefinerías. Se comienza estudiando su mecanismo de activación, revelándose la hemoglobina como un excelente candidato para ello. Además, se analiza la influencia del peróxido de hidrogeno en la activación, descubriéndose como un elemento a optimizar en la reacción. Posteriormente, se diseña un catalizador de galactosa oxidasa, evaluando su actividad y estabilidad en distintas químicas de inmovilización reversibles e irreversibles. Para investigar más profundamente las limitaciones del catalizador, se analiza la concentración de oxígeno en el interior de la partícula mediante la incorporación de un indicador luminiscente. Este estudio muestra claramente el incremento de restricciones difusionales y la disminución de oxígeno disponible con el incremento de carga enzimática. Finalmente, se escoge el catalizador inmovilizado sobre dextrán sulfato-agarosa y se le incorpora la hemoglobina como activador para su empleo autosuficiente. Esta aplicación consigue una conversión del 80% en 4 horas de reacción en un reactor tipo tanque agitado con suministro de aire.

Por otro lado, se examina el proceso de inmovilización de proteínas mediante la aplicación de un modelo matemático para predecir su perfil de distribución en la partícula. Con el modelo, se analizan las variables fundamentales del proceso de inmovilización y

se definen parámetros para su caracterización. Además, se define un módulo observable de inmovilización que es capaz de predecir el perfil de distribución de la proteína según su tiempo de inmovilización. Para terminar, se valida el modelo de reacción-difusión mediante la predicción de perfiles de concentración de proteína experimentales.

Finalmente, se realizan reacciones de oxidación de glucosa y galactosa para analizar la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno en el proceso. Para ello, se emplean los catalizadores previamente diseñados con GOX y GalOx inmovilizadas. Se comienza por una prueba de concepto en reactores no instrumentados de bajo volumen (15 mL de volumen de reactor), seguido del escalado a reactores instrumentados de media escala (0.5 y 1.0 L de volumen de reactor). Durante las reacciones, se monitoriza la concentración de oxígeno disuelto y se extraen muestras para el análisis de la evolución de sustratos o productos. En cada caso, se varían tanto la velocidad de agitación como el caudal de gas para obtener casos paradigmáticos de distintas limitaciones por oxígeno. Para terminar, se presenta un modelo cinético para simular y predecir los cursos de reacción. Se realiza un análisis de sensibilidad observando la influencia del OTR en la conversión y en las concentraciones de  $O_2$  y  $H_2O_2$  en la reacción.

En conclusión, esta Tesis doctoral aborda distintos aspectos de la biocatálisis, combinando la inmovilización enzimática con herramientas de modelado computacional para el diseño de biocatalizadores enzimáticos dependientes de oxígeno y su posterior aplicación en biorreactor. Comenzando con un análisis cinético de las oxidasas en fase soluble y heterogénea, seguido del estudio más profundo de la inmovilización de la GalOx y examinando la importancia de la distribución de la enzima en la partícula inmovilizada, para terminar con la aplicación de los biocatalizadores en reactores con suplemento de aire.

## **ABSTRACT**

Chemical transformations based on enzymatic processes have gained enormous relevance in recent years due to their greater respect for the environment. The mild reaction conditions required, together with the considerable reduction of by-products and the low toxicity of the solvents used, have positioned biocatalysis as a reference for the future and sustainability.

Within biocatalysis, oxidases are a very attractive group of enzymes due to their ability to oxidize a wide variety of substrates. Their potential application in fields such as pollutant remediation, the pharmaceutical industry, or the production of compounds of interest in biorefineries has made them clear targets for development in protein engineering and bioprocesses. However, their application is strongly limited by the low solubility of O<sub>2</sub> in aqueous media, requiring a continuous supply of O<sub>2</sub> during the reaction. Catalyst, reactor, and reaction medium engineering are common strategies for the intensification of oxygen-dependent processes. This is where enzyme immobilization comes into play. This technique allows the integration of the catalyst into a solid matrix for use in continuous operations, as well as easy separation from the reaction medium and possible reuse. In addition, a good design of the immobilized biocatalyst can give it greater stability against high temperatures, organic solvents and extreme conditions of pH or mechanical stress, thus increasing its productivity.

In this context, the present Thesis aims at the design and characterization of oxygen-dependent immobilized catalysts, as well as the identification of their main limitations and opportunities for intensification. The effect of the immobilization rate on the enzyme distribution in the particle and the importance of the oxygen transfer rate in oxidase catalyzed processes are also studied.

First, a soluble phase kinetic analysis of four oxidases of biotechnological interest, glucose oxidase (GOX), galactose oxidase (GalOx), laccase and tyrosinase, is performed. These enzymes follow a two-substrate-dependent hyperbolic Ping-Pong kinetic model. Data from complete courses of dissolved oxygen consumption are acquired and analyzed by a combination of differential and integral methods. With this, the rate dependence of each enzyme on the main substrate and oxygen concentration is obtained, and their opportunities for intensification are analyzed. The results show a high-rate dependence on O<sub>2</sub> for GOX and GalOx, intermediate for laccase and low for tyrosinase. Finally, the kinetic parameters obtained are validated and applied to sugar oxidation reactions in an

instrumented stirred tank reactor with air supply, with good predictions for GOX and GalOx.

Subsequently, this same method of analysis is applied, but with the enzymes in heterogeneous phase. For this purpose, their immobilization on solid porous agarose and methacrylate supports is studied and characterized. Different immobilization chemistries are explored, finally applying a reversible one by anion exchange in GOX, laccase and tyrosinase and by cation exchange in GalOx. In addition, the effect of enzyme loading on the observable catalyst efficiency and observable saturation constants is analyzed. Also, differential, and integral analyses of the reaction courses are performed to elucidate the intrinsic kinetics of each case. On the other hand, a mathematical reaction-diffusion model is developed to simulate the efficiency of the catalysts and to analyze limiting factors and opportunities for intensification.

Then, GalOx is analyzed in greater depth due to its more recent interest in biorefinery applications. We start by studying its activation mechanism, revealing hemoglobin as an excellent candidate for it. In addition, the influence of hydrogen peroxide in the activation is analyzed, being discovered as an element to be optimized in the reaction. Subsequently, a galactose oxidase catalyst is designed, evaluating its activity and stability in different reversible and irreversible immobilization chemistries. To further investigate the limitations of the catalyst, the oxygen concentration inside the particle is analyzed by incorporating a luminescent indicator. This study clearly shows the increase of diffusional restrictions and the decrease of available oxygen with increasing enzyme loading. Finally, the catalyst immobilized on dextran sulfate-agarose is chosen and hemoglobin is incorporated as an activator for its self-sufficient use. This application achieves a conversion of 80% in 4 hours of reaction in a stirred tank reactor with air supply.

On the other hand, the protein immobilization process is examined by applying a mathematical model to predict its distribution profile in the particle. With the model, the fundamental variables of the immobilization process are analyzed and parameters for its characterization are defined. In addition, an observable immobilization module is defined that is able to predict the distribution profile of the protein according to its immobilization time. Finally, the reaction-diffusion model is validated by predicting experimental protein concentration profiles.

Finally, glucose and galactose oxidation reactions are performed to analyze the influence of oxygen transfer rate on the process. For this purpose, previously designed

## *Abstract*

catalysts with immobilized GOX and GalOx are used. It starts with a proof of concept in low volume non-instrumented reactors (15 mL reactor volume), followed by scale-up to medium scale instrumented reactors (0.5 and 1.0 L reactor volume). During the reactions, dissolved oxygen concentration is monitored, and samples are taken for analysis of substrate or product evolution. In each case, both stirring rate and gas flow rate are varied to obtain paradigmatic cases of different oxygen limitations. Finally, a kinetic model is presented to simulate and predict the reaction courses. A sensitivity analysis is performed by observing the influence of OTR on the conversion and on the concentrations of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction.

In conclusion, this PhD Thesis addresses different aspects of biocatalysis, combining enzyme immobilization with computational modeling tools for the design of oxygen-dependent enzymatic biocatalysts and their subsequent application in bioreactor. Starting with a kinetic analysis of oxidases in soluble and heterogeneous phase, followed by the deeper study of GalOx immobilization and examining the importance of enzyme distribution in the immobilized particle, and ending with the application of biocatalysts in air-supplemented reactors.

---

---

**CAPÍTULO 1.**

**INTRODUCCIÓN**

---

---



# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. MEDIOAMBIENTE Y QUÍMICA SOSTENIBLE**

Los ingenieros químicos reconocen desde hace tiempo la necesidad de tener en cuenta parámetros tanto medioambientales como económicos a la hora de desarrollar procesos que se aplicarán a la fabricación de productos químicos. Más allá del uso estequiométrico de reactivos, la catálisis ofrece ventajas significativas y, en la actualidad, se hace cada vez más hincapié en las reacciones químicas mediadas biológicamente, denominadas más generalmente bioconversiones.

A mediados de la década de 1980, crecía la preocupación por las grandes cantidades de residuos que generaba la industria química. Estaba claro que era necesario un cambio de paradigma, desde los conceptos tradicionales de eficiencia y selectividad de las reacciones, que se centran en gran medida en el rendimiento químico, a otro que asigna valor a la maximización de la utilización de materias primas, la eliminación de residuos y la evitación del uso de sustancias tóxicas y/o peligrosas [1]. Había una necesidad acuciante de una química alternativa, más limpia, que aprovechara mejor los recursos y produjera menos residuos. A medida que aumentaba la concienciación sobre el medio ambiente, se fue haciendo más hincapié en la prevención de residuos en origen que en la eliminación de residuos y el control de la contaminación mediante soluciones de final de proceso. La Ley estadounidense de Prevención de la Contaminación de 1990 [2] centró la atención en la necesidad de reducir la contaminación ambiental y reconoció que la prevención de residuos en origen no sólo elimina el coste del tratamiento de residuos sino que, de hecho, refuerza la competitividad económica mediante un uso más eficiente de las materias primas. Esta ley dio lugar a un cambio fundamental en la estrategia de protección del medio ambiente -del tratamiento de residuos "al final de la cadena" a la prevención de residuos- y propició la aparición del término "química verde" en la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) a principios de la década de 1990.

Una definición sucinta de la química verde es la siguiente: La química verde utiliza eficientemente las materias primas (preferiblemente renovables), elimina los residuos y evita el uso de reactivos y disolventes tóxicos o peligrosos en la fabricación y aplicación de productos químicos [3]. La química verde es, ante todo, prevención de la

## Capítulo 1. Introducción

contaminación y disminución en la generación de residuos. El término obtuvo reconocimiento formal con la publicación de los 12 principios de la química verde, por Anastas y Warner en 1998 en su libro *Green Chemistry: Teoría y práctica* [4], en el que el elemento fundamental es "benigno por diseño". Los 12 principios de la química verde pueden resumirse del siguiente modo.

1. Prevención de residuos en lugar de remediación
2. Eficacia atómica
3. Materiales menos peligrosos
4. Productos más seguros por su diseño
5. Disolventes inocuos
6. Eficiencia energética por diseño
7. Materias primas preferiblemente renovables
8. Síntesis más cortas (evita la derivatización)
9. Reactivos catalíticos en lugar de estequiométricos
10. Diseño de productos para su degradación
11. Metodologías analíticas para la prevención de la contaminación
12. Procesos intrínsecamente más seguros

El término desarrollo sostenible se introdujo en 1987 con la publicación del informe Brundtland, *Nuestro futuro común*, de la Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo [5]. El informe reconocía la necesidad de un desarrollo industrial y social que proporcionara a la creciente población mundial una calidad de vida satisfactoria, pero que ese desarrollo también debía ser sostenible a lo largo del tiempo. El desarrollo sostenible se definió como "el desarrollo que satisface las necesidades de la generación actual sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades" [5]. Según Graedel [6] para ser sostenible, una tecnología debe cumplir dos condiciones: (i) los recursos naturales deben utilizarse a un ritmo que no agote inaceptablemente los suministros a largo plazo, y (ii) los residuos deben generarse a un ritmo no superior al que pueda asimilar fácilmente el entorno natural. Está muy claro que una economía basada en recursos fósiles no renovables -petróleo, carbón y gas natural- consume recursos naturales a un ritmo mucho mayor del que se producen en la naturaleza y que el dióxido de carbono se está generando a un ritmo mucho mayor del que puede ser asimilado por el entorno natural, lo que conduce a un cambio climático indeseable. Por tanto, es necesario encontrar un equilibrio entre la equidad social, el impacto medioambiental y el desarrollo económico. El desarrollo sostenible se diferencia de la

química verde en que incorpora el aspecto económico. Si una tecnología no es económicamente competitiva, no será sostenible a largo plazo. El mayor interés por el crecimiento ecológico y sostenible, unido a la creciente preocupación por el cambio climático, ha centrado la atención en la eficiencia de los recursos y está impulsando la transición de una economía lineal de "tomar-hacer-usar-eliminar" a una economía circular más ecológica y sostenible [7]. La bioeconomía circular se basa en la utilización de recursos biológicos renovables, la minimización de residuos y la promoción de procesos industriales y agrícolas que respeten los límites ambientales. En este contexto, se fomenta la integración de prácticas sostenibles en todos los aspectos de la producción y el consumo, lo que contribuye tanto a la mitigación del cambio climático como a la promoción de un desarrollo económico equitativo y sostenible.

## **1.2. EL PAPEL DE LA BIOCATÁLISIS EN LA QUÍMICA SOSTENIBLE**

Dentro de la catálisis, la biocatálisis ofrece una serie de características que inciden y enfatizan en aspectos clave de la catálisis como herramienta clave para llevar a cabo una química sostenible. Los procesos biocatalíticos pueden ser ecológicos y sostenibles [8–10]:

- Las enzimas proceden de recursos baratos y renovables con una disponibilidad y unos costes estables, a diferencia de los precios y la disponibilidad fluctuantes de los escasos catalizadores de metales preciosos.
- Las enzimas son biodegradables, esencialmente no tóxicas y no peligrosas.
- Los procesos biocatalíticos suelen llevarse a cabo en condiciones suaves, en agua a presiones y temperaturas cercanas a las ambientales. Esto permite un acoplamiento relativamente sencillo de procesos en cascada rentables y ambientalmente atractivos [11].
- Los procesos biocatalíticos suelen prescindir la activación de grupos funcionales, y etapas de protección y desprotección, lo que permite procesos económicos por etapas [12] que generan menos residuos y son más rentables y sostenibles que los procesos convencionales.
- Las enzimas suelen presentar una excelente quimio-, regio- y estereo-selectividad.

El creciente éxito de la biocatálisis en la producción industrial de sustancias químicas en las últimas dos o tres décadas ha sido posible gracias a los espectaculares avances de la biología molecular. Tradicionalmente, el descubrimiento de enzimas implicaba la recogida de muestras de campo para preparar cultivos microbianos en el laboratorio. El

desarrollo de la bioinformática en combinación con las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) [13] cambió radicalmente esta situación al permitir la bioprospección de nuevas enzimas codificadas en los genes disponibles en las muestras recogidas en el medio ambiente. En resumen, el número de enzimas disponibles aumentó drásticamente. Además, los avances de la microbiología industrial en fermentaciones y síntesis microbiana facilitaron la producción de enzimas a gran escala y bajo coste [14,15].

Paralelamente, se desarrollaron actividades totalmente nuevas y mejoras espectaculares en los atributos esenciales de enzimas nuevas y existentes (actividad, estabilidad y selectividad) gracias a los avances de la ingeniería de proteínas en evolución dirigida [16,17] o mutagénesis racional [18,19]. En procesos industriales, las enzimas deben trabajar con sustratos a menudo estructuralmente muy diferentes de sus homólogos naturales [20] y a concentraciones de sustrato y producto que superan con creces las habituales en la naturaleza. El enfoque clásico para la optimización de procesos consiste en modificar el proceso para adaptarlo al biocatalizador disponible en el mercado. En cambio, ahora es posible, con la ayuda de la ingeniería de proteínas, modificar el biocatalizador para que se ajuste al proceso ideal, en lo que respecta a parámetros como la concentración de sustrato y producto, la productividad volumétrica y del catalizador (rendimiento espacio-temporal), el tiempo de reacción y la selectividad [21].

Sin embargo, la gran estabilidad de la suspensión enzimática en medio acuoso las convierte en compuestos difíciles de recuperar. Por ello es común que las enzimas se utilicen generalmente en un solo ciclo sin reutilización, lo que resulta difícil de conciliar con una economía circular. Este inconveniente puede solucionarse desarrollando métodos eficaces de inmovilización de enzimas, sobre soportes sólidos o retenidas en biorreactores de membrana, que permitan un reciclaje y reutilización para un proceso rentable y respetuoso con el medio ambiente [22,23]. Además de los avances mencionados, otro que estimula la aplicación de la biocatálisis en la fabricación de productos químicos es la aparición de la economía circular de base biológica, en la que los productos químicos se fabrican a partir de biomasa renovable. Esto implica generalmente la conversión de carbohidratos en medios acuosos, es decir, condiciones ideales para la biocatálisis.

### **1.3. OXIDASAS**

Las oxidaciones revisten una importancia capital en el ámbito de la tecnología química, ya que posibilitan la síntesis de una amplia variedad de compuestos químicos,

el diseño y optimización de procesos industriales eficaces, el abastecimiento energético o el tratamiento de aguas residuales. No obstante, pueden plantear desafíos significativos en términos de selectividad de la reacción, consumo energético, generación de residuos o impacto ambiental. Es por esto que las oxidasas han suscitado un interés creciente en los últimos años, basándose en los avances tanto en el conocimiento científico como en la creciente demanda de métodos sostenibles y eficientes en diversas industrias [24–27]. A continuación, se exponen algunas razones por las que las oxidasas se han convertido en el centro de una renovada atención:

- **Química verde y sostenibilidad.** Los principios de la química verde, que hacen hincapié en los procesos respetuosos con el medio ambiente, han ganado protagonismo. Las oxidasas ofrecen una alternativa ecológica a los métodos químicos tradicionales, trabajando a menudo en condiciones suaves y produciendo menos subproductos.
- **Empleo de oxígeno como cosustrato.** La elevada disponibilidad de oxígeno molecular como sustrato hace a las oxidasas unas enzimas siempre interesantes en la industria biotecnológica.
- **Ingeniería enzimática y evolución dirigida.** Los avances en ingeniería enzimática y evolución dirigida han permitido a los científicos modificar y optimizar las oxidasas para aplicaciones específicas. Esto ha ampliado la gama de sustratos sobre los que pueden actuar las oxidasas y ha mejorado su eficiencia catalítica.
- **Síntesis quimioenzimática de productos farmacéuticos.** La industria farmacéutica ha mostrado un interés creciente por la síntesis quimioenzimática, en la que las enzimas, incluidas las oxidasas, se integran en procesos químicos para agilizar la producción de compuestos farmacéuticos. Este enfoque a menudo conduce a una fabricación más rentable y respetuosa con el medio ambiente.
- **Desarrollo de procesos enantioselectivos.** Las oxidasas son cruciales en el desarrollo de procesos enantioselectivos, que permiten la producción de compuestos quirales de gran pureza óptica. A medida que aumenta la demanda de compuestos enantioméricamente puros, las oxidasas se han convertido en valiosas herramientas en la síntesis asimétrica.
- **Aplicaciones biotecnológicas.** Las oxidasas han encontrado aplicaciones en diversos procesos biotecnológicos, desde la producción de biocombustibles hasta la síntesis de

química fina. Su versatilidad las hace atractivas para una amplia gama de aplicaciones industriales.

- **Mayor conocimiento de los mecanismos enzimáticos.** La investigación actual ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos enzimáticos, incluidos los de las oxidasas. Este conocimiento permite un diseño más racional y la optimización de catalizadores enzimáticos para reacciones específicas.
- **Recursos renovables y biorrefinerías.** El cambio hacia una bioeconomía basada en recursos renovables y procesos sostenibles ha despertado el interés por las enzimas que pueden contribuir a la conversión eficiente de la biomasa en productos valiosos. Las oxidasas desempeñan un papel importante en estos procesos de bioconversión.
- **Avances en ingeniería de bioprocesos.** Las innovaciones en ingeniería de bioprocesos han facilitado el escalado y la aplicación industrial de las reacciones enzimáticas. Esto ha hecho más factible la integración de las oxidasas en procesos de fabricación a gran escala.

En resumen, el reciente aumento del interés por las oxidasas es el resultado del creciente énfasis en las tecnologías sostenibles y ecológicas, junto con los avances en ingeniería de enzimas, biocatálisis y nuestra comprensión de los mecanismos enzimáticos. La versatilidad de las oxidasas para llevar a cabo oxidaciones selectivas y eficientes las sitúa como herramientas valiosas en la búsqueda de procesos químicos más sostenibles y económicamente viables.

Las oxidasas son un tipo de enzimas que catalizan reacciones de oxidación en las que un sustrato actúa como donante de electrones, mientras que una molécula aceptora de electrones, como el oxígeno molecular ( $O_2$ ), actúa como aceptor final de electrones, formando agua, peróxido de hidrógeno u otros productos oxidados. Además, son importantes en sistemas biológicos porque participan en procesos esenciales, como la respiración celular, la biosíntesis de compuestos secundarios y la eliminación de metabolitos tóxicos.

### **1.3.1. Las oxidorreductasas y sus generalidades**

Las enzimas oxidorreductasas incluyen al menos 26 subclases de enzimas implicadas en vías metabólicas cruciales para la célula [28]. Catalizan reacciones de oxidación-reducción que implican la transferencia de electrones, libres o como átomos de hidrógeno, entre un donante (agente reductor, que se oxida) y un aceptor (agente oxidante, que se reduce), o la transferencia de átomos de oxígeno del  $O_2$ , que se reduce, a una molécula

orgánica, que se oxida. Estas reacciones representan al menos un tercio de todas las reacciones enzimáticas registradas en la base de datos BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) [29].

Las oxidorreductasas desempeñan un papel fisiológico fundamental, catalizan reacciones cruciales en todos los sistemas vivos. Para ello, emplean cofactores solubles complejos que intervienen en la catálisis. Se utilizan en el desarrollo de tecnologías químicas para reducir o eliminar la generación de sustancias peligrosas generadas en la producción de compuestos químicos [30,31]. Este grupo de enzimas puede actuar sobre una amplia variedad de compuestos orgánicos (alcoholes, aminas y cetonas) e inorgánicos (incluidos pequeños aniones sulfito y metales como el mercurio).

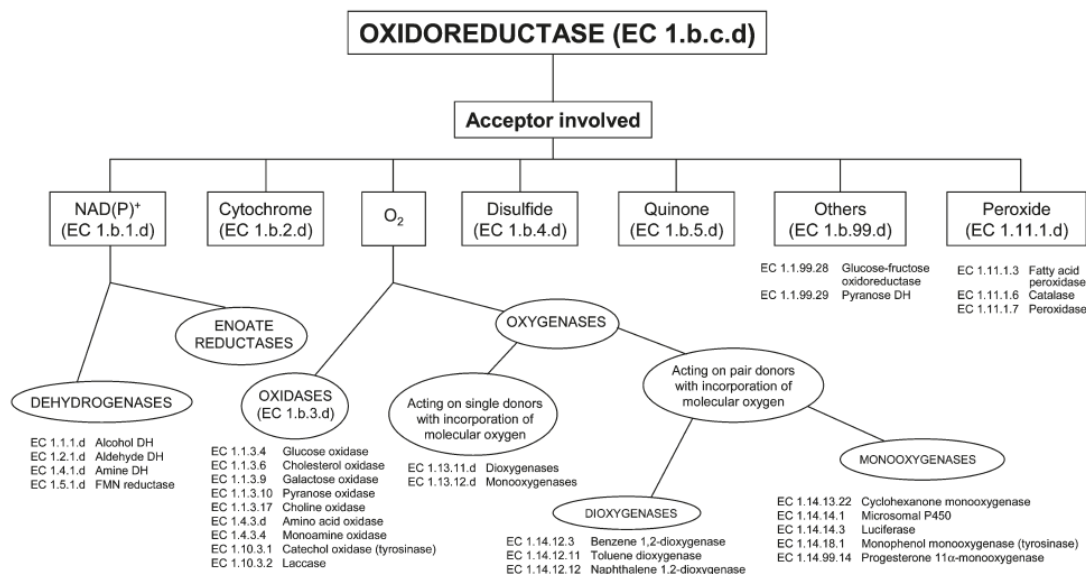
Los aceptores de electrones, es decir, los compuestos que oxidan el sustrato de interés se pueden dividir en dos categorías, inorgánicos u orgánicos. Entre los inorgánicos, algunos ejemplos comunes incluyen el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ), el ion cúprico ( $Cu^{2+}$ ), el nitrato ( $NO_3^-$ ) o el sulfato ( $SO_4^{2-}$ ). Estos aceptores inorgánicos suelen ser utilizados por microorganismos en procesos de respiración anaerobia o en la descomposición de compuestos inorgánicos. Los ejemplos más comunes de cofactores orgánicos incluyen el NAD(P)<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)), el FAD (flavín adenina dinucleótido) y el FMN (flavín mononucleótido), así como compuestos orgánicos como el piruvato, el acetato, el succinato y el citrato. Asimismo, algunas enzimas contienen cofactores que son grupos prostéticos más grandes, como los grupos hemo, que contienen metales como el hierro, y participan en la catálisis de reacciones redox. Estos aceptores orgánicos de electrones suelen ser utilizados en procesos metabólicos por microorganismos y células eucariotas para la generación de energía y la síntesis de compuestos celulares.

A finales de julio de 2010, casi 1200 tipos diferentes de oxidorreductasas fueron clasificadas por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB). En el código clásico de cuatro dígitos propuesto en 1961 (EC a.b.c.d), se asignó el número "1" para indicar la clase de oxidorreductasas (primera cifra, "a"). La segunda cifra ("b") indica el grupo funcional que se oxida o se reduce ("1" denota un grupo CHOH, "2" un grupo CHO o CO COOH o monóxido de carbono, etc.). La tercera cifra ("c") suele indicar el tipo de aceptor implicado: "1" indica NAD(P)<sup>+</sup>, "2" un citocromo, "3" oxígeno molecular, "4" un disulfuro, "5" una quinona o un compuesto similar, "6" un grupo nitrogenado, "7" una proteína ferrosulfurada, "8" una flavina, hasta "99" otros aceptores. En subclases EC 1.13 (oxidorreductasas que actúan

sobre donantes únicos con incorporación de oxígeno molecular) y EC 1.14 (oxidorreductasas que actúan sobre donantes emparejados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular), se utiliza un esquema de clasificación diferente, y subclases (identificadas por la cifra "c") se numeran a partir de 11 en adelante. También se denominan "oxigenasas" y, más concretamente, "monooxigenasas" o "dioxigenasas", en función del número de átomos de oxígeno incorporados en el sustrato oxidado.

Las peroxidasas (oxidorreductasas que actúan sobre un peróxido como aceptor) también se clasifican de forma diferente. Los tres primeros dígitos son siempre EC 1.11.1, mientras que los diferentes sustratos que se oxidan se identifican mediante la cuarta cifra ("d") del código.

La **Figura 1.1** muestra algunas de las oxidorreductasas que han encontrado aplicaciones significativas en química sintética o analítica. En cuanto a la explotación de enzimas aisladas, se ha relacionado principalmente con oxidorreductasas en las que intervienen tres tipos de aceptores: NAD(P)<sup>+</sup> (deshidrogenasas y enoato reductasas), oxígeno (oxidasas, monooxigenasas, dioxigenasas) y peróxido de hidrógeno (peroxidasas).



**Figura 1.1.** Clasificación de las oxidorreductasas que poseen aplicaciones en química sintética o analítica [32].

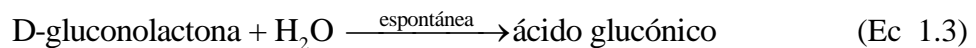
Retomando el grupo de las oxidasas (EC 1.b.3.d), éstas contienen también las alcohol oxidasas, las amina oxidasas y las aminoácido oxidasas entre otras, aunque no se profundizará en ellas. La discusión se centrará en dos carbohidratos oxidasas (glucosa oxidasa EC 1.1.3.4 y galactosa oxidasa EC 1.1.3.9) y dos polifenoles oxidasas (lacasas

EC 1.10.3.2 y las catecoloxidasas que actúan sobre los difenoles y sustancias afines, también conocidas como tirosinasas EC 1.10.3.1).

### 1.3.2. Carbohidrato oxidasas

#### Glucosa oxidasa

La glucosa-1-oxidasa (GOX) EC 1.1.3.4, es una enzima bien caracterizada (**Tabla 1.1**), que cataliza la oxidación de la beta-D-glucosa (Ec. 1.1) a D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno [33,34]. El peróxido de hidrógeno se suele eliminar catalíticamente para formar agua y medio mol de oxígeno (Ec. 1.2), mientras que la D-gluconolactona se descompone de manera espontánea y rápida para producir ácido glucónico (Ec. 1.3). Además, la actividad enzimática de la GOX se reduce cuando el peróxido de hidrógeno no se elimina e inactiva la enzima [33]. También, si el producto de descomposición de la D-gluconolactona, el ácido glucónico (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) se acumula, se reduce el pH de la solución. Curiosamente, se han publicado estudios que muestran que tanto el ácido glucónico [35] como el peróxido de hidrógeno [36,37] pueden provocar inhibición por producto en la GOX.

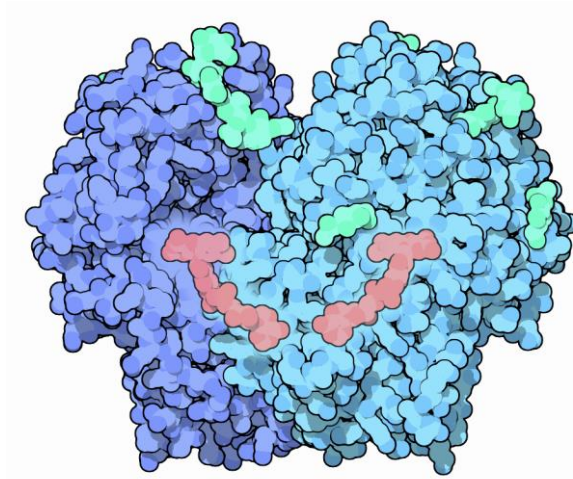


Estructuralmente, como se muestra en la **Figura 1.2**, la glucosa oxidasa es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 80 kDa idénticas y dos dinucleótidos de flavina adenina (FAD). El cofactor FAD actúa como transportador de electrones durante la catálisis [34]. La forma más comúnmente disponible de la enzima procede del hongo *Aspergillus niger* y contiene alrededor de un 20 % en peso de amino azúcar y aproximadamente 16-19 % en peso de carbohidratos, de los cuales el 80 % en peso es N- u O-glucosídicamente unido a moléculas de manosa [38–40].

**Tabla 1.1.** Propiedades de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*.

<b>Propiedad</b>	<b>Valores</b>
<b>Peso molecular</b>	150-186 kDa [38-40]
<b>Actividad específica (pH 5.6; 25-37°C)</b>	80-172 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ [38,40]
<b>K<sub>M</sub> (constante Michaelis respecto a glucosa)</b>	50-74 mM (pH 5.5; 15-30°C, oxígeno; [41]) 33 mM (pH 5.6; 25°C, oxígeno; [38])
<b>Rango de temperatura</b>	20-50°C [42]
<b>Rango de pH</b>	4-7 [36,39]
<b>Punto isoeléctrico (pI)</b>	4.2 [43]

La glucosa oxidasa es una enzima producida de forma natural por algunos hongos e insectos [32]. Como era de esperar, su función natural está estrechamente relacionada con su actividad catalítica (Ec. 1.1-1.3). La función principal de la GOX es actuar como agente antibacteriano y antifúngico mediante la producción de peróxido de hidrógeno. El estrés oxidativo permanente a través del mantenimiento de peróxido de hidrógeno a baja concentración por la actividad catalítica continua de GOX ha sido reportado en la literatura [44-46], siendo muy eficaz contra el crecimiento bacteriano o fúngico, especialmente si el microorganismo no produce eliminadores de peróxido de hidrógeno como la catalasa. La descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa intrínseca del microorganismo puede protegerlo contra el efecto antibacteriano o antifúngico del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, no es tan eficaz si el peróxido de hidrógeno es producido constantemente por la GOX. Experimentos anteriores han demostrado que el nivel micromolar de peróxido de hidrógeno que se mantiene permanente por la actividad catalítica de GOX ya es suficiente para inhibir el crecimiento celular [47].



**Figura 1.2.** Glucosa oxidasa con sus dos subunidades representadas en azul claro, mientras que la coenzima FAD se representa en rosa. Imagen de Goodsell (2006), Instituto de Investigación Scripps.

La glucosa oxidasa es capaz de oxidar monosacáridos, nitroalcanos y compuestos hidroxílicos [34]. Tomando como referencia la velocidad de reacción de la glucosa (100%), sólo la 2-deoxi-D-glucosa (20-30%), la 4-O-metil-D-glucosa (15%) y la 6-deoxi-D-glucosa (10%) son oxidadas por la glucosa oxidasa de *A. niger* a una velocidad significativa [43,48]. Las actividades de la glucosa oxidasa frente a otros sustratos son típicamente pobres, con velocidades de reacción inferiores al 2% de la de la glucosa [43,48].

La utilidad de la GOX en diversos campos ha desencadenado la búsqueda de nuevas fuentes de producción a partir de otras especies de hongos e insectos para satisfacer la demanda de propiedades mejoradas, como una mayor actividad catalítica [49]. A continuación, se muestran sus principales aplicaciones.

### ***Aditivo alimentario***

La glucosa oxidasa tiene la consideración de “Generalmente considerada segura” (GRAS) según la clasificación de la FDA (Administración de alimentos y drogas de EE. UU.) y está disponible a granel para su uso en la industria alimentaria como aditivo en forma líquida (p. ej., envase de 5 litros) o en polvo (p. ej., bolsa de 2 kg). A menudo se clasifica con propiedades antioxidantes, conservantes y estabilizantes. Hay muchos productos alimentarios en los que se puede utilizar la GOX y se puede encontrar una lista detallada en la base de datos de la Comisión del Codex Alimentarius [50]. El preparado de GOX de calidad alimentaria utilizado suele contener una mezcla de GOX y catalasa

porque las dos enzimas se encuentran juntas de forma natural en la pared celular del micelio [51]. La separación de la GOX de la catalasa es costosa y no es esencial en los preparados de calidad alimentaria. Además, la catalasa ayuda a descomponer el peróxido de hidrógeno producido por la GOX, reduciendo así su inhibición y desactivación [36,37]. Además, se utiliza en la industria alimentaria:

- Posee un uso importante en los productos lácteos y el sistema de la lactoperoxidasa como productor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma continua [52].
- Se utiliza como oxidante eficaz para producir pan con textura mejorada y un mayor volumen de la hogaza [53,54].
- Se ha empleado para la eliminación de glucosa sobrante y como aditivo antimicrobiano en la producción de huevo en polvo deshidratado [55].
- Se utiliza como antioxidante/conservante (eliminador de oxígeno) en alimentos enlatados/envasados [56].
- También se ha usado para disminuir la cantidad de alcohol en los vinos, reduciendo la cantidad de glucosa disponible en el medio de fermentación [57].

### ***Producción de ácido glucónico***

El ácido glucónico y sus sales derivadas son “Generalmente consideradas seguras” (GRAS) y pueden utilizarse en una amplia gama de industrias [58] como el teñido de textiles, la limpieza de superficies metálicas, los aditivos alimentarios, los detergentes, el hormigón, los cosméticos [59] y los productos farmacéuticos [60]. Como aditivo alimentario, puede utilizarse como regulador de la acidez, gasificante, estabilizador del color, antioxidante y agente quelante en pan, piensos, bebidas, etc. [61,62]. Industrialmente, el ácido glucónico se produce principalmente por fermentación [63], con una producción mundial estimada de unas  $5 \cdot 10^4$ - $10 \cdot 10^4$  toneladas/año [60,64].

Como todos los procesos de fermentación, existen algunas desventajas. Los cultivos requieren varios nutrientes adicionales y al menos varios días para crecer y realizar la bioconversión. Además, los cultivos producen subproductos no deseados, necesitan purificaciones posteriores y consumen sustratos que impiden una alta eficiencia de conversión. Por tanto, el uso de la conversión enzimática se considera un método viable para reducir los costes y tiempo de producción [65]. Por ejemplo, durante 1997 y 2003 se presentaron patentes que reivindicaban un proceso basado en GOX, capaz de alcanzar casi 100% de conversión, requiriendo menos tiempo que la fermentación y sin impurezas [66,67]. El biorreactor que utiliza glucosa oxidasa inmovilizada es una de las

configuraciones preferidas que se están investigando [68]. La inmovilización permite reusar las enzimas, reduce los costes y permite un diseño relativamente más sencillo de los reactores para producir ácido glucónico de forma continua y eliminar el producto deseado. A pesar de estas ventajas potenciales la falta de adopción industrial implica que hay importantes obstáculos que superar antes de que se produzca la adopción masiva de proceso de bioconversión basado en enzimas.

### *Sensores de glucosa*

Newman y Turner [69] estimaron en 2005 que el valor de mercado mundial de los biosensores es de unos 5.000 millones de dólares, y el 85% se atribuye a los biosensores de glucosa, y muchos de estos sensores disponibles en el mercado se basan en la GOX inmovilizada. La glucosa oxidasa se utiliza comúnmente para construir biosensores amperométricos para aplicaciones médicas [69] y la industria alimentaria [70]. Se aplica un potencial eléctrico constante entre el electrodo de trabajo y el de referencia, provocando una reacción catalítica que impulsa el flujo de corriente que es proporcional a la concentración de la molécula objetivo [71]. Estos sensores amperométricos de glucosa basados en la GOX pueden dividirse en tres generaciones según su principio de funcionamiento y desarrollo histórico [69].

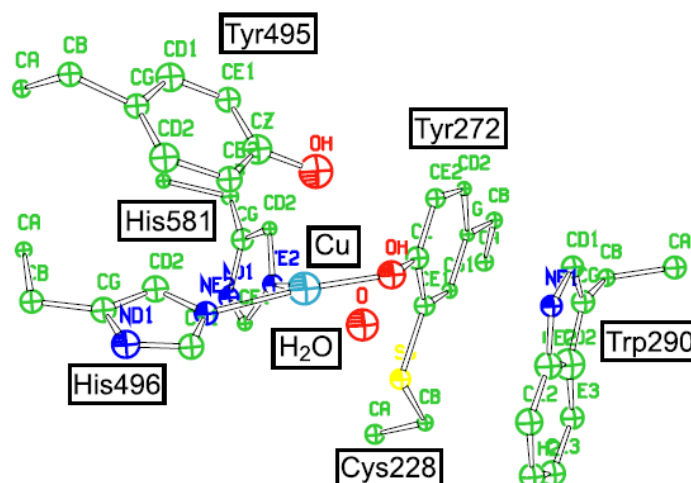
1. En la primera generación, la concentración de oxígeno o peróxido de hidrógeno, medida por un electrodo apropiado, se utiliza como indicador de la concentración de glucosa. Sin embargo, la interferencia por otras especies redox es un problema de este diseño.
2. En la segunda generación, se utilizan mediadores para transportar electrones entre la enzima y el electrodo. Este mediador sustituye al oxígeno, el cual era necesario y a menudo limitado en la primera generación. Por desgracia, todavía sufre, aunque menor medida que la primera generación, de las interferencias debidas a otras especies redox como el oxígeno.
3. Para eliminar las interferencias, en la tercera generación, se emplea la transferencia directa de electrones de la enzima al electrodo a través de una serie de centros de transmisión "cableados".

Por otro lado, también existen los sensores de glucosa basados en la detección optoquímica del consumo de oxígeno, que emplean compuestos cuya fluorescencia es amortiguada por el oxígeno. Las sondas típicas para el oxígeno incluyen complejos

luminiscentes de rutenio, platino o paladio que son fuertemente amortiguados a medida que aumenta la  $[O_2]$  [72,73].

### Galactosa oxidasa

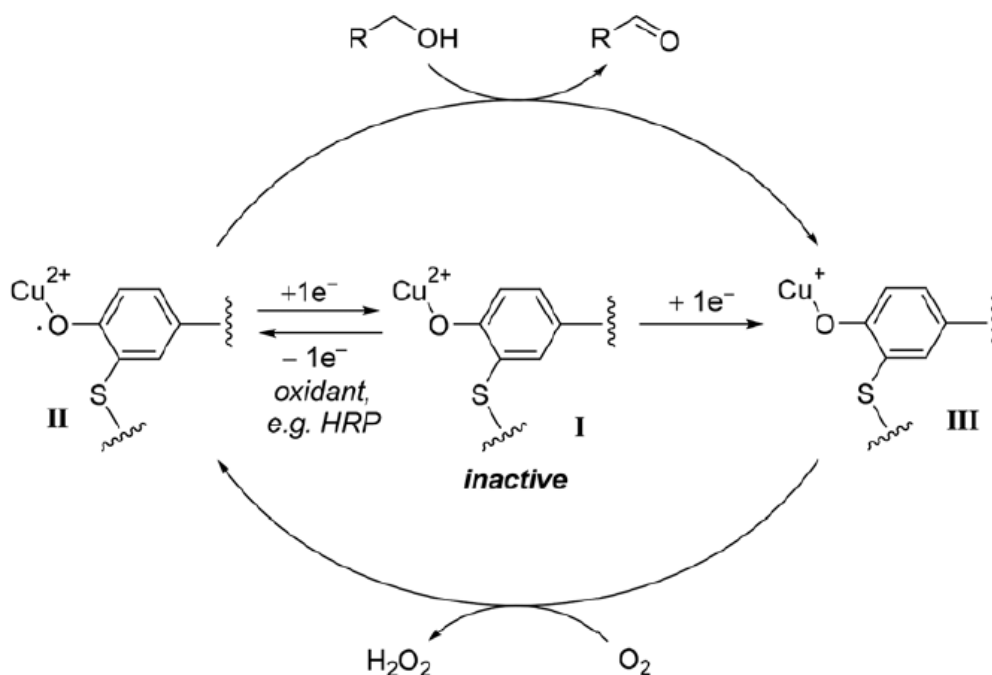
La galactosa oxidasa (GalOx) EC 1.1.3.9, es un miembro bien estudiado de la familia de las mono-cobre oxidasas extracelulares de origen fúngico que se describió por primera vez a finales de la década de 1950 [74]. Estas enzimas realizan una química redox de dos electrones [75], acoplado la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos con la reducción de  $O_2$  a  $H_2O_2$ . La aparente paradoja, una oxidación de dos electrones catalizada por un solo átomo de cobre, se explica por la presencia de una unidad de radical de tirosina en el centro activo de la proteína, que actúa como un segundo centro redox durante el ciclo catalítico **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** El centro activo de la galactosa oxidasa. El ion metálico del centro activo (Cu), la esfera de coordinación interna (Tyr272, Tyr495, His496, His581, y disolvente coordinado) y Trp 290 en la esfera externa del complejo. Imagen extraída de [75].

El ciclo catalítico generalmente aceptado para la GalOx [75,76] se muestra en la **Figura 1.4**. La GalOx puede existir en tres estados únicos, de los cuales dos (**II** y **III**) son catalíticamente activos, mientras que la especie **I** es un complejo de Cu(II) catalíticamente inactivo. La oxidación de un electrón del complejo **I** genera la especie radical **II** de Cu(II), que promueve la oxidación del sustrato alcohol para formar el aldehído deseado mediante un proceso secuencial de transferencia de dos electrones y dos protones. La especie de Cu(I) **III** asociada puede entonces reformar el complejo **II** mediante oxidación con oxígeno molecular. Se ha sugerido que la especie reactiva **II** puede sufrir una vía de

desactivación por reducción de un electrón y salirse del ciclo catalítico, dando lugar a una velocidad más lenta y a una conversión incompleta del sustrato [77]. En general, las enzimas peroxidadasas, como la HRP se han utilizado como activadores enzimáticos para regenerar eficientemente las especies oxidadas **II** a partir de las reducidas **I** mediante la oxidación de un electrón [78,79], aunque esta interacción proteína-proteína todavía no se comprende del todo [80].



**Figura 1.4.** Ciclo catalítico simplificado de la GalOx, propuesto por Whittaker [75].

#### *Necesidad compuestos activadores externos*

Uno de los compuestos más interesantes e históricamente utilizados para activar la galactosa oxidasa ha sido el  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  [76–78,81,82]. Este compuesto es muy atractivo por su bajo coste y elevada disponibilidad, sin embargo, su empleo debe ser cuidadoso ya que es un compuesto tóxico que también puede causar la degradación de la enzima. Además, ciertos estudios muestran que este compuesto tiene un TON (número de recambio) bastante limitado y requiere cantidades estequiométricas para activar la enzima, ya que no es capaz de regenerarse con el peróxido de hidrógeno producido en la reacción [78,79,83].

El otro compuesto más recientemente utilizado para activar la GalOx es la peroxidasa de rábano picante (HRP). Sus ventajas son que se necesitan cantidades catalíticas para activarla y que se regenera con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido in situ, sin embargo, es una enzima que

sigue siendo bastante cara de producir y, por lo tanto, no es rentable para reacciones a media o gran escala [79,82,84]. Por tanto, existe la oportunidad de mejorar el proceso identificando un oxidante químico de molécula pequeña como activador no enzimático y de bajo coste.

Las proteínas que contienen grupos hemo poseen un gran potencial como activadores. Estas proteínas no han sido reportadas previamente como activadores de GalOx, pero debido a su buena disponibilidad, relativo bajo precio, y posibilidad de regeneración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ debido a la reacción de Fenton, son potencialmente atractivas en este papel. Por otro lado, también existen referencias en la bibliografía de porfirinas férricas de origen animal, como la hemina o la hematina [83,85], así como de porfirinas inorgánicas de hierro y manganeso con excelentes resultados [82].

### **Propiedades**

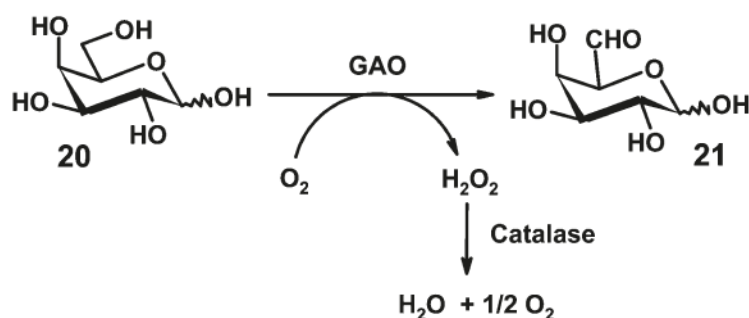
El papel fisiológico GalOx no está claro, aunque podría estar implicado en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su posterior uso como co-oxidante para las peroxidasas que degradan la lignina y la celulosa y/o como defensa antibiótica en la rizosfera. En la **Tabla 1.2** se muestran las principales propiedades encontradas en bibliografía de la GalOx proveniente del hongo *Fusarium graminearum* NRRL 2903 (anteriormente identificado erróneamente como *Dactylium dendroides* [86]).

**Tabla 1.2.** Propiedades de la galactosa oxidasa de *Fusarium graminearum*.

<b>Propiedad</b>	<b>Valores</b>
<b>Peso molecular</b>	68.5 kDa [87]
<b>Actividad específica en galactosa (pH 7.0; RT)</b>	159 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ [88]
<b>K<sub>M</sub> (constante Michaelis respecto a galactosa)</b>	82 mM (pH 7.0; 25°C, oxígeno; [87]) 132 mM (pH 7.0; 30°C, oxígeno; [89])
<b>Rango de temperatura</b>	30-60°C [90]
<b>pH óptimo</b>	6.0-7.5 [88]
<b>Punto isoeléctrico (pI)</b>	7.6 [89]

La **Figura 1.5** muestra la oxidación catalizada por GalOx de D-galactosa (20) en la posición C-6 en presencia de oxígeno para dar D-galactohexodialdosa (21) y peróxido de hidrógeno. El subproducto peróxido de hidrógeno normalmente debe eliminarse con

catalasa para evitar la inactivación de la enzima. Cabe destacar el hecho de que la reacción se detiene en la fase de oxidación del aldehído y no continúa hacia el ácido.



**Figura 1.5.** Oxidación de galactosa (20) para formar D-galactohexodialdosa (21) catalizada por la GalOx [32].

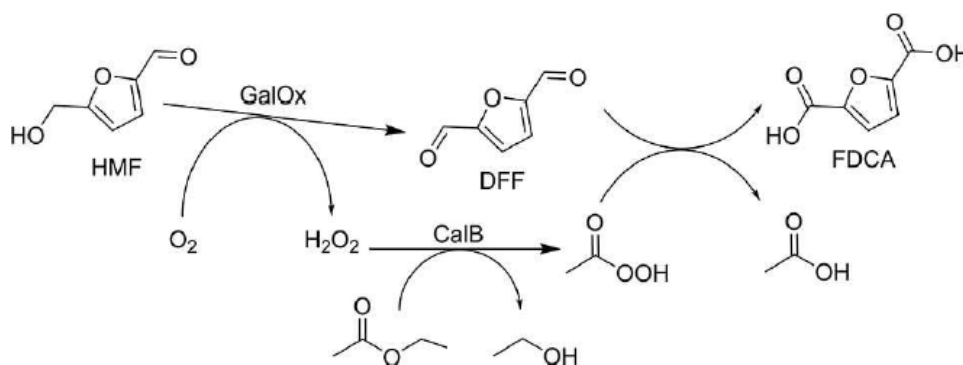
### **Aplicaciones**

El alcance del sustrato de GalOx es amplio, e incluye compuestos derivados del azúcar, alcoholes primarios y bencílicos, así como el 5-hidroximetilfurfural (HMF). En concreto, el HMF constituye una gran plataforma para la síntesis de diferentes productos derivados de la biomasa, entre los que destacan el ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA). El FDCA ha sido uno de los doce productos químicos provenientes de biomasa con mayor proyección [91]. El FDCA es la espina dorsal del furanoato de polietileno (PEF), un material que constituye una alternativa 100% de base biológica respecto al plástico convencional de tereftalato de polietileno (PET) [92].

Dado que el HMF contiene un grupo alcohol y un grupo aldehído, la biosíntesis del FDCA a partir del HMF requiere tres pasos de oxidación consecutivos, lo que significa que la reacción puede tener lugar a través de una multitud de productos intermedios [93]. Se han explorado diversos procesos para la oxidación de HMF a FDCA, incluyendo el uso de electrocatálisis, fotocatalálisis o catálisis mediante óxidos metálicos [94].

Sin embargo, la biocatálisis sigue siendo el proceso preferido debido a su naturaleza ecológica y sostenible. Concretamente, es en la primera etapa de oxidación de HMF a DFF es donde interviene la GalOx [95]. Una de las primeras cascadas enzimáticas, aunque no completamente biocatalítica, se propuso en 2013, en la que el HMF se oxidaba primero con 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO) para obtener DFF, que luego se oxidó a FDCA utilizando ácido peracético formado in situ con la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) [96]. En otro estudio, se emplea la biocatálisis en células completas en una reacción en cascada para transformar el HMF en FDCA utilizando vainilina

deshidrogenasa (VDH1) y HMF/furfural oxidorreductasa (HmfH) co-expresadas en *Escherichia coli* [97]. La posibilidad de utilizar una sola enzima para catalizar la oxidación de HMF a FDCA utilizando la 5-hidroximetilfurfural oxidasa (HMFO) fue descubierta hace relativamente poco tiempo [98,99]. Otra estrategia propuesta consiste en utilizar una aril-alcohol oxidasa (AAO) para transformar el HMF en FFA, convirtiéndolo posteriormente en FDCA mediante una peroxigenasa inespecífica [100]. También se estableció una reacción en cascada de un solo paso utilizando GalOx, peroxidasa de rábano picante (HRP) y aldehído oxidasa periplásmica (PaoABC), con el mismo producto intermedio [101]. Además, se ha tratado de implantar la ingeniería del medio de reacción, llevando a cabo la síntesis del intermedio 2,5-diformilfurano (DFF) en un sistema bifásico de acetato de etilo, **Figura 1.6** [102].



**Figura 1.6.** Cascada enzimática conceptual para la síntesis de ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA) a partir de 5-hidroximetilfurfural (HMF) mediante 2,5-diformilfurano (DFF) utilizando galactosa oxidasa (GalOx) y *Candida antarctica* lipasa B (CalB), esquema obtenido de [102].

En general, la comunidad de la biocatálisis ha sido testigo de grandes avances en la conversión de HMF en FDCA en diferentes sistemas de reacción mediante métodos enzimáticos o utilizando células completas.

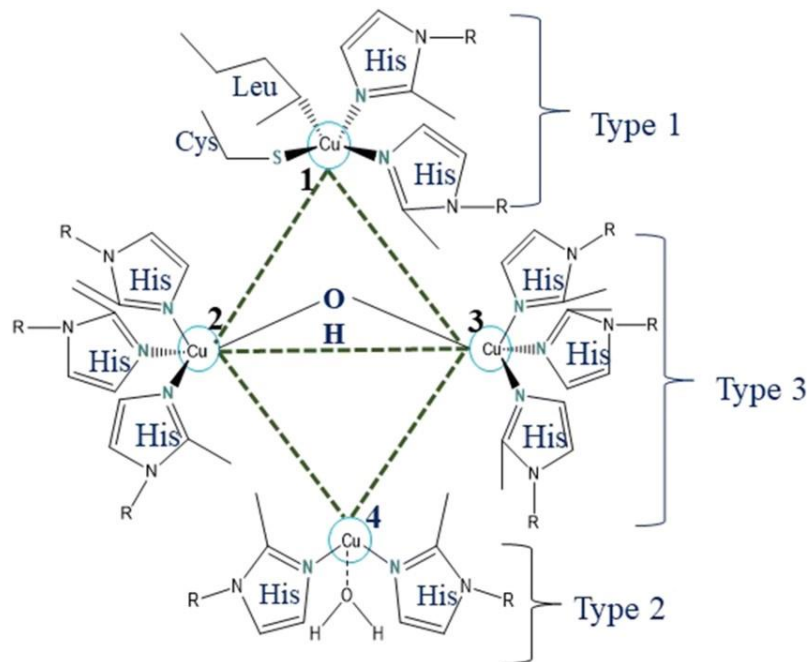
### 1.3.3. Polifenol oxidasas

#### Lacasas

Las lacasas, también conocidas como bencenodiol oxidorreductasas con la clasificación enzimática EC 1.10.3.2, forman parte de la superfamilia de las multicobre oxidasas [103]. Se pueden encontrar en una gran variedad de organismos, como hongos, plantas [104] y bacterias [105], y cada una de ellas presenta diversas funciones según su

organismo de origen y las condiciones fisiológicas o patológicas específicas. Las funciones de las lacasas pueden clasificarse a grandes rasgos en tres grupos: (1) unión de monómeros, (2) descomposición de polímeros y (3) escisión de anillos de compuestos aromáticos [106]. En consecuencia, las lacasas contribuyen a procesos como la lignificación y la oxidación del hierro en las plantas, la deslignificación, la pigmentación, la formación de cuerpos fructíferos y la patogénesis en los hongos, así como la producción de melanina y la síntesis de proteínas de la cubierta endosporosa en las bacterias [107–109]. Las lacasas vegetales y fúngicas se encuentran normalmente en localizaciones extracelulares, mientras que las bacterianas son predominantemente intracelulares [110].

Las lacasas son glicoproteínas que existen en forma de dímeros o tetrámeros. Se basan en átomos de cobre localizados en tres centros distintos: el centro de cobre Tipo-1 o azul, el centro de cobre Tipo-2 o normal y el centro de cobre Tipo-3 o binuclear acoplado, **Figura 1.7**. Estos centros se distinguen por sus señales características de resonancia paramagnética electrónica (EPR) [111,112].



**Figura 1.7.** Sitio activo de la lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre, esquema obtenido de [113].

A nivel de su estructura tridimensional, se cree que las lacasas encontradas en bacterias, hongos y plantas tienen tres dominios dispuestos secuencialmente. Tanto los experimentos de laboratorio como los estudios *in silico* revelan que, a pesar de su amplia distribución taxonómica y de la diversidad de sustratos, la arquitectura molecular del sitio

catalítico de las lacasas comparte similitudes con la de las multicobre oxidasas. Las lacasas poseen la notable capacidad de catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos, tanto fenólicos como no fenólicos, al tiempo que reducen el oxígeno molecular a agua. Esta versatilidad las hace muy valiosas en términos de sus aplicaciones comerciales [114].

A diferencia de las peroxidasas, las lacasas utilizan oxígeno molecular ( $O_2$ ) en lugar de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para la oxidación de los monolignoles [115,116]. Para llevar a cabo su función catalítica, las lacasas se basan en átomos de cobre distribuidos entre los tres centros de cobre distintos mencionados anteriormente. Estos centros de cobre facilitan la retirada de electrones de los sustratos, transformándolos en radicales libres que posteriormente pueden sufrir polimerización. Una vez que la enzima adquiere cuatro electrones, los dona al oxígeno molecular, dando lugar a la formación de moléculas de agua (como se describe en la Ec. 1.4) [117]. En resumen, la catálisis de la lacasa puede dividirse en tres pasos principales:

1. Reducción del Cu de Tipo 1 mediante la reducción del sustrato.
2. Transferencia interna de electrones desde el Cu de Tipo 1 al grupo trinuclear de Cu de Tipo 2 y 3.
3. Reducción de oxígeno (a agua) en el cobre Tipo-2 y Tipo-3 [118].

La reacción global es la siguiente:



Las lacasas suelen existir en forma de múltiples isoenzimas, cada una con sus propias preferencias de sustrato [119]. Además de su capacidad para oxidar monofenoles y polifenoles, las lacasas tienen la capacidad de oxidar una amplia gama de compuestos aromáticos, incluyendo fenoles sustituidos, diaminas, aminas aromáticas, tioles e incluso compuestos inorgánicos específicos como yodo,  $Mo(CN)_8^{4-}$ , y  $Fe(CN)_6^{4-}$  [105,114]. Los sustratos orgánicos de las lacasas pueden clasificarse en tres grupos: ortosustituidos (p. ej., guaiacol, o-fenilendiamina, pirocatecol, dihidroxifenilalanina, pirogalol, ácido cafeico, ácido gálico y ácido protocatecúico), meta-sustituidos (m-fenilendiamina, orcinol, resorcinol y cloroglucina) y para-sustituidos (p-fenilendiamina, p-cresol e hidroquinona), todos ellos con un par de electrones desapareados. Para la mayoría de las lacasas, los compuestos ortosustituidos son los sustratos más favorables [114]. Además, en presencia de mediadores, las lacasas pueden ampliar su especificidad de sustrato, permitiendo la oxidación de compuestos más complejos [117]. En la **Tabla 1.3** se

muestran las principales propiedades encontradas en bibliografía de la lacasa proveniente del hongo clásico *Agaricus bisporus*.

**Tabla 1.3.** Propiedades de la lacasa de *Agaricus bisporus*.

Propiedad	Valores
<b>Peso molecular</b>	96-110 kDa [120]
<b>Actividad específica en catecol (pH 6,0; RT)</b>	3.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ [121]
<b>K<sub>M</sub> (constante Michaelis respecto a catecol)</b>	1.11 mM (pH 5.0; 25°C; oxígeno; [122]) de <i>Trametes versicolor</i>
<b>Rango de temperatura</b>	30-60°C [120]
<b>pH óptimo</b>	4.0-4.5 [123]
<b>Punto isoeléctrico (pI)</b>	~4 [114]

En cuanto a sus aplicaciones, las lacasas se emplean en procesos como la deslignificación y el blanqueo de la pasta de papel [124] hasta la biorremediación de contaminantes ambientales [125,126]. También desempeñan un papel crucial en la prevención de la decoloración del vino [127], tienen aplicaciones en el campo de la medicina [128,129], ayudan en la oxidación de tintes y sus precursores [130], facilitan la conversión enzimática de productos químicos intermedios y contribuyen a la formación de compuestos a partir de la lignina [131]. Estas enzimas versátiles se están explorando para una amplia gama de fines agrícolas, industriales y médicos, y actualmente la investigación se centra en la biooxidación, la biotransformación y la tecnología de biosensores [132,133].

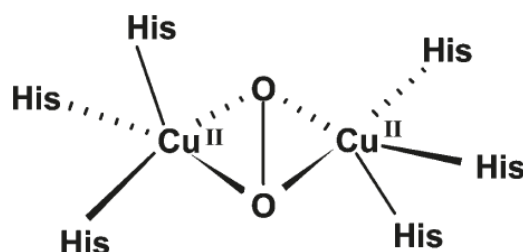
La excepcional eficiencia catalítica y la amplia especificidad de sustrato de las lacasas las hacen más ventajosas que los catalizadores químicos o microbianos convencionales. Sin embargo, en las aplicaciones de las lacasas pueden surgir problemas prácticos, como el elevado coste del aislamiento y la purificación, la imposibilidad de reutilización y la inestabilidad estructural. Estos problemas pueden superarse inmovilizando las lacasas en soportes sólidos, empleando una variedad de métodos y sustratos [134,135]. En particular, las lacasas fúngicas, que están fácilmente disponibles (en su mayoría localizadas extracelularmente) y pueden funcionar en un amplio rango de pH, desde ácido a neutro, además de mostrar una alta termoestabilidad, son las preferidas

en diversas aplicaciones industriales en comparación con sus homólogas bacterianas y vegetales [136,137].

### Tirosinasa

Las tirosinasas, con clasificación EC 1.10.3.1, también conocidas por otros nombres como catecol oxidasas, fenol oxidasas o polifenol oxidasas, son una clase de enzimas de cobre muy extendidas en todos los ámbitos de la vida. Desempeñan un papel esencial en diversos procesos biológicos, como el oscurecimiento de los vegetales y la síntesis de melaninas. Dada su importancia en fisiología, se han publicado numerosas revisiones que tratan exhaustivamente sus características estructurales, mecanismos catalíticos, activación e inhibición, así como sus aplicaciones en biotecnología y síntesis [138–141].

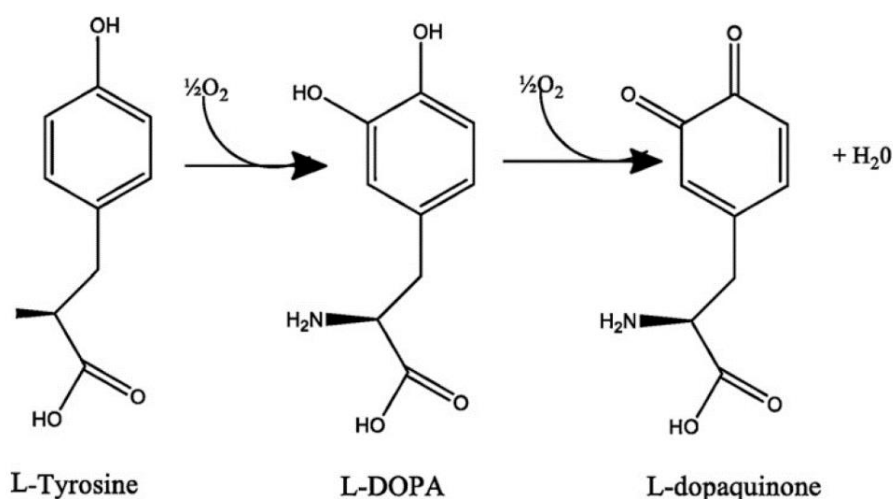
Cada enzima tirosinasa posee dos átomos de cobre en su centro activo, estando cada átomo de cobre coordinado por tres residuos de histidina, formando lo que se conoce como "centro de cobre de tipo 3". Dependiendo del estado de oxidación de estos átomos de cobre y de su interacción con el oxígeno molecular, el sitio activo puede existir en tres estados diferentes. Por ejemplo, la **Figura 1.8** ilustra el clúster de cobre dentro de la llamada "oxi-tirosinasa".



**Figura 1.8.** El centro activo de cobre en la "oxi-tirosinasa", esquema extraído de [32].

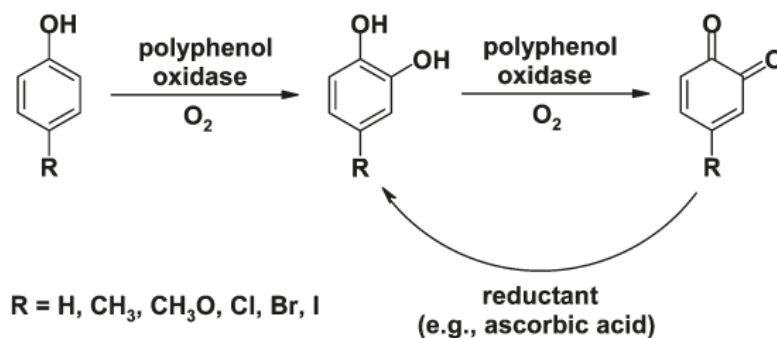
Las oxidaciones catalizadas por estas enzimas sobre la L-tirosina a través de un complejo mecanismo de reacción [142] se representan en la **Figura 1.9**. Inicialmente, las tirosinasas actúan como monooxigenasas sobre fenoles, permitiendo reacciones de orto-hidroxilación (actividad monofenolasa o cresolasa). Posteriormente, funcionan como oxidasas, convirtiendo los catecoles generados en las quinonas correspondientes (actividad difenolasa o catecolasa). Debido a estas dos funciones, las tirosinasas se han asignado tanto a la subclase EC 1.14.18.1 (monofenol monooxigenasas) y a la subclase EC 1.10.3.1 (catecol oxidasas).

Las quinonas formadas son moléculas muy reactivas y, especialmente en medios acuosos, tienden a sufrir reacciones no enzimáticas adicionales que dan lugar a la polimerización. Este proceso de polimerización conduce a la creación de melaninas de alto peso molecular y pigmentos polifenólicos relacionados. La reactividad de las quinonas se aprovecha cada vez más para modificar las fibras textiles naturales, y hay varios casos de injertos de estos materiales catalizados por tirosinasa en presencia de compuestos fenólicos, como se documenta en informes publicados [143,144].



**Figura 1.9.** Oxidación de L-tirosina a L-dopaquinona por la tirosinasa. Esquema obtenido de [139].

La reactividad de las quinonas también desempeña un papel fundamental en las aplicaciones primarias de las tirosinasas. En situaciones en las que el resultado deseado es la producción de catecoles a partir de precursores fenólicos (ya que la ortohidroxilación eficiente de fenoles sigue siendo un reto mediante síntesis química), se hace necesario reducir las quinonas in situ. Esta reducción puede conseguirse llevando a cabo las reacciones en presencia de un agente reductor, como ascorbato o hidroxilamina, junto con aniones borato, que forman complejos con los catecoles [145,146], **Figura 1.10.**



**Figura 1.10.** Síntesis quimioenzimática de catecoles sustituidos. Esquema obtenido de [32].

En la **Tabla 1.4** se muestran las principales propiedades encontradas en bibliografía de la tirosinasa proveniente del hongo clásico *Agaricus bisporus*.

**Tabla 1.4.** Propiedades de la tirosinasa de *Agaricus bisporus*.

<b>Propiedad</b>	<b>Valores</b>
<b>Peso molecular</b>	110-130 kDa [147,148]
<b>Actividad específica en tirosina (pH 6.8; 25°C)</b>	1.22 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ [149]
<b>K<sub>M</sub> (constante Michaelis respecto a tirosina)</b>	0.18 mM (pH 6.8; 30°C; O <sub>2</sub> ; [150]) 0.21 mM (pH 7.0; 25°C; O <sub>2</sub> ; [150])
<b>Rango de temperatura</b>	30-55°C [151]
<b>pH óptimo</b>	6-7 [147]
<b>Punto isoelectrico (pI)</b>	4.75 [147]

La tirosinasa demuestra versatilidad en su capacidad para utilizar una alta gama de compuestos fenólicos como sustratos. Su amplia compatibilidad de sustratos ha dado lugar a amplias aplicaciones en biorremediación para abordar los contaminantes fenólicos y el desarrollo de biosensores para el análisis de compuestos fenólicos. A continuación, se ofrece una visión general de los avances recientes en las aplicaciones convencionales impulsadas por la tirosinasa.

#### ***Biorremediación de contaminantes fenólicos y tintes***

Debido a su amplia gama de sustratos compatibles, la tirosinasa se emplea con frecuencia en la remediación de contaminantes fenólicos peligrosos presentes en las aguas residuales. Se han ideado varias técnicas de inmovilización para desintoxicar contaminantes fenólicos, como nanopartículas magnéticas con fenoles y bisfenol A [152,153].

#### ***Biosensores para la detección de compuestos fenólicos***

El uso convencional de la tirosinasa implica la creación de biosensores para controlar y detectar compuestos fenólicos en diversas muestras. Para mejorar parámetros

como los límites de detección y la sensibilidad, se han integrado diversos materiales con la tirosinasa. En particular, los avances en nanotecnología han acelerado el desarrollo de electrodos basados en nanomateriales. Normalmente, estos biosensores se emplean para el análisis de contaminantes fenólicos como el bisfenol A en el agua [154], la detección de componentes aromáticos en alimentos y bebidas, como el tirosol en la cerveza y la catequina en el té [155], y también se utilizan en el análisis farmacéutico con fines de diagnóstico [156].

### ***Producción de L-DOPA***

La enfermedad del Parkinson es un trastorno neurológico caracterizado por una deficiencia del neurotransmisor dopamina en el cerebro. La L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), un aminoácido natural en los seres humanos y precursor de la dopamina se ha convertido en un medicamento muy utilizado para esta enfermedad. Esto se debe principalmente a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, algo que la dopamina no puede hacer [157]. En la actualidad, un número significativo de personas mayores padecen la enfermedad de Parkinson y presentan síntomas como rigidez y temblores. En consecuencia, la demanda de L-DOPA en el mercado mundial es considerable, estimada en unas 250 toneladas al año [158].

Aunque la tirosinasa se encuentra ampliamente en la naturaleza, la investigación para la producción de L-DOPA se ha centrado predominantemente en la tirosinasa fúngica, empleando ácido L-ascórbico como agente reductor. A pesar de la exploración de diversos materiales de inmovilización para facilitar el reciclado del biocatalizador y la utilización de varios tipos de reactores, la tasa de conversión y productividad aún no han superado el 60% y los 500 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectivamente. En consecuencia, la producción de L-DOPA mediante procesos impulsados por tirosinasa sigue estando limitada hasta que se desarrolle un método práctico y más eficiente. Recientemente se están estudiando sistemas electro-enzimáticos, sustituyendo el ácido ascórbico por un cátodo para ceder electrones [157]. Esto ha aumentado significativamente la conversión, sin embargo, la productividad sigue estando limitada por la baja solubilidad de la tirosina en medio acuoso. Para añadir viabilidad económica a la producción electro-enzimática de L-DOPA, se deben desarrollar métodos rentables de producción e inmovilización de tirosinasa para su reutilización eficiente [159].

### ***Delignificación de biomasa lignocelulósica en biorrefinerías***

Según Min et al. [160], la promiscuidad catalítica exhibida por la tirosinasa la posiciona como un candidato potencial para el pretratamiento enzimático de la lignina. La elevada promiscuidad catalítica de la tirosinasa permite ampliar sus aplicaciones enzimáticas. Dado que la lignina es un polímero natural complejo de base fenólica, y teniendo en cuenta el amplio espectro de sustratos de la tirosinasa para diversos compuestos fenólicos, Min et al. [160] investigaron la promiscuidad catalítica de la tirosinasa en la delignificación. Sus hallazgos revelaron que la tirosinasa puede oxidar el alcohol veratrílico, un sustrato comúnmente utilizado para evaluar la actividad ligninolítica, a pesar de que el alcohol veratrílico es un compuesto no fenólico y no es el sustrato principal de la tirosinasa.

Además, la tirosinasa logró la descomposición del 4-fenoxifenol y del guayacil glicerol- $\beta$ -guayacil éter, que son compuestos modelo diméricos de la lignina. Esto indica que la actividad promiscua de la tirosinasa tiene la capacidad de escindir enlaces 4-O-5 y C $\alpha$ -C $\beta$  dentro de la lignina. En consecuencia, la tirosinasa no solo resulta prometedora como pretratamiento enzimático en una biorrefinería en condiciones de pH neutro con oxígeno molecular como aceptor de electrones, sino que estos hallazgos también aportan información valiosa para comprender mejor la evolución de la especificidad enzimática en la degradación de la lignina [160].

#### **1.4. INTENSIFICACIÓN DE BIOTRANSFORMACIONES DEPENDIENTES DE OXÍGENO CATALIZADAS POR ENZIMAS INMOVILIZADAS**

Este apartado de la introducción corresponde a una revisión bibliográfica publicada por el autor y el director de esta tesis doctoral en la revista científica “Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry”, cuya primera página se muestra a continuación.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Current Opinion in  
Green and Sustainable Chemistry

## Intensification of oxygen-dependent biotransformations catalyzed by immobilized enzymes

Alvaro Lorente-Arevalo, Miguel Ladero and Juan M. Bolivar

Oxidative biotransformations find a prominent role in the fine chemical industry and the valorization of renewable feedstocks. Implementation of oxygen-dependent reactions faces some challenges across scales and at different levels of development. First, the fruitful development of enzyme candidates and identification of reaction possibilities is not in consonance with the implementation in process engineering. Second, reaction engineering faces a complex interplay of reaction kinetic, oxygen transfer and process stability. Third, given the advances in synergic fields such as molecular biology, chemistry, material sciences, and (micro)process engineering, an interdisciplinary assembly from a consistent discipline around heterogeneous biocatalyst engineering would be of strategic value. We show advances in design of active and robust immobilized enzyme catalysts to be applied in (continuous) intensified processes. A framework based on the joint design of a catalyst and reactor will be discussed for the design and optimization of the catalysts and biotransformations involved.

### Addresses

Chemical and Materials Engineering Department, Faculty of Chemical Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, 28040, Spain

Corresponding author: Bolivar, Juan M ([juanmbol@ucm.es](mailto:juanmbol@ucm.es))

Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry 2021, 32:100544

This review comes from a themed issue on **Heterogeneous biocatalysis for sustainable chemistry 2021**

Edited by Lorena Betancor and Fernando López-Gallego

Available online 24 July 2021

For complete overview of the section, please refer the article collection - **Heterogeneous biocatalysis for sustainable chemistry 2021**

<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100544>

2452-2236/© 2021 Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Introduction

Oxidations are one of the most important transformations in the chemical industry. Besides well-established transformations in pharmaceutical and fine chemistry, diverse oxidative transformations are fundamental reactions in the processing, valorization, and upgrading of renewable raw materials in integrated biorefineries [1–3]. Biooxidations are a great alternative

to chemocatalytic methods of performing oxidations that suffer from numerous limitations: harmful oxidants, side reactions, lack of regioselectivity and stereoselectivity, and so on. In addition, oxidative enzymes enable chemists to perform highly selective and efficient transformations; for many of them, no chemical counterpart is known [3,4]. Biological oxidation also allows the use of molecular oxygen as the oxidant, which allows mild condition efficiency in terms of atom economy [3].

Oxygen-dependent enzymatic oxidation is approaching maturity and practical applicability in synthesis at the laboratory scale [2–4]. From a mechanistic point of view, the reactions involve oxygenation and dehydrogenation. Therefore, the application of oxidative enzymes is interesting across different areas of the biochemical technology, from integrated biorefineries to pharmaceutical chemistry, and using different raw materials [1,11]. The portfolio covers the selective oxidation of primary and secondary alcohols to the corresponding aldehydes and ketones catalyzed by copper or flavin-dependent oxidases acting on aliphatic alcohols or carbohydrates [5–7]. Another group is the laccases and multicopper oxidases which oxidize organic substrates with application in synthetic chemistry [8]. Mono-oxygenases catalyze the selective hydroxylation or the aerobic oxidation of ketones and cyclic ketones to esters and lactones, respectively (Baeyer–Villiger mono-oxygenases). Beyond these well-established transformations, the new waves of biocatalyst development constantly bring new reactions, for example, the oxidation of secondary alcohols, amino alcohols, and 5-hydroxymethylfurfural [9,10].

The plethora of chemical reactions that oxidative enzymes provide is not sufficiently aligned with the challenges at reaction engineering level [4,12]. In process engineering the aim is the achievement of a required intensity (reaction rate and product concentration and purity) and process stability [12,13], which are consequent with sustainability and green criteria. Diverse issues such as low enzymatic activity, catalyst instability, inhibitions, cofactor regeneration, and substrate supply jeopardize a suitable development across scales. In addition, the kinetic analysis and reaction implementation of oxygen-dependent biocatalysts encounter the thermodynamic and kinetic limitations of the sufficient oxygen supply. The low solubility of the oxygen not only limits its maximum possible supply rate but

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry 2021, 32:100544

Como se ha comentado, las oxidaciones son una pieza fundamental de la industria química y desempeñan un papel esencial no sólo en los procesos farmacéuticos y de química fina, sino también en las diversas conversiones que sustentan el procesado, la valorización y la mejora de las materias primas renovables en las biorrefinerías integradas [24,161–163]. Las biooxidaciones surgen como una alternativa atractiva a los métodos convencionales de oxidación catalítica, que se enfrentan a varios inconvenientes, como

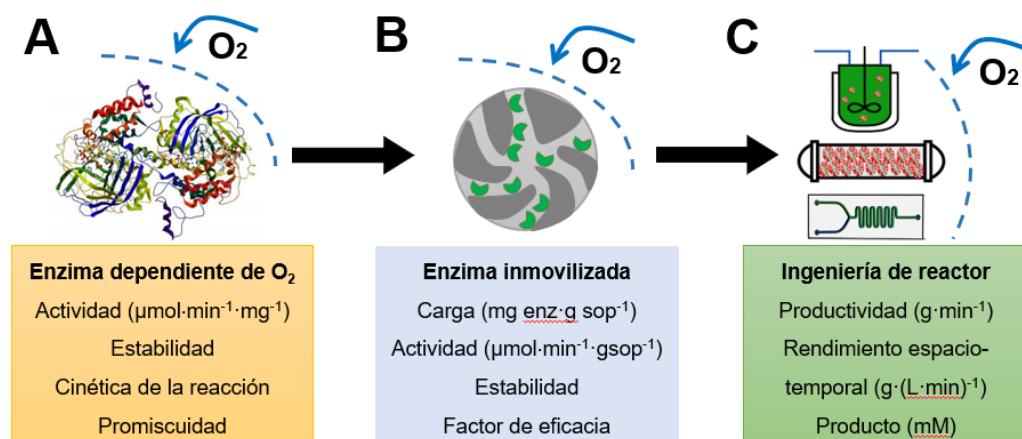
los oxidantes nocivos y los subproductos indeseables, así como al reto de lograr una regioselectividad y estereoselectividad precisas [163,164]. Además, las enzimas oxidativas permiten a los químicos realizar transformaciones extraordinariamente selectivas y eficientes, algunas de las cuales no tienen equivalente químico [163,164]. En particular, la oxidación biológica aprovecha el oxígeno molecular como agente oxidante, ofreciendo condiciones suaves y mejorando la economía de átomos [163].

El ámbito de la oxidación enzimática dependiente de oxígeno avanza de forma significativa, mejorando su aplicabilidad práctica a escala de laboratorio [24,162–164]. Desde una perspectiva mecanicista, estas reacciones implican procesos de oxigenación y deshidrogenación. Esta versátil gama abarca la oxidación selectiva de alcoholes primarios y secundarios, dando lugar a sus respectivos aldehídos y cetonas [165]. Estas transformaciones son hábilmente realizadas por oxidasas dependientes de cobre o de flavina, que muestran competencia en la conversión de alcoholes alifáticos y carbohidratos como sustratos [166–169]. Entre las enzimas más destacadas, tanto las lacasas y tirosinasas, como las oxidasas multicobre emergen como valiosos catalizadores, oxidando de forma eficaz compuestos orgánicos, con importantes aplicaciones en química sintética [118,138]. Las monooxigenasas, por su parte, se especializan en la hidroxilación selectiva u oxidación aeróbica de cetonas y cetonas cíclicas, dando lugar a ésteres y lactonas, ejemplificadas por las monooxigenasas de Baeyer-Villiger. Además de estas transformaciones ya conocidas, el panorama en constante cambio del desarrollo de biocatalizadores trae consigo nuevas reacciones prometedoras. Algunos ejemplos son la oxidación de alcoholes secundarios, aminoalcoholes y la transformación del 5-hidroxiacetilfurfural [94,95,170]. En consecuencia, la utilidad de las oxidasas se extiende a diversos ámbitos de la tecnología bioquímica, desde las biorrefinerías integradas hasta la química farmacéutica [161,171].

La riqueza de las transformaciones químicas facilitadas por las enzimas oxidativas no suele estar a la altura de los retos encontrados a nivel de ingeniería de reacción [27,164,172]. En el ámbito de la ingeniería de procesos, el objetivo principal es maximizar tanto la velocidad de reacción, como la concentración de producto y su pureza, al tiempo que se garantiza la estabilidad del proceso [172,173]. Este objetivo está intrínsecamente relacionado con la sostenibilidad y los criterios ecológicos [24]. Una multitud de retos, entre los que se incluyen cuestiones como la limitada actividad enzimática, la inestabilidad de los catalizadores, los factores inhibidores, la regeneración de cofactores y la disponibilidad de sustratos, suponen obstáculos para la progresión

fluida de estos procesos enzimáticos a diferentes escalas. Además, el análisis cinético y la aplicación práctica de biocatalizadores dependientes de oxígeno se enfrentan a las restricciones termodinámicas y cinéticas asociadas a un suministro adecuado de oxígeno. La solubilidad limitada del oxígeno no sólo reduce la velocidad máxima de suministro alcanzable, sino que también influye directamente en la eficiencia con la que se puede emplear una determinada enzima oxidativa [26,172,173].

Para que la biocatálisis oxidativa se convierta en una tecnología habilitadora, es necesario integrar en el proceso de investigación y desarrollo, desde sus primeras fases, un amplio abanico de disciplinas, como la ingeniería de proteínas, la ingeniería de catalizadores o la ingeniería de procesos. Este enfoque multidisciplinar ofrece un conjunto de herramientas prometedor [25,173–177]. En particular, técnicas como la inmovilización de enzimas y la catálisis heterogénea emergen como métodos instrumentales fundamentales para la implementación e intensificación de biocatalizadores, tal y como se representa en la **Figura 1.11**. Las ventajas más conocidas abarcan la capacidad de reuso, la posibilidad de operación en continuo, facilitar la escalabilidad del reactor y agilizar la separación posterior [174,178,179]. En el contexto de esta sección, se muestran los últimos avances en el diseño y la utilización de catalizadores inmovilizados con enzimas oxidativas. El énfasis se dirige a abogar por un enfoque de desarrollo global para los procesos enzimáticos oxidativos, que comience desde las primeras fases de la investigación. Este enfoque integrado puede enmarcarse en tres niveles, caracterizado por dos etapas fundamentales de desarrollo. Estas etapas exigen una atención profunda tanto a la eficacia del rendimiento del catalizador como a su perfecta integración en el reactor, como se muestra en la **Figura 1.11**.



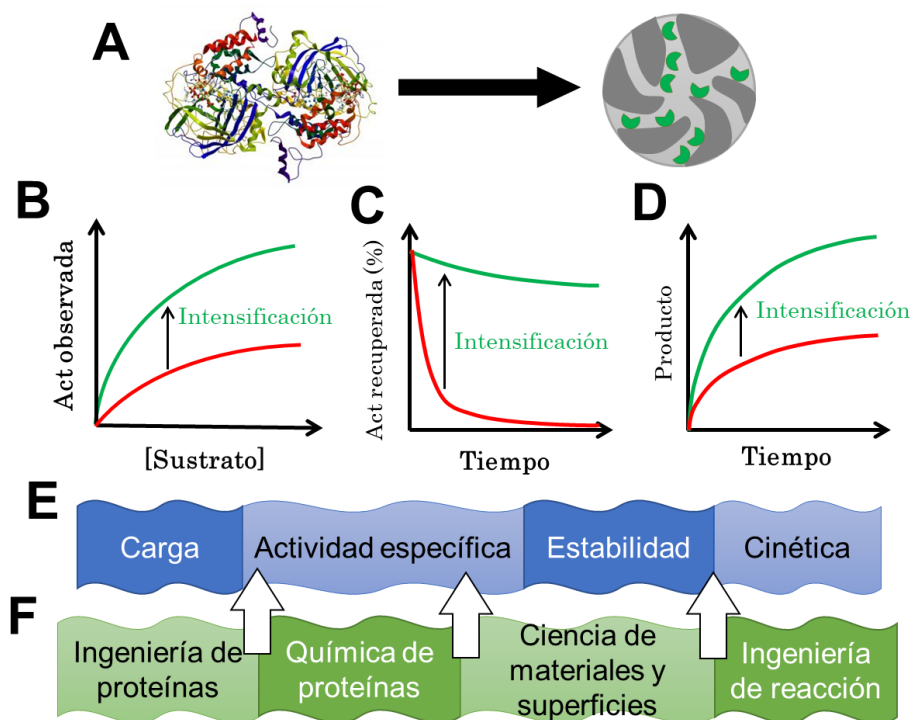
**Figura 1.11.** Cadena de desarrollo de una reacción dependiente de oxígeno catalizada por enzimas en soporte sólido. *Panel A:* Nivel de enzima libre y los parámetros clave. La cinética hacia el sustrato principal y el oxígeno es relevante para comprender futuros cuellos de botella. *Panel B:* Nivel de enzima inmovilizada y los parámetros clave de diseño, que definen la actividad y el potencial de estabilidad del biocatalizador. *Panel C:* Nivel de ingeniería de la reacción, donde las propiedades del catalizador se traducen en rendimiento y cantidad total de producto. Imagen adaptada de [173].

#### 1.4.1. Desarrollo de catalizadores enzimáticos oxidativos: enfocado en la actividad

El éxito en la utilización de catalizadores enzimáticos oxidativos depende de la disponibilidad de preparados que sean a la vez activos, duraderos y rentables. Conseguir la actividad y estabilidad deseadas en catalizadores solubles es el resultado de estrategias integradas que combinan la ingeniería de proteínas y la biotecnología molecular [175,180,181]. La inmovilización de enzimas se erige como una tecnología fundamental que potencia el diseño de biocatalizadores efectivos para procesos industriales. El proceso de transformación de estas enzimas en biocatalizadores de soporte sólido requiere una cuidadosa selección y aplicación de materiales de soporte, técnicas de inmovilización y una caracterización exhaustiva en condiciones operativas realistas [23,182–184].

Idealmente, el catalizador debería mostrar una elevada actividad en un amplio espectro de concentraciones de sustrato, manteniendo esta actividad a través de una operación en continuo o en varios lotes consecutivos, como se representa en la **Figura 1.12**. Además, la integración eficaz del catalizador en un reactor optimizado es primordial para garantizar un funcionamiento estable en condiciones de reacción intensificadas [26,27,176,177]. El resultado final de estos esfuerzos es fruto de una serie de decisiones

estratégicas tomadas durante el proceso de investigación y desarrollo del catalizador, como se ilustra en la **Figura 1.12**.



**Figura 1.12.** Características de un catalizador enzimático intensificado dependiente de oxígeno en soporte sólido. *Panel A:* El diseño de la inmovilización debe perseguir una excelente cinética en condiciones estables (alta actividad en un amplio rango de concentración de sustrato), *Panel B:* Una elevada eficacia catalítica (el objetivo es que la velocidad máxima de la enzima inmovilizada sea similar al de la enzima libre, que se mantiene a lo largo del tiempo (alta estabilidad, *Panel C*). *Panel D:* La formación de producto se intensifica con el tiempo. El logro de la intensificación se parametriza en unas pocas variables clave (*Panel E*) que dependen del enfoque (idealmente) integrado de las diferentes tecnologías facilitadoras (*Panel F*). Imagen adaptada de [173].

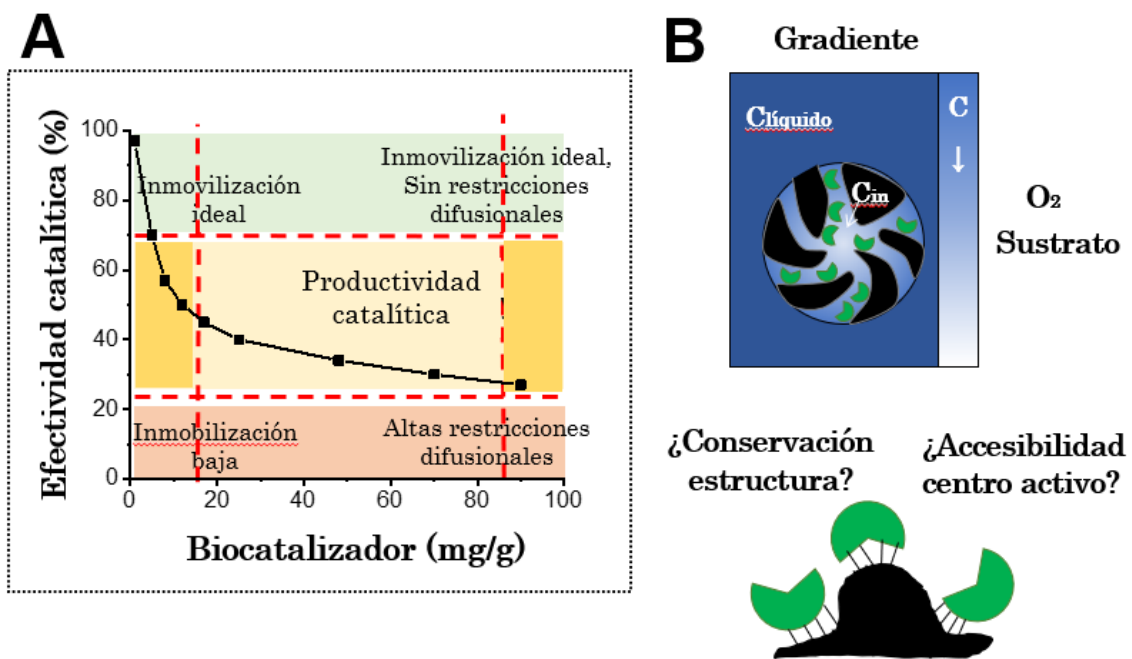
La velocidad de reacción máxima debida a una determinada cantidad de catalizador es la actividad ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$ ), que depende de la cantidad de enzima cargada en el material ( $\text{mg}_{\text{enzima}}\cdot\text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$ ) y de la actividad específica de la enzima inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{enzima}}^{-1}$ ). La capacidad de aumentar la carga depende de una química de inmovilización adecuada y de las características estructurales de los materiales portadores [183,185–187]. Los avances en la ingeniería de materiales y la inmovilización controlada de enzimas permiten superar muchos de los límites actuales.

Normalmente, la actividad específica de la enzima inmovilizada es inferior al de la enzima libre. Los parámetros para expresar esa diferencia y cuantificar la eficacia de la inmovilización son abundantes y su armonización es necesaria para una divulgación científica eficaz [182,183,188]. Un parámetro común en la ingeniería de reacción para abordar dicha variación es el factor de eficacia global (eficacia catalítica) que expresa la relación entre la velocidad de reacción proporcionada por la enzima inmovilizada y la enzima libre (expresada en la misma cantidad de unidad de referencia: por ejemplo, mg de enzima). La **Figura 1.13A** muestra un esquema de las ventanas de diseño de un biocatalizador inmovilizado en función de diferentes fenómenos subyacentes.

El factor de eficacia global puede ser inferior a la unidad debido a diferentes razones como las modificaciones estructurales tras la inmovilización, también conocidas como efectos de inmovilización, o fenómenos físicos como efectos de partición y resistencias a la transferencia de materia, **Figura 1.13B**. En el diagrama, se ilustra cómo, a bajas cargas enzimáticas, los valores de actividad observables son normalmente la respuesta más directa de las consecuencias estructurales de la inmovilización, **Figura 1.13A**. El grupo de las "consecuencias estructurales de la inmovilización" es un conjunto diverso, normalmente opaco, que compromete diversos niveles moleculares. En primer lugar, la actividad del catalizador oxidativo inmovilizado debe lidiar con la funcionalidad del cofactor redox, que puede requerir suministro externo, regeneración o reactivación en condiciones de reacción [82,84,189]. Además, el ensamblaje estructural eficiente de oxidasas y monooxigenasas no es una tarea trivial. Junto con la importancia de la orientación de la enzima y de la mínima distorsión de la estructura secundaria y terciaria, es necesario el ensamblaje cuaternario de su conformación multimérica o multidominio tras la inmovilización [167]. En este último sentido, la inmovilización programable orientada mediante módulos de unión fusionados genéticamente ha proporcionado estabilización estructural [185,190–192]. Otra estrategia es el uso de técnicas posteriores a la inmovilización para asegurar el ensamblaje de las multiunidades y el control preciso de la unión covalente suave [193,194].

La bibliografía sobre este tema abarca una amplia gama de valores de actividad observados, tal y como se ha documentado en estudios previos [195–198]. Esta diversidad de valores muestra que la actividad enzimática puede ser influenciada por varios factores, como las condiciones experimentales, las variantes de la enzima estudiada o las técnicas de medición empleadas. La **Figura 1.13A** subraya la importancia de realizar un análisis exhaustivo de la actividad de los catalizadores enzimáticos inmovilizados para desvelar

tendencias y factores limitantes subyacentes. En particular, a altos niveles de actividad (carga), garantizar un suministro eficiente de sustrato, en particular oxígeno, a la fase sólida surge como un reto primordial para optimizar el rendimiento de las enzimas inmovilizadas [188,199,200]. Las características fisicoquímicas del soporte, su tamaño y la distribución espacial del catalizador constituyen parámetros de diseño fundamentales que interactúan estrechamente con la cinética de la reacción. La carga de enzima y el tamaño de partícula ejercen una influencia crítica sobre el alcance de las restricciones difusionales, afectando en consecuencia a la actividad específica observable de la enzima inmovilizada [200–202]. El estudio y diseño de tales biocatalizadores puede guiarse por análisis convencionales de ingeniería de reacciones químicas o integrarse con metodologías de detección intrapartícula in situ [188,199]. La medición de la concentración de oxígeno disponible dentro de soportes sólidos ha proporcionado pruebas directas de las limitaciones difusionales experimentadas por enzimas inmovilizadas dependientes de oxígeno [200–202]. Más recientemente, se ha demostrado que el posicionamiento de las oxidasas en las capas externas de la partícula representa un factor fundamental para minimizar los gradientes de oxígeno, aliviando así las limitaciones en el suministro de oxígeno a la enzima inmovilizada [203,204].



**Figura 1.13.** Factores que modifican la eficacia catalítica de un catalizador enzimático en soporte sólido dependiente de oxígeno. *Panel A:* Ventana de diseño para la inmovilización de una oxidasa con el objetivo de maximizar la productividad del catalizador, que es el resultado de la carga enzimática y la eficacia catalítica. Las

restricciones en el diseño se indican con líneas discontinuas, que revelan las principales limitaciones debidas a la carga de la enzima y a la eficacia catalítica. Aumentar la eficacia catalítica requiere identificar y eliminar el factor limitante general, que podría ser la química de inmovilización, la orientación de la enzima o el transporte de materia. *Panel B*: Los dos tipos principales de causas subyacentes de la disminución del factor de eficacia. Figura adaptada de [173].

#### **1.4.2. Desarrollo de catalizadores enzimáticos oxidativos: enfocado en la estabilidad**

La evolución temporal de la formación de productos depende de la cinética de reacción [205–208], en concreto de cómo responden las velocidades de las reacciones pertinentes a los cambios en las concentraciones de los compuestos de reacción, y de la estabilidad a largo plazo del catalizador, como se ilustra en la **Figura 1.12**. La comprensión de la cinética de las enzimas dependientes de oxígeno presenta un reto nada trivial. Los avances recientes, concretamente del grupo de investigación de Woodley, han puesto de manifiesto los progresos en la configuración experimental y una comprensión más profunda de la interacción entre la cinética y el rendimiento del proceso [79,205–207]. En el contexto de la estabilidad del catalizador, es imperativo que el perfil de estabilidad se ajuste a los requisitos del proceso. Lo ideal sería que este análisis se realizara en condiciones realistas a nivel de investigación en laboratorio.

Para lograr la estabilidad mediante el diseño racional de enzimas inmovilizadas es necesario identificar la etapa crítica que rige el proceso de inactivación [209]. En catálisis homogénea, la inactivación de enzimas en la interfase gas-líquido es un fenómeno dominante que puede resolverse cuando una enzima se confina en materiales mesoporosos protegiendo a la enzima de este fenómeno [174]. Otra vía de inactivación característica es la provocada, en las oxidasas, por el peróxido de hidrógeno. Esta inactivación puede evitarse o reducirse acoplado una reacción en serie donde se consume el peróxido de hidrógeno o acoplado una reacción paralela para descomponer el peróxido de hidrógeno y producir oxígeno como la catalizada por la catalasa [210–213]. La eliminación instantánea del peróxido de hidrógeno puede lograrse mediante la co-inmovilización de la oxidasa y una catalasa auxiliar dentro de la estructura porosa del soporte sólido. A pesar del alto recambio catalítico de las catalasas, la carga y co-localización de la catalasa es un componente importante para la estabilización [212,213], como ha demostrado recientemente el Grupo de Guisan co-inmovilizando alrededor de

5-6 mg de catalasa por mg de oxidasa [213] para eliminar instantáneamente más del 93% del peróxido de hidrógeno. Además, la concentración crítica de inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede variar en función de la oxidasa [214,215] y el tipo de inmovilización, por lo que normalmente es necesario un estudio personalizado. Más allá de la modificación de la estructura primaria, la inactivación enzimática comprende múltiples efectos de distorsión estructural. Las condiciones operativas para la estabilización de enzimas y su protección frente a agentes desnaturizantes están bien descritas para múltiples casos y representan un aspecto sustancial de la ciencia de la inmovilización de enzimas [174,179,216].

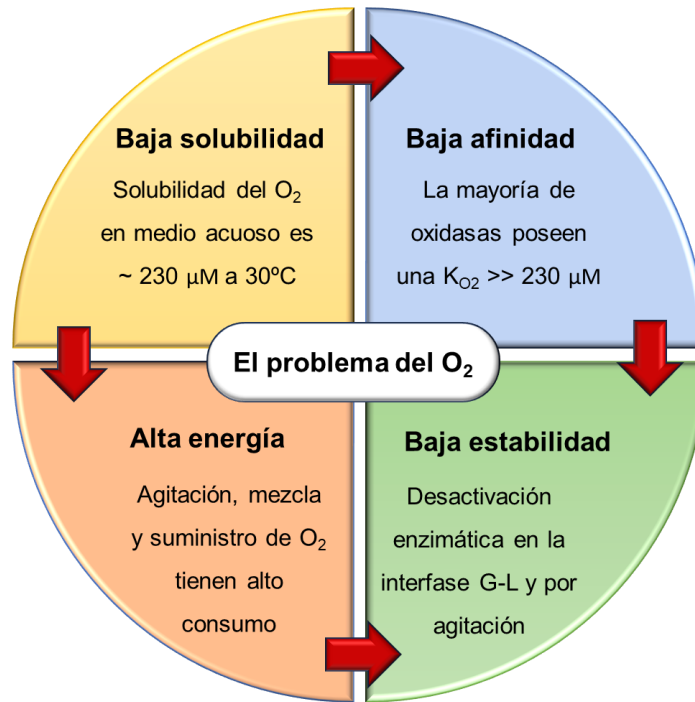
Algunos casos recientes subrayan la creciente tendencia hacia aplicaciones a medida de enzimas oxidativas. En un caso digno de mención, la inmovilización covalente de galactosa oxidasa, colina oxidasa y monoamino oxidasa en un soporte sólido mostró una notable estabilidad y reutilización a largo plazo. Estas enzimas inmovilizadas superaron a sus homólogas libres en términos de termoestabilidad (más de 20 veces) y estabilidad en disolventes, como se documenta en la referencia [197]. El grupo de investigación de G. Álvaro también ha contribuido significativamente al desarrollo de catalizadores oxidativos dependientes de oxígeno con relevancia industrial mediante ingeniería de inmovilización [189,192,198,217]. Por ejemplo, estabilizaron e inmovilizaron con éxito la eugenol oxidasa, lo que permitió reutilizar el biocatalizador en hasta 18 ciclos de reacción, multiplicando por más de 12 la productividad del biocatalizador [198]. Otro logro notable fue la inmovilización de una monooxigenasa Baeyer-Villiger en tándem con una glucosa deshidrogenasa, lo que facilitó la síntesis de derivados de  $\epsilon$ -caprolactona y se sometió a una evaluación rigurosa durante varios ciclos consecutivos. La co-inmovilización demostró ser el enfoque más eficiente, con una tasa de conversión media del 83% observada a lo largo de 15 ciclos de reutilización, lo que en última instancia conduce a una mejora de 50 veces en la productividad del biocatalizador en comparación con las enzimas solubles cuando se emplea una estrategia de alimentación por lotes, como se muestra en la referencia [217]. En situaciones en las que la estabilidad molecular inherente de las enzimas libres es suficiente, las técnicas de inmovilización dirigida reversible o de unión covalente suave surgen como herramientas valiosas para alcanzar un equilibrio adecuado entre actividad y estabilidad, como se discute en las referencias [194,218,219].

### **1.4.3. Limitaciones de las enzimas dependientes de oxígeno**

El suministro eficiente de O<sub>2</sub> en la síntesis química biocatalítica se enfrenta a varios retos, sobre todo a gran escala. En muchas ocasiones, la baja [O<sub>2</sub>] alimentada a la enzima es la principal causa en la ineficiencia del proceso, pero este fenómeno puede tener distintas razones. Estos retos pueden clasificarse de la siguiente manera:

- 1) La baja velocidad de transferencia del O<sub>2</sub> gas a la fase acuosa [220,221].
- 2) La solubilidad limitada del O<sub>2</sub> en soluciones acuosas, especialmente a temperaturas óptimas para el funcionamiento de las enzimas y habituales en los procesos industriales [222,223].
- 3) La naturaleza de consumo energético de la transferencia activa de O<sub>2</sub> al medio a través de métodos como la agitación, el burbujeo o la aspersion [221,224]. Además, la agitación y el burbujeo a menudo provocan la desactivación de las enzimas libres en las interfases gas-líquido o debido a fuerzas de cizallamiento. Este fenómeno no es específico de las enzimas que utilizan O<sub>2</sub>, sino que es común a todas las reacciones enzimáticas que requieren un sustrato gaseoso [225,226].
- 4) Muchas enzimas dependientes de O<sub>2</sub> muestran una baja afinidad por el O<sub>2</sub> [79,207,208,227–229], lo que limita la eficiencia global de la reacción, especialmente a temperaturas en las que la solubilidad del O<sub>2</sub> es particularmente baja [230].
- 5) La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de la reacción catalítica oxidativa puede reducir la estabilidad y la actividad de las enzimas [231].

Estos retos se ilustran resumidos en la **Figura 1.14**. A pesar de que se han optimizado numerosas enzimas dependientes del O<sub>2</sub> a escala de laboratorio, sólo unas pocas han pasado con éxito a escala industrial. La principal limitación es la falta de métodos o procesos técnicos estandarizados para la optimización rápida y uniforme de las enzimas dependientes del O<sub>2</sub> en aplicaciones a gran escala.



**Figura 1.14.** Limitaciones/retos de las enzimas dependientes de oxígeno. Los recuadros ilustran cómo se manifiesta cada reto. Las flechas indican cómo cada reto puede intensificar el efecto del otro, es decir, la baja solubilidad del  $O_2$  requiere aumentar la velocidad de agitación y, por tanto, el aporte de energía, y esto también aumentará la velocidad de desactivación de las enzimas. La baja afinidad al  $O_2$  ralentizará la velocidad catalítica y, por tanto, el tiempo total de reacción, lo que contribuirá a la desactivación de las enzimas. Figura adaptada de [27].

En este contexto es importante remarcar tanto la necesidad como la dificultad de un análisis cinético completo de numerosas oxidasas. En primer lugar, la ingeniería de la reacción química es la disciplina más idónea para elucidar el grado de dependencia o afinidad de  $O_2$  en las oxidasas. Otras disciplinas relacionadas como la ingeniería del medio de reacción o la ingeniería de reactores o de proteínas son las responsables de solucionar los problemas la baja solubilidad del  $O_2$  en medio acuoso o la baja estabilidad enzimática en ciertas condiciones de operación, respectivamente.

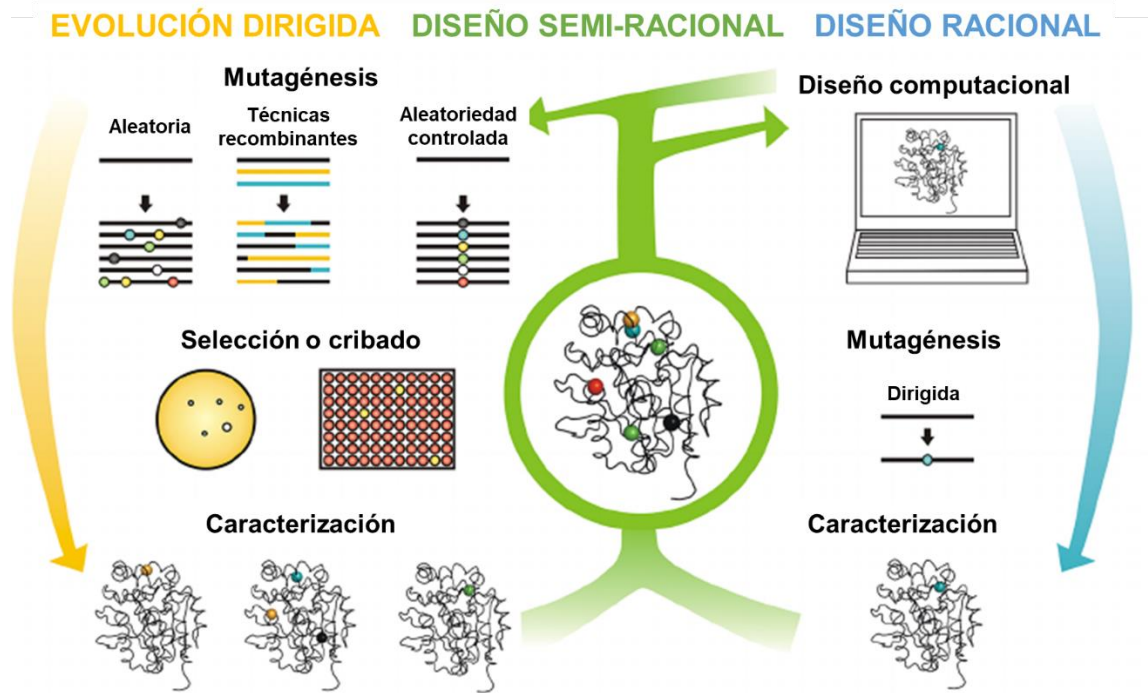
Sin embargo, la existencia de análisis cinéticos que se centren en las limitaciones por oxígeno son realmente escasos, siendo casi exclusivos del grupo de investigación de John Woodley [205–207]. Además, estos análisis cinéticos normalmente requieren un equipo sofisticado y costoso para el control de la  $[O_2]$  por encima de los valores de saturación de aire en fase acuosa. Por ello, creemos que el desarrollo de una metodología

de análisis cinético sencilla en enzimas dependientes de O<sub>2</sub> sería de gran interés para la comunidad científica, y es lo que se presenta en el Capítulo 4 de la presente Tesis.

#### **1.4.4. Ingeniería de proteínas para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas**

Con el auge de la ingeniería de proteínas como potente herramienta para modificar enzimas y mejorar su rendimiento, las enzimas dependientes de O<sub>2</sub> se han convertido en un objetivo atractivo dentro de este campo. Se han empleado varias estrategias de ingeniería enzimática para alterar y ampliar el alcance de los sustratos, aumentar la estereoselectividad y la regioselectividad y mejorar la estabilidad de diversas enzimas dependientes del O<sub>2</sub> [24,232–234], **Figura 1.15**.

Sin embargo, en la actualidad, sólo un número limitado de estudios se ha dedicado a abordar los retos relacionados con el O<sub>2</sub> mediante la ingeniería de proteínas. Un estudio notable surgió de la colaboración entre los laboratorios de Turner y Woodley. En este trabajo, se empleó la ingeniería enzimática para mejorar la cinética del O<sub>2</sub> de la galactosa oxidasa [235]. La variante modificada facilitó la conversión biocatalítica escalable de 5-HMF a 2,5-diformilfurano (DFF) y mostró un número de recambio mejorado (TTN) superior a 10<sup>6</sup>. Uno de los objetivos de esta investigación era aumentar la afinidad de la enzima por el O<sub>2</sub> (K<sub>O2</sub>). Mediante múltiples rondas de mutagénesis dirigida en el sitio activo, se desarrolló una variante con una afinidad por el O<sub>2</sub> significativamente mayor. La variante más activa, M<sub>A-6</sub>, mejoró la unión al O<sub>2</sub> y al sustrato, con lo que la K<sub>O2</sub> se redujo 9 veces en comparación con la variante inicial (M<sub>3-5</sub>). Curiosamente, la variante M<sub>A-6</sub> conservó el mismo aminoácido en la posición 290 (Trp) que el tipo nativo, que previamente se había cambiado a Phe en M<sub>3-5</sub> para mejorar la selectividad enantiomérica [236]. Sin embargo, la nueva variante M<sub>A-6</sub> mostró una eficiencia catalítica 10 veces mayor (k<sub>cat</sub>/K<sub>O2</sub>) en comparación con M<sub>1</sub>.



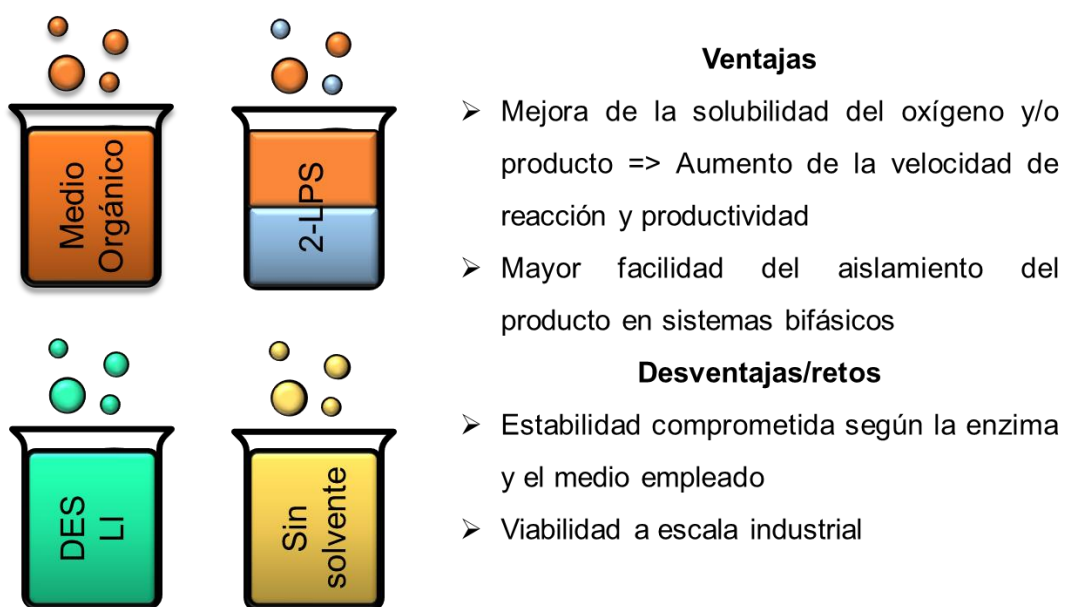
**Figura 1.15.** Estrategias de ingeniería enzimática para la mejora del rendimiento catalítico industrial, adaptada de [234].

Además, la mejora de la estabilidad de las enzimas en presencia de  $H_2O_2$  mediante ingeniería enzimática puede mitigar sus efectos adversos sobre las enzimas. Muchas oxidasas generan  $H_2O_2$  de forma natural como parte de su ciclo catalítico y, dependiendo de su tipo, las monooxigenasas también pueden producir  $H_2O_2$  como subproducto. Por consiguiente, abordar la estabilidad de las enzimas dependientes de  $O_2$  en estas condiciones es un reto importante. En este contexto, un estudio concreto empleó la ingeniería enzimática para aumentar la estabilidad oxidativa de una monooxigenasa Baeyer-Villiger (BVMO) de *Pseudomonas putida*, incrementando su resistencia al  $H_2O_2$ . Se aplicó un enfoque de diseño racional a los residuos de aminoácidos a lo largo de los túneles de acceso al  $H_2O_2$ , con una predicción facilitada por herramientas computacionales como CAVER y PELE. Los residuos propensos a la oxidación por  $H_2O_2$ , como la metionina y la tirosina, fueron sustituidos por otros hidrofóbicos. La triple mutante C302L/M340L/M380L exhibió un TTN de 4100, lo que representa un aumento de 2.8 veces en comparación con el tipo nativo. Tras 3 horas de incubación en presencia de 25 mM de  $H_2O_2$ , la mutante retuvo el 80% de su actividad residual, en contraste con sólo el 15% del tipo nativo [237].

### 1.4.5. Ingeniería del medio de reacción para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas

Un enfoque comúnmente empleado para la intensificación de procesos consiste en llevar a cabo reacciones biocatalíticas en medios no convencionales. Esta estrategia permite aumentar la carga de sustrato, especialmente en el caso de compuestos hidrófobos, mejorando la solubilidad del oxígeno [238]. Esto es especialmente importante cuando se utiliza oxígeno como sustrato, como ocurre en las reacciones en las que intervienen oxidasas, lacasas, monooxigenasas, dioxigenasas y halogenasas. Esta estrategia incluye varios enfoques, como los líquidos iónicos de tipo disolventes eutécticos de bajo punto de fusión (DES), los sistemas de dos fases líquidas (2-LPS), los medios orgánicos y una variante específica conocida como sustratos puros (sistemas sin disolventes), **Figura 1.16**. Aunque los disolventes orgánicos tienen el potencial de aumentar significativamente las cargas de sustrato, a menudo plantean problemas relacionados con la estabilidad de las enzimas [26,239]. Una forma eficaz de abordar este problema es el uso de un 2-LPS acuoso-orgánico, como se ejemplificó en la aminohidroxilación estereoselectiva de olefinas de estirenilo [240].

#### Oxidaciones enzimáticas en medios no convencionales



**Figura 1.16.** Ventajas y desventajas/retos en de las oxidaciones enzimáticas en medios no convencionales.

En medios exclusivamente orgánicos, la inmovilización de enzimas es una estrategia frecuentemente empleada para paliar los efectos desestabilizadores inducidos

por el medio. La inmovilización de enzimas como la galactosa oxidasa, la colina oxidasa y la monoamino oxidasa de *Aspergillus niger* se ha documentado como un medio eficaz para mejorar sus capacidades biocatalíticas en medios orgánicos [197].

Los disolventes eutécticos de bajo punto de fusión (DES), posicionados como alternativas más respetuosas con el medio ambiente respecto a ciertos disolventes orgánicos, pueden emplearse para mejorar las reacciones oxidativas enzimáticas. La combinación de la 5-hidroximetilfurfural oxidasa con una gama diversa de DESs demostró una termoestabilidad mejorada, con resultados notables observados en el sistema DES glucosa:fructosa:agua (Glu:Fru:H<sub>2</sub>O, 1:1:6) [241]. Esta mayor termoestabilidad permite operar a temperaturas elevadas, aumentando así la velocidad de reacción y la productividad global. La investigación también incluyó una exploración de la solubilidad del oxígeno en los DES al 60% (v/v), que no reveló ningún efecto beneficioso perceptible.

Aunque el concepto relativamente reciente de los disolventes eutécticos avanzados de gran interés en la investigación académica, aún no se ha demostrado todo su potencial a escala técnica. Esto es especialmente relevante para las condiciones caracterizadas como verdaderamente "eutécticas avanzadas", con una adición mínima o nula de agua, ya que los DES a menudo se enfrentan a una alta viscosidad, lo que dificulta una transferencia de materia eficiente [242]. En general, el uso de medios no acuosos es muy prometedor para conseguir solubilidades de oxígeno varias magnitudes superiores a las del agua [238], especialmente valiosas para intensificar enzimas oxidativas. Por ejemplo, Sato et al. destacaron cómo la longitud de la cadena alquílica de la estructura del disolvente orgánico influye en la solubilidad del oxígeno. En el caso de los alcoholes, las longitudes de cadena más largas corresponden a una mayor solubilidad, mientras que, en los disolventes alcanos, las longitudes de cadena más pequeñas dan lugar a una mayor solubilidad del oxígeno [223].

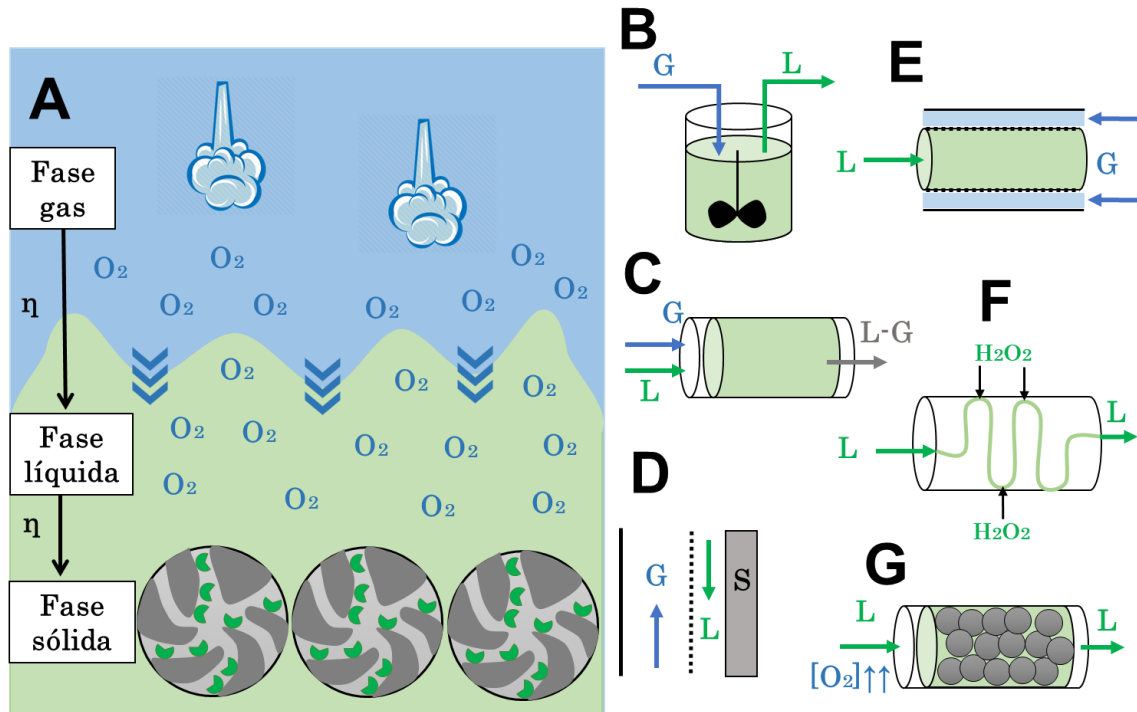
Por tanto, la exploración del uso de líquidos iónicos y disolventes eutécticos avanzados innovadores, que son biocompatibles y ajustables, brinda la oportunidad de crear disolventes con propiedades excepcionales mediante la selección estratégica de distintos componentes. A pesar de ello, el agua sigue siendo el disolvente preferido, y su miscibilidad con los disolventes es un criterio crucial para la selección. En esencia, existe un importante potencial inexplorado para desarrollar disolventes respetuosos con el medio ambiente para los procesos de oxidación biocatalítica, abordando la demanda de

producción sostenible de productos químicos de base biológica en una economía circular [239].

#### **1.4.6. Ingeniería de reactores para intensificar las reacciones enzimáticas oxidativas**

Dada la baja solubilidad del oxígeno en el medio de reacción (acuoso), es necesario un suministro externo, que afecta no sólo a las fases tardías de la aplicación, sino también a las fases tempranas de la caracterización cinética [79,205,206,243]. Normalmente se utilizan métodos dispersivos, en los que una fase gaseosa (aire, O<sub>2</sub> puro) se pone en contacto con la fase líquida y la velocidad de transferencia viene dada por el coeficiente de transferencia de materia en el líquido ( $k_{La}$ ) [221,244,245]. La velocidad de reacción suele estar limitada por la baja velocidad de transferencia de O<sub>2</sub> (OTR) y la solubilidad en agua [205–207], **Figura 1.17A**. Por ejemplo, en reactores aireados agitados a escala industrial, puede alcanzarse un valor máximo de 5 min<sup>-1</sup> (equivalente a un máximo teórico de 1.2 mM·min<sup>-1</sup> cuando la fase líquida está totalmente desoxigenada y, por tanto, el catalizador totalmente infrautilizado) [205,221,243,246].

Recientemente se ha corroborado que la concentración de oxígeno disuelto es el factor limitante de la velocidad de oxidación catalizada por glucosa oxidasa en un reactor de tanque agitado (**Figura 1.17B**). Los resultados demostraron una correlación notable: un simple aumento de 3 veces en el valor de oxígeno en el gas de alimentación duplicó la velocidad de reacción, superando el efecto de un aumento sustancial de 10 veces en la concentración de enzima [205]. Merece la pena señalar que, mientras que el  $k_{La}$  (coeficiente de transferencia de materia) puede mejorarse mediante un diseño adecuado del reactor, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) está estrechamente vinculada a la fuerza impulsora, que varía de forma proporcional a la disponibilidad de oxígeno. En consecuencia, se relaciona con la cinética de la reacción [205,206,246]. La mejora de la capacidad de transferencia de oxígeno entra principalmente en el dominio de la ingeniería de reactores [247–249]. Como se muestra en la **Figura 1.17**, se esbozan varias estrategias. La bibliografía documenta avances significativos en el diseño de reactores en ámbitos estrechamente relacionados, especialmente en microrreactores continuos utilizados en catálisis química, que han mejorado con éxito el  $k_{La}$  [177,250–252]. Sin embargo, integrar los biocatalizadores de forma compatible con el medio de reacción y alinear sus características con la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) sigue siendo un reto, que a menudo depende del catalizador específico empleado [253–256].



**Figura 1.17.** Ingeniería de reactores para la intensificación de oxidaciones dependientes del oxígeno. El panel A muestra las características multifásicas de la reacción. La limitación de la velocidad de reacción puede residir en la transferencia gas-líquido o en la velocidad de transferencia (un gradiente de oxígeno) a la fase sólida. Diferentes alternativas de ingeniería de reacción trabajan en la mejora de la velocidad de transferencia de oxígeno o/y en la mejora del suministro local en la fase sólida. Los paneles B-G muestran las diferentes estrategias de reactores utilizadas mencionadas en el texto. Figura adaptada de [173].

Podrían explorarse otros métodos para aumentar no sólo la velocidad de transporte, sino también para garantizar simultáneamente una concentración de  $O_2$  suficiente a nivel local [27,251,257]. Utilizando microrreactores de flujo continuo, se puede maximizar la relación superficie-volumen interfacial y minimizar el tiempo total de reacción [248,256]. Utilizando un reactor tubular de flujo segmentado (**Figura 1.17C**) para la hidroxilación enzimática del trans-hex-2-enol, van Schie et al. obtuvieron un gran número de recambio (TON) ( $3 \cdot 10^5$ ) a baja conversión. Sin embargo, a una conversión

alta del 90%, el rendimiento espacio-temporal (STY) fue bajo ( $0,25 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ ) [258]. Por otro lado, se puede aplicar un microrreactor continuo de película descendente para la oxidación de glucosa catalizada por GOX libre [259], obteniendo un STY de  $\sim 80 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  a una conversión del 20-30% a bajo TON ( $2\cdot 10^3$ ), **Figura 1.17D**. Utilizando el mismo tipo de reactor, se consiguió un STY de hasta  $45 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ , sin embargo, a bajo TON de GOX soluble y baja conversión [254]. También se ha empleado un reactor de celdas agitadas para mejorar la velocidad de las reacciones de oxidación biocatalíticas para la misma transformación [243,260]. Otra configuración de reactor interesante es la de tubo en tubo, en la que la fase acuosa y la gaseosa están separadas físicamente por una membrana [207,253,253,256], **Figura 1.17E**. Por otro lado, recientemente se aplicó la oxidación biocatalítica de glucosa para producir gluconato sódico en un lecho empacado rotatorio (RPB). Los resultados indicaron que el valor experimental de  $k_{La}$  estaba en el rango de  $0,01\sim 0,028 \text{ s}^{-1}$ , lo que permitió una tasa de producción de hasta  $6\sim 12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en el IL-RSR, siendo 7 veces la de un reactor de tanque agitado [261].

Con todo esto, todavía es necesario profundizar en la tecnología que permite la integración de la enzima en este tipo de reactores y su operación en régimen continuo.

## **1.5. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS**

Las enzimas, con sus notables propiedades de alta actividad, selectividad y especificidad, tienen el potencial de facilitar procesos químicos complejos en condiciones experimentales y ambientales favorables [262,263]. En consecuencia, la transformación de enzimas de entidades biológicas a reactores industriales es una búsqueda apasionante. Afortunadamente, se dispone de numerosas técnicas para mejorar las características de las enzimas, que abarcan varios ámbitos científicos que han experimentado avances significativos en los últimos años, como la microbiología, la ingeniería de proteínas y la química de proteínas. A pesar del desarrollo de diversas técnicas modernas, enfoques aparentemente tradicionales como la inmovilización han demostrado ser herramientas poderosas para mejorar casi todas las propiedades de las enzimas cuando se diseñan adecuadamente. Esto incluye aspectos como la estabilidad, la actividad, la especificidad, la selectividad y la reducción de la inhibición [178].

Para que el uso de un catalizador enzimático relativamente caro sea económicamente viable, su recuperación y reutilización se convierten en un imperativo en muchos casos. Además, el empleo de una enzima inmovilizada no sólo simplifica el diseño del reactor y el control de la reacción [264–266] (ya que la reacción puede detenerse simplemente

filtrando la enzima), sino que también permite un uso versátil del reactor. De ahí que la inmovilización sea a menudo un requisito previo para emplear enzimas como biocatalizadores industriales y ofrezca la solución más directa a los problemas de solubilidad asociados a estos valiosos biocatalizadores. Sin embargo, la noción de reutilización de enzimas implica intrínsecamente que la estabilidad del preparado enzimático final debe ser lo suficientemente alta como para facilitar dicha reutilización. Por consiguiente, para que una enzima sea un candidato viable para su reutilización, debe presentar una estabilidad inherente o sufrir una estabilización sustancial durante el proceso de inmovilización. En la **Tabla 1.5** se muestran las principales ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.

**Tabla 1.5.** Ventajas y desventajas o retos de la inmovilización de enzimas.

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas/Retos</b>
Mayor estabilidad, especialmente frente a disolventes orgánicos y altas temperaturas	Menor actividad enzimática en comparación a la enzima libre, por baja accesibilidad al centro activo o cambios estructurales en la enzima
Separación sencilla del biocatalizador, resultando en menores costes del proceso de purificación	Costes adicionales de los soportes y métodos de inmovilización
Permite la operación en continuo sin necesidad de membranas	Existencia de restricciones difusionales, que disminuyen la concentración de entrada de los sustratos
Posibilidad de reutilizar el biocatalizador	El método de inmovilización es distinto para cada enzima y es difícil de predecir
Posibilidad de co-inmovilizar cofactores u otras enzimas con una gran proximidad	
Mayor estabilidad frente fuerzas mecánicas como efectos de cizalla o burbujeo de gas	

Por tanto, en esencia, la inmovilización de enzimas permite una fácil separación y reutilización del biocatalizador, facilita una recuperación del producto más sencilla y a menudo mejora la resistencia a la inactivación de enzimas frente a los diferentes agentes desnaturizantes (incluyendo pH extremos o altas temperaturas, la presencia de

disolventes orgánicos, inhibidores, etc.). Los protocolos de inmovilización de enzimas descritos en la bibliografía se pueden clasificar en tres grupos principales [178,267,268]:

- Enzima unida a un soporte sólido (mediante unión covalente o no covalente al soporte).
- Enzima atrapada o encapsulada, donde se forma una red polimérica tridimensional en presencia de la enzima.
- Entrecruzamiento de enzimas con reactivos bifuncionales (por ejemplo, entrecruzado cristales de enzimas (CLECs) y agregados (CLEAs).

Por otro lado, se pueden distinguir dos formas de inmovilización de proteínas en soportes sólidos porosos: reversible o irreversible. En el primer caso, la enzima puede ser liberada del soporte pudiéndose recuperar éste una vez se haya inactivado la enzima; por el contrario, en el segundo caso, la enzima está unida de forma irreversible por lo que cuando la enzima esté inactiva, se ha de eliminar todo el biocatalizador, enzima y soporte [178]. Sin embargo, con la inmovilización reversible, generalmente, no se pueden alcanzar grandes factores de estabilización debido a que no son capaces de rigidificar la estructura terciaria de la enzima. Esto puede ser distinto para el caso de enzimas multiméricas, en las que se puede evitar la disociación de las subunidades mediante la estabilización de su estructura cuaternaria [269].

Aparte de su aplicación como biocatalizadores heterogéneos reutilizables, la inmovilización de enzimas es una plataforma adecuada para desarrollar dispositivos tecnológicos estables para aplicaciones analíticas, aplicaciones energéticas y biomedicina (por ejemplo, biosensores, biocombustibles), así como herramientas para la química de proteínas en fase sólida o microdispositivos para la liberación controlada de drogas [270].

A continuación, se exponen y explican las distintas estrategias de inmovilización, tanto irreversibles como reversibles.

### **1.5.1. Métodos irreversibles: Inmovilización mediante enlace covalente**

Este tipo de inmovilización implica una unión irreversible entre la enzima y el soporte, estableciendo enlaces fuertes y estables que evitan la liberación de la enzima al medio de reacción. La unión covalente se realiza a través de grupos funcionales presentes en la superficie del soporte activado, como los grupos  $-NH_2$  (Lys),  $-SH$  (Cys),  $-OH$  (Tyr y Ser),  $-COOH$  (Asp y Glu), y los grupos correspondientes en la superficie de la proteína. De esta manera, se logra la unión irreversible de la enzima al soporte mediante enlaces como amida, tio-éter, éter, enlaces carbamatos, etc. [271]. Es crucial que los aminoácidos

esenciales para la catálisis no participen en la unión covalente al soporte para lograr una inmovilización eficiente.

### ***Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos glioxil (Gly)***

La inmovilización no garantiza automáticamente la estabilización de la enzima, ya que no induce por sí misma una rigidez en la estructura terciaria de la proteína. Por lo tanto, la elección del sistema de inmovilización apropiado es crucial para lograr la estabilización enzimática [178]. La inmovilización mediante una unión covalente multipuntual en soportes altamente funcionalizados a través de brazos espaciadores cortos e involucrando numerosos residuos de la superficie de la enzima, favorece la rigidez en la estructura terciaria de la proteína [178,272–274]. Esto significa que las posiciones relativas de los residuos involucrados en la unión covalente multipuntual permanecen inalteradas durante los cambios conformacionales inducidos por agentes distorsionantes, como altas temperaturas, solventes orgánicos o valores extremos de pH. Este fenómeno reduce los cambios conformacionales que podrían llevar a la inactivación de la enzima, lo que permite aumentar su estabilidad.

Los soportes activados con grupos glioxil exhiben unas excelentes características para lograr esta unión irreversible con la enzima. Estos presentan una monocapa de grupos aldehídos totalmente expuestos al medio con los que reaccionan fácilmente los aminos primarios no ionizados de la enzima. Estos grupos tienen además un brazo espaciador muy corto, de forma que parte de la superficie de la enzima queda muy próxima a la superficie del soporte lo cual confiere a la enzima inmovilizada una gran rigidez y estabilidad.

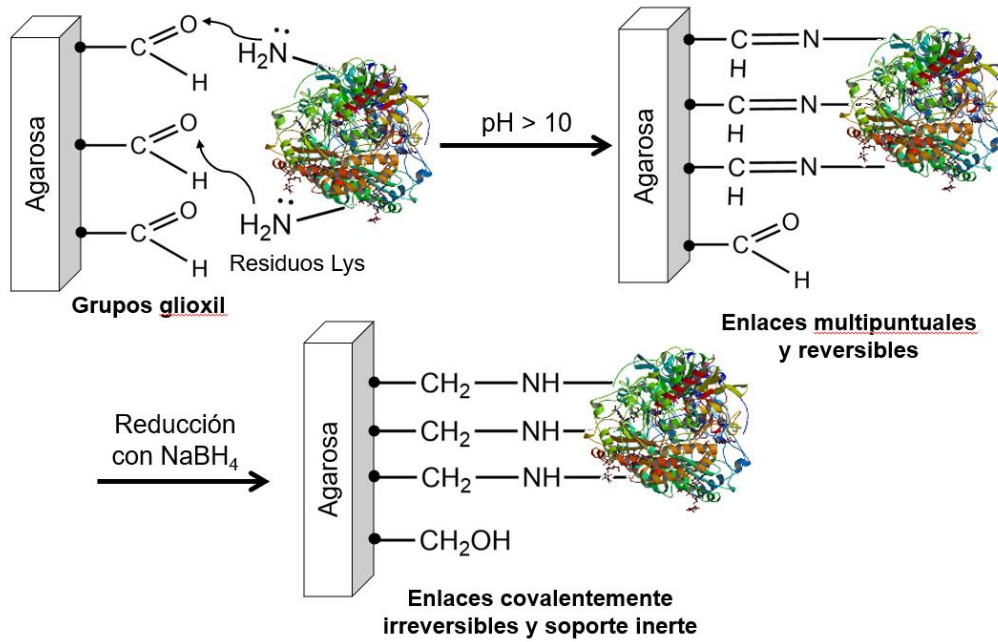
Por otra parte, el control sobre el grado de activación del soporte posibilita alcanzar densidades elevadas de grupos aldehídos por unidad de superficie, lo que facilita una interacción intensa entre la enzima y el soporte. No obstante, este sistema presenta tres inconvenientes:

- La necesidad de llevar a cabo la inmovilización a un pH básico (> 10), lo cual puede ser problemático para algunas enzimas debido a su baja estabilidad en estas condiciones.
- El uso de borohidruro en la reducción del enlace tipo base de Schiff puede plantear problemas en términos de disminución de actividad.
- Este sistema inmoviliza estrictamente proteínas a través de la zona más rica en Lys, y aunque estos residuos son abundantes en la superficie de la mayoría

de las proteínas, algunas no presentan muchos de estos residuos, lo que dificulta su estabilización en este tipo de soportes.

A pesar de estos desafíos, numerosas enzimas han sido inmovilizadas mediante esta estrategia, logrando altos niveles de estabilización en comparación con las enzimas solubles [275]. Es importante señalar que, aunque la mayoría de las proteínas no se inmovilizan en grupos glioxil a pH neutro, existen excepciones, como las proteínas con varios grupos amino terminales (por ejemplo, proteínas formadas por varias subunidades). Los grupos amino terminales tienen un pK entre 7.0-8.0, y si están en el mismo plano, permitirían la inmovilización de la enzima sobre grupos glioxil incluso a pH neutro [276]. Además, la inmovilización en agarosa glioxil a pH 8,0 en presencia de ditionitrito (DTT) estabiliza las bases de Schiff y permite la inmovilización unipuntual irreversible de enzimas a pH neutro (seguido de la incubación a pH alcalino para involucrar las Lys próximas y así lograr una unión covalente multipuntual)[277].

Como se ha mencionado, la inmovilización se lleva a cabo a través de la región de la superficie de la enzima que presenta la mayor densidad de grupos amino primario, no limitándose únicamente al grupo amino más reactivo, como suele ocurrir en la mayoría de las otras técnicas de inmovilización covalente. En una primera etapa, **Figura 1.18**, se establecen enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre los  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las Lys y los grupos aldehídos del soporte. Las Lys son típicamente aminoácidos abundantes en la superficie proteica, expuestos al medio, y cuando están desprotonadas, actúan como nucleófilos altamente reactivos, por lo que es necesario realizar la reacción a un pH superior al pKa de los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (pH 9.2). En esta primera interacción entre la enzima y el soporte se forman al menos dos uniones. Tras la incubación, durante la cual la enzima se orienta sobre el soporte mediante su región más rica en grupos amino reactivos, se produce una interacción múltiple pero reversible [275,278].



**Figura 1.18.** Inmovilización covalente multipuntual sobre glioxil-agarosa. Figura adaptada de [279].

En un segundo paso, se lleva a cabo la reducción de las bases de Schiff a enlaces amino secundario mediante borohidruro de sodio. Esta reducción no solo permite establecer una unión irreversible entre la enzima y el soporte, sino que también transforma todos los grupos aldehído remanentes en grupos hidroxilo, generando así una matriz inerte e hidrofílica. Este último aspecto es crucial para prevenir reacciones indeseadas o no controladas que podrían desestabilizar la proteína, incluso llegando a inactivarla.

#### ***Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos vinil-sulfona (VS)***

Los soportes activados con vinil-sulfona (VS) se han empleado para la inmovilización de diversas enzimas y proteínas [280–285]. En los últimos tiempos, se han propuesto las perlas de agarosa activadas con VS como soporte adecuado para estabilizar enzimas mediante la unión covalente multipuntual [286,287]. Los grupos vinil-sulfona muestran reactividad con varios grupos de aminoácidos de las proteínas (como Lys, Tyr, His, grupo(s) amino terminal(es)) sin requerir una activación previa de la proteína [286,287]. La reacción del soporte enzimático da lugar a la formación de enlaces estables tras la inmovilización, eliminando la necesidad de estabilización adicional para evitar la rotura de los enlaces durante las operaciones, incluso en condiciones adversas [286,287]. Sin embargo, es aconsejable bloquear los grupos vinil-sulfona restantes con

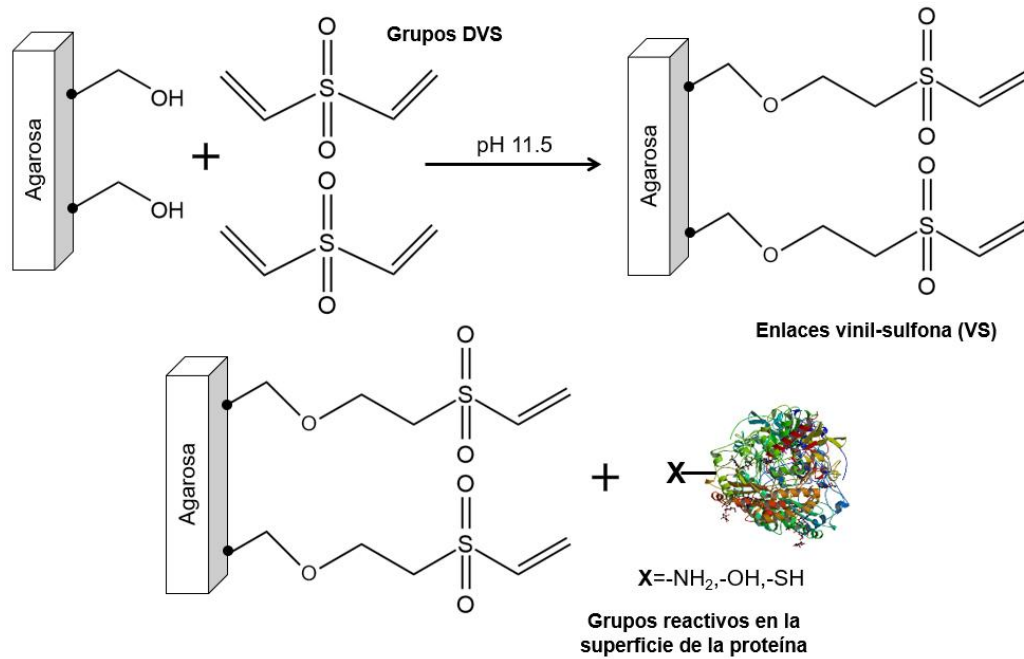
diferentes nucleófilos (por ejemplo, aminoácidos, compuestos amino o tiol) al final de la reacción para evitar reacciones incontroladas entre la enzima y el soporte [286,287].

Estos grupos reactivos presentan una excelente estabilidad en condiciones de almacenamiento e inmovilización, permitiendo la inmovilización de proteínas en un amplio rango de valores de pH. En varios casos concretos [286,287], distintas tripsinas se inmovilizaron con éxito en valores de pH comprendidos entre 5 y 10, observándose una inmovilización más rápida en valores de pH alcalinos.

En comparación con otros soportes utilizados con éxito para estabilizar enzimas mediante la unión covalente multipuntual (como los soportes activados con epoxi [288,289], glutaraldehído [290] o glioxil [275]), los soportes activados con VS presentan algunas ventajas. A diferencia de los soportes activados con epóxidos, los basados en VS presentan una mayor reactividad, lo que permite la inmovilización directa de la enzima mediante la unión covalente sin el requisito previo de la adsorción de la enzima en la superficie del soporte [286,287]. Aunque los soportes activados con epoxi y VS comparten una gama similar de grupos reactivos (los grupos epoxi también tienen la capacidad de reaccionar lentamente con las moléculas carboxílicas) [291], los soportes activados con VS destacan por su mayor reactividad.

En contraste con los soportes activados con glioxil, que reaccionan principalmente con grupos amino primarios, los soportes activados con VS pueden unirse a un espectro más amplio de grupos funcionales [292]. Además, cuando se consideran soportes para la inmovilización de biomacromoléculas sin necesidad de estabilización, los soportes con VS ofrecen ventajas. Eliminan el requisito de inmovilización a valores de pH alcalinos y la necesidad de un paso de reducción (por ejemplo, utilizando borohidruro de sodio), como es el caso de los soportes con glioxil [293].

Sin embargo, la principal limitación de esta activación reside en la mayor longitud del brazo espaciador (debido a la adición de 4 átomos de C y un S a los grupos reactivos del soporte, como se ilustra en el **Figura 1.19**). Este alargamiento podría disminuir potencialmente la rigidificación conseguida mediante la unión covalente multipuntual [178,179,190,273]. Sin embargo, el brazo espaciador alargado también puede ofrecer la ventaja de implicar un mayor porcentaje de la superficie de la enzima en la reacción enzima-soporte [178,179,190,273].



**Figura 1.19.** Activación de la agarosa con DVS y posterior reacción del soporte activado con proteínas. Figura adaptada de [287].

La reactividad limitada de los grupos epoxi y glioxil en situaciones específicas ha conducido al desarrollo de soportes heterofuncionales para la inmovilización de enzimas. Estos soportes permiten diferentes orientaciones facilitadas por otros grupos (como metales inmovilizados o grupos iónicos) mientras se emplea la misma química y bajo idénticas condiciones de inmovilización [294]. En el caso de los soportes con VS, su alta reactividad puede dificultar el uso de esta estrategia para orientar la inmovilización de enzimas, ya que pueden inmovilizar covalentemente proteínas en un rango de pH de 5-10. Sin embargo, la reactividad de varios grupos enzimáticos varía a diferentes valores de pH, lo que permite la posibilidad de alterar la orientación de las enzimas simplemente ajustando el pH de inmovilización [286,287].

### 1.5.2. Métodos reversibles: Inmovilización por intercambio iónico

Las fuerzas implicadas en la adsorción iónica de la proteína al soporte son principalmente de naturaleza electrostática. Aunque estas fuerzas son débiles, su abundancia es suficiente para establecer una unión estable entre la enzima y el soporte. Los procedimientos de inmovilización suelen ser sencillos; consiste en poner en contacto la enzima con el soporte en condiciones suaves de reacción (baja fuerza iónica). A pesar de que estos métodos permiten una inmovilización reversible, la unión resultante es muy

resistente, lo que los hace útiles en procesos industriales donde el precio del soporte es un factor significativo en el coste total del biocatalizador.

Tradicionalmente, estos métodos se han empleado más para la purificación de enzimas que para la inmovilización, debido a las dificultades asociadas con el mantenimiento de la proteína adsorbida en el soporte bajo las condiciones de reacción deseadas [295–297]. Factores como variaciones de pH, presencia de sustratos o productos ionizables, y el uso de altas temperaturas para solubilizar reactivos pueden acelerar el proceso de desorción de la enzima [298–300]. En respuesta a esto, se han desarrollado matrices flexibles con una amplia superficie y una alta densidad de residuos iónicos para interactuar con la superficie enzimática, permitiendo así la aplicación de enzimas adsorbidas en soportes iónicos como biocatalizadores en procesos industriales. Esta aproximación posibilita una unión más fuerte en comparación con las matrices rígidas convencionales de adsorción iónica, como agarosa dietilaminoetil (DEAE) y agarosa monoamino-N-aminoetil (MANAE). Además, este tipo de inmovilización al ser más suave permite conservar potencialmente una mayor actividad en enzimas más sensibles a los cambios estructurales.

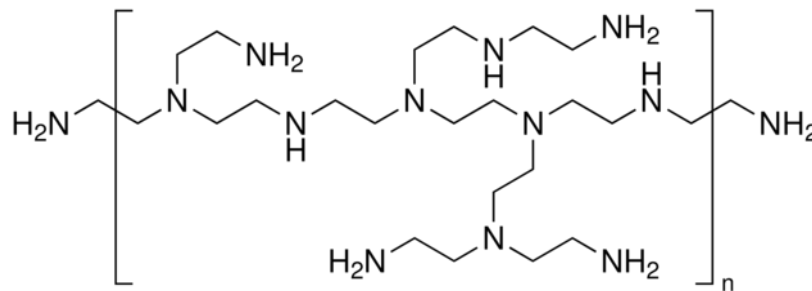
Una estrategia para lograr la inmovilización reversible y robusta de enzimas, sin distorsionar su estructura tridimensional, implica revestir las superficies de soportes porosos con polímeros iónicos flexibles que contienen una alta densidad de grupos cargados para el intercambio iónico [301,302]. Sin embargo, cuando la enzima se inactiva o el biocatalizador deja de ser productivo, se puede someter el sistema a condiciones drásticas (como 1 M de NaOH o NaCl) para recuperar el soporte polimérico libre de la enzima inactiva. A diferencia de los soportes convencionales, que suelen tener una densa capa de grupos cargados positiva o negativamente [303,304], presentando una superficie plana de interacción con la proteína (adsorción bidimensional), los soportes recubiertos con polímeros iónicos flexibles permiten una interacción tridimensional. En este caso, la adsorción ocurre a lo largo de un volumen, ya que la flexibilidad del polímero facilita la adaptación a la estructura de la proteína. Además, se ha observado que proteínas que no pueden ser adsorbidas en soportes convencionales pueden ser exitosamente adsorbidas en soportes recubiertos con estos polímeros [305,306].

### ***Unión reversible por intercambio aniónico con polietilenimina (PEI)***

La polietilenimina (PEI) destaca por ser un polímero sintético ampliamente utilizado en diversas aplicaciones debido a su versatilidad química, atribuida a la

presencia de aminas catiónicas primarias (25%), secundarias (50%) y terciarias (25%) [307,308]. La estructura de la PEI, formada por la unión de unidades de iminoetileno, puede adoptar diversas arquitecturas (lineal, ramificada, en peine, en red y dendrímero) en función de los métodos de síntesis y modificación. Estas variaciones influyen significativamente en sus propiedades físicas y químicas [309]. Además, los distintos métodos de síntesis permiten que el PEI esté disponible en una amplia gama de pesos moleculares.

La PEI ramificada (**Figura 1.20**) presenta un estado líquido muy viscoso a temperatura ambiente, mientras que la PEI lineal es sólida. La PEI posee varias características ventajosas para aplicaciones generalizadas, como su baja toxicidad, su facilidad de separación y reciclaje y su bajo olor. Además de estas atractivas características, un aspecto distintivo que diferencia la PEI de otros poliiiones (como la polialilamina o el quitosano) es su elevada capacidad de carga. Esta característica justifica su amplio uso en diversos campos, como detergentes, adhesivos, tratamiento de aguas [310], cosméticos, captura de dióxido de carbono [311–313], transfección de ADN y administración de fármacos [314,315]. A pesar de ser una base polimérica débil con valores de pKa entre 7.9 y 9.6, la alta densidad de carga iónica de la PEI la convierte en un material rentable.

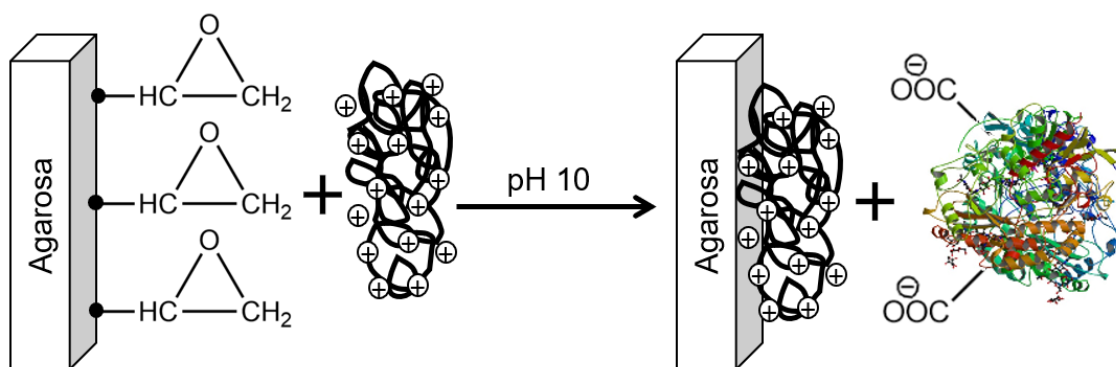


**Figura 1.20.** Estructura química de la polietilenimina ramificada.

Normalmente, la polietilenimina disponible en el mercado presenta una estructura ramificada. La PEI ramificada (BPEI) es soluble en disolventes polares como el agua, el etanol y la acetona. Esta molécula resulta especialmente atractiva para el diseño de biocatalizadores debido a su estructura azarosa y a su capacidad para cubrir las superficies de soportes o proteínas [316]. La vía sintética convencional para producir BPEI implica la polimerización electrofílica (o catiónica) de apertura en anillo de la etilenimina no sustituida con un catalizador protónico, como los ácidos de Lewis y sus sales, los ácidos de Brønsted fuertes, los halogenuros de alquilo, los ésteres de ácidos fuertes, los fenoles,

los ácidos carboxílicos o halógenos [317]. Esta polimerización da lugar a la formación de grupos amino secundarios en la cadena polimérica, que son más básicos que el monómero. En consecuencia, se produce una amplia transferencia de cadena al polímero, lo que da lugar a la ramificación.

El recubrimiento de superficies de soporte con PEI las activa para la inmovilización de enzimas mediante el intercambio aniónico. Aunque esta aplicación específica de la PEI se publicó por primera vez en 1991 [317], desde entonces se han producido numerosos avances. El proceso de inmovilización implica la formación de múltiples enlaces iónicos entre la enzima y el soporte, lo que conduce a un desplazamiento de los iones contrarios en ambas superficies [305], **Figura 1.21**.



**Figura 1.21.** Agarosa-epoxi recubierta con polietilenoimina, que reacciona por intercambio iónico con los grupos de alta densidad negativa de la enzima.

El uso de estos soportes con lechos poliméricos para inmovilizar biomacromoléculas ofrece varias ventajas sobre los intercambiadores de aniones convencionales [174,317].

- La adsorción enzimática es robusta debido a los múltiples grupos catiónicos de PEI a distancias variables que pueden adaptarse a la distancia entre grupos enzimáticos.
- La estructura en espiral azarosa del polímero evita la distorsión de la enzima durante la interacción a través de múltiples puntos.
- La adsorción tridimensional que proporciona el lecho polimérico formado por PEI supera la adsorción bidimensional de los soportes estándar [306].

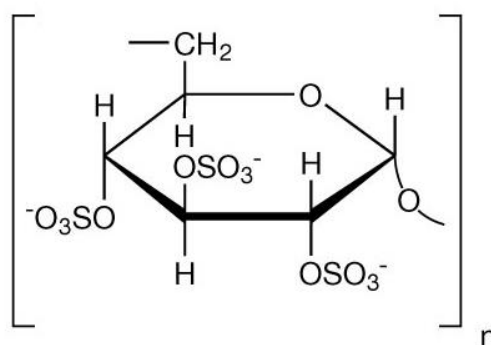
Estas ventajas han permitido la inmovilización de más del 80% de las proteínas contenidas en un extracto proteico crudo [301], por lo que parece evidente que la carga neta de la proteína no es la razón de la inmovilización de la enzima, sino la posibilidad de establecer muchos puentes iónicos. Esta idea ha permitido el desarrollo de diferentes

intercambiadores iónicos a medida para la inmovilización selectiva de diferentes proteínas [318].

No obstante, la utilización de PEI puede plantear ciertos retos. Por ejemplo, el polímero puede interactuar con las cavidades internas de la proteína, donde pueden encontrarse cationes críticos, lo que provocaría la inactivación de la enzima. Esto contrasta con el uso de pequeños grupos catiónicos en una superficie plana, donde estas interacciones son menos probables. Además, la movilidad de la PEI puede contribuir a una cierta desestabilización de la enzima con la que interactúa. No se espera que el intercambio iónico provoque una rigidificación estructural significativa a la enzima, y este efecto es aún menos pronunciado con la PEI debido a su alta movilidad. Sin embargo, pueden observarse algunos efectos estabilizadores relacionados con la creación de microambientes hidrofílicos para generar partición de disolventes [319,320].

#### ***Unión reversible por intercambio catiónico con dextrán-sulfato (DS)***

El dextrano es un polisacárido compuesto por poli- $\alpha$ -D-glucósidos de origen microbiano, caracterizado por enlaces glucosídicos predominantemente en C-1 $\rightarrow$ C-6, según la definición de la IUPAC [321], **Figura 1.22**. Este biopolímero es sintetizado naturalmente por diversas bacterias que prosperan en medios que contienen sacarosa [322], presentando una amplia gama de pesos moleculares (3 a 2000 kDa). Las dextranucrasas de *Leuconostoc* spp. [323,324], *Weissella* spp. [325,326] y lactobacilos [327,328] son responsables de su producción, siendo *Leuconostoc mesenteroides* la fuente más común de dextranos comercializados [329,330].



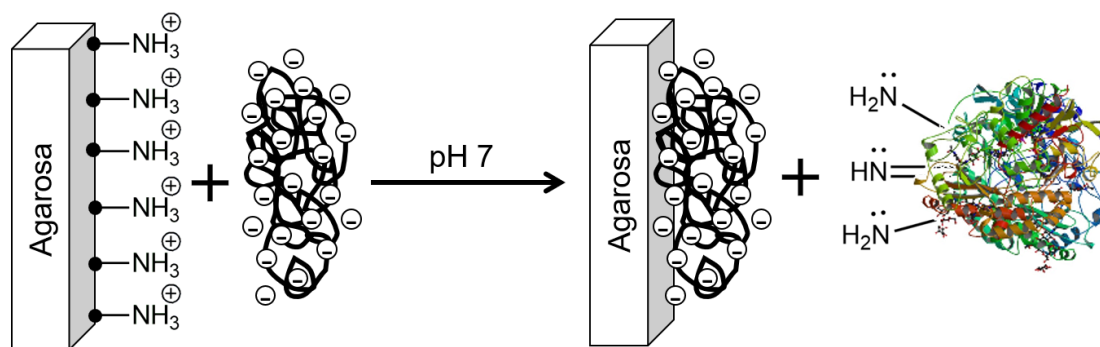
**Figura 1.22.** Estructura química del polímero dextrán-sulfato.

Tradicionalmente, las fracciones de dextranos de bajo peso molecular se han utilizado principalmente en biotecnología como expansores del volumen plasmático [331,332]. Esto se atribuye no sólo a su estructura lineal y a su alta solubilidad en agua, sino también a su composición química, basada principalmente en enlaces  $\alpha$ -1,6. Esta

composición hace que los dextranos sean menos susceptibles a la hidrólisis enzimática en comparación con otros oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4, como el glucógeno [333], que puede ser descompuesto por dextranasas microbianas en el tracto gastrointestinal.

Los dextranos presentan características favorables, como una alta solubilidad en agua, estabilidad en condiciones ácidas y básicas suaves y un número considerable de grupos hidroxilo. Estas propiedades hacen de los dextranos un material excelente para diversos protocolos de derivatización y para someterse a procesos de entrecruzamiento químico o físico [86,87]. Típicamente, el grupo hidroxilo C-2 es el más reactivo, y la conjugación de diferentes moléculas con el dextrano puede conseguirse mediante diversos procedimientos [86]. A pesar de la variedad de metodologías, una característica común entre ellas es que el anillo de glucopiranososa del polisacárido permanece inalterado.

Esta técnica consiste en utilizar soportes con grupos catiónicos en su superficie, lo que facilita la adsorción de un polímero iónico. Dado que el polímero posee un número de cargas significativamente mayor que la superficie del soporte, la carga global viene dictada por el propio polímero [302,334]. Además, si el polímero incorpora numerosos grupos iónicos, su adsorción en el soporte se vuelve robusta. Esto simplifica y agiliza la preparación de la matriz, eliminando la necesidad de grupos que permitirían reacciones covalentes entre el polímero y el soporte [302,334]. Es importante además seleccionar el polímero de DS con el peso molecular más adecuado, dependiendo también del tamaño de la proteína a inmovilizar. Este método es adecuado para enzimas con alta densidad de cargas positivas en su superficie (como lisinas, argininas o histidinas) que son muy sensibles a la inmovilización covalente multipuntual, **Figura 1.23**.

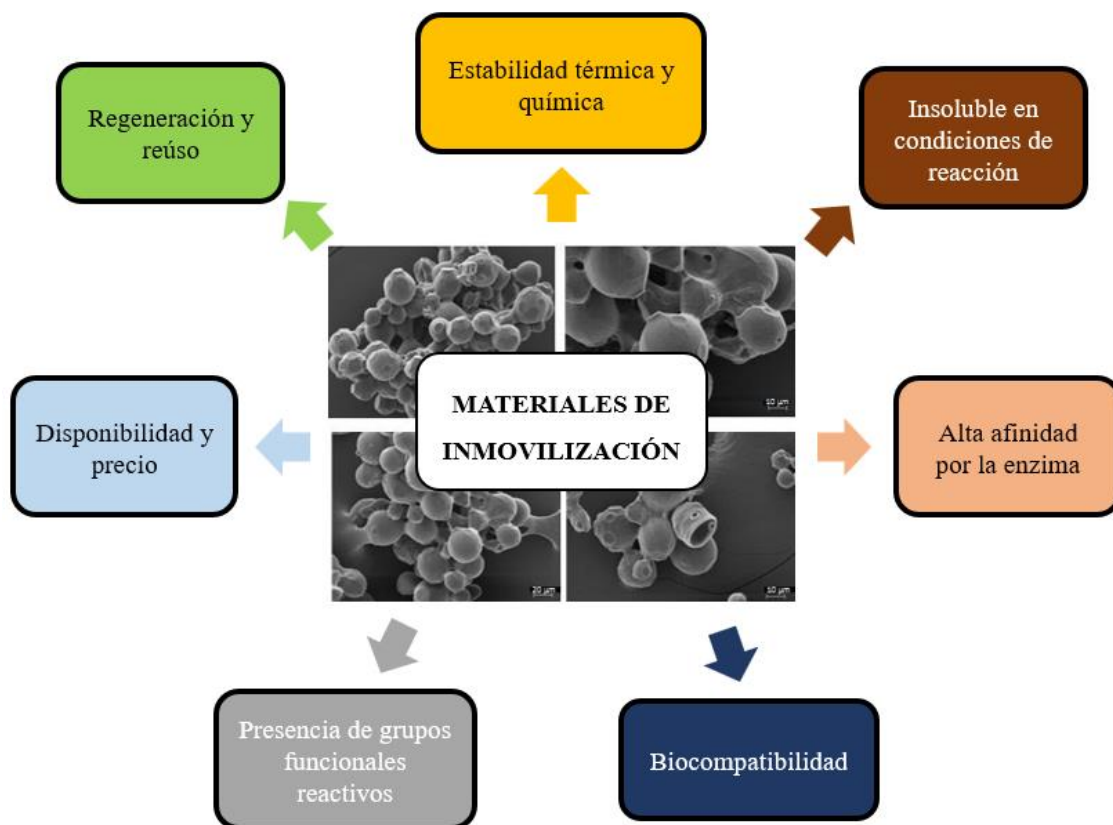


**Figura 1.23.** MANAE-agarosa recubierta con dextrán-sulfato, que reacciona por intercambio iónico con los grupos de alta densidad positiva de la enzima.

### **1.5.3. Materiales utilizados para la fabricación de soportes de inmovilización**

Existe una amplia gama de materiales de diversas fuentes que pueden servir como soportes para la inmovilización de enzimas y que se clasifican en materiales orgánicos, inorgánicos, híbridos o compuestos. La función principal del soporte es salvaguardar la estructura de la enzima frente a las duras condiciones de reacción, ayudando así a la enzima inmovilizada a mantener una elevada actividad catalítica [335]. La elección de un material adecuado, como los soportes hidrofóbicos para la inmovilización de lipasas, puede mejorar la actividad del biocatalizador [336,337]. Sin embargo, existen limitaciones en este ámbito, ya que la matriz no debe afectar negativamente a la estructura de la enzima más allá de lo necesario para establecer interacciones estables enzima-matriz.

Por otro lado, debe haber compatibilidad entre los grupos funcionales de los dos materiales para facilitar la formación de estas interacciones enzima-matriz, algo especialmente crucial en el caso de la inmovilización covalente [269]. El soporte necesita exponer los sitios activos del catalizador para facilitar la unión de moléculas de sustrato, con el objetivo de reducir las limitaciones difusionales de sustratos y productos [338]. En la **Figura 1.24** se describen brevemente las características esenciales que deben tener los materiales de soporte para una inmovilización enzimática eficaz. No obstante, hay que recordar que la selección adecuada de un soporte está directamente relacionada con el tipo de enzima y con el proceso en el que se utilizará el biocatalizador.



**Figura 1.24.** Principales características de los materiales de los soportes empleados para la inmovilización de enzimas.

Debido a la inestabilidad habitual de las enzimas en entornos hidrófobos, los materiales hidrófilos son óptimos para formar matrices en la inmovilización de enzimas. Además, los soportes inertes son preferibles para evitar interacciones incontroladas entre la enzima y el soporte [339]. Los procedimientos de inmovilización suelen implicar tanto soportes orgánicos como inorgánicos [268]. Esta última categoría engloba numerosas matrices basadas en sílice y óxidos metálicos, como zeolitas, sílices mesoporosas, alúmina, cerámicas, vidrios mesoporosos y nanopartículas magnéticas [340]. Estos materiales están disponibles con una amplia gama de precios y características mecánicas [340,341], siendo sus características clave su completa inocuidad microbiológica y sus excepcionales propiedades mecánicas. Especialmente, cabe destacar el amplio uso de soportes basados en metacrilato en el campo de la biocatálisis, dónde recientemente se ha publicado un estudio comparando el desempeño de biocatalizadores basados en materiales de agarosa y metacrilato en reacciones de aminación y oxidación [342].

En la inmovilización de enzimas se emplean varias clases de soportes orgánicos, como los basados en poliacrilamida y poli(alcohol vinílico) [343,344], poliamidas como el nailon [345] y polisacáridos. Además, numerosos azúcares macromoleculares han encontrado aplicaciones, entre ellos el almidón, la celulosa y, más recientemente, el dextrano, el quitosano/quitina, el alginato [346,347] y los derivados de la agarosa, que han ganado una gran popularidad [348,349].

Teniendo en cuenta los factores económicos, el almidón y la celulosa aparecen como las opciones más viables [350]. Por desgracia, el almidón es susceptible a la degradación microbiana, por lo que su uso contemporáneo es relativamente infrecuente. Además, los soportes basados en almidón presentan unas propiedades mecánicas y reológicas inferiores. La celulosa, con su característica estructura tridimensional, requiere costosos tratamientos para hacerla apta para las técnicas de inmovilización. Las hebras compactas formadas por las cadenas de celulosa, interconectadas a través de un conjunto regular de enlaces de hidrógeno entre cadenas, suponen un reto para muchos reactivos, que requieren tratamientos duros para su penetración [351]. Como alternativa, la celulosa podría solubilizarse utilizando disolventes apropiados y precipitarse después en una forma amorfa e hinchada, mejorando la accesibilidad a los agentes derivatizantes [352].

Otros polisacáridos, como los dextranos y el pullulano [353], están disponibles en formas entrecruzadas que presentan una resistencia considerable a la degradación bacteriana y fúngica. Además, estos soportes suelen presentar propiedades físicas excepcionales, como una elevada área superficial y un gran tamaño de poro. Sin embargo, los derivados del dextrano (por ejemplo, Sephadex® y Sephacryl®) son relativamente caros, y su resistencia mecánica es limitada, junto con una escasa compatibilidad geométrica con las enzimas. Por el contrario, la agarosa destaca como una alternativa natural que, en determinadas formas, puede resultar más rentable. Posee una elevada afinidad hidrofílica, compatibilidad con diversas estrategias de activación, amplia disponibilidad con diversos tamaños de poro y resistencia a la agitación mecánica. Además, el tamaño de las partículas de agarosa puede ajustarse, oscilando entre mm y  $\mu\text{m}$ , en función de la aplicación específica. A continuación, se profundiza en la estructura y características de la agarosa, el soporte más utilizado en esta tesis.

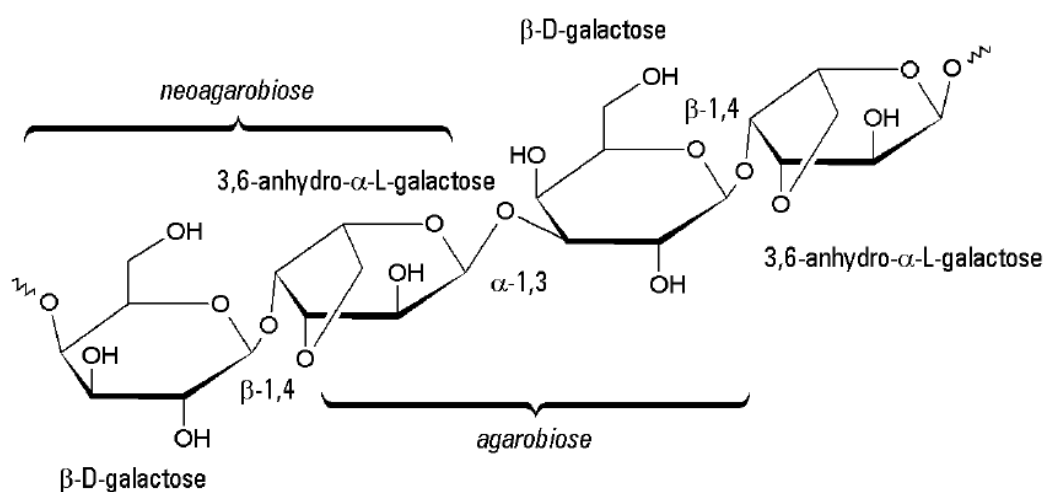
### Agarosa

El agar o agar-agar es una sustancia carragenina, un polisacárido no ramificado que se obtiene de la pared celular de varias especies de algas de los géneros *Gelidium*,

*Eucheuma* y *Gracilaria*, entre otros, dando lugar, según la especie, a un color característico. La palabra "agar" procede del malayo agar-agar, que significa gelatina. También se conoce con los nombres de "gelosa", "gelosina", "gelatina vegetal", "gelatina china" o "gelatina japonesa". Las algas y el gel que se extrae de ellas se utilizan desde la antigüedad en los países de Extremo Oriente (China, Japón, Corea, etc.) y se trajeron a Europa hacia mediados del siglo XIX. Hoy en día, las algas productoras se cultivan en muchas zonas [354].

### Estructura química

El agar consta de dos componentes principales: agarosa y agarpectina [355]. La agarosa, que constituye la mayor parte del agar, es un heteropolisacárido gelificante neutro. Es un polímero lineal caracterizado tanto por enlaces  $\alpha$ - como  $\beta$ - glucosídicos, a diferencia de la mayoría de los polisacáridos comunes, incluido el dextrano [356–358]. La unidad monomérica de la agarosa, ilustrada en la **Figura 1.25**, consiste en dos monosacáridos: -D-galactosa y 3,6-anhidro--L-galactosa. Estos monosacáridos están unidos por enlaces glucosídicos (1-4) (entre -D-galactosa y 3,6-anhidro--L-galactosa, formando la unidad básica disacárida conocida como neoagarobiosa) y (1-3) (entre 3,6-anhidro--L-galactosa y -D-galactosa, formando la unidad básica disacárida llamada agarobiosa). Estos enlaces pueden ser hidrolizados por dos enzimas distintas:  $\alpha$ -agarasa (C.E. 3.2.1.158) y  $\beta$ -agarasa (C.E. 3.2.1.81) [359,360]. Sólo unos pocos microorganismos poseen estas actividades enzimáticas [361], lo que explica el amplio uso del agar en los medios de cultivo sólidos microbiológicos.



**Figura 1.25.** Estructura vertebral de la agarosa. Las unidades de disacáridos que se repiten se denominan agarobiosa y neoagarobiosa. En el caso de la agarpectina, las

posiciones 2 o 6 de residuos de 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa pueden ser sustituidas por residuos de  $-\text{OSO}_3^-$ ,  $-\text{OCH}_3$ , glucuronato o piruvato [362].

La agarosa presenta un alto grado de polimerización, con un peso molecular determinado de al menos 120 kDa, equivalente a aproximadamente 800 residuos de azúcar [363]. El contenido en sulfatos sólo es admisible hasta un 0.15%. La agarpectina, es relativamente heterogénea, pero comparte la misma unidad de repetición [364]. Aproximadamente el 8% de las posiciones 2- o 6- de los residuos 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa en la agarpectina pueden sustituirse por residuos  $-\text{OSO}_3^-$ ,  $-\text{OCH}_3$ , glucuronato o piruvato [362,365]. Estos sustituyentes influyen significativamente en el potencial gelificante del material. Los polímeros de agarosa forman robustos enlaces con un gran diámetro, superior al de una enzima. El diámetro aumenta con el porcentaje de agarosa (o grado de entrecruzamiento), facilitando un mayor soporte/interacción enzimática cuando se utiliza agarosa con un porcentaje considerable. Sin embargo, a medida que aumenta el porcentaje de agarosa, disminuye el diámetro de los poros. En consecuencia, es necesario optimizar la agarosa utilizada para cada enzima [272].

### ***Propiedades funcionales***

En bioquímica, el agar y los geles de agarosa encuentran aplicación como soportes para electroforesis [366] e inmovilización de proteínas [350], aprovechando sus ventajosas propiedades funcionales. En agua, la agarosa actúa como un coloide fuertemente hidrófilo, liófilo y altamente inerte. La característica más atractiva del agar y la agarosa es su capacidad para formar de forma reversible geles estables y firmes. Sorprendentemente, a diferencia de otros soportes hidrofílicos como los materiales basados en dextrano, poliacrilamida y alcohol polivinílico, los geles de agar y agarosa muestran una contracción o hinchazón mínima cuando se altera el solvente [350].

La arquitectura tridimensional de la red polimérica permanece prácticamente inalterada incluso cuando las moléculas de agua, alojadas dentro de los poros del gel, son desplazadas y sustituidas por otros disolventes como la acetona. Además, los geles de agarosa muestran una sinéresis (separación de las fases de componen la suspensión) muy lenta y baja [367], lo que garantiza que el diámetro de los poros prácticamente no se vea afectado. La constancia de los parámetros estructurales es una característica valiosa a la hora de diseñar y aplicar protocolos de modificación química que requieren condiciones no acuosas. Esta característica crucial permite conservar el mismo volumen de la matriz incluso cuando el agua se sustituye (parcialmente) por disolventes orgánicos. Las enzimas

inmovilizadas suelen mostrar una mayor tolerancia a entornos menos polares que sus homólogas solubles.

Además, la agarosa demuestra una notable estabilidad química en condiciones operativas típicas, en particular a niveles de  $\text{pH} > 3$ . En ausencia de oxígeno o en presencia de agentes reductores, los geles de agar entrecruzados pueden soportar tratamientos de hasta  $120^{\circ}\text{C}$  con NaOH al 10%-30% sin destrucción de la matriz [350]. Aunque la estabilidad en ambientes ácidos es algo menor, son factibles tratamientos breves con HCl 1 M o  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 50%. También en este caso, el mecanismo de entrecruzamiento contribuye a mejorar la estabilidad.

Los geles de agarosa pueden transformarse fácilmente mediante entrecruzamiento químico en estructuras de partículas esféricas porosas, como microesferas, cuyo tamaño y porosidad se controlan con precisión mediante procedimientos de preparación meticulosos. Entre los métodos más conocidos para crear estas estructuras se encuentran la gelificación por pulverización o suspensión [368,369]. Más recientemente, la utilización de técnicas de emulsificación de membranas microporosas ha facilitado la producción de microesferas monodispersas, especialmente adecuadas para operaciones en columna [370,371]. Numerosos proveedores ofrecen preparados comerciales de agarosa en forma de microesferas con diámetros y porosidades específicos, siendo ABT® (Madrid, España) y Sepharose® (Uppsala, Suecia) de los productores industriales más importantes.

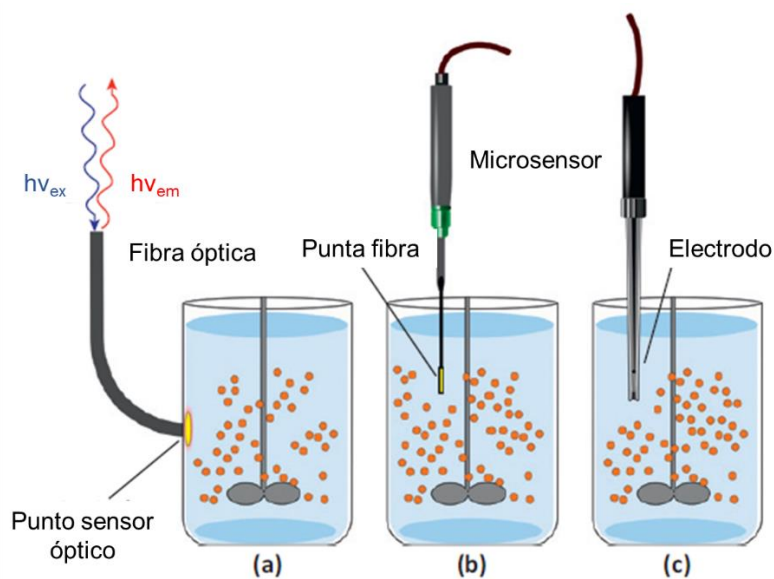
## **1.6. DETECCIÓN OPTOQUÍMICA DEL OXÍGENO Y SU APLICACIÓN EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS**

### **1.6.1. Principios de la detección optoquímica del $\text{O}_2$**

Dada la importancia del oxígeno disuelto como sustrato en las reacciones con las oxidasas, la detección y cuantificación de este parámetro desempeña un papel fundamental en numerosas aplicaciones biotecnológicas [372–374]. Tradicionalmente, esta variable se determina in situ empleando electrodos amperométricos Clark [375,376]. Enfoques electroquímicos más recientes utilizan transistores químicos de efecto de campo [375]. Sin embargo, el tamaño relativamente grande de los sensores electroquímicos limita su aplicabilidad a microescala, y existe el inconveniente inherente del consumo activo de  $\text{O}_2$  durante la medición.

En la última década, los sensores optoquímicos han surgido como una alternativa convincente y disponible comercialmente [377]. Estos sensores comprenden moléculas indicadoras luminiscentes inmovilizadas en una capa de polímero permeable al analito, que pueden localizarse en la punta de una fibra o en las paredes de un recipiente de reacción transparente. Esta detección puede realizarse de forma no invasiva desde el exterior mediante fibras ópticas conectadas a un dispositivo de medición optoelectrónico (**Figura 1.26**). Los sensores optoquímicos de O<sub>2</sub> se ofrecen en diversos formatos, como láminas o puntos, (micro)sensores de fibra óptica o partículas sensibles a escala micro o nanométrica [378,379]. Estos formatos versátiles permiten un despliegue no invasivo y flexible en lugares de medición apropiados, facilitando las lecturas analíticas a escala microscópica.

La matriz polimérica no sólo sirve de soporte para el indicador, sino que también influye significativamente en la selectividad, sensibilidad, rango dinámico, tiempo de respuesta y (foto)estabilidad del sensor óptico [380]. Por consiguiente, la selección cuidadosa tanto del indicador como de la matriz es crucial para el desarrollo satisfactorio de un sensor óptico de O<sub>2</sub> adaptado a una aplicación específica.



**Figura 1.26.** Detección óptica de oxígeno en disolución. Se puede utilizar un sensor integrado de un punto (a) o un microsensado (b). Para determinar el pH o el O<sub>2</sub> suele utilizarse un electrodo convencional (c). Figura adaptada de [381].

En las últimas tres décadas, se han documentado en la literatura numerosos compuestos indicadores para la detección de O<sub>2</sub> [382]. En particular, los complejos luminiscentes de rutenio(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos han ganado popularidad debido a sus propiedades únicas [383]. En particular, su versatilidad permite crear colorantes indicadores sensibles a diversos analitos objetivo sin necesidad de modificar la instrumentación (por ejemplo, la fuente de luz, los filtros ópticos, el detector y la electrónica).

Entre los sensores químicos luminiscentes, los sensores optoquímicos de O<sub>2</sub> operan basándose en el atenuado dinámico de la fosforescencia mostrada por el indicador. Este apantallamiento influye tanto en la intensidad como en el tiempo de vida de la fosforescencia, con tiempos de vida que suelen estar comprendidos entre 1 y 100  $\mu$ s. Generalmente se prefiere la medición del tiempo de vida porque sirve como parámetro de referencia intrínseco. A diferencia de las mediciones de intensidad, la medición del tiempo de vida no se ve afectada por factores como la dispersión, la reflexión, las variaciones en la configuración optoelectrónica y la distribución desigual o el blanqueo del indicador [384]. En el ámbito de los sensores luminiscentes basados en la vida útil, la opción preferida es la detección sensible a la fase de la emisión modulada del compuesto indicador [385]. Este enfoque es el preferido debido a su simplicidad, rápida respuesta y asequibilidad en términos de la instrumentación requerida. La determinación del tiempo de vida puede realizarse tanto en el dominio temporal como en el frecuencial [386–388].

### **1.6.2. Inmovilización de indicadores luminiscentes en soportes sólidos**

Como se ha comentado, los sensores optoquímicos se emplean ampliamente para determinar el O<sub>2</sub> en solución. Sin embargo, realizar las mismas mediciones directamente dentro de un soporte poroso supone un reto con los equipos actuales. Por consiguiente, es necesario hacer que los soportes empleados respondan internamente al O<sub>2</sub>, y un enfoque prometedor consiste en la incorporación de indicadores de luminiscencia adecuados. Estos indicadores deberán de ser suficientemente sensibles en el intervalo de operación (por ejemplo, del 0-21% de O<sub>2</sub> en caso de operar con aire) e interactuar lo menos posible tanto con la enzima como con la química de inmovilización escogida.

Aunque se ha explorado la conjugación directa de la enzima con un luminóforo sensible al pH (por ejemplo, tioisocianato de fluoresceína), existe el posible inconveniente de alterar la función de la enzima [389]. Como alternativa, se ha investigado el marcaje del soporte en lugar de la enzima, **Figura 1.27A**. Algunos

ejemplos son el atrapamiento en perlas de alginato [390], la incorporación covalente en micropartículas de poli(etilenglicol) [391], membranas [392], y la adsorción iónica en superficies de sílice activadas con aminas [393]. En particular, se ha demostrado que la fluoresceína (un colorante sensible al pH) y el dicloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio(II) (un indicador sensible al O<sub>2</sub>) se adsorben de forma estable en soportes fabricados con material de polimetacrilato, eliminando la necesidad de su unión covalente [381,394].

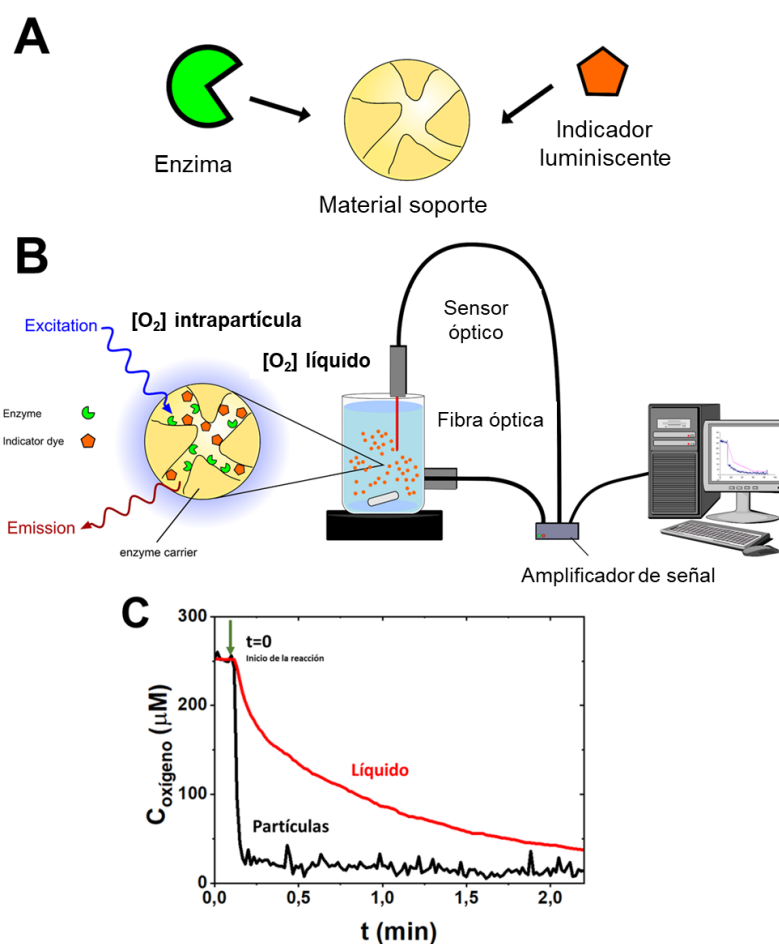
Cabe destacar que el marcaje luminiscente demuestra una gran compatibilidad con una amplia gama de grupos reactivos en la superficie de soportes hidrofóbicos (por ejemplo, aldehído, amina, ácido carboxílico, diol, epóxido), que ya están presentes en los soportes comerciales o pueden introducirse fácilmente mediante una derivatización conveniente [202,394,395]. La fuerte adsorción observada se debe probablemente a la complementariedad hidrofóbica entre el indicador y el soporte, lo que da lugar a un marcaje casi irreversible durante la incubación en un tampón acuoso. Por lo tanto, sería interesante explorar la posible transferencia del sencillo procedimiento de marcaje por luminiscencia no covalente a materiales soportados alternativos, especialmente significativos en la inmovilización de enzimas, como la sílice [268,396,397] y la agarosa [216,268].

En experimentos con dos enzimas industriales, la cefalosporina C amidasa y la glucosa oxidasa, el marcaje del portador con fluoresceína y Ru(dpp)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> no afectó negativamente a la inmovilización de la enzima en modo alguno [202,394,395]. Aunque estos resultados sugieren la útil biocompatibilidad del procedimiento de marcado, no pueden generalizarse. Es aconsejable evaluar sistemáticamente los efectos del indicador sobre la actividad o la estabilidad de la enzima inmovilizada que se examina. No obstante, es crucial subrayar que, a menos que haya un deterioro significativo de la función enzimática por los indicadores inmovilizados, la medición del pH interno o de la concentración de O<sub>2</sub> sigue siendo muy valiosa para evaluar el papel de la difusión en la limitación de la velocidad de reacción global [381].

### **1.6.3. Detección in situ de O<sub>2</sub> intrapartícula**

Las configuraciones analíticas para la detección interna se clasifican en función de si ofrecen resolución espacial del parámetro medido. La configuración experimental ilustrada en la **Figura 1.27B** es eficaz para obtener valores promediados globales del parámetro interno en tiempo real, recogiendo simultáneamente datos tanto en la fase

líquida como en el interior del soporte. Sin embargo, problemas como el ruido y otras perturbaciones en las señales ópticas registradas (por ejemplo, dispersión, deriva) limitan la aplicabilidad de las determinaciones de parámetros internos basadas en la intensidad de fluorescencia a sistemas no agitados en los que las partículas son esencialmente estacionarias. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de enfoques analíticos alternativos, en particular los basados en el tiempo de vida de la fluorescencia [386], siendo la doble referencia de vida útil (DLR en sus siglas en inglés) un ejemplo notable [394,395].



**Figura 1.27.** Etapas en la detección in situ del oxígeno intrapartícula. *Panel A:* La correcta inmovilización del indicador luminiscente en el interior de la partícula sin interferir con la enzima es crucial. *Panel B:* La excitación del indicador luminiscente se realiza con luz azul. Se analiza la [O<sub>2</sub>] tanto en la fase líquida como en el interior de la partícula. *Panel C:* Ejemplo de los cursos de oxígeno de un biocatalizador limitado por el transporte de oxígeno.

Las mediciones autorreferenciadas y las determinaciones del tiempo de vida por fluorescencia demuestran un mayor rendimiento analítico, especialmente en sistemas agitados. La doble referencia de vida útil (DLR), en particular, ofrece una versatilidad notable, ya que no se ve afectada por la concentración del catalizador, la configuración del reactor ni la escala de operación. La determinación de la concentración interna de O<sub>2</sub> mediante mediciones promediadas en el espacio se ha logrado con éxito utilizando la técnica de modulación de fase [199].

En la **Figura 1.27C**, se presenta un ejemplo de determinación de la concentración interna de O<sub>2</sub> en un biocatalizador enzimático. La observación de un gradiente significativo entre las concentraciones de O<sub>2</sub> en la fase líquida y el interior del soporte indica claras limitaciones en el suministro de oxígeno al soporte sólido. Concretamente, en biocatalizadores inmovilizados dependientes de oxígeno este tipo de estudio es muy interesante. Permite distinguir si las principales limitaciones en la actividad aparente son debidas a efectos de inmovilización (cambios en la estructura terciaria de la enzima o falta de accesibilidad al centro activo) o debido a restricciones difusionales. Con este conocimiento adquirido se puede trabajar en estrategias de intensificación focalizando en el método de inmovilización, las características del soporte o el tipo de suministro externo de oxígeno.



---

---

# **CAPÍTULO 2.**

## **ALCANCE Y OBJETIVOS**

---

---

## **2. ALCANCE Y OBJETIVOS**

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el diseño de biocatalizadores enzimáticos para la intensificación de bioprocesos oxidativos. Se trata de un planteamiento de varias etapas y multidisciplinar que consta de los siguientes subobjetivos:

- 1) Desarrollo de metodologías para la caracterización de catalizadores dependientes de oxígeno y su estudio cinético en fase líquida.
- 2) Desarrollo y aplicación de metodologías de inmovilización de catalizadores oxidativos dependientes de oxígeno y su caracterización mediante un estudio cinético.
- 3) Estudio del mecanismo de activación de la galactosa oxidasa mediante el cribado de activadores y la influencia del peróxido de hidrógeno en el proceso.
- 4) Diseño de un biocatalizador activo y estable de galactosa oxidasa mediante la aplicación de diferentes estrategias de inmovilización y estudio detallado de sus restricciones difusionales mediante la co-inmovilización de un indicador luminiscente.
- 5) Desarrollo de modelos matemáticos para el estudio y predicción de la distribución de las enzimas inmovilizadas en el interior las partículas y su influencia en rendimiento catalítico.
- 6) Estudios de intensificación de procesos mediante el estudio de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en biorreactores aireados para la aplicación de los biocatalizadores en procesos de oxidación enzimática.

Cada uno de estos objetivos hace referencia a un capítulo de la presente tesis doctoral en el apartado de Resultados y Discusión (capítulos 4-8).

---

---

**CAPÍTULO 3.**

**MATERIALES Y**

**MÉTODOS**

---

---

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

En esta sección se describen las especificaciones técnicas de los principales materiales empleados en el desarrollo de la investigación. Se han estructurado en tres partes, según su naturaleza: enzimas, materiales de inmovilización y reactivos empleados.

#### **3.1.1. Enzimas**

Todas las enzimas usadas en el desarrollo de la presente tesis fueron preparaciones comerciales en forma de polvo liofilizado. Éstas se pueden dividir según su importancia en principales y auxiliares. Las enzimas principales han sido objeto directo de estudio y análisis, mientras que las auxiliares han servido de apoyo a las principales en las reacciones de oxidación. Enzimas principales:

- Glucosa oxidasa (GOX) de *Aspergillus niger*: tipo VII (G2133), actividad  $\geq 100$  U mg<sup>-1</sup>, un peso molecular de 160 kDa y un contenido en proteína  $\geq 60$  %. Una unidad (U) oxida 1  $\mu$ mol de D-glucosa para formar D-gluconolactona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 5.1 y 35°C. Datos reportados por el proveedor.
- Galactosa oxidasa (GalOx) de *Dactylium dendroides*: (G7400), actividad  $\geq 3.0$  U mg<sup>-1</sup>. Una unidad (U) produce un incremento en la absorbancia a 425 nm de 1.0 min<sup>-1</sup> a pH 6.0 y 25°C en un sistema de 3.4 mL de volumen de reacción con peroxidasa y O-toluidina. Datos reportados por el proveedor.
- Lacasa de *Agaricus bisporus*: (40452), actividad  $\geq 4.0$  U mg<sup>-1</sup>. Una unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de catecol por minuto a pH 6.0 y 25°C.
- Tirosinasa de champiñón: (T3824), actividad  $\geq 1.0$  U mg<sup>-1</sup>. Una unidad (U) produce un incremento en la absorbancia a 280 nm de 1.0 min a pH 6.5 y 25°C en un sistema de 3.0 mL de volumen de reacción con L-tirosina. Datos reportados por el proveedor.

Enzimas auxiliares:

- Peroxidasa de rábano: (77332), actividad  $\geq 120$  U mg<sup>-1</sup>. Una unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de ABTS por minuto a pH 6.0 y 25°C. Datos reportados por el proveedor.

- Catalasa de hígado bovino: (C9322), actividad 2.000-5.000 U mg<sup>-1</sup>, y un contenido en proteína  $\geq 60$  %. Una unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima que descompone 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a pH 7.0 y 25°C, cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye de 10.3 a 9.2 mM.

Todas las enzimas fueron adquiridas a Merck (Darmstad, Alemania).

### **3.1.2. Materiales de inmovilización**

En este apartado se describen los materiales que han servido como soportes para la inmovilización de enzimas. Los materiales, porosos y esféricos, fueron adquiridos de casas comerciales con gran experiencia en la fabricación de materiales, y principalmente usados en columnas de cromatografía o concretamente para inmovilizar enzimas. Éstos se pueden dividir por su naturaleza en orgánicos e inorgánicos. Dentro de los orgánicos tenemos los materiales basados en agarosa entrecruzada, de la casa comercial es Agarose Bead Technologies (Madrid, España). Estos materiales pueden variar en el grado de entrecruzamiento y el tamaño de partícula. En concreto, en esta tesis se ha utilizado únicamente el material de agarosa del 4% de entrecruzamiento, mientras que en cuanto al tamaño de partícula se ha empleado el estándar, 50-150  $\mu$ m de diámetro de partícula. El nombre completo del material es Agarose Bead Standard 4% BCL (beads crosslinked) que durante la tesis se abreviará como (Ag).

En cuanto a los materiales inorgánicos empleados se encuentran los basados en metacrilato activados con grupos epóxido, comercialmente denominados Lifetech<sup>TM</sup> provistos por la casa comercial Purolite (Minnesota, USA). Son materiales hidrófobos con una elevada estabilidad mecánica, con distintos tamaños de poro y partícula según su demanda. En este caso se utilizó un material con un tamaño de poro de 600-1200 Å y un tamaño de partícula de 150-300  $\mu$ m. El nombre completo del material es Lifetech<sup>TM</sup> ECR8209F. En la **Tabla 3.1** se resumen las principales las propiedades técnicas específicas de cada material, de acuerdo a los proveedores.

**Tabla 3.1.** Propiedades técnicas específicas de los materiales de inmovilización empleados, de acuerdo a los proveedores.

	Purolite ECR 8209F	Agarose 4BCL
<b>Forma</b>	Esférica	Esférica
<b>Tamaño de partícula (µm)</b>	150-300	50-150
<b>Tamaño de poro (Å)</b>	600-1200	Agarosa entrecruzada 4%
<b>pH estabilidad</b>	5-9	3-13
<b>Humedad (%)</b>	62-72	100
<b>Grupos funcionales primarios</b>	Epóxidos	Hidroxilos

### 3.1.3. Reactivos

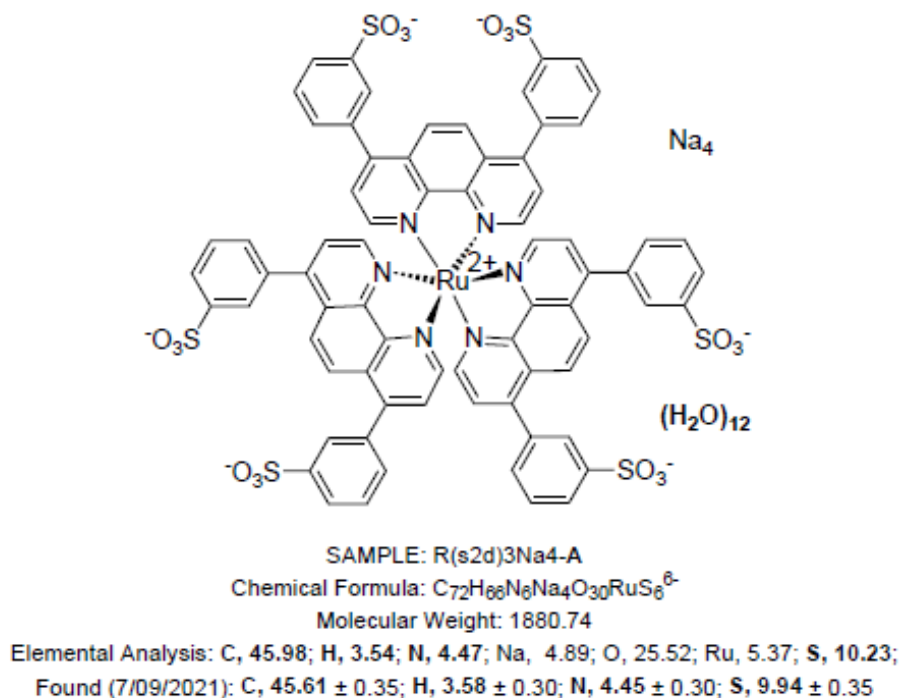
En una tesis doctoral en el campo de la ingeniería química se emplean una gran cantidad de reactivos químicos. Para resumirlos y describirlos de una forma sencilla de seguir por el lector se han dividido por proveedores y según su aplicación. En la Tabla 3.2 se muestran los reactivos empleados, organizados en sustratos y productos, activadores de la GalOx y compuestos para funcionalización de soportes de cada proveedor.

**Tabla 3.2.** Reactivos empleados en la Tesis, organizados por proveedor y principal aplicación.

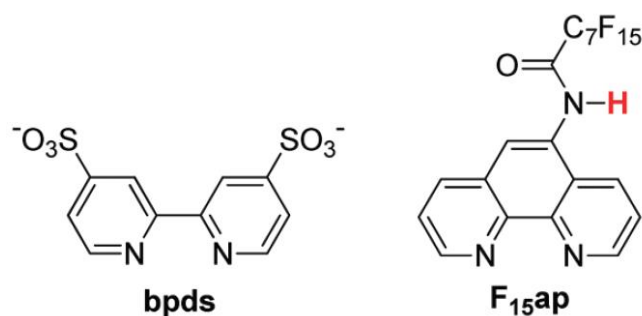
Proveedor	Sustratos y productos
Merck (Darmstadt, Alemania)	D-(+)-glucosa, D-(+)-galactosa, pirocatecol, L-tirosina, 5-hidroxi metilfurfural (HMF), ácido D-(+)-glucónico δ-lactona
Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	Peróxido de hidrógeno al 35% estabilizado

**Tabla 3.3.** Reactivos empleados en la Tesis, organizados por proveedor y principal aplicación (continuación).

Proveedor	Activadores GalOx
Merck (Darmstadt, Alemania)	Hexacianoferrato (III) de potasio trihidrato $[K_3Fe(CN)_6]$ , hemoglobina de sangre bovina (Hb), mioglobina de corazón equino, hemina bovina, hematina porcina, ferrocianuro de hierro (III), Cloruro de manganeso (III) 5,10,15,20-tetra(4-piridil)-21H,23H-porfina tetrakis(metocloruro), 5,10,15,20-Cloruro de tetraquis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina de hierro(III)
Proveedor	Funcionalización de soportes
Merck (Darmstadt, Alemania)	(±)-Epiclorhidrina, glicidol, borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ), polietilenimina (PEI, Mw~25.000), sal sódica de sulfato de dextrano (DS, Mr~40.000), divinil sulfona (DVS), etilendiamina (EDA), (meta)periodato de sodio, acetona
Proveedor	Otros compuestos
Panreac Química (Barcelona, España)	Reactivo Bradford, dihidrógeno fosfato de sodio, glicina de grado molecular
Labbox (Barcelona, España)	Cloruro de sodio, hidróxido de sodio
Merck (Darmstadt, Alemania)	Acetato de sodio trihidrato, tetraborato de sodio decahidrato, albúmina de suero bovino (BSA)
Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	Dicloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio (II) $[Ru(dpp)_3]$
Grupo de Investigación UCM en Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA)	$Na_4[Ru(pbbs)_3]$ abreviado como $Ru(pbbs)_3$ , cuya estructura y análisis elemental se muestra en la <b>Figura 3.1</b> . $Na_2[Ru(bpds)_2(F_{15ap})]$ abreviado como $Ru(bpds)_2$ cuya estructura parcial se muestra en la <b>Figura 3.2.Figura 3.1</b> . Estructura química y análisis elemental del complejo de Rutenio $[Ru(pbbs)_3]$ sintetizado por el grupo GSOLFA de la Universidad Complutense de Madrid.



**Figura 3.1.** Estructura química y análisis elemental del complejo de Rutenio [Ru(pbbs)<sub>3</sub>] sintetizado por el grupo GSOLFA de la Universidad Complutense de Madrid.



**Figura 3.2.** Estructura química de los ligandos quelantes bpdS y F<sub>15</sub>ap del Ru(bpdS)<sub>2</sub> [398]. El protón intercambiable está marcado en rojo.

#### 3.1.4. Datos

Los datos de los procesos de inmovilización mostrados en la **Tabla 7.1**, junto con sus distintos perfiles de proteína en forma de gráficas intensidad de fluorescencia (%) frente a distancia de infiltración ( $\mu\text{m}$ ) (Anexos, **Figura 11.59-11.65**) fueron suministrados por el laboratorio de “Biotransformación heterogénea” del CIC Biomagune cuyo líder es el Dr. Fernando López Gallego. Algunos de estos datos están en las siguientes publicaciones, pero muchos otros detalles no fueron publicados. Las referencias de las publicaciones

son: TtADH y His-GluDH [399], Fab, NOX y Transaminasa [400], IgG [401], mientras que para la EGFP todavía no han sido publicados.

### **3.2. EQUIPOS**

Esta sección enumera y describe todos los equipos utilizados a lo largo de la investigación, desde dispositivos experimentales hasta equipos de análisis o equipamientos auxiliares.

#### **3.2.1. Equipos de reacción**

**Medida actividad enzimática:** Para la medida de la actividad enzimática dónde se empleó el método de las velocidades iniciales de consumo de oxígeno, se utilizó un sistema como el que se muestra en la **Figura 3.3**. Éste consta de una placa calefactora con termopar y agitación, junto con viales de vidrio de 7 mL de volumen dónde se llevó a cabo la reacción. La agitación se realizó con barras magnéticas cilíndricas de 15x4 mm. Normalmente, se utilizó una placa metálica dónde se introducía el termopar (como se observa en la figura). Esta placa contenía nueve huecos para colocar los viales y así homogeneizar su temperatura.



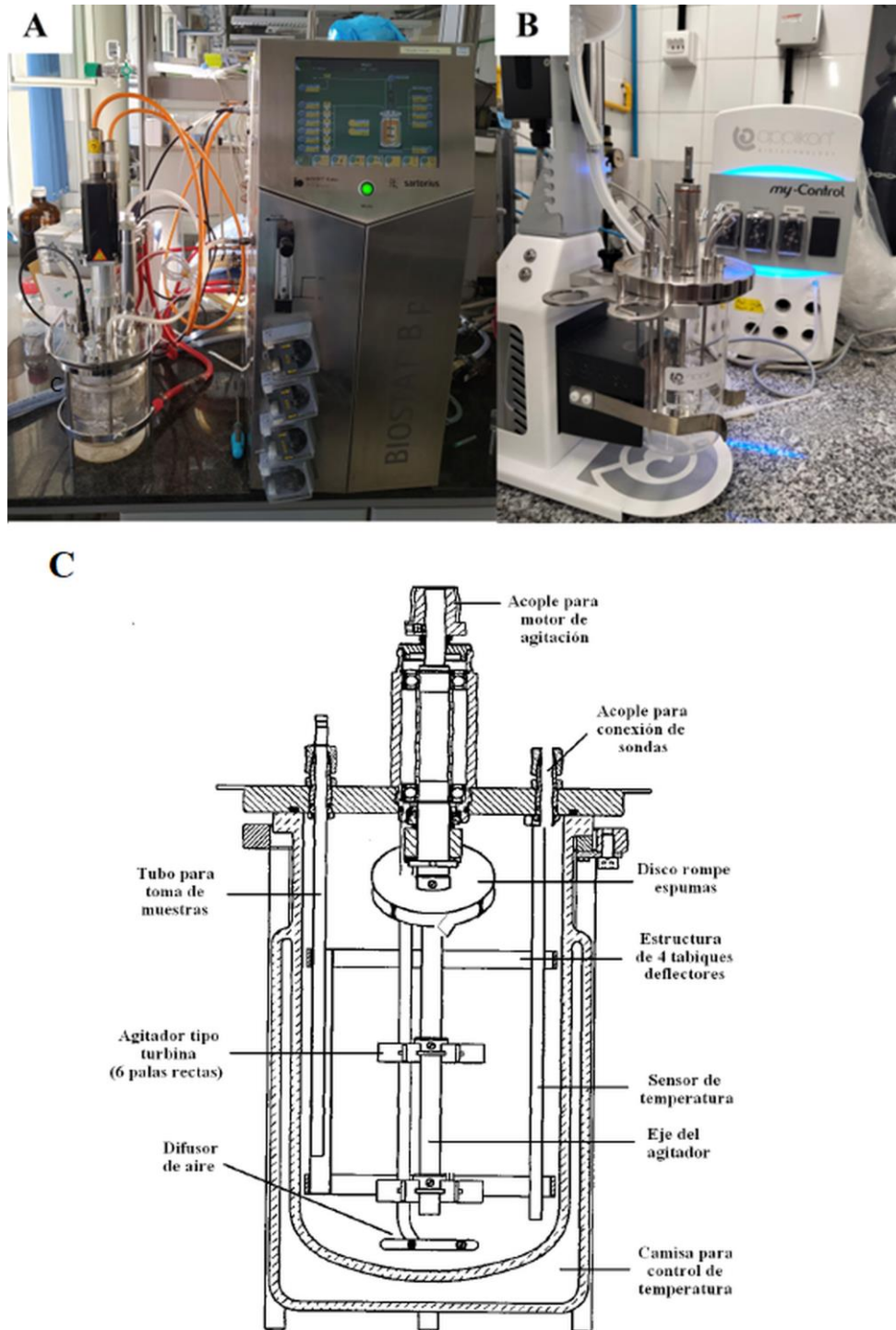
**Figura 3.3.** Sistema experimental de medición de actividad enzimática. Consta de una placa calefactora con termopar y agitación, junto con viales de vidrio de 7 mL de volumen total.

**Biorreactores:** Durante la tesis se emplearon reactores tipo tanque agitado discontinuos de dos tamaños distintos. En primer lugar, se empleó un equipo de Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus. Se compone de una o dos cubas de borosilicato con camisa de 1 o 2 L, unidas a una estación de control, tal y como se muestra en la **Figura 3.4A y 3.4C**.

En esta unidad se registran las señales emitidas por las sondas introducidas en la cuba y, a su vez, controla las variables de operación mediante el software MFCS/WIN3. El control de temperatura (en un rango máximo de 0-100 °C) se lleva a cabo mediante un sensor Pt-100 con un error de  $\pm 0.1$  °C. La temperatura se regula mediante la circulación de agua por un circuito cerrado gracias al equipo de refrigeración y recirculación de agua FRIGOMIX® 1000, de Sartorius. Mediante este sistema también se realiza la circulación de agua a través del condensador de la cuba de reacción. El O<sub>2</sub> se mide con una sonda Hamilton OXYFERM FDA 225, cuyo rango de medida es de 0-100 % en saturación de aire, cuyos valores se fijan en función de la calibración aplicada. El pH se mide con una sonda Hamilton EasyFerm Plus K8 200, cuyo rango de medida es de 2-12 unidades de pH, y el control se realiza mediante la introducción de disoluciones ácidas o básicas cuyo caudal es impulsado por bombas peristálticas. Para la agitación (0-2000 rpm  $\pm 10$  rpm) se emplea un motor de 180 W que actúa sobre una varilla de acero inoxidable con una turbina tipo Rushton de 6 palas planas, la velocidad es medida por un tacómetro. El aire es conducido hasta la cuba gracias a la acción de compresores. Posteriormente, el gas es filtrado (0.2  $\mu$ m diámetro de poro) e insuflado a través de un difusor toroidal. Se emplea un controlador de flujo másico que permite la mezcla de dos gases. En todos los casos, el tipo de acción de control que se aplica es PID (Proporcional, Integrativa, Derivativa).

El otro equipo que se empleó fue un biorreactor de la casa Applikon Biotechnology (Delft, Países Bajos), modelo my-Control MiniBio de 500 mL de capacidad, mostrado en la **Figura 3.4B**. Este biorreactor está equipado con distintos accesorios para controlar las condiciones de operación y llevar a cabo el proceso de manera deseada. El pH se mide con una sonda específica del controlador del biorreactor. A su vez dicho dispositivo cuenta con control PID de las variables empleadas (agitación y temperatura). El caudal de aire empleado en el proceso se extrajo de la línea de aire comprimido existente en el departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas, la presión de entrada al biorreactor se ajustó a 1 atm por

medio de un filtro manorreductor y el caudal se reguló con un rotámetro de precisión. Antes de entrar al biorreactor, el caudal de aire se esterilizó por filtración.



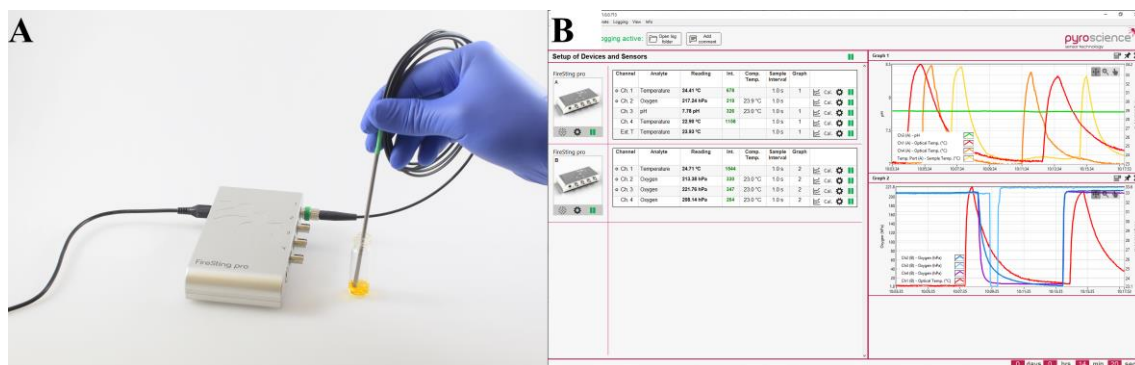
**Figura 3.4.** Representación de los biorreactores de Sartorius y Applikon empleados. *Panel A:* Imagen de la instalación de Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus: estación de control conectada a una cuba de 1 L. *Panel B:* Imagen de la instalación de

Applikon Biotechnology, modelo my-Control MiniBio de 500 mL de capacidad. *Panel C*: Esquema del biorreactor de Sartorius señalando sus componentes [402].

### **3.2.2. Equipos de análisis**

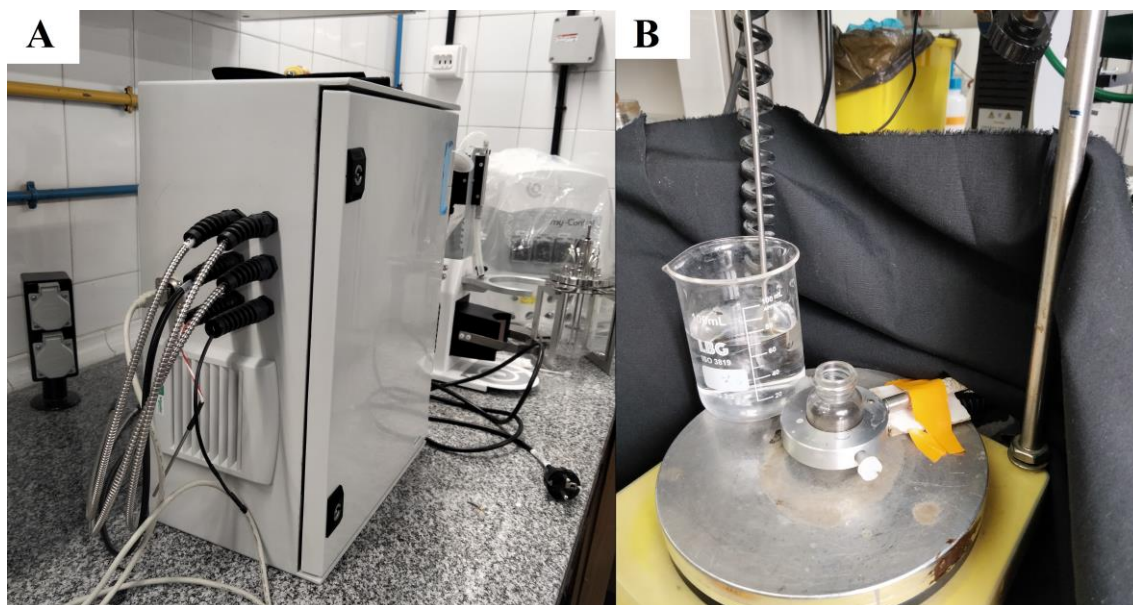
**Sensor de oxígeno:** Para la medida del consumo de oxígeno disuelto se empleó un sensor de fibra óptica de la casa Pyroscience OXROB10. La medida se basa en la cuantificación de la presión parcial de oxígeno, tanto en fase líquida como en fase gas. Posee un rango de medida de 0-44 mg L<sup>-1</sup> con una precisión de  $\pm 0.1$ . Esta precisión depende del calibrado realizado. El valor de concentración nula de O<sub>2</sub> viene calibrado de fábrica, y usualmente se suele calibrar solamente el 100% de saturación con aire. Permite adquirir valores cada 1 s, por lo que es apropiado para cinéticas relativamente rápidas. Posee una vida útil mayor de 3 años y está ópticamente aislado. El tiempo de respuesta es inferior a 15 segundos según el fabricante (alrededor de 7 s según nuestras medidas). El sensor está fabricado con acero inoxidable, y sus dimensiones son de 10 cm de largo y 3 mm de diámetro [403].

El sensor de O<sub>2</sub> está conectado a un hardware llamado FireSting®-PRO, con capacidad para 4 canales ópticos (para medir O<sub>2</sub> o pH) y otro sensor adicional de temperatura (Pt100). Dos de estos canales se personalizaron por Pyroscience para emitir luz azul visible para excitar los complejos de rutenio mediante LEDs de fibra óptica. El Pt100 permite la compensación automática de la temperatura con ruido y latencia cero de las mediciones del sensor óptico en muestras con temperaturas variables, incluso durante mediciones a alta velocidad. Este dispositivo incorpora una supresión mejorada de la luz ambiental, así como modos de medición inteligentes para prolongar la vida útil del sensor. El software empleado tanto para graficar los datos como para la posterior medida de consumo de oxígeno es de la propia casa comercial, siendo respectivamente PyroWorkbench y PyroDataInspector.



**Figura 3.5.** Sensor de oxígeno FireSting®-PRO de Pyroscience [403]. *Panel A:* Imagen del sensor de oxígeno de Pyroscience junto con el hardware multicanal FireSting®-PRO. *Panel B:* Vista del software PyroWorkbench encargado de la recogida y muestra de datos.

**Equipo de fibra óptica sensible a la fase (OPTOSEN®):** La medida de la concentración de oxígeno intrapartícula se realizó gracias a un dispositivo de fibra óptica sensible al desplazamiento de fase, desarrollado por el Grupo Interlab y el Grupo de Investigación en Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la UCM. El sistema electrónico consta de dos partes, la unidad optoelectrónica y el módulo de sensores. El módulo de sensores consta de 4 sensores LED de 470 nm como fuentes luminosas de excitación, moduladas digitalmente a 39, 78, o 156 kHz (en nuestro caso se usó la de 39 kHz). El módulo óptico contiene un filtro de paso de banda de color CS5-60 de 450 nm (100 nm FWHM) en el canal de excitación y uno de 570 nm en el canal de emisión. La luminiscencia de los cuatro terminales sensibles se controla con un fotomultiplicador compacto H11901-01. El equipo OPTOSEN® y el sistema experimental de medida se muestran en la **Figura 3.6**. Para más información sobre el equipo consultar [385].



**Figura 3.6.** Equipo de fibra óptica sensible a la fase (OPTOSEN®) con su sistema experimental. *Panel A:* Equipo de fibra óptica sensible a la fase (OPTOSEN®). *Panel B:* Sistema experimental de medida con el equipo OPTOSEN®.

**Equipo de cromatografía líquida de alta resolución:** La concentración de azúcares y ácidos de las muestras se determinaron mediante un cromatógrafo de líquidos Agilent, modelo Series 1100, controlado con el software Agilent ChemStation®. El equipo consta de: una cabina de disolvente, con botellas que contienen los distintos eluyentes; un degasificador de vacío para la eliminación de burbujas de la fase móvil; una bomba cuaternaria que impulse un determinado caudal del eluyente; un inyector automático capaz de tomar un volumen de muestra programado e introducirlo en una válvula de seis vías para su mezcla con la fase móvil; el horno de columna termostaticado para el control de la temperatura en la columna de separación de los componentes de la muestra; un detector de diodos con una lámpara de deuterio y una matriz de fotodiodos (DAD, *Diode Array Detector*), para la obtención de un espectro de absorción UV-Vis (Ultravioleta-Visible); y un detector de índice de refracción (RID, *Refractive Index Detector*) con una celda de muestra y otra de referencia. Para la separación de los compuestos se empleó una columna de protones de la casa comercial Benson polymeric (Reno, EE. UU.) BP-800 H<sup>+</sup> (8%,300x7.8 mm).

**Espectrofotómetro de absorción UV-Vis:** Para ciertas medidas colorimétricas se empleó un espectrofotómetro JASCO, modelo V-630. El sistema óptico constaba de un monocromador simple, con un intervalo de longitud de onda de 190-1100 nm y un ancho

de banda espectral de 1.5 nm. Como detector usaba un fotodiodo de silicio (S1337). Para las medidas en la región UV se emplea una lámpara de deuterio, de 190-350 nm, mientras para la región visible e infrarrojo próximo se utiliza una lámpara halógena de tungsteno, de 330-1100 nm.

**Medidor de pH:** Para medir el pH en disolución se empleó medidor de CRISON, modelo Basic 20. Este equipo es capaz de medir valores comprendidos entre 2 y 16 unidades de pH con un error de  $\pm 0.01$ . La calibración se realizó siempre con 3 puntos, a valores de pH 4.01, 7.00 y 9.21.

**Balanzas:** En función de la magnitud de la pesada se ha empleado una balanza de precisión de Sartorius, modelo modelo Practum 1102-1S (capacidad máxima de 1100 g y precisión de  $\pm 0.01$  g) o una balanza analítica de MS204S de Mettler Toledo (capacidad máxima 220 g y precisión de  $\pm 0.0001$  g).

### **3.2.3. Equipos auxiliares**

**Microcentrífuga:** Equipo de IKA®, modelo mini G, con capacidad para 8 microtubos de hasta 2 mL. Empleada para la separación de sobrenadante y suspensión de la enzima inmovilizada. Trabaja a una velocidad fija de 6000 rpm.

**Agitador rotativo (rueda):** Para la homogeneización de las preparaciones enzimáticas y otras disoluciones se utilizó un agitador rotativo de la marca Fisherbrand™ (Thermo Fisher), con un intervalo de velocidad de 5-80 rpm y capacidad para colocar tanto microtubos de hasta 2 mL, como tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 mL.

**Termobloque:** Para la incubación preparaciones enzimáticas a temperaturas superiores a la temperatura ambiente se empleó un termo-agitador de la marca Eppendorf, modelo ThermoMixer® C. Este equipo tiene la capacidad de enfriar las preparaciones 15°C por debajo de la temperatura ambiente y hasta 100°C, usando una agitación orbital de 300-3000 rpm.

**Sistema de purificación de agua:** Equipo de Younglin, aquaMAX™-Ultra 370, con una resistividad de 18 M $\Omega$ -cm, concentración de carbono orgánico total (Total Organic Carbon-TOC) de 5~10 ppb y un caudal máximo de 1.5 L min<sup>-1</sup>.

**Pipetas:** Se utilizaron 4 pipetas de distintos volúmenes, 2-20, 20-200, 100-1000 y 1000-5000  $\mu\text{L}$  de la casa comercial Labbox, modelo Easy 40 Elite.

### **3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **3.3.1. Medida de la actividad enzimática**

##### ***Sensor de oxígeno***

La actividad de las cuatro enzimas principales se midió analizando la velocidad inicial de consumo de oxígeno. La concentración de oxígeno en disolución se cuantificó con el sensor óptico FireSting®-PRO robusto de Pyroscience (OXROB10). La disminución de la concentración de oxígeno se registró durante 5-10 minutos. La reacción se produjo en un vial de 7 mL con agitación a 250 rpm mediante una barra magnética de 14x7 cm y temperatura constante a 30°C. El volumen final de reacción fue 5.0 mL, conteniendo 100 mM de glucosa, 250 mM de galactosa o 1.0 mM de L-tirosina en 100 mM de tampón fosfato sódico (NaPi) pH 7.0. En el caso de la lacasa, el ensayo se realizó con 5.0 mM de catecol en 100 mM de tampón acetato de sodio pH 5.0. Para la activación de la GalOx, se realizó un ensayo estándar utilizando 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , y las actividades ofrecidas se calcularon en base a este ensayo.

En el caso de la catalasa, su actividad se midió analizando la velocidad inicial de producción de oxígeno, ya que se produce 1/2 mol de oxígeno por cada mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido. El volumen final de reacción fue de 5 mL, conteniendo 2.4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 100 mM de tampón fosfato sódico (NaPi) pH 7.0 y una concentración de catalasa soluble de 0.01  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La reacción se realizó en las mismas condiciones que las anteriores, agitación magnética a 250 rpm y temperatura constante a 30°C.

La enzima comercial liofilizada se suspendió en tampón fosfato sódico 10 mM a pH 7.0. Para el biocatalizador inmovilizado, se empleó una relación de soporte/disolución de 1/10, suspendiendo el biocatalizador NaPi 10 mM a pH 7.0. La concentración de enzima, tanto libre como inmovilizada, varió en función de la actividad específica de cada preparación, pero normalmente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de enzima a la mezcla de reacción, dando lugar a concentraciones muy dispares de la enzima libre en cada caso, pero de 20  $\text{mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$  aproximadamente de enzima inmovilizada. Se determinó una unidad (U) de actividad enzimática como 1  $\mu\text{mol}$  de oxígeno consumido/producido por minuto en las condiciones mencionadas y una concentración inicial de oxígeno de 215  $\mu\text{M}$  (valor de saturación de la disolución con aire a 30°C y 100 mM de tampón). El vial no es hermético,

pero la aireación superficial debida al contacto entre la superficie del líquido y el aire se comprobó que era despreciable en comparación con las tasas de consumo de oxígeno.

### ***Ensayos colorimétricos***

Como método alternativo, pueden realizarse ensayos colorimétricos. En los casos de la GOX y GalOx, la actividad se puede medir analizando la velocidad de inicial de producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante un ensayo enzimático acoplado con ABTS. Además, la HRP también se puede medir con un ensayo colorimétrico siguiendo el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm. Los ensayos se realizaron en el espectrofotómetro Jasco FP-6300. Se empleó agitación magnética y temperatura constante a 30°C en todos los casos. El volumen final de reacción fue de 2 mL, conteniendo 250 mM del sustrato principal, 1 mM de ABTS y 50 µL de enzima, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.0. Se registró el aumento de la absorbancia a 420 nm durante 10 min. Una unidad (U) de actividad enzimática se determinó como 1 µmol de ABTS<sup>+</sup> producido por minuto, donde  $\epsilon(\text{ABTS}^+) = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ . En el caso de la lacasa, la actividad se midió siguiendo la velocidad de reacción inicial de formación de benzoquinona. El volumen final de reacción fue de 2 mL, conteniendo 1 mM de catecol en tampón acetato sódico 100 mM pH 5.0 y 50 µL de enzima. Se registró el aumento de la absorbancia a 410 nm durante 10 min. Se determinó una unidad (U) de actividad enzimática como 1 µmol de catecol consumido por minuto, donde  $\epsilon(\text{benzoquinona}) = 2.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ . En el caso de la tirosinasa, la actividad se midió siguiendo las velocidades de reacción iniciales de formación de dopaquinona. El volumen final de reacción fue de 2 mL, conteniendo 500 µL de L-tirosina 2 mM en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.0 y 50 µL de enzima. Se registró el aumento de la absorbancia a 475 nm durante 10 min. Se determinó una unidad (U) de actividad enzimática como 1 µmol de dopaquinona producida por minuto, donde  $\epsilon(\text{dopacromo}) = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $b = 1 \text{ cm}$ .

### **3.3.2. Activación de materiales soportados**

A continuación, se describen los métodos de activación de los materiales empleados en esta tesis (agarosa 4BCL y Purolite 8209F) mediante adsorción iónica reversible (PEI y DS) y enlace covalente irreversible (Gly y VS). La nomenclatura de cada material comienza por el nombre del soporte, seguido de los grupos funcionales con que ha sido activado.

#### ***Activación de soportes con polietilenimina (PEI)***

En primer lugar, el soporte de agarosa 4BCL (con grupos hidroxilo en su superficie) debe activarse con grupos epóxido. La activación del soporte de agarosa con grupos epóxido mediante epíclorhidrina se realizó tal como está previamente descrito [404]. Para ello, se lavaron 100 g de agarosa 4BCL con abundante agua destilada durante filtración. Posteriormente, se incubó la agarosa en una disolución de 160 mL de acetona en 440 mL de agua, conteniendo 2.0 g de borohidruro de sodio y 24 g de NaOH. Se añadieron 110 mL de epíclorhidrina lentamente a 4°C. Después, se incubó a temperatura ambiente durante 16 h sometida a agitación suave (evitando la agitación magnética porque puede dañar el soporte). Finalmente, se filtró el soporte y se lavó abundantemente con agua destilada.

Para la activación con PEI, se preparó partiendo de epóxido-Ag como se reportó previamente en [301]. Se pesó la cantidad necesaria de PEI y se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada en una relación 1/10, de tal forma que hubo 1 g de PEI por ml de epóxido-Ag. Una vez disuelta la PEI, se ajustó su pH a 10. Después, se incubó junto a los gramos correspondientes de epóxido-Ag y se mantuvo 16 h bajo agitación suave a 25 °C. Por último, el soporte se lavó con tampón acetato de sodio 100 mM pH 4, después con tampón borato de sodio 100 mM pH 9, posteriormente, con NaCl 1 M para eliminar la PEI unida no covalentemente al soporte y finalmente con exceso de H<sub>2</sub>O destilada.

Para la activación de la Purolite 8209F con PEI, como éste es un metacrilato activado con grupos epóxido, sólo habría que repetir el procedimiento descrito para la activación de epóxido-Ag con PEI.

### ***Activación de soportes con dextrán-sulfato (DS)***

Para la activación de soportes con DS, éstos hay que activarlos previamente con etilendiamina (EDA). La preparación tanto de agarosa como Purolite monoamino-N-aminoetil (MANAE) se preparó como se reportó previamente [405]. Se prepararon 2 M de EDA en 90 mL de agua destilada y se ajustó su pH a 10 lentamente a 4°C. Después se incubaron 10 g de epóxido-Ag o epóxido-Pur en la disolución durante 2 h bajo agitación suave a 25 °C. Finalmente, el soporte se lavó con tampones de 500 mL en el siguiente orden: acetato de sodio 100 mM pH 5, bicarbonato de sodio 100 mM pH 10, NaCl 1 M y finalmente con exceso de agua destilada.

Posteriormente, los soportes activados con grupos MANAE se activaron con DS mediante el protocolo descrito anteriormente [302]. 5 g de soporte activado con MANAE se añadieron a una disolución que contenía 400 mg·mL<sup>-1</sup> de dextrán-sulfato (DS) de 40

kDa por gramo de soporte (5 g de soporte y 4 g de DS) disueltos en 10 mL de 25 mM de fosfato de sodio pH 7. La mezcla se incubó durante 16 horas a 25°C bajo agitación suave. Después, el soporte se lavó con 1 L de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.0 bajo agitación suave durante 1 hora, para disminuir la viscosidad del DS. Finalmente, el soporte se lavó con abundante agua destilada para eliminar el exceso de DS.

#### ***Activación de soportes con grupos glioxil/aldehído***

Para matizar, los soportes de agarosa se activaron con grupos glioxil (mediante glicidol) mientras que los de Purolite lo hicieron con grupos aldehído (a partir de la apertura de los grupos epóxido), aunque ambos son de la misma naturaleza.

Los soportes de agarosa se activaron como se describió en [279]. 20 g de agarosa 4BCL lavada se suspendieron en 35 mL de agua destilada. Después, se añadió a esta suspensión 9.5 mL de disolución NaOH 1.7 M con 0.65 g de borohidruro de sodio. Una vez se homogeneizó el sistema, se añadieron 7 mL de glicidol lentamente con el sistema a 4°C. La disolución se mantuvo bajo agitación suave durante 16 h a 25°C. Después, se filtró y lavó el soporte con exceso de agua destilada. Se disolvieron 20 g del soporte en 300 mL de agua destilada y se añadió la cantidad apropiada de solución de oxidación (100  $\mu\text{mol NaIO}_4/\text{g}_{\text{agarose}}$  o 150  $\mu\text{mol NaIO}_4/\text{g}_{\text{purolite}}$ ) al soporte bajo agitación. Se mantuvo la agitación durante 2 h a 25°C.

Para la preparación de los soportes aldehído-Pur, se pesan 20 g de Purolite 8209F y se añaden a una disolución de 300 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Se mantiene la suspensión bajo agitación suave durante 2 h a 25°C para realizar la hidrólisis. Después, se filtra y lava el soporte con exceso de agua destilada. Finalmente, se disuelven 20 g del soporte en 300 mL de agua destilada y se añade la cantidad correspondiente de periodato de sodio. Se mantuvo la agitación durante 2 h a 25°C.

Para cuantificar los grupos aldehído introducidos, 200  $\mu\text{L}$  de una dilución apropiada de periodato de sodio (1.43  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para agarosa y 2.14  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para purolite) se mezcló con una disolución 1:1 de KI 10% y una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Se midió la absorbancia a 419 nm y se compararon los valores obtenidos antes y después de la oxidación frente a patrones de  $\text{NaIO}_4$  [275,279].

#### ***Activación de soportes con grupos vinil-sulfona (VS)***

Se siguió el protocolo descrito por [287]. Un volumen de 7.5 mL de DVS se añadió a 200 mL de bicarbonato de sodio 333 mM pH 11.5 y se mantuvo bajo agitación hasta que se obtuvo una disolución homogénea. Después, se añadieron 10 g del soporte (sin

activación previa tanto de la agarosa como la purolite), manteniendo una agitación suave durante 2 h. Finalmente, el soporte se lavó y filtró con abundante agua destilada.

### **3.3.3. Inmovilización enzimática en los materiales activados**

En todos los casos, una disolución enzimática con cierta concentración, a pH y condiciones indicadas se incubó con una determinada cantidad de soporte. Se tomaron muestras de sobrenadantes y suspensión total a diferentes tiempos, además del blanco (suspensión de enzima libre incubada en las mismas condiciones) y se determinó su actividad, para evaluar el proceso de inmovilización.

#### ***Inmovilización sobre soportes por adsorción física por intercambio iónico (PEI y DS)***

Como procedimiento general se incubaron 100 mg de soporte con 1 mL de solución enzimática preparada en tampón de inmovilización (fosfato de sodio 10 mM pH 7.0) a 25°C durante 2 h bajo agitación rotatoria suave de 25 rpm. Después, los derivados inmovilizados se lavaron mediante centrifugación o filtración con un exceso de agua destilada y almacenados a 4°C.

#### ***Inmovilización irreversible por enlace covalente (Gly y DVS)***

Para la inmovilización en soportes activados con grupos glioxil, el derivado se preparó incubando 100 mg de soporte en una suspensión enzimática de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10.05 a 25 °C bajo agitación suave, durante 1-2 h, según el tiempo de inmovilización. Finalmente, los derivados se redujeron con borohidruro de sodio a 1 mg·mL<sup>-1</sup> en una suspensión 1:10 soporte/volumen total (en algunos casos fue necesario añadir bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10.05 inmediatamente antes de reducir para cumplir esta relación) durante 30 min a 25 °C [275]. Finalmente, el derivado se centrifugó o filtró y se lavó con agua destilada y fosfato de sodio 10 mM a pH 7.0.

Para la inmovilización en soportes activados con grupos divinil sulfona, el derivado se preparó incubando 100 mg de soporte en una suspensión enzimática de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10.0 a 25°C bajo agitación suave, durante 1-2 h, según el tiempo de inmovilización. En algunos casos la agitación se mantuvo durante 24-72 h para evaluar el efecto del tiempo de incubación. Como punto final de reacción, el derivado inmovilizado se incubó durante 16-24 h a 25°C en 1 M de glicina (nucleófilo débil) disuelta en 100 mM de bicarbonato de sodio pH 10.0. Finalmente, los derivados se lavaron con exceso de agua destilada por centrifugación o filtración y se almacenaron a 4°C.

### 3.3.4. Caracterización de las enzimas inmovilizadas

Para caracterizar un biocatalizador inmovilizado, hay que definir una serie de parámetros para cuantificar el rendimiento y la eficacia de la inmovilización. Los parámetros más empleados son el rendimiento de inmovilización, el factor de eficacia y la actividad recuperada [406,407]. El rendimiento de inmovilización es la cantidad de enzima que se adhiere al soporte en comparación con el total de enzima que se ofrece al soporte, tal y como se muestra en la Ecuación 3.1.

$$\text{Rdto de inmovilización (\%)} = \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{\text{Actividad ofrecida}} \cdot 100 \quad (\text{Ec 3.1})$$

La **actividad ofrecida** es la actividad enzimática en la fase líquida de la inmovilización medida en condiciones estándar y expresada por unidad de masa de soporte ( $g_{\text{soporte}}$ ). La **actividad inmovilizada** se calcula como la diferencia entre la actividad ofrecida y la suma de la actividad de los sobrenadantes en el proceso de inmovilización. Es la actividad retenida al final del proceso de inmovilización.

La **actividad recuperada** del biocatalizador es la relación entre la actividad observada y la actividad ofrecida (Ecuación 3.2). Otorga una visión global de la eficiencia de la inmovilización. La **actividad observada** es la velocidad inicial de consumo de oxígeno por unidad de masa en las condiciones estándar definidas para cada enzima (ver apartado 3.3.1).

$$\text{Actividad recuperada(\%)} = \frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad ofrecida}} \cdot 100 \quad (\text{Ec 3.2})$$

El factor de eficacia del biocatalizador es la relación entre la actividad observada y la actividad inmovilizada (Ecuación 3.3). Indica la cantidad de enzima que es activa en relación a la cantidad de enzima que se ha inmovilizado.

$$\text{Factor de eficacia (\%)} = \frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad inmovilizada}} \cdot 100 \quad (\text{Ec 3.3})$$

### 3.3.5. Marco teórico del análisis cinético

El análisis de la cinética enzimática implica el estudio de las variables que afectan a la velocidad de una reacción química. Para lograr esto, se investiga y se desarrolla un modelo cinético que describe cómo las enzimas interactúan con sus sustratos para catalizar la conversión en productos. Este proceso implica determinar las constantes cinéticas que caracterizan la eficiencia de la enzima, como la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ )

y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). Estos parámetros proporcionan información sobre la afinidad de la enzima por su sustrato y la eficacia con la que lo convierte en producto.

Para una reacción de dos sustratos, como la catalizada por una oxidasa, con estequiometría 1:1 (Ecuación 3.4), la ecuación derivada simplificada que mejor describe la velocidad de reacción es el modelo ping-pong bi-bi [172,408], Ecuación 3.5.



$$R = -\frac{dS}{dt} = -\frac{dO_2}{dt} = \frac{Act_{max} \cdot [E_0] \cdot [S] \cdot [O_2]}{[S] \cdot [O_2] + K_S \cdot [O_2] + K_{O_2} \cdot [S]} \quad (\text{Ec } 3.5)$$

Dónde  $R$  es la velocidad de reacción en  $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $Act_{max}$  es la actividad de la enzima a concentraciones saturantes de ambos sustratos, la actividad máxima alcanzable en  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ; la  $[E_0]$  es la concentración de enzima inicial en  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $[S]$  y  $[O_2]$  son las concentraciones de sustrato principal y oxígeno, respectivamente, en mM; y  $K_S$  y  $K_{O_2}$  son las constantes de afinidad de sustrato principal y oxígeno, respectivamente, en mM.

La razón entre la actividad de la enzima y la actividad máxima alcanzable ( $Act_{max}$ ) da una idea del potencial catalítico de la enzima, Ecuación 3.6.

$$\gamma = \frac{Act}{Act_{max}} = \frac{[S] \cdot [O_2]}{[S] \cdot [O_2] + K_S \cdot [O_2] + K_{O_2} \cdot [S]} \quad (\text{Ec } 3.6)$$

Cuando la concentración de oxígeno es constante, la Ec 3.6 se simplifica a una cinética hiperbólica aparente dependiente de  $[S]$ :

$$R = \frac{Act_{max_{app} S} \cdot [S]}{K_{S_{app}} + [S]} \quad (\text{Ec } 3.7)$$

$K_{S_{app}}$  es la constante aparente del sustrato principal, definida como:

$$K_{S_{app}} = \frac{K_S \cdot [O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \quad (\text{Ec } 3.8)$$

$Act_{max_{app} S}$  es la actividad máxima observable a una concentración fija de oxígeno:

$$Act_{max_{app} S} = \frac{Act_{max} \cdot [O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \quad (\text{Ec } 3.9)$$

Cuando la concentración de sustrato principal es constante, la Ec 3.6 se simplifica a una cinética hiperbólica aparente dependiente de  $[O_2]$ :

$$R = \frac{Act_{\max_{app} O_2} \cdot [O_2]}{K_{O_2 app} + [O_2]} \quad (\text{Ec } 3.10)$$

$K_{O_2 app}$  es la constante aparente del oxígeno, definida como:

$$K_{O_2 app} = \frac{K_{O_2} \cdot [S]}{K_S + [S]} \quad (\text{Ec } 3.11)$$

$Act_{\max_{app} O_2}$  es la actividad máxima observable a una concentración fija de S:

$$Act_{\max_{app} O_2} = \frac{Act_{\max} \cdot [S]}{K_S + [S]} \quad (\text{Ec } 3.12)$$

### **3.3.6. Estudio de la estabilidad en los biocatalizadores de GalOx**

El estudio de la estabilidad de los biocatalizadores de GalOx se realizó incubándolos en condiciones no reactivas. En primera estancia se evaluó la estabilidad a distintas temperaturas, y, posteriormente, en presencia de disolventes orgánicos. Sin embargo, el análisis de las muestras se realizó en las mismas condiciones en todos los casos:

Volumen final de reacción de 5 mL, con 250 mM de galactosa en 100 mM de tampón fosfato sódico a pH 7.0 y 30°C. Se empleó una agitación magnética a 250 rpm. La concentración del soporte de enzima inmovilizada varió en función de la actividad específica de cada preparación, pero normalmente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de enzima inmovilizada a la mezcla de reacción, lo que dio lugar a una concentración final de biocatalizador de 20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Para la activación del biocatalizador, se empleó 0.1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

La estabilidad se cuantificó mediante el parámetro  $t_{1/2}$  (tiempo de vida medio) el cual se refiere al tiempo que tarda el derivado en disminuir su actividad un 50%. El otro parámetro empleado fue la actividad retenida (%) del derivado a cierto tiempo de medida.

#### ***A distintas temperaturas***

Para el estudio de estabilidad a temperatura ambiente, el biocatalizador se incubó en tampón fosfato sódico 10 mM. Posteriormente, se colocó en un agitador rotatorio con agitación suave constante a 20 rpm y a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a

varios intervalos de tiempo y su actividad se midió inmediatamente mediante un ensayo estándar de consumo de oxígeno.

Para el estudio de estabilidad en condiciones de inactivación térmica, el biocatalizador se incubó en todos los casos en tampón fosfato sódico 10 mM. Después, se colocó en un termobloque (ThermoMixer C de Eppendorf; Hamburgo, Alemania) a 40 °C y con agitación orbital constante a 500 rpm. Se tomaron muestras a cada tiempo deseado y su actividad se midió inmediatamente mediante un ensayo estándar de consumo de oxígeno.

#### ***En presencia de disolventes orgánicos***

Para el estudio de estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, el biocatalizador se incubó en disoluciones al 50% (v/v) de etanol o acetona y tampón fosfato sódico 10 mM. Posteriormente, se colocó en un agitador rotatorio con agitación suave constante a 20 rpm y a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a varios intervalos de tiempo y su actividad se midió inmediatamente mediante un ensayo estándar de consumo de oxígeno.

#### **3.3.7. Medida del oxígeno intrapartícula**

El principio de la medición consiste en el registro de los datos del tiempo de vida de luminiscencia del indicador inmovilizado mediante la técnica de modulación de fase [202,386,409]. Los luminóforos pertenecen al grupo de compuestos de coordinación de rutenio (II) con ligandos quelantes poliazaheroaromáticos. Sus ventajas para producir terminales sensibles para mediciones de luminiscencia por fibra óptica incluyen una fuerte absorción en la región azul del espectro electromagnético, emisión roja intensa, largos tiempos de vida de emisión (0.2 a 7 microsegundos), considerable fotoestabilidad (en comparación con las moléculas indicadoras fluorescentes puramente orgánicas) y, sobre todo, la posibilidad de sintonizar finamente sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas a través de la molécula indicadora.

El luminóforo se excitó a 470 nm, y la emisión de luz se registró a longitudes de onda superiores a 570 nm. Tras la excitación en el dominio de la frecuencia utilizando luz modulada sinusoidalmente en intensidad, la señal de luminiscencia registrada se convirtió en un desplazamiento de fase. Las mediciones se realizaron utilizando una frecuencia de modulación ( $f_{\text{mod}}$ ) de 39 kHz. El desplazamiento de fase ( $\varphi$ ) puede correlacionarse con el tiempo de vida de la luminiscencia ( $\tau$ ) mediante la Ecuación 3.13.

$$\tau = \frac{\tan \varphi}{2 \cdot \pi \cdot f_{\text{mod}}} \quad (\text{Ec } 3.13)$$

Dado que el O<sub>2</sub> atenúa dinámicamente la luminiscencia del colorante indicador, el tiempo de vida de la luminiscencia está relacionado con la concentración de O<sub>2</sub>. Se aplicó el modelo de Stern-Volmer para describir la dependencia del tiempo de vida con la concentración de O<sub>2</sub>, como se muestra en la Ecuación 3.14, donde  $\varphi_0$  y  $\tau_0$  son los desplazamientos de fase y el tiempo de vida para una solución completamente desprovista de O<sub>2</sub> por reacción de la GalOx. K<sub>sv</sub> es una constante de proporcionalidad.

$$\frac{\tan \varphi_0}{\tan \varphi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{sv} \cdot [O_2] \quad (\text{Ec } 3.14)$$

La monitorización del desplazamiento de fase se llevó a con el equipo (OPTOSEN®) desarrollado por el Grupo Interlab y el Grupo de Investigación en Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la UCM. Para los experimentos se utilizó un vial de vidrio de 7 mL con un volumen de trabajo de 6 mL. Se aplicó agitación magnética con una barra de 15x4 mm a 250 rpm. El vial se colocó en una placa calefactora a 30°C y la fibra óptica se fijó en la superficie del vial de precipitados con la ayuda de un componente de aluminio personalizado (**Figura 3.6B**). El sistema se cubrió con un paño negro para eliminar las interferencias causadas por la luz ambiental. Para la reacción enzimática, se suspendieron 4-7 mg·mL<sup>-1</sup> de biocatalizador coimmobilizado con rutenio en tampón (NaPi 100 mM, pH 7.0) saturado de aire. La carga de partículas se ajustó según fuera necesario para obtener una relación señal-ruido útil. Se añadió una concentración de glucosa de 100 mM a la solución con el biocatalizador inmovilizado, para posteriormente desoxigenar el medio con glucosa oxidasa. Una vez que la señal medida se mantuvo estable, se añadió un volumen de 500 µL de galactosa (250 mM en solución) al medio para iniciar la reacción. El cambio de desplazamiento de fase, y por tanto la concentración de O<sub>2</sub> intrapartícula, se monitorizó a lo largo del tiempo. Tras 5 min de reacción, se desoxigenó el medio añadiendo GOX en exceso. De esta forma, se llevó a cabo la calibración del medio libre de oxígeno “in situ”.

En primera instancia estos experimentos se diseñaron para realizarlos con el FireSting®-PRO y un canal de fibra óptica concretamente diseñado para absorber la luz azul de excitación del complejo luminiscente. Sin embargo, se necesitaban grandes cargas de catalizador en la reacción para obtener una relación señal/ruido suficiente, por lo que

se exploraron otros medios más precisos de análisis. Finalmente se optó por el uso del equipo OPTOSEN® para estas medidas por su excelente relación señal/ruido, a pesar de su limitación para recoger datos cada 10 s, diez veces menos que con el FireSting®-PRO.

Se realizó una prueba de la medida del consumo de oxígeno con la enzima libre tanto con el sensor robusto como con el indicador de fase soluble para validar la técnica. Se comprobó que ambas señales se solapan con un error inferior al 5%.

En estos experimentos se emplearon activadores alternativos al  $K_3Fe(CN)_6$  debido a la interacción con los complejos de rutenio, que imposibilitaba la precisión en las medidas. La actividad ofrecida al soporte se calculó con el ensayo estándar con  $K_3Fe(CN)_6$  como activador, pero la HRP o la hemoglobina se utilizaron como activadores solubles en cada caso debido a su compatibilidad para medir el oxígeno intrapartícula. También se comprobó que la inmovilización de los complejos indicadores de oxígeno en la concentración empleada ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{supp}}^{-1}$ ) afectó menos del 5% a la actividad enzimática. El gradiente de oxígeno observado en la partícula se calculó como la diferencia máxima entre la concentración de oxígeno en el líquido y la partícula.

### **3.3.8. Medida de transferencia de oxígeno en biorreactor**

Para la medida de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR en sus siglas en inglés) se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de materia ( $k_La$ ) mediante el método dinámico de desorción con nitrógeno. En ciertas condiciones de agitación, se satura de aire el medio y, posteriormente se introduce nitrógeno a un caudal determinado para retirar el oxígeno de la fase líquida, tomando datos de la concentración de oxígeno cada pocos segundos durante unos minutos. El proceso se lleva a cabo a distintas velocidades de agitación y de caudales de nitrógeno.

La determinación experimental del producto  $k_La$  se basa en la ausencia del consumo de oxígeno por la enzima/microorganismo, por lo que en el balance de  $O_2$  sólo se considera el término de transporte, Ecuación 3.15.

$$\frac{d[O_2]}{dt} = OTR = k_La \left( [O_2]^* - [O_2] \right) \quad (\text{Ec } 3.15)$$

A su vez, el  $k_La$  depende de forma exponencial de la velocidad superficial de nitrógeno ( $V_s$ ), la velocidad de agitación ( $N$ ) y la viscosidad del fluido ( $\mu_L$ ) [221,224]. Finalmente, se obtienen los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$  y  $C$  de la Ecuación 3.16 para obtener el  $k_La$  a distintas condiciones de trabajo.

$$k_L a = C \cdot V_s^\alpha \cdot N^\beta \cdot \mu_L^\lambda \quad (\text{Ec } 3.16)$$

### 3.3.9. Reacciones de oxidación en biorreactor aireado

Estas reacciones de oxidación se realizaron con GOX con glucosa como sustrato y con GalOx con galactosa como sustrato.

#### *Reacciones con GOX*

En un reactor de 1 L (Biostat B Plus) de Sartorius AG (Göttingen, Alemania), mostrado en la **Figura 3.4A**, se realizaron estudios completos del curso temporal de la conversión de glucosa. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 500 mL de volumen total, 100 mM de tampón NaPi a pH 7.0, 100 mM de glucosa, 80 mg·L<sup>-1</sup> de catalasa, 1,5 mg·L<sup>-1</sup> de GOX, 25 °C, 150 rpm de agitación y 50% o 25% de saturación de aire. A intervalos regulares de tiempo se extrajeron muestras de 500 µL para su análisis, donde se detuvo la reacción vertiendo la muestra en un vial con 500 µL de disolución HCl 3.7%. Posteriormente, las muestras se analizaron por HPLC con un Jasco Plus equipado con columna de carbohidratos polimérica Benson (BP-800 H<sup>+</sup>) a 60°C. Como fase móvil se empleó una mezcla de disolventes de H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M con un caudal de 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. Para el análisis de ácido glucónico, se siguió la absorbancia a 218 nm en 15 min con un detector Jasco Plus MD-2015 de múltiples longitudes de onda. Se obtuvo una curva patrón lineal para el ácido glucónico, con un coeficiente de regresión de 0.9994.

#### *Reacciones con GalOx*

En el caso de la GalOx, las reacciones se realizaron en ambos reactores de 1 y 0.5 L de volumen. En el biorreactor de 1 L, las condiciones de reacción fueron las siguientes: 500 mL de volumen total de tampón NaPi 50 mM a pH 7.0, 20 mM de galactosa, 200 mg·L<sup>-1</sup> de catalasa, 50 mg·L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 500 mg·L<sup>-1</sup> de GalOx, 25 °C, 150 rpm de agitación y 50% o 20% de saturación de aire. A intervalos regulares de tiempo se extrajeron muestras de 500 µL para su análisis, donde se detuvo la reacción vertiendo la muestra en un vial con 500 µL de disolución HCl 3.7%. Posteriormente, las muestras se analizaron por HPLC con un Jasco Plus equipado con columna de carbohidratos polimérica Benson (BP-800 H<sup>+</sup>) a 60°C. Como fase móvil se empleó una mezcla de disolventes de H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M con un caudal de 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. Para el análisis de galactosa, se siguió el índice de refracción en 15 min con un detector Jasco Plus RI-2031,

obteniéndose una curva patrón lineal para la galactosa, con un coeficiente de regresión de 0.9954.

En el biorreactor de 0.5 L de volumen, dónde se empleó la enzima inmovilizada en dextrán sulfato-Ag con una carga enzimática de  $32 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  como biocatalizador y la hemoglobina se coinmovilizó como activador, con una carga de  $8 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{supp}}^{-1}$ , las condiciones de reacción fueron las siguientes: volumen de reacción de 165 mL, control de temperatura a  $30^\circ\text{C}$  y 100 mM NaPi pH 7.0. Galactosa inicial de 25 mM, carga de GalOx de  $25.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , concentración de biocatalizador de  $24.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , catalasa libre de  $0.61 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , agitación de 200 rpm y caudal de aire de  $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ . A intervalos regulares de tiempo, se extrajeron muestras de 400  $\mu\text{L}$  para su análisis, donde se detuvo la reacción vertiendo la muestra en un vial con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de HCl al 9 %. Posteriormente, las muestras se analizaron con un HPLC Jasco Plus equipado con una columna de carbohidratos polimérica Benson (BP-800 H<sup>+</sup>) a  $60^\circ\text{C}$ . Como fase móvil se empleó una mezcla de disolventes de H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M con un caudal de  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para el análisis de galactosa se siguió el índice de refracción en 20 min con un detector RI-2031 Jasco Plus a  $55^\circ\text{C}$ . Se obtuvo una curva patrón lineal para la galactosa, con un coeficiente de regresión de 0.9993.

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

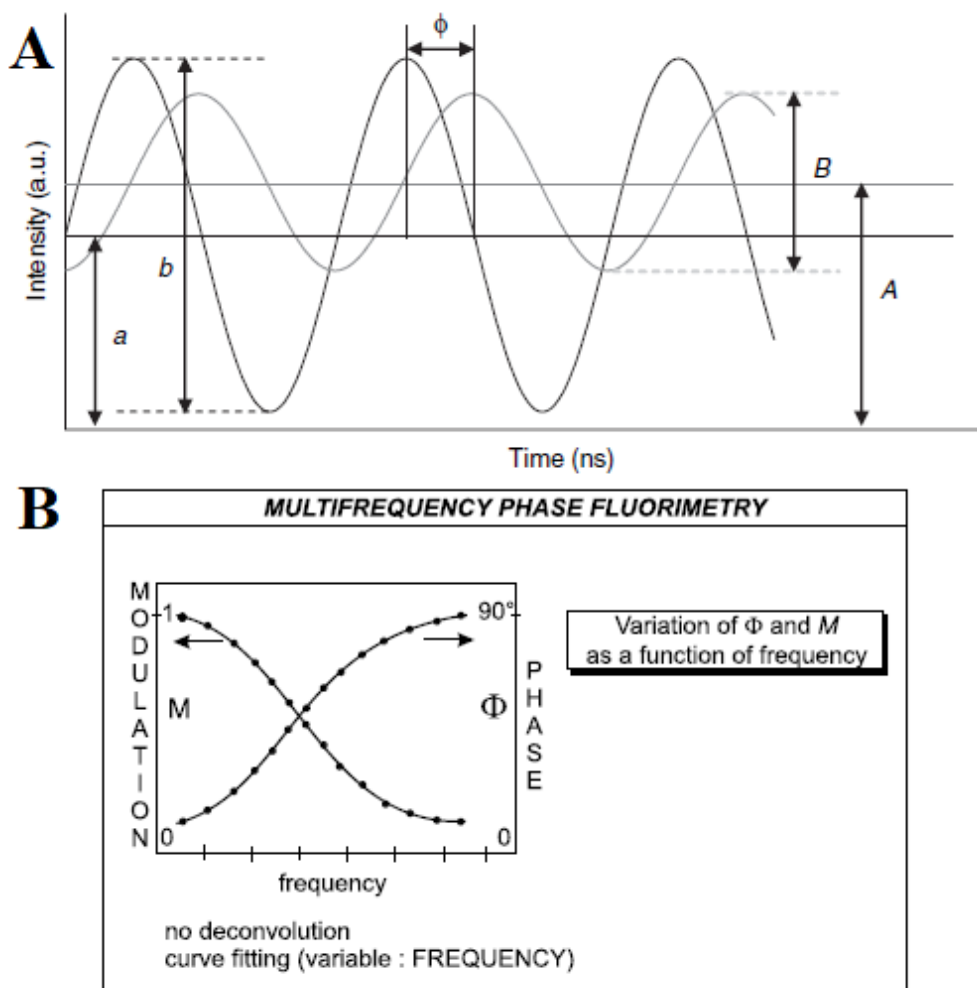
En este apartado se describe y explica el fundamento de los métodos de análisis empleados.

#### **3.4.1. Medida de la concentración de oxígeno con sensor óptico**

El fundamento de la medida del oxígeno disuelto tanto en el líquido como en la partícula se basa en la técnica de modulación de fase [386,409,410]. Es un método para medir el tiempo de decaimiento mediante la excitación de la muestra usando una fuente continua de excitación cuya intensidad se modula a una frecuencia muy alta. La emisión de fluorescencia resultante también se modula a la misma frecuencia. Sin embargo, debido al tiempo de vida finito de la fluorescencia, la emisión se retrasa en el tiempo con respecto a la excitación. Este retraso se mide como un desplazamiento de fase ( $\varphi$ ), que puede utilizarse para calcular el tiempo de decaimiento, denominado vida de fase ( $\tau_\varphi$ ), dado por la ecuación:

$$\tau_\varphi = f_{\text{mod}}^{-1} \tan \varphi \quad (\text{Ec } 3.17)$$

Además, el tiempo de vida conduce a una menor profundidad de modulación de la emisión en relación con la de la luz de excitación, como se muestra en la **Figura 3.7**.



**Figura 3.7.** Principio de la medición del tiempo de vida en el dominio de la frecuencia. *Panel A:* El tiempo de vida de la fluorescencia se calcula a partir del desplazamiento de fase y la demodulación de la luz emitida (curva gris) con respecto a la luz de excitación modulada sinusoidalmente (curva negra). *Panel B:* Fundamento de la fluorimetría de modulación de fase en el dominio de la frecuencia. Ambas ilustraciones obtenidas de [410].

El grado en que esto ocurre depende del tiempo de decaimiento del fluoróforo y de la frecuencia de modulación. El factor de demodulación,  $m$ , viene dado por:

$$m = \frac{B/A}{b/a} \quad (\text{Ec } 3.18)$$

donde  $b/a$  es la modulación de la luz de excitación y  $B/A$ , para la luz emitida. El tiempo de vida calculado a partir de la demodulación se denomina tiempo de vida de modulación ( $\tau_m$ ) y viene dada por:

$$\tau_m = \frac{1}{f_{\text{mod}}} \left[ \frac{1}{m^2} - 1 \right]^{1/2} \quad (\text{Ec 3.19})$$

En los decaimientos monoexponenciales, los tiempos de vida de la fase y de la modulación se corresponden. Una diferencia en los tiempos de vida de fase y modulación es indicativa de un decaimiento de fluorescencia multiexponencial o de interacciones de estado excitado del fluoróforo.

### **3.4.2. Métodos colorimétricos**

Dentro de los métodos colorimétricos se ha empleado principalmente el método Bradford [411] para la cuantificación de la cantidad de proteína en nuestra enzima comercial. Su fundamento se basa en la unión no covalente del azul de Coomassie G-250 a las proteínas a través de residuos de arginina y lisina en condiciones ácidas proporcionadas por el ácido fosfórico. Esto produce un cambio de color hacia el azul que se mide a una absorbancia de 595 nm. La variabilidad de estos residuos en cada proteína es su principal desventaja.

En primer lugar, se realiza una recta patrón con Albúmina de suero bovino (BSA en sus siglas en inglés) que será nuestra proteína de referencia y posteriormente se mide nuestra muestra enzimática mezclada con el reactivo Bradford, obteniéndose un valor, que, interpolado en la recta patrón, nos ofrece la cantidad de proteína en la muestra.

### **3.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución**

La HPLC (en sus siglas en inglés) es una técnica muy útil y ampliamente utilizada para la separación y cuantificación de distintos componentes conocidos en una muestra. En la HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (en nuestro caso una columna de protones) mediante el bombeo de líquido (fase móvil, en nuestro caso agua ácida) a alta presión a través de la columna.

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Concretamente, en este caso se empleó una cromatografía de intercambio

aniónico puesto que la columna estaba formada de una resina de copolímeros de poliestireno-divinilbenceno sulfonados (catión fuerte).

Una vez los compuestos son separados mediante la columna de intercambio iónico, pasan por los módulos de detección. Tanto la glucosa como la galactosa fueron cuantificadas mediante el detector de índice de refracción (RID: *Refraction Index Detector*). Este dispositivo mide la desviación de la luz comparada con una celda de referencia a partir de la cual se crea la señal medida en el cromatograma.

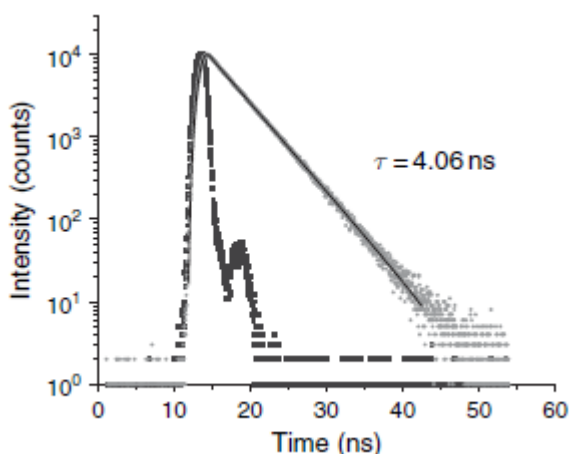
Sin embargo, debido al solapamiento ocurrido en los cromatogramas de RID por parte de la glucosa y el ácido glucónico, éste último se decidió medir con el detector de matriz de diodos (DAD: *Diode Array Detector*) a una longitud de onda específica de 219 nm. Los detectores de matriz de diodos utilizan una rejilla para dispersar la luz en una matriz de fotodiodos una vez que la luz ha atravesado la celda de flujo. Como resultado, todas las longitudes de onda se absorben simultáneamente, lo que proporciona al analito un espectro de absorción completo y a tiempo real.

#### **3.4.4. Caracterización de indicadores luminiscentes mediante TCSPC**

Para la elección del luminóforo más adecuado en el análisis de la concentración de oxígeno intrapartícula, se empleó la técnica TCSPC (recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo). Mediante esta técnica se pueden caracterizar distintos indicadores luminiscentes mediante su tiempo de decaimiento (tiempo de excitación del compuesto) a las condiciones experimentales deseadas (cierta saturación en aire, distinta concentración del indicador, etc.). En nuestro caso lo que buscamos es un indicador con un tiempo de decaimiento lo más elevado posible en el rango de 0-21% de [O<sub>2</sub>], para así tener un sensor muy sensible y con una relación señal/ruido muy elevada.

En el método del dominio del tiempo, la muestra se excita utilizando un pulso de excitación corto, y la intensidad de emisión dependiente del tiempo se mide tras el pulso de excitación. La población del estado excitado decae exponencialmente. En el caso más sencillo, el decaimiento es monoexponencial y el tiempo de vida se deduce de la pendiente del gráfico del logaritmo de la intensidad frente al tiempo. Sin embargo, la mayoría de los fluoróforos presentan decaimientos multicomponentes, y los tiempos de decaimiento y los factores preexponenciales asociados se determinan ajustando los decaimientos multiexponenciales a los datos. En general, el tiempo de vida medio de un fluoróforo puede calcularse promediando el tiempo de estado excitado sobre el decaimiento de intensidad del fluoróforo [386,409].

La mayoría de los fluorímetros de dominio temporal se basan en el método de TCSPC [412]. Este método se basa en el hecho de que la probabilidad de detectar un fotón en el tiempo  $t$  después del pulso de excitación es proporcional a la intensidad de fluorescencia en ese momento. La curva de intensidad de fluorescencia se reconstruye tras cronometrar y registrar los fotones individuales emitidos tras un gran número de pulsos de excitación. Los sistemas TCSPC proporcionan una sensibilidad excepcional, pero la adquisición de datos puede llevar bastante tiempo.



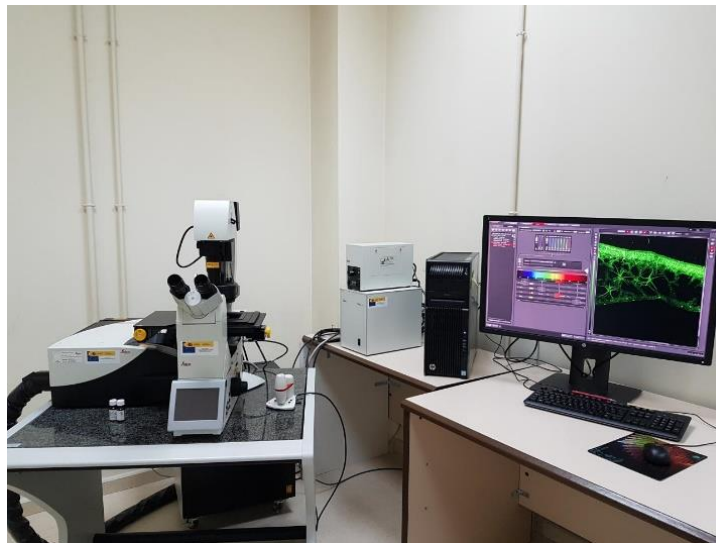
**Figura 3.8.** Decaimiento de la fluorescencia de la rodamina 6G obtenido mediante TCSPC. El tiempo de vida se extrae de un ajuste monoexponencial de los datos experimentales. La intensidad medida se muestra en puntos de color gris claro en una escala logarítmica y la función de respuesta del instrumento en gris oscuro. Imagen obtenida de [410].

La **Figura 3.8** muestra como ejemplo el decaimiento de la fluorescencia de una solución acuosa de rodamina 6G medida por TCSPC. Un ajuste monoexponencial de estos datos arroja un tiempo de vida de 4.1 ns. Sin embargo, la mayoría de los sistemas biológicos, contienen entornos heterogéneos y múltiples especies emisoras, por lo que a menudo se obtienen tiempos de vida multiexponenciales.

### **3.4.5. Microscopía de fluorescencia**

Esta técnica se empleó para conocer la distribución espacial del indicador luminiscente inmovilizado en la partícula de agarosa. La técnica se realizó en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de Técnicas Biológicas ubicada en el campus de la UCM y es una Instalación Científico-Técnica Singular (ICTS), siendo una referencia nacional en esta técnica.

El equipo empleado fue un microscopio confocal de barrido láser (TCS SP8 de Leica), **Figura 3.9.** Microscopio confocal de barrido láser (TCS SP8 de Leica). con sistema de superresolución hyvolution y equipado con 4 detectores de fluorescencia y 4 láseres (405, 488, 552 y 638 nm). En esta técnica, se usa un tinte fluorescente (o la propia fluorescencia de la muestra) para marcar estructuras o moléculas específicas en la muestra, y estos tintes emiten luz cuando son excitados por ciertas longitudes de onda de luz. La luz emitida por el tinte puede capturarse con una cámara y usarse para crear una imagen del espécimen.



**Figura 3.9.** Microscopio confocal de barrido láser (TCS SP8 de Leica). Imagen obtenida del CAI de Técnicas Biológicas de la UCM.

### **3.5. RECURSOS INFORMÁTICOS**

Para la realización de la tesis, se han empleado distintos recursos informáticos, los cuales se detallan a continuación:

- **Berkeley Madonna:** Es el programa de simulación que más se ha empleado y ha sido de gran ayuda tanto en el diseño de experimentos como en la comprensión de distintos fenómenos fisicoquímicos. Berkeley Madonna es un paquete de software de modelización matemática, desarrollado en la Universidad de California en Berkeley [413,414]. Resuelve numéricamente ecuaciones diferenciales ordinarias y ecuaciones en diferencias. Su punto fuerte reside en una sintaxis relativamente sencilla para definir ecuaciones diferenciales unida a una interfaz de usuario simple pero potente.

- **Aspen Custom Modeler® V11:** Empleado para el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales obtenidos de tipo integral (concentración vs tiempo). Permite el diseño del modelo cinético deseado al que ajustar los datos, a la vez que ofrece interesantes parámetros estadísticos. Emplea métodos matemáticos de ajuste no lineal, basados en el algoritmo NL2SOL, combinado con integración numérica por el método de Euler. Se ha usado en numerosos estudios científicos de simulación en ingeniería química [415,416].
- **OriginLab® 2021:** Utilizado para la elaboración de gráficas y figuras, así como para realizar ajustes matemáticos sencillos de datos experimentales de tipo diferencial (velocidad vs concentración) a modelos hiperbólicos.
- **PyMOL:** Se empleó para producir imágenes 3D de alta calidad de macromoléculas biológicas, como las enzimas. Gracias a este programa, se facilita la comprensión de la estructura terciaria de la enzima, permitiendo visualizar la localización de su centro activo, los residuos que componen su estructura, etc.
- **ChemDraw:** Software utilizado principalmente para la ilustración de los distintos grupos funcionales involucrados en la inmovilización enzimática. Es un programa sencillo pero potente para dibujar tanto compuestos químicos sencillos como esquemas de reacción complejos.

### 3.6. MÉTODOS MATEMÁTICOS

En este apartado se describen los métodos matemáticos empleados tanto para el tratamiento de datos como para la simulación de reacciones químicas acopladas a otros fenómenos, así como los parámetros estadísticos empleados.

#### 3.6.1. Métodos de cálculo

Para el ajuste de los datos experimentales obtenidos a los modelos cinéticos se pueden utilizar tanto datos diferenciales (velocidad vs concentración) como datos integrales (concentración vs tiempo). Según el tipo de datos empleado, el método de cálculo será diferencial o integral.

**Método diferencial:** En este caso, se ha empleado el método diferencial principalmente con datos de concentración de sustrato principal  $[S]$  u oxígeno  $[O_2]$ . Si tenemos datos de velocidad o actividad (que es velocidad por unidad de masa de enzima o soporte) en función de  $[S]$ , entonces esta velocidad es una velocidad de reacción inicial a un valor

constante de saturación en aire, normalmente  $[O_2]=0.215$  mM. Sin embargo, si lo que se tiene es la velocidad en función de  $[O_2]$ , esta velocidad se ha obtenido a un valor constante de  $[S]$ , y son velocidades a distintos tiempos de reacción, no sólo al comienzo.

Una vez obtenidos estos datos, se llevan al programa Origin® para ajustarlos. Normalmente poseen una tendencia hiperbólica o lineal dependiendo de la concentración de sustrato empleada y las características cinéticas intrínsecas de la enzima estudiada.

**Método integral:** Los datos integrales comprenden al menos un gráfico del curso completo de la reacción que describe cómo evolucionan las especies (sustrato y producto) a lo largo del tiempo. Este gráfico de reacción es la forma integrada de la cinética y muestra cómo ésta cambia con el tiempo y el progreso de la reacción (conversión de sustrato). Estos datos suelen ser mucho más voluminosos (ya que se empleó el monitoreo en línea del oxígeno) y son útiles también para detectar la existencia de desactivación del catalizador o inhibición por producto (la inhibición por sustrato se puede observar también con el método diferencial).

La manera de ajustar estos datos a un modelo cinético consiste en alimentar al software empleado (en este caso Berkeley Madonna o Aspen Custom Modeler) con los datos de concentración vs tiempo. En este método, la mayor dificultad está en escoger un modelo cinético lo más sencillo posible que sea capaz de explicar los datos experimentales. En cuanto al ajuste de los datos integrales estrictamente, se ha empleado Aspen Custom Modeler por la posibilidad de realizar un ajuste de respuesta múltiple a un mismo modelo, mientras que Berkeley Madonna permite el ajuste de un solo experimento a la vez. En cuanto a la resolución por parte de Aspen Custom Modeler, se empleó la integración numérica de las ecuaciones del modelo empleando el algoritmo de Euler de intervalo variable acoplado al algoritmo NL2SOL de regresión no lineal, un método adaptativo de regresión no lineal por mínimos cuadrados. La resolución numérica realizada por el software Madonna de Berkeley se basó en una combinación del método de Runge-Kutta de 4° orden para la integración con un algoritmo de Levenberg-Marquardt para la regresión no lineal.

### **3.6.2. Modelo de reacción-difusión**

Se ha desarrollado un modelo de reacción-difusión para simular tanto la cinética de reacción de una enzima inmovilizada (Capítulo 5) como el proceso de inmovilización de una enzima en un soporte poroso (Capítulo 7). Posteriormente, con los resultados de las simulaciones, se formulan hipótesis que después se comprueban experimentalmente.

El análisis matemático de la reacción heterogénea se basa en la realización de balances de materia en la partícula. El transporte de materia por difusión considera que el oxígeno y el sustrato principal (o la enzima) penetran en el interior de la partícula porosa y se genera el producto de reacción.

Para aplicar el modelo, primero hay que hacer ciertas suposiciones para poder expresar matemáticamente cada término de la ecuación [407]. **1) Las partículas se suponen esféricas.** Todas las partículas de la matriz del soporte se consideran esféricas para un tratamiento matemático más sencillo. **2) Las partículas son isotermas.** Como los gradientes de temperatura generados por el proceso de reacción son generalmente despreciables, suponer una temperatura constante en todas las partículas es razonable y simplifica enormemente el análisis matemático. **3) La transferencia de materia se produce únicamente por difusión.** Supondremos que la partícula es impermeable al flujo, por lo que el transporte convectivo en los poros se considera despreciable. **4) La difusión puede describirse mediante la ley de Fick.** Se ignora la interacción del sustrato con otros gradientes de concentración y los fenómenos que afectan al transporte de especies cargadas. La ley de Fick considera la *difusividad efectiva* del sustrato en el sólido,  $D_{eff}$ . El valor de  $D_{eff}$  es una función compleja de las características de difusión molecular del sustrato, la tortuosidad del camino de difusión dentro del sólido y la fracción del volumen de la partícula disponible para la difusión [407,417,418]. Se supone que  $D_{eff}$  es constante y no cambia con la posición. **5) Las partículas son homogéneas.** Se supone que las enzimas inmovilizadas se distribuyen uniformemente dentro de la partícula. **6) El coeficiente de partición del sustrato es la unidad.** Esta afirmación es válida para la mayoría de los sustratos y partículas, y garantiza que no hay discontinuidad de concentración en la interfase sólido-líquido. **7) Las propiedades físicas de la partícula se encuentran en estado estacionario.** Se considera que parámetros como la densidad o porosidad en la partícula no varían con el tiempo. **8) La concentración de sustrato varía con una única variable espacial.** Suponemos que la concentración de sustrato varía sólo en la dirección radial, y que el sustrato difunde radialmente a través de la partícula desde la superficie externa hacia el centro.

Con estas suposiciones, se realiza un balance de materia del sustrato alrededor de la partícula considerando los procesos de transferencia de materia y reacción que ocurren en el radio  $r$ . Ambos sustratos se difunden en la partícula en el radio  $r_n$  y salen en el radio  $r_{n-1}$ , mientras que en la superficie el producto se genera por reacción. Por lo tanto, el interior de la partícula se dividió en pequeñas capas para la resolución numérica,

típicamente 75, donde el volumen de cada capa se supuso idealmente mezclado. Para cada capa, el balance de materia para el sustrato viene dado por la siguiente ecuación,

$$\frac{dC_{S_n}}{dt} \varepsilon \frac{4}{3} \pi (r_n^3 - r_{n-1}^3) = \varepsilon \cdot j_n 4\pi r_n^2 - \varepsilon \cdot j_{n-1} 4\pi r_{n-1}^2 - R \frac{4}{3} \pi (r_n^3 - r_{n-1}^3) \quad (\text{Ec 3.20})$$

Donde  $\varepsilon$  es la porosidad de la partícula,  $n$  es el número de capas y  $n=1$  representa la capa más interna,  $C_S$  es la concentración de sustrato en la partícula,  $r$  es la distancia medida radialmente desde el centro,  $R$  es la velocidad de reacción por unidad de volumen de partícula y  $t$  es el tiempo de inmovilización. Cada término de la ecuación de balance de materia tiene unidades de, por ejemplo,  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$ . El flujo molar  $j_n$  se obtiene mediante la siguiente ecuación,

$$j_n = D_{eff} \frac{C_{S_{n+1}} - C_{S_n}}{\Delta r} \quad (\text{Ec 3.21})$$

Donde  $D_{eff}$  es la difusividad efectiva del sustrato en la partícula, siendo  $300 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  el valor fijado para tanto  $\text{O}_2$  como sustrato principal durante las simulaciones del comportamiento de las enzimas inmovilizadas, un valor similar al encontrado en bibliografía [419]. El valor de  $D_{eff}$  para la enzima soluble como sustrato en las simulaciones del proceso de inmovilización se situó en  $70 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . El flujo  $j_{n-1}$  se obtiene de forma análoga utilizando  $n$  y  $n-1$ .

Por otro lado, hay que considerar tanto la cinética de reacción de la enzima inmovilizada como del proceso de inmovilización de las enzimas libres. Para el primer caso, se emplea el modelo ping-pong bisustrato mostrado en la Ec 3.6. Mientras que, para el segundo, se considera una velocidad de reacción de primer orden respecto a la concentración de enzima, mostrado en la Ec 7.1. Estas ecuaciones se incluyen en el término  $R_n$ . Sustituyendo (Ec 3.21) en (Ec 3.20) y simplificando, la ecuación del balance de materia alrededor de la partícula es la siguiente,

$$\frac{dC_{S_n}}{dt} = \frac{3D_{eff}}{\Delta r (r_n^3 - r_{n-1}^3)} \left[ r_n^2 \cdot (C_{S_{n+1}} - C_{S_n}) - r_{n-1}^2 \cdot (C_{S_n} - C_{S_{n-1}}) \right] - R_n \quad (\text{Ec 3.22})$$

Para la capa más interna, donde no es posible el flujo a la siguiente capa, Ec 3.22 se simplifica a,

$$\frac{dC_{S_1}}{dt} = \frac{3D_{eff}}{\Delta r^2} (C_{S_2} - C_{S_1}) - R_1 \quad (\text{Ec 3.23})$$

Por último, hay que considerar la transferencia de materia desde la fase líquida hasta la superficie de la partícula, donde  $C_{S0}$  es la concentración de sustrato en la fase líquida,

$$\frac{dC_{S0}}{dt} = \frac{3D_{eff}}{\Delta r^2} (C_{S1} - C_{S0}) \quad (\text{Ec 3.24})$$

Por último, es importante mencionar que este modelo se puede emplear para simular dos tipos de casos. En el primero, seleccionando un valor muy bajo de catalizador por volumen de reactor (0.01%), se simulan las velocidades iniciales de reacción del proceso. En estas condiciones, variables como el factor de eficacia o el gradiente de oxígeno en la partícula se encuentran en estado pseudo-estacionario, y, por tanto, son interesantes de medir.

Para el segundo caso, es decir, la simulación de los cursos completos de reacción, se selecciona una masa de catalizador por volumen de reactor similar a la empleada en condiciones de experimentación (5%). Este caso es muy útil para predecir variables como el tiempo de reacción, la concentración inicial de sustrato o la masa de catalizador a emplear.

### 3.6.3. Parámetros estadísticos

Se utilizan para cuantificar la bondad de ajuste entre los distintos modelos o parámetros cinéticos propuestos. Para ello, se han empleado como parámetros estadísticos el error cuadrático medio (RMSE), la suma de residuos al cuadrado (SSR), la F de Fischer ( $F_{95}$ ) y el criterio de Akaike (AICc).

El error cuadrático medio, RMSE (Root Mean Square Error) (Ec 3.25) es un parámetro que minimizar. Su valor representa una medida del error entre los datos experimentales y los estimados en el modelo obtenido. Este parámetro se basa en la suma de residuos al cuadrado, SSR (Sum of Squared Residuals) (Ec 3.26), teniendo en cuenta el número de grados de libertad que ofrece el modelo (N-K).

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{(N - K)}} \quad (\text{Ec 3.25})$$

$$SSR = \sum_{j=1}^{j=K} \sum_{i=1}^{i=N} (C_{ij,exp} - C_{ij,calc})^2 \quad (\text{Ec 3.26})$$

Siendo N el número de datos experimentales y K el número de parámetros del modelo. Otro criterio estadístico que se ha utilizado para determinar la validez de los modelos propuestos está representado por la F de Fisher ( $F_{95}$ ), Ec 3.27. Es un parámetro significativo que indica la probabilidad de que el modelo esté representado por una distribución de Fisher-Snedecor al 95% de probabilidad. Es un parámetro que maximizar, que debe de estar siempre por encima de un valor crítico (teórico y tabulado). Siendo N el número de datos experimentales y K el número de parámetros del modelo.

$$F_{95} = \frac{\sum_{i=1}^N \left( \frac{y_{i,calc}}{K} \right)^2}{\sum_{i=1}^N \left( \frac{SSR}{N-K} \right)} \quad (\text{Ec } 3.27)$$

Por último, para cuantificar la calidad relativa del modelo empleado, se ha utilizado el criterio de información de Akaike (AIC), Ec 3.28. Este criterio maneja un balance entre la bondad de ajuste del modelo y su complejidad, penalizando la sobreparametrización. Dado un conjunto de modelos candidatos para los datos, el modelo preferido es el que tiene el valor mínimo en el AIC. Cuando el tamaño de la muestra es finito, se utiliza AICc, una ecuación corregida, Ec 3.29.

$$AIC = N \cdot \ln \left( \frac{SSR}{N} \right) + 2K \quad (\text{Ec } 3.28)$$

$$AICc = AIC + \frac{2K \cdot (K+1)}{N-K-1} \quad (\text{Ec } 3.29)$$

Dónde N el número de datos experimentales y K el número de parámetros del modelo.



---

---

## **CAPÍTULO 4.**

# **ANÁLISIS CINÉTICO EN FASE HOMOGÉNEA DE ENZIMAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>**

---

---

## 4. ANÁLISIS CINÉTICO EN FASE HOMOGÉNEA DE ENZIMAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>

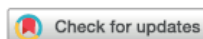
Este capítulo corresponde a un artículo científico publicado por el autor y el director de esta tesis doctoral en la revista “Reaction Chemistry and Engineering”, cuya primera página se muestra a continuación.

Reaction  
Chemistry &  
Engineering



PAPER

View Article Online  
View Journal | View Issue



Cite this: *React. Chem. Eng.*, 2021, 6, 2058

### Framework of the kinetic analysis of O<sub>2</sub>-dependent oxidative biocatalysts for reaction intensification†

Alvaro Lorente-Arevalo,  Miguel Ladero  and Juan M. Bolivar \*

The application of oxygen-dependent enzymes is limited by the low oxygen solubility, a fact that hinders the full operational exploitation of the enzyme activity. This oxygen limitation also creates a difficulty for understanding the intrinsic enzyme kinetics, a critical aspect for the process implementation of oxidative enzymes. Kinetic analysis of O<sub>2</sub>-dependent enzymes is a case of ping-pong bi-substrate reaction kinetics but with the added feature of a fixed low concentration of oxygen dissolved in the liquid medium. We propose an analysis framework based on a combination of differential methods (based on initial reaction rates-concentration plots) to analyze the main substrate dependency, while the subsequent integral method (consumption time courses of oxygen dissolved) serves to analyze the oxygen dependency. The methodology is applicable by using the oxygen initially dissolved and only working with liquid suspensions. The analysis was applied to paradigmatic case studies with importance in modern green biooxidations. The modeling framework was validated and applied in scale-up reactions in an instrumented aerated stirred tank reactor.

Received 14th June 2021,  
Accepted 2nd August 2021

DOI: 10.1039/d1re00237f

rsc.li/reaction-engineering

Aunque se reconoce ampliamente que la actividad observable de una oxidasa está afectada por la concentración de oxígeno y la de sustrato principal en su relación con la cinética específica, su relevancia para la aplicación práctica del proceso aún no se comprende completamente [172,208]. Sin embargo, el empleo de los principios clásicos de la ingeniería de la reacción química, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías analíticas, brinda una perspectiva renovada sobre este asunto [205,206].

Como se ha mencionado en la introducción, existe la necesidad de la caracterización cinética de una gran cantidad de oxidasas, que normalmente sólo han sido estudiadas desde el punto de vista del sustrato principal, pero no desde el O<sub>2</sub>. Tradicionalmente, estos análisis de la limitación del oxígeno eran más complejos y se empleaban costosas instalaciones experimentales para controlar la [O<sub>2</sub>] inicial en recipientes herméticos a presión. El desarrollo reciente de sensores optoquímicos

sensibles al oxígeno permite la monitorización y adquisición de numerosos datos cinéticos para la elucidación de la dependencia de oxígeno de estas enzimas. Con estas nuevas tecnologías, es posible el desarrollo de metodologías de análisis cinético de forma más sencilla y para un público más amplio. Es por tanto que en este capítulo se desarrolla una metodología robusta para estimar parámetros cinéticos de reacciones biocatalíticas en un laboratorio convencional.

Si se establecen condiciones de saturación de aire en medio acuoso ( $[O_2] = 0.25$  mM), la relación entre la velocidad de reacción (actividad observable) dada por una oxidasa en comparación con su máximo,  $\gamma$ , puede expresarse sólo en función de  $S$ ,  $K_S$  y  $K_{O_2}$ , Ec 4.1. La **Figura 4.1** muestra casos para distintos valores de  $K_S$ . En los casos de enzimas con una constante de afinidad baja para  $S$  ( $K_S < 1$  mM), existe un amplio rango de concentración de sustrato principal para operar a la velocidad aparente máxima, **Figura 4.1A**. Para situaciones en las que la constante de afinidad del sustrato principal también es alta (por ejemplo,  $K_S > 10$  mM), **Figura 4.1B**, esta región de operación a velocidad máxima disminuye. La eficacia máxima,  $\gamma$ , en caso de que haya  $[S]$  en exceso, sólo está limitada por la constante de afinidad intrínseca para el oxígeno,  $K_{O_2}$ , de manera que los valores alcanzados de  $\gamma$  son mayores cuando  $K_{O_2}$  es menor. En las **Figura 4.1A-B** se han sombreado las zonas en las que no existe dependencia ni del sustrato principal ni del oxígeno, en esa zona las enzimas trabajan a máxima velocidad. El área no sombreada corresponde a la región donde también hay dependencia por el sustrato principal. Estos paneles pueden fusionarse en un único gráfico, **Figura 4.1C**, donde  $\gamma$  se expresa en función de la concentración normalizada de sustrato ( $S/K_S$ ) a diferentes  $K_{O_2}$ , siguiendo la Ecuación 4.1:

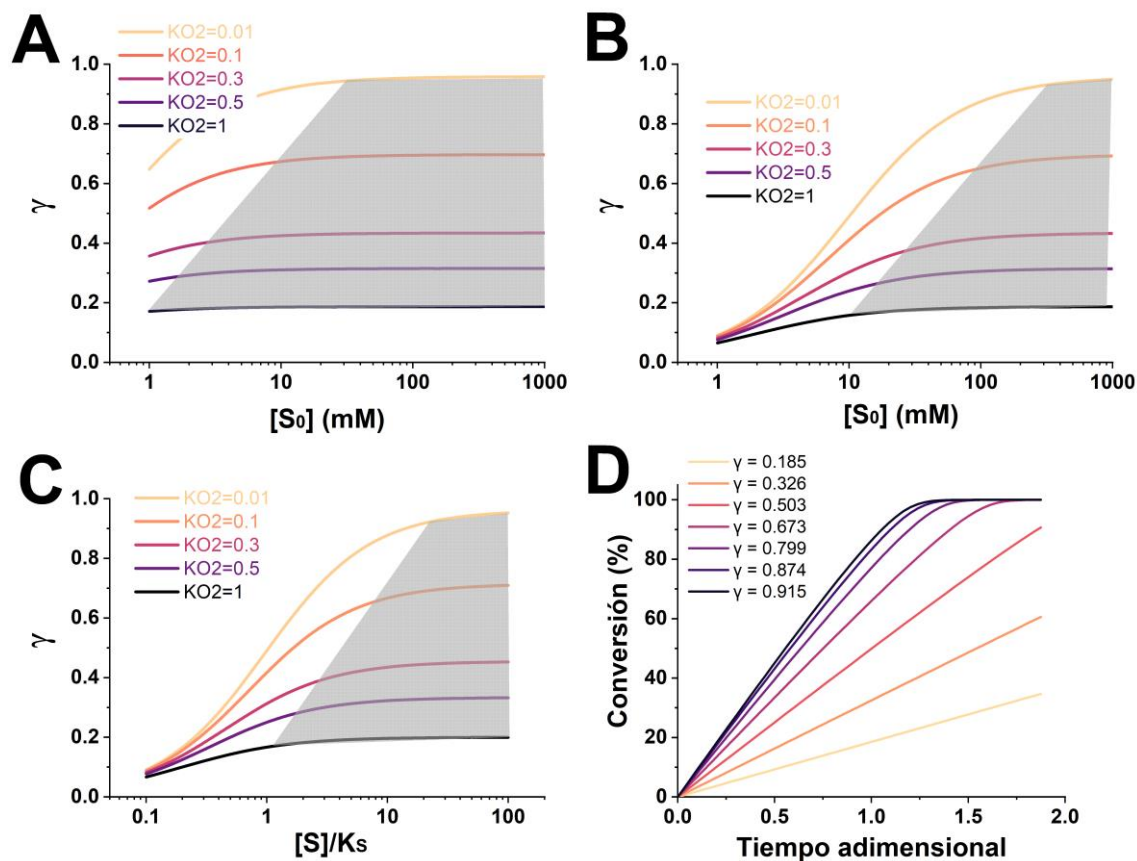
$$\gamma = \frac{\frac{[S] \cdot [O_2]}{K_S \cdot ([O_2] + K_{O_2})}}{\frac{[S]}{K_S} + \frac{[O_2]}{[O_2] + K_{O_2}}} = \frac{S' \cdot O_2^*}{S' + O_2^*} \quad (\text{Ec 4.1})$$

Donde el término  $\frac{[O_2]}{[O_2] + K_{O_2}}$  expresa la limitación de  $O_2$  ( $O_2^*$ ) y  $S'$  expresa la

concentración normalizada de sustrato ( $S/K_S$ ), siendo la expresión  $\gamma$  una hipérbola rectangular con un valor máximo igual a  $O_2^*$ . El valor de la eficacia  $\gamma$  depende de la cinética intrínseca respecto al oxígeno ( $K_{O_2}$ ), mientras que la ventana de operación para la velocidad máxima depende de la constante de afinidad para el oxígeno y del  $K_S$ . La

maximización del uso de la enzima y de la productividad del reactor requiere el cálculo de estos parámetros. La **Figura 4.1D** ilustra las consecuencias de  $\gamma$  en un curso de conversión representativo de una oxidasa. El tiempo de operación se normaliza con la razón  $(R_{max}/[S]_0)$  para dar lugar al denominador tiempo adimensional, Ec 4.2.

$$\text{Tiempo adimensional} = \text{tiempo} \cdot \frac{R_{max}}{S_0} \quad (\text{Ec 4.2})$$

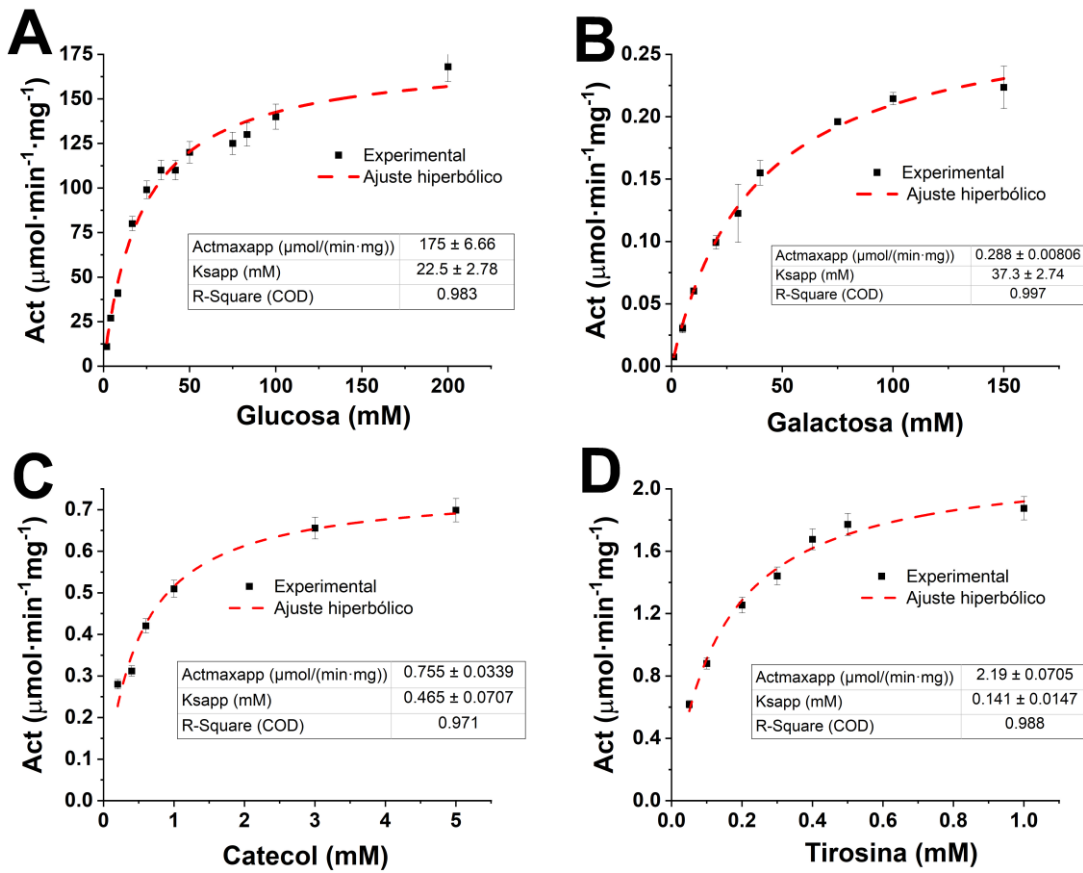


**Figura 4.1.** Eficacia de la enzima ( $\gamma$ ) en función de la cinética intrínseca respecto al oxígeno y la concentración de sustrato principal inicial. *Panel A:* Relación entre actividad observable y actividad máxima,  $\gamma$ , en función de la concentración de sustrato,  $[S]$ , variando  $K_{O_2}$  (mM),  $K_S=0.5$  mM; *Panel B:* Relación entre actividad observable y actividad máxima,  $\gamma$ , en función de la concentración de sustrato,  $[S]$ , variando  $K_{O_2}$  (mM),  $K_S=10$  mM; *Panel C:* Relación entre actividad observable y actividad máxima,  $\gamma$ , en función de la concentración normalizada de sustrato ( $S/K_S$ ) a diferentes  $K_{O_2}$  (mM); *Panel D:* Conversión del sustrato principal ( $S$ ) frente al tiempo adimensional para diferentes valores de  $\gamma$ ,  $S_0/K_S=20$ . Condiciones comunes a todos los paneles:  $[O_2]=0.25$  mM,  $[E]=0.1$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $Act_{max}=5$  U·mg<sup>-1</sup>.

El análisis de los límites de operación, principalmente del  $O_2$ , muestra la importancia de la determinación de las constantes de afinidad en una etapa temprana del diseño del catalizador. Lo ideal, sería realizar un análisis detallado mediante la variación sistemática de  $[S]$  a  $[O_2]$  fijo y de  $[O_2]$  a  $[S]$  fijo. Sin embargo, como se ha comentado, los enfoques experimentales para la variación del  $[O_2]$  inicial requieren equipos sofisticados. Por tanto, se ha buscado una alternativa mediante la combinación de un análisis diferencial e integral basado en cursos de consumo de oxígeno con el tiempo. Esto se desarrolla a continuación.

#### **4.1. ANÁLISIS DIFERENCIAL PARA DILUCIDAR LA DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CON EL SUSTRATO PRINCIPAL**

La actividad de una oxidasa puede cuantificarse midiendo la velocidad de reacción inicial de consumo de oxígeno o formación de producto,  $\left. \frac{dO_2}{dt} \right|_{t \rightarrow 0}$ , según la Ec 3.5. Bajo la condición de  $[S] \gg [O_2]$ , y midiendo la actividad a diferentes  $[S]$  iniciales a una concentración fija de oxígeno, la  $Act_{maxapp}$  y la  $K_{Sapp}$ , ambas incluyendo  $O_2^*$  en su expresión, pueden calcularse según las Ecs. 3.8-3.9. La **Figura 4.2** muestra la gráfica  $Act-[S]$  para diferentes oxidasas. GOX y GalOx (paneles A y B respectivamente) muestran valores medio-altos de  $K_{Sapp}$  mientras que lacasa y tirosinasa (paneles C y D respectivamente) muestran valores bajos de  $K_{Sapp}$ .

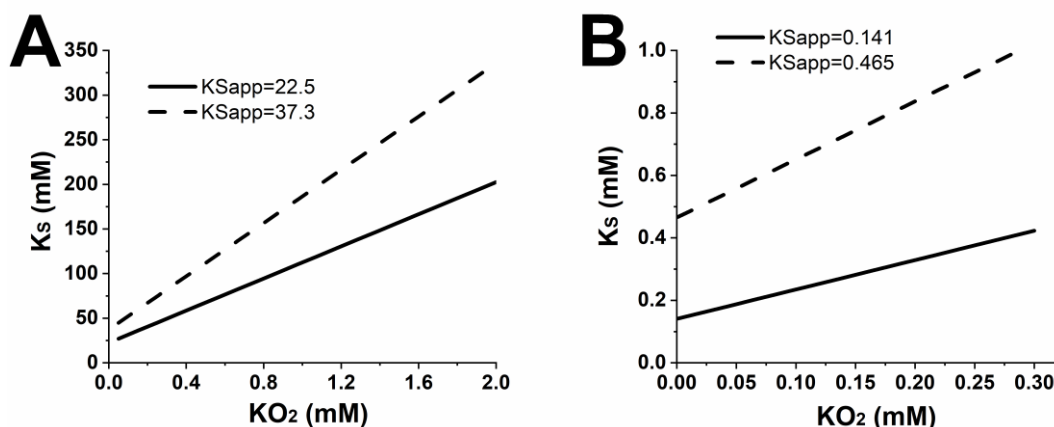


**Figura 4.2.** Determinación de actividad frente a  $[S]$  para las diferentes enzimas, mostrando la constante de afinidad aparente respecto al sustrato principal,  $K_{Sapp}$ . Los experimentos se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0. *Panel A:* GOX, *Panel B:* GalOx, *Panel C:* lacasa, *Panel D:* tirosinasa.

A partir de los experimentos realizados, sería posible simular el rendimiento de la reacción enzimática a saturación total de aire, pero no es posible calcular el  $K_{O_2}$  intrínseco ni predecir el rendimiento del catalizador a un nivel diferente de saturación de aire. También se desconoce el valor intrínseco de  $K_S$  y la ventana operacional de las enzimas. Sin embargo, es posible restringir los valores. Una vez calculado  $K_{Sapp}$ , se puede definir el lugar geométrico de las combinaciones de  $K_S$  y  $K_{O_2}$  que explican cada valor (Ec 4.3).

$$K_S = K_{Sapp} + K_{Sapp} \cdot \frac{K_{O_2}}{O_2} \quad (\text{Ec } 4.3)$$

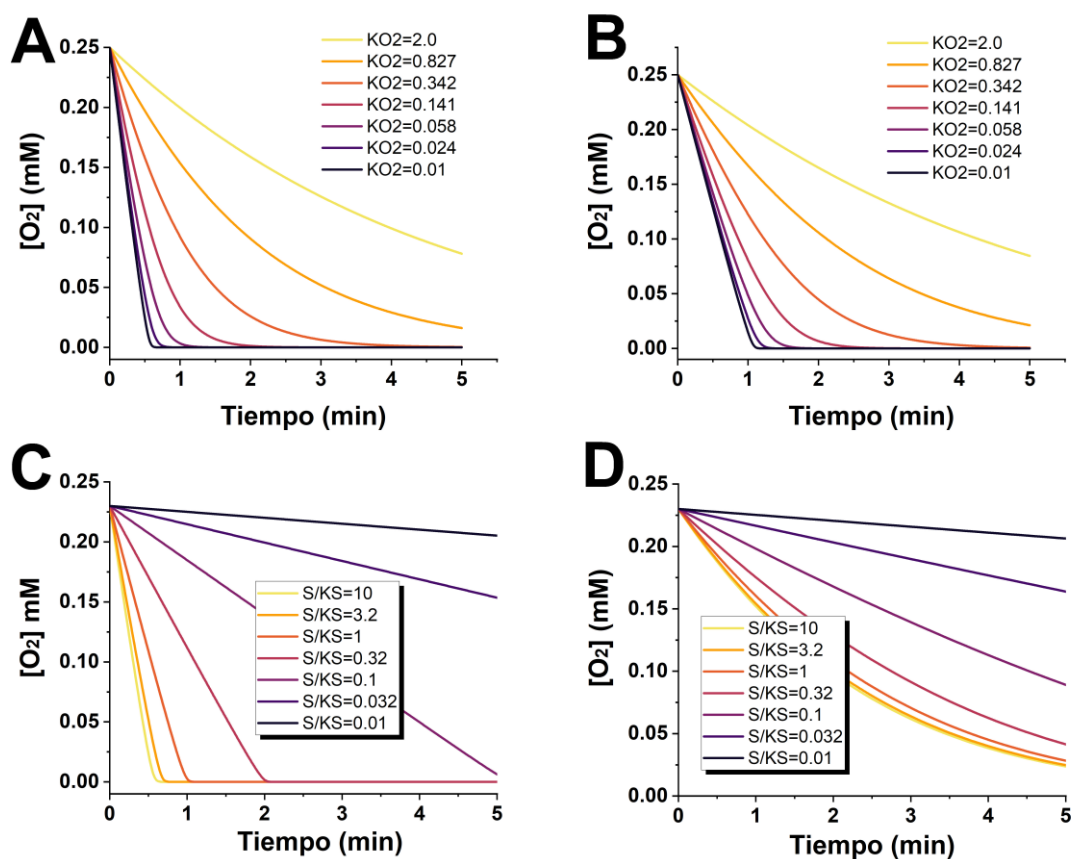
La **Figura 4.3** muestra la dependencia proporcional entre  $K_{Sapp}$ ,  $K_S$  y  $K_{O_2}$ . Sin embargo, existen infinitos pares de valores posibles de  $K_S$  y  $K_{O_2}$  que satisfacen la información del  $K_{Sapp}$ . El panel A muestra el lugar geométrico para GOX y GalOx, mientras que Panel B lo muestra para lacasa y tirosinasa.



**Figura 4.3.** Pares de combinaciones de  $K_S$  y  $K_{O_2}$  que satisfacen los valores de  $K_{Sapp}$  calculados previamente. *Panel A:* GOX y GalOx. *Panel B:* Lacasa y tirosinasa.  $[O_2]=0.25$  mM.

#### 4.2. ANÁLISIS DIFERENCIAL PARA DILUCIDAR LA DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CON EL OXÍGENO

Este estudio sólo puede realizarse mediante la observación de la velocidad reacción en función del oxígeno. El trabajo a una concentración de oxígeno controlable distinta de la saturación del aire suele requerir configuraciones complicadas de reactor. Para simplificar y permitir un enfoque general en el que se opere con una saturación fija de aire, se emplean nuevas tecnologías de detección extendidas, junto con las características fisicoquímicas de las reacciones de oxidación. Como se ha comentado, la detección optoquímica ofrece la posibilidad de cuantificar el consumo de oxígeno en una configuración convencional de laboratorio con una alta precisión y una respuesta de tiempo muy breve. Bajo la condición de  $[S] \gg [O_2]$ ,  $[S]$  puede asumirse constante, y la monitorización del curso completo de conversión del oxígeno disuelto es muy útil para analizar la cinética, empleando la Ec 3.10. La **Figura 4.4** muestra un conjunto de ejemplos simulados de cursos de consumo de oxígeno dependientes de la cinética intrínseca respecto al  $O_2$ .

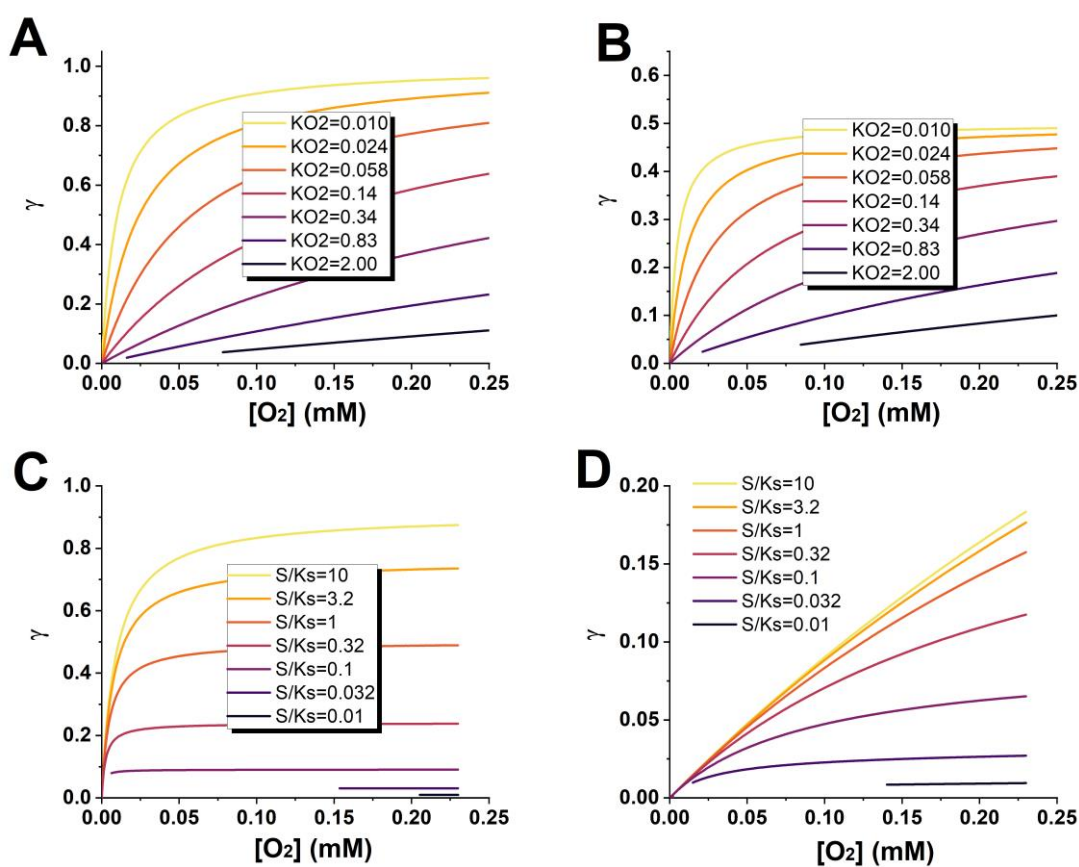


**Figura 4.4.** Cursos de consumo de oxígeno simulados a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM) y  $[S]/K_S$ . *Panel A:*  $K_S = 0.1$  mM; *Panel B:*  $K_S = 100$  mM; *Panel C:*  $K_{O_2} = 0.01$  mM; *Panel D:*  $K_{O_2} = 1$  mM. Condiciones comunes a todos los paneles:  $[S_0] = 100$  mM,  $[E] = 0.1$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $Act_{max} = 5$  μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>.

La **Figura 4.4** ilustra diferentes escenarios situados en el espacio definido por los siguientes extremos: ( $K_{O_2}$  bajo,  $K_S$  bajo), ( $K_{O_2}$  bajo,  $K_S$  alto), ( $K_{O_2}$  alto,  $K_S$  bajo), ( $K_{O_2}$  alto,  $K_S$  alto). Los paneles A y B muestran lo que cabe esperar en los extremos de  $S/K_S$  en función de la cinética intrínseca hacia el  $O_2$ . A un nivel alto de dependencia del  $O_2$  ( $K_{O_2}$  alto) las líneas se vuelven más curvas mostrando la disminución de la velocidad de reacción al progresar la reacción, mientras que a un nivel bajo de dependencia del  $O_2$  ( $K_{O_2}$  bajo), las líneas son rectas manifestando el orden de reacción cero hacia el oxígeno. Los paneles C y D ofrecen la perspectiva de la variación sistemática de  $S$  para una  $[E]$  fija bajo dos extremos de  $K_{O_2}$ . En el caso de bajo nivel de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  bajo; Panel C), todo el conjunto de cursos de reacción son rectos independientes de la saturación con  $S$ . Para los casos de alto nivel de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  alto, Panel D), las líneas son curvas y sólo se vuelven rectas cuando el sustrato también es limitante. Por lo tanto, la identificación de líneas curvas es una evidencia de la limitación de  $O_2$  en el rango de

solubilidad de oxígeno, mientras que las líneas rectas podrían manifestar ausencia de limitación de  $O_2$  o contradictoriamente, limitaciones de ambos sustratos ( $K_S$  alto/ $K_{O_2app}$  bajo según la Ec 3.11).

Por otro lado, se puede obtener una perspectiva más esclarecedora de la ecuación cinética obteniendo la primera derivada de la curva de concentración frente al tiempo. Por diferenciación gráfica de los datos de la **Figura 4.4**, se pueden obtener los valores de actividad frente a  $O_2$ . Con este gráfico es posible calcular  $K_{O_2app}$ .  $K_{O_2app}$  depende de  $[S]$ ,  $K_{O_2}$  y  $K_S$  según la Ec 3.11. En la **Figura 4.5** se muestran resultados a modo de ejemplo.



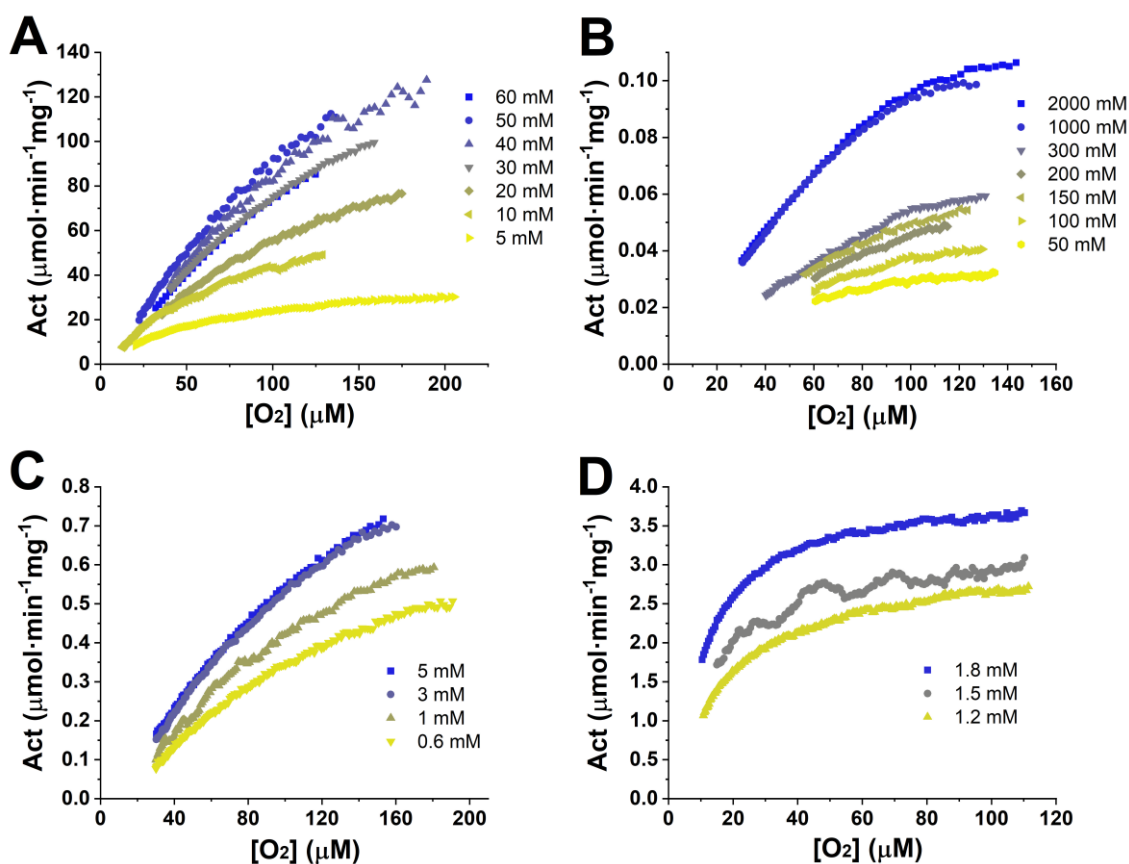
**Figura 4.5.** Relación entre actividad observable y actividad máxima,  $\gamma$ , frente a  $O_2$  a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM) y  $S/K_S$ . *Panel A:*  $K_S=0.1$  mM; *Panel B:*  $K_S=100$  mM; *Panel C:*  $K_{O_2}=0.01$  mM; *Panel D:*  $K_{O_2}=1$  mM. Condiciones comunes a todos los paneles:  $[S_0]=100$  mM,  $[E]=0.1$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $Act_{max}=5$   $\mu$ mol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>.

Los paneles A y B ilustran lo que cabe esperar en situaciones extremas de  $[S]/K_S$  en función de la cinética intrínseca respecto al  $O_2$ . En ambos casos, a niveles altos de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  alto) las líneas se tornan más rectas mostrando el control del  $O_2$  (reacción de primer orden) y un aumento casi proporcional de la velocidad de reacción

con el  $O_2$ . A bajo nivel de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  bajo), las líneas se curvan mostrando una clara forma hiperbólica, manifestando el alcance de orden cero de reacción hacia el oxígeno a altas  $[O_2]$ . Los paneles C y D muestran la perspectiva de la variación sistemática de S para  $[E]$  fija en dos escenarios extremos. En el caso de un bajo nivel de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  bajo), todo el conjunto de cursos es hiperbólico con una velocidad máxima de reacción constante alcanzada a cierto nivel de  $[O_2]$ . Cuanto más bajo es el  $[S]/K_S$ , más amplia es la zona con dependencia de orden cero, y más disminuye el  $K_{O_2app}$ . Para los casos de altos niveles de dependencia de  $O_2$  ( $K_{O_2}$  alto), las líneas son rectas y sólo se vuelven hiperbólicas (manifestándose en líneas más horizontales) cuando el sustrato principal también es limitante, lo que conlleva una disminución de  $K_{O_2app}$ . Por lo tanto, la identificación de líneas rectas es evidencia de limitación de  $O_2$  en el rango de solubilidad de oxígeno, mientras que la existencia de líneas curvas hiperbólicas puede manifestar ausencia de limitación de  $O_2$  o, contradictoriamente, limitación de ambos sustratos. El cambio de curvatura en los paneles C y D está relacionado con el cambio de la  $K_{O_2app}$ , que puede calcularse a partir de los gráficos anteriores mediante la aplicación de los métodos de cálculo adecuados. Una situación extrema ocurre cuando la  $K_{O_2app}$  es igual a la  $K_{O_2}$  intrínseca, (para  $[S]/K_S$  muy altas) y por lo tanto se puede obtener directamente. Esto sólo es posible cuando la  $K_{O_2}$  es significativamente menor que la  $[O_2]$  inicial. Estos métodos se aplicaron a continuación para los cuatro casos de estudio.

Según en este contexto de análisis, se midieron los cursos de consumo de oxígeno disuelto con el tiempo al variar la concentración de sustrato (**Figura 11.1-11.5**). La cantidad de enzima, E, se varió de forma adecuada para acceder a un número suficiente de datos tanto a bajo como a alto nivel de saturación de aire. La **Figura 4.6** muestra el resultado de la diferenciación gráfica de los cursos temporales de oxígeno. Los paneles A y B muestran el resultado para el GalOx y el GOX, que se asemejan al resultado de la **Figura 4.5D**. Los paneles A y B muestran principalmente una tendencia lineal en un amplio rango de oxígeno, curvándose las líneas paulatinamente a medida que se disminuye  $[S]$ . En ambos casos, pero especialmente en la GOX, se puede observar cómo divergen las curvas a alto  $O_2$ , indicando una alta dependencia de oxígeno, pero son un haz convergente de líneas rectas a bajas  $[O_2]$ , indicando primer orden a bajo  $O_2$ . Los paneles C y D muestran el resultado de la lacasa y la tirosinasa. El panel C muestra un caso más intermedio, en el que las líneas son ligeramente más curvas, aun así, fue difícil capturar la saturación aparente de oxígeno debido a la dificultad de disminuir S sin comprometer la limitación estequiométrica impuesta de oxígeno. El panel D muestra

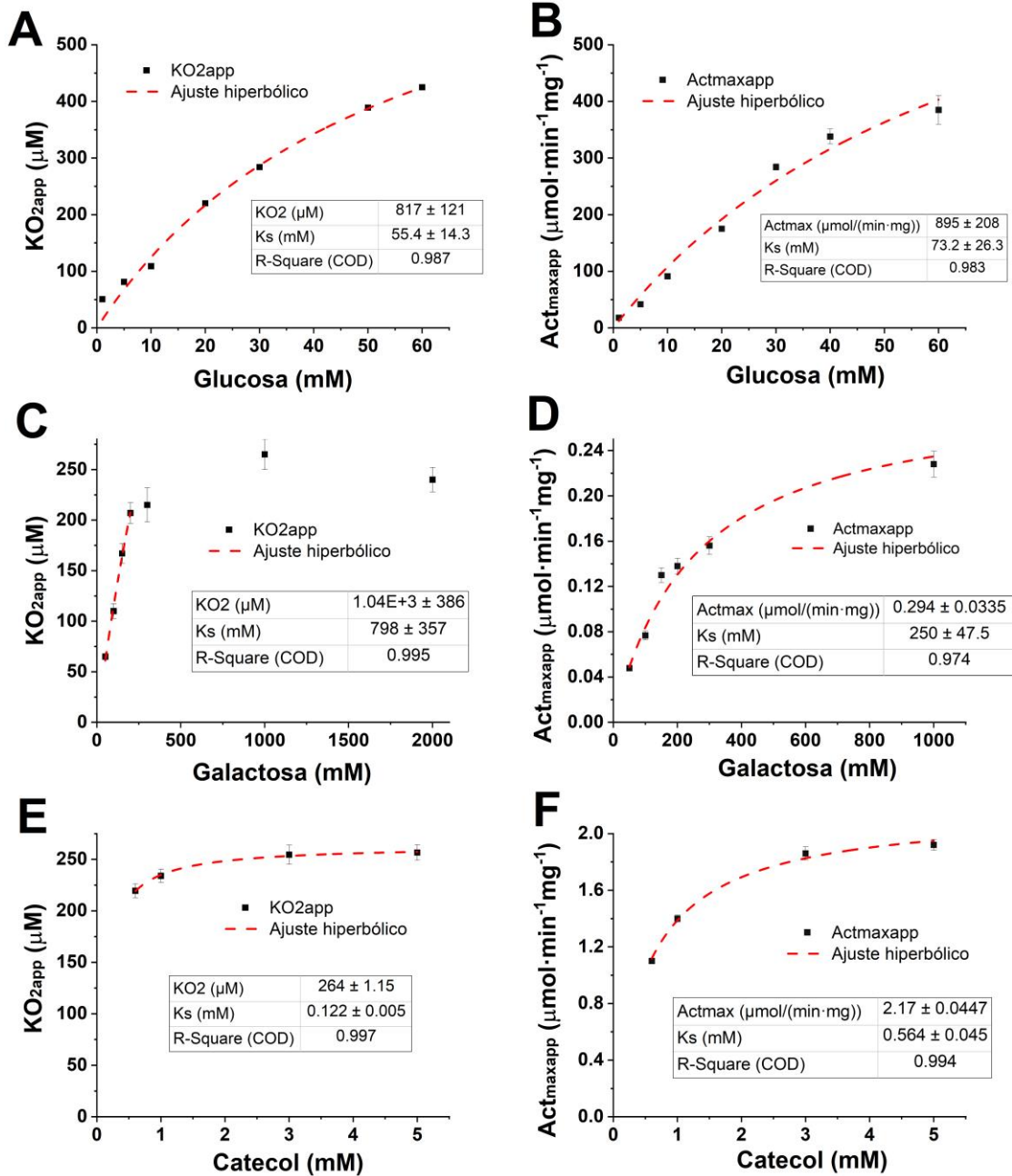
gráficas de actividad muy curvadas, que indican la aproximación a la saturación con oxígeno en el rango de solubilidad, bastante similar a la **Figura 4.5C**.



**Figura 4.6.** Datos experimentales de actividad ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) frente a concentración de oxígeno ( $\mu\text{M}$ ) a distintas  $[S]$ . *Panel A:* GOX,  $[E]=0.0015\text{-}0.003\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Panel B:* GalOx,  $[E]=5\text{-}10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Panel C:* lacasa,  $[E]=0.35\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Panel D:* tirosinasa,  $[E]=0.10\text{-}0.16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .  $[\text{O}_2] = 0.215\text{ mM}$  en condiciones de saturación de aire al 100 %, 25 °C y 50 mM de tampón fosfato pH 7.

Una vez analizados cualitativamente todos los datos, se pretende plantear un modelo cinético adecuado. Los datos se analizan en base a la Ec 3.10, donde puede calcularse una  $K_{O_2app}$ . La **Figura 4.7** muestra los resultados para las tres primeras enzimas, mientras que la **Tabla 4.1** muestra los resultados para la tirosinasa. Para GOX,  $K_{O_2app}$  se calcula fácilmente para el rango de glucosa 60-5 mM en base a la Ec 3.10, mientras que un modelo de potencial de primer orden funcionaría mejor para  $[\text{Glucosa}] > 60\text{ mM}$ , ya que  $K_{O_2app}$  aumenta con  $[S]$  y la saturación aparente con  $[\text{O}_2]$  no se alcanza sólo con saturación de aire. Esto es una indicación de que la  $K_{O_2}$  intrínseca se encuentra por encima del valor de la saturación del aire. A partir de la dependencia de  $K_{O_2app}$  vs

glucosa, y usando la Ec 3.11, se pueden calcular  $K_{O_2}$  y  $K_S$ , y, a partir de la dependencia de  $Act_{maxapp}$  vs glucosa, y usando la Ec 3.12, se pueden calcular  $K_S$  y  $Act_{max}$ , como se muestra en la **Tabla 4.2**. Para GalOx y lacasa, los paneles C y E muestran la dependencia de  $K_{O_2app}$  acercándose a un valor para  $K_{O_2}$  a altas concentraciones de sustrato que puede calcularse usando la Ec 3.11, y el valor de  $K_S$  puede calcularse según la Ec 3.12, como se muestra en los paneles D y F, respectivamente. La **Figura 11.6** muestra el resultado cuando se utiliza  $K_3Fe(CN)_6$  como activador. Para la tirosinasa, dado el bajo valor de  $K_S$ , todos los puntos de  $K_{O_2app}$  se aproximan al valor intrínseco, mostrado en la **Tabla 4.1**. Los resultados de la estimación de la constante intrínseca se muestran en la **Tabla 4.2**.



**Figura 4.7.** Análisis diferencial de los parámetros cinéticos aparentes dependientes del oxígeno frente al sustrato principal  $[S]$  para GOX, GalOx y lacasa. *Panel A:*  $K_{O_2app}$  vs  $[S]$  para GOX, *Panel B:*  $Act_{maxapp}$  vs  $[S]$  para GOX,  $[E_{GOX}] = 0.0015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Panel C:*  $K_{O_2app}$  vs  $[S]$  para GalOx, *Panel D:*  $Act_{maxapp}$  vs  $[S]$  para GalOx,  $[E_{GalOx}] = 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Panel E:*  $K_{O_2app}$  vs  $[S]$  para lacasa, *Panel F:*  $Act_{maxapp}$  vs  $[S]$  para lacasa,  $[E_{Lacasa}] = 0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Tabla 4.1.** Valores de  $K_{O_2app}$  y  $Act_{max\ app}$  para tirosinasa obtenidos a partir del análisis diferencial de los parámetros cinéticos aparentes dependientes del oxígeno frente al sustrato principal  $[S]$ .  $[E_{tirosinasa}] = 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Tirosina (mM)	$K_{O_2app}$ ( $\mu\text{M}$ )	$Act_{max\ app}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )
1.8	11.6	4.07
1.5	13.3	3.32
1.2	19	3.15

Cabe destacar una particularidad en la **Figura 4.7C**. Se han descartado puntos a alta concentración de galactosa por haber sido mal interpretados en el ajuste hiperbólico. Al realizar la reacción de GalOx con HRP como activador, se detecta una fase de latencia al inicio de la reacción (**Figura 11.2**), que hace que este primer descenso sea más gradual de lo normal, y que el software interpreta como que se ha alcanzado la saturación de oxígeno ( $K_{O_2app}$  cercana a  $250\ \mu\text{M}$ ), pero en realidad no es así. Por otro lado, para la lacasa en la **Figura 4.7E**, sólo se han capturado los puntos de saturación de la hipérbola, así como en la **Tabla 4.1** sólo se muestran los valores de saturación de  $K_{O_2app}$  para la tirosinasa. El problema es que cuando se trabaja a  $[S]$  con valores cercanos de saturación con aire ( $200\ \mu\text{M}$ ), también empieza a limitar el sustrato principal, la velocidad de reacción disminuye mucho y no se consume por completo la concentración de oxígeno, por lo que se complica acometer el ajuste a una función hiperbólica. Además, el manejo de datos diferenciales requiere la diferenciación de los cursos temporales de oxígeno, por lo que aumentan los errores de propagación. En la siguiente sección, se muestra cómo interpretar y calcular la constante cinética utilizando directamente los datos integrales.

**Tabla 4.2.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir del análisis diferencial para cada enzima, con su análisis estadístico.

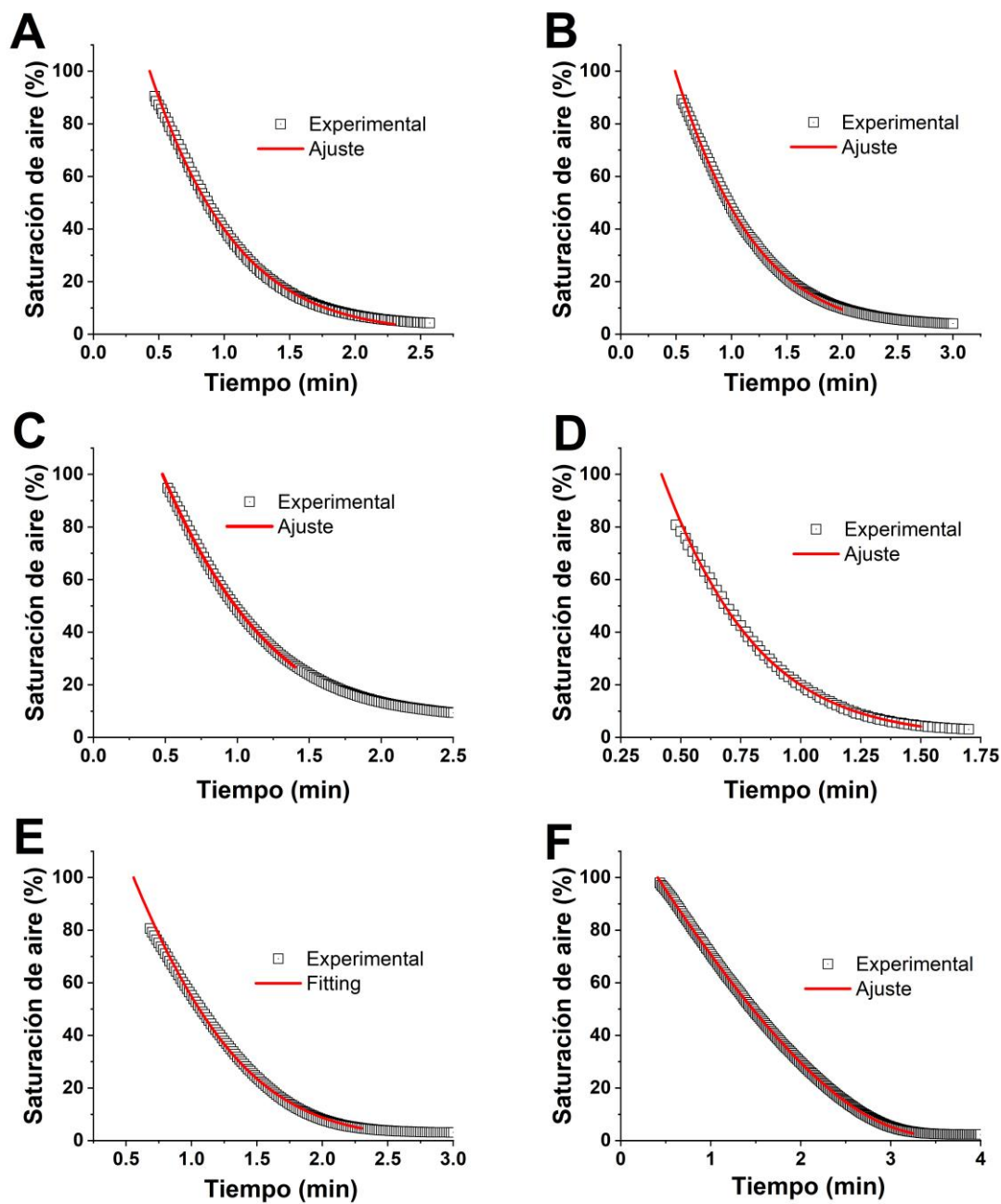
	GOX	GalOx_HRP	GalOx_K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Lacasa	Tirosinasa
<i>K<sub>Sapp</sub></i> (mM)	22.5 ± 2.78	32.9 ± 4.03	37.3 ± 2.74	0.465 ± 0.071	0.141 ± 0.015
<i>K<sub>O2</sub></i> (μM)	817 ± 121	1250 ± 238	1202 ± 267	264 ± 1.15	11.6 ± 0.58
<i>K<sub>S</sub></i> (mM)	55.4 ± 14.3	250 ± 47.5	241 ± 53.5	1.05 ± 0.046	0.147 ± 0.050
<i>Act<sub>max</sub></i> (μmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	895 ± 208	0.294 ± 0.033	2.33 ± 0.55	2.17 ± 0.045	4.07 ± 0.010
<i>SRC</i>	249	1812	888	3015	615
<i>RMSE</i>	1.44	3.11	2.94	15.7	4.4
<i>F Fischer</i>	32511	3811	4492	53284	63074
<i>AIC</i>	46	281	157	207	357

### 4.3. ELUCIDACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA DEL O<sub>2</sub>: ANÁLISIS INTEGRAL

En esta sección se emplean directamente los cursos temporales de oxígeno para el análisis cinético. La inspección cualitativa de los cursos temporales, como se muestra en la **Figura 4.4**, es muy útil para situar el rango significativo de las constantes cinéticas. Para la cuantificación, se realiza a continuación un análisis integral de simple respuesta con el software Berkeley Madonna. Cada curso temporal de oxígeno se ajustó de forma independiente para el cálculo de las constantes. Las **Figura 11.7-11.12** muestran todos los ajustes. Cabe mencionar que, cuando se obtienen datos integrales, emplear un método integral para estimar los parámetros conduce a valores más precisos que utilizando métodos diferenciales, porque de esta manera se evita el error al diferenciar.

Posteriormente, los cursos temporales de oxígeno se ajustaron al modelo Ping-Pong propuesto minimizando los residuos al cuadrado. Un ejemplo de los ajustes realizados se muestra en la **Figura 4.8**. La **Tabla 4.3** muestra los parámetros obtenidos del ajuste al modelo cinético, así como su bondad estadística. Se utilizaron las restricciones de la **Figura 4.3** para ayudar al ajuste disminuyendo un grado de libertad.

Los resultados muestran como la aplicación de un ajuste por simple respuesta alcanzó valores del mismo orden de magnitud que el análisis previamente realizado, **Tabla 4.2.**, pero con valores mejorados de los parámetros de bondad de ajuste (F, AICc).

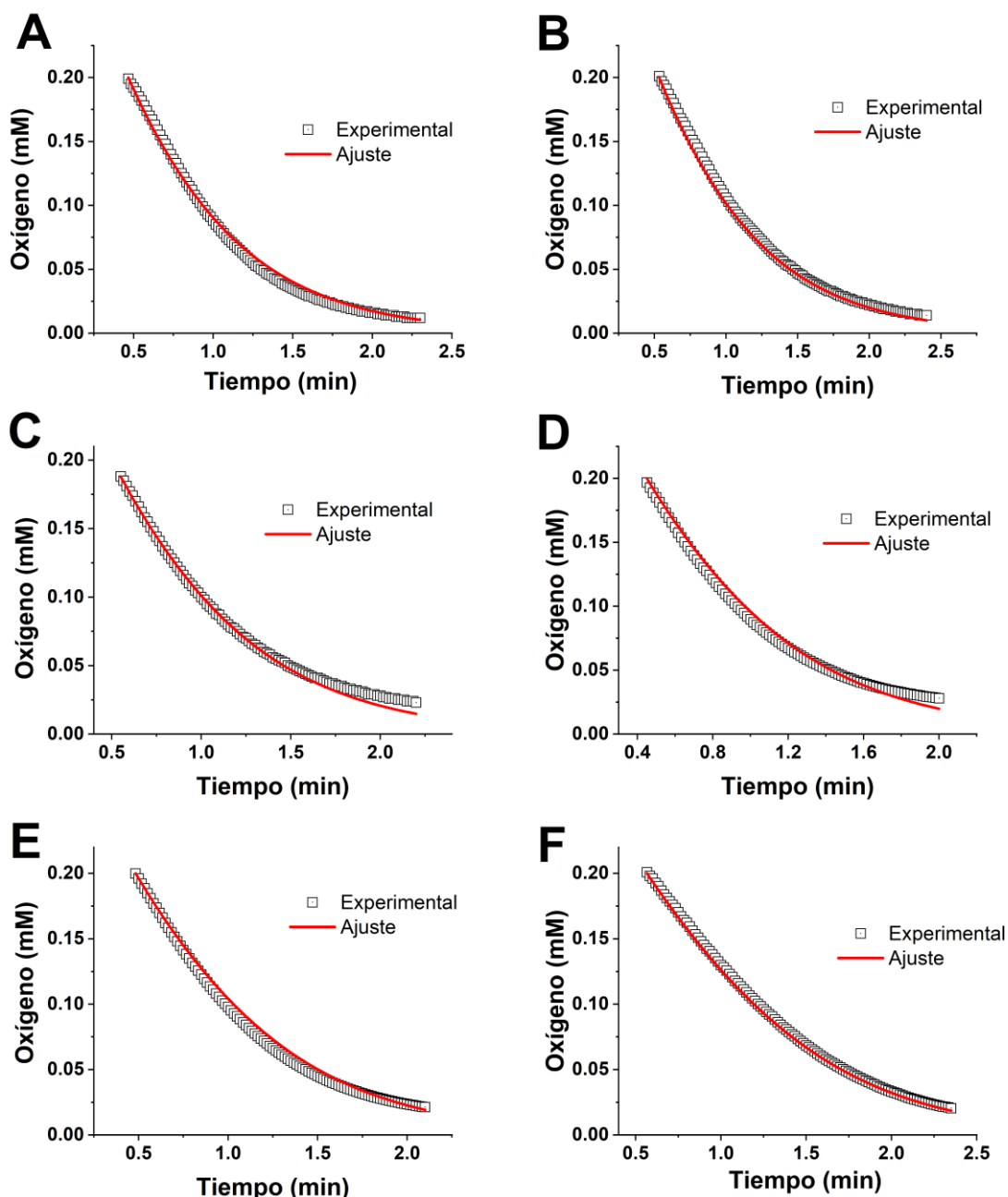


**Figura 4.8.** Ejemplo representativo del análisis integral de simple respuesta con BM para GOX. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 2000 mM; *Panel B:* 400 mM; *Panel C:* 100 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 10 mM; *Panel F:* 1 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).

**Tabla 4.3.** Parámetros cinéticos obtenidos del análisis integral por simple respuesta para cada enzima, con su análisis estadístico.

	GOX	GalOx_HRP	GalOx_K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Lacasa	Tirosinasa
<i>K</i> <sub>O<sub>2</sub></sub> (μM)	785 ± 122	1640 ± 175	1680 ± 184	348 ± 52.0	14.0 ± 3.6
<i>K</i> <sub>S</sub> (mM)	105 ± 15.8	287 ± 29.5	323 ± 41.7	1.22 ± 0.18	0.149 ± 0.016
<i>Act</i> <sub>max</sub> (μmol·min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )	740 ± 91.7	0.272 ± 0.103	3.062 ± 0.559	2.35 ± 0.49	4.12 ± 0.304
<i>SRC</i>	103	89	31	13.1	124
<i>RMSE</i>	0.71	0.70	0.59	0.292	0.48
<i>F Fischer</i>	1.23·10 <sup>6</sup>	9.85·10 <sup>5</sup>	3.08·10 <sup>5</sup>	2.21·10 <sup>6</sup>	4.27·10 <sup>6</sup>
<i>AICc</i>	-202	-180	-84.7	-357	-598

A continuación, se realizó el análisis integral de múltiple respuesta con el software Aspen Custom Modeler. Se utilizaron simultáneamente todos los cursos temporales de oxígeno variando la concentración inicial de sustrato y no se aplicó la restricción de la **Figura 4.3**. En este caso, se incluyen dos variables independientes al mismo tiempo en el ajuste, introduciendo efectos cruzados de estas variables y conduciendo a valores aún más precisos de los parámetros a estimar. Para ello, los datos de oxígeno-tiempo se ajustan al modelo Ping-Pong propuesto minimizando los residuos al cuadrado. Un ejemplo de los ajustes realizados se muestra en la **Figura 4.9**, y el conjunto completo de ajustes se muestran en los Anexos (**Figura 11.13-11.16**). La **Tabla 4.4** muestra los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste. Los valores de los parámetros de bondad del ajuste (F, AIC) mejoraron aún más.



**Figura 4.9.** Ejemplo representativo del análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 2000 mM; *Panel B:* 400 mM; *Panel C:* 100 mM; *Panel D:* 75 mM; *Panel E:* 50 mM; *Panel F:* 25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).

Es interesante observar la falta de ajuste a tiempos finales en algunos casos. Esto puede deberse a dos factores. El primero, fenomenológico, consiste en una tasa de consumo de oxígeno inferior a la esperada, probablemente debido a las dificultades para alcanzar niveles de anoxia en reactores no herméticos o a características más profundas del mecanismo cinético (como cierta reversibilidad en la reacción). El segundo factor es

específico del mecanismo de ajuste. El software tiende a ajustar mejor los datos del comienzo porque tienen un peso específico mayor, es decir, los residuos al cuadrado de los valores a concentraciones más altas son mayores y, por tanto, el software los minimiza más. Por lo tanto, la elección de la cantidad de enzima utilizada (y el perfil de tiempo de O<sub>2</sub> obtenido) debe adaptarse en función de la región pertinente para que los parámetros cinéticos obtenidos sean significativos.

**Tabla 4.4.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste por respuesta múltiple del análisis integral en Aspen para cada enzima.

	<b>GOX</b>	<b>GalOx</b>	<b>Lacasa</b>	<b>Tirosinasa</b>
<b><i>K</i><sub>O<sub>2</sub></sub> (μM)</b>	741 ± 3.0	2070 ± 18.0	305 ± 9.0	16.0 ± 1.47
<b><i>K</i><sub>S</sub> (mM)</b>	53.3 ± 1.5	460 ± 7.7	1.22 ± 0.18	0.150 ± 0.002
<b><i>Act</i><sub>max</sub> (μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)</b>	740 ± 91.7	3.06 ± 0.56	1.10 ± 0.01	5.43 ± 0.064
<b><i>SRC</i></b>	0.0702	0.161	0.00599	4.04
<b><i>RMSE</i></b>	0.0246	0.0360	0.00582	0.099
<b><i>F Fischer</i></b>	15625	151947	1624768	23822269
<b><i>AICc</i></b>	-775	-667	-1415	-1878

Una vez calculados los parámetros del modelo cinético, se pueden comparar con los parámetros disponibles en la literatura. Para la GOX, Ringborg y colaboradores [207] investigaron la oxidación de la glucosa a 25°C en un reactor de flujo tubular concéntrico, donde la concentración de oxígeno se varió de 0.2 a 7 mM, reportando una *K<sub>S</sub>* de 75 ± 9.4 mM y una *K<sub>O<sub>2</sub></sub>* de 520 ± 9.0 μM. Las pequeñas diferencias en los valores pueden deberse al tipo de reactor utilizado y a las mayores concentraciones de oxígeno empleadas en el reactor tubular concéntrico. Esa compleja configuración permite elevadas presiones de gas y un mejor estudio del *K<sub>O<sub>2</sub></sub>* debido al estudio de una mayor región de oxígeno, mientras que nuestra configuración es mucho más sencilla y fácil de implementar, pero requiere numerosos experimentos y un minucioso trabajo de cálculo. Sin embargo, un cuidadoso método de cálculo por etapas arroja valores similares para ambos parámetros.

En cuanto a la GalOx, Kwiatkowski y colaboradores [78] analizaron la oxidación de galactosa a 20°C con GalOx de *Dactylum dentroides* monitorizando el consumo de oxígeno a saturación de aire e informaron de una *K<sub>S</sub>* de 175 mM y una *K<sub>O<sub>2</sub></sub>* de 3000 μM, el último valor informado como incierto porque no se pudo alcanzar la saturación

completa de la enzima en las condiciones experimentales. Además, los valores se derivan basándose en el mecanismo bi bi ordenado, una suposición que posteriormente fue refutada [75,76]. Una medida más precisa de  $K_{O_2}$  fue llevada a cabo por Humphreys y colaboradores [81] realizando la reacción a 10°C y con  $K_3Fe(CN)_6$  como activador, disminuyendo así la velocidad de reacción y la concentración de oxígeno a la que se observaba la saturación de la enzima. En estas condiciones, y analizando la concentración de oxígeno entre 12-350  $\mu M$ , se determinó una  $K_{O_2}$  de 440  $\mu M$ , un valor muy inferior al reportado previamente e, incluso, inferior al aquí reportado, manifestando su dificultad de cálculo.

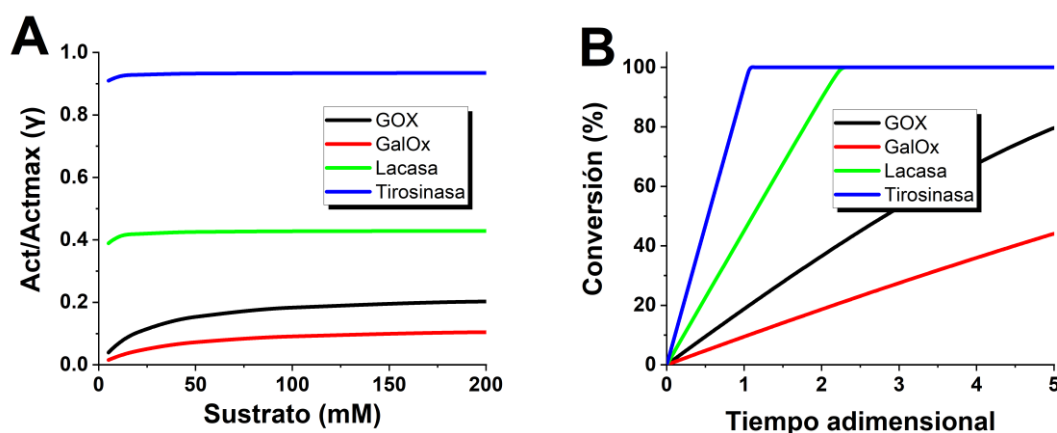
En el caso de la lacasa, Gigi y colaboradores [420] analizaron la enzima de *Botrytis cinerea* y estudiaron una serie de propiedades de la enzima intracelular y las compararon con las de la enzima extracelular para determinar si se producían cambios significativos durante la excreción al medio. Las  $K_{O_2}$  de la enzima extracelular e intracelular fueron de 250 y 370  $\mu M$ , respectivamente, en presencia de aire, siendo estos valores muy similares a los reportados en este estudio. Además, informaron que las diferencias en la velocidad de oxidación de numerosos sustratos fenólicos no eran muy grandes.

Para la tirosinasa fúngica, Muñoz-Muñoz y colaboradores [421] estudiaron la oxidación de la esculetina por un método cronométrico a 25°C y saturación de aire. En algunos casos en los que las o-quinonas generadas por las polifenol oxidasas son inestables, se ha propuesto el uso de un reductor como el ácido ascórbico, que las reduce instantáneamente a o-quinonas, para seguir la actividad enzimática, ya que la desaparición del ácido ascórbico puede seguirse espectrofotométricamente. El método cronométrico registra la absorbancia debida a la formación del producto una vez consumido el ácido ascórbico. Analizaron varios parámetros cinéticos a diferentes valores de pH y determinaron el  $K_{O_2}$  a pH 4.5 y 7.0 como  $41 \pm 4.1$  y  $40 \pm 4.0$   $\mu M$ , respectivamente, valores ligeramente superiores a los obtenidos en este estudio.

#### **4.4. APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO Y ANÁLISIS DE LOS CURSOS DE FORMACIÓN DE PRODUCTO CON EL TIEMPO**

Una vez realizada la modelización cinética y calculadas las constantes, se ha resumido en la **Figura 4.10A** la relación entre la actividad operativa y la actividad máxima de cada enzima variando la concentración del sustrato principal, mientras que en

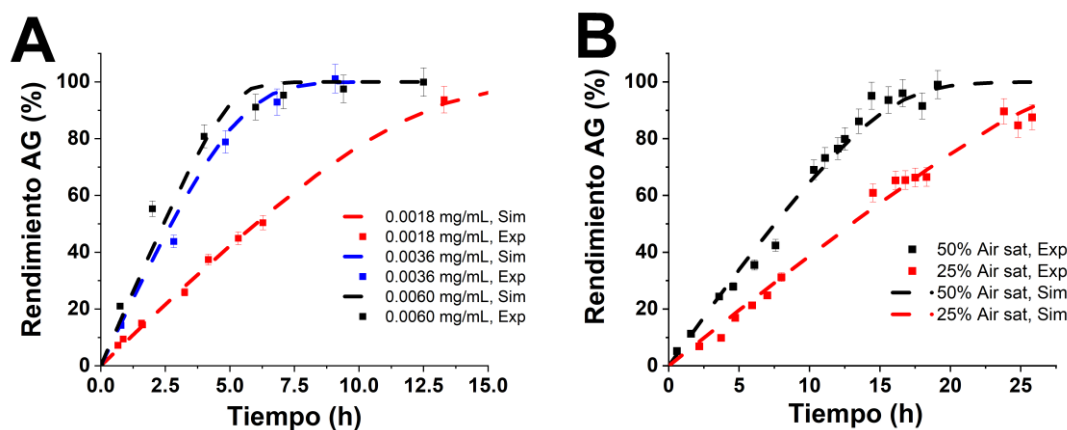
la **Figura 4.10B** se muestra un ejemplo de los cursos temporales de reacción de cada enzima. Ambas simulaciones se realizaron con los datos de la **Tabla 4.4**.



**Figura 4.10.** Análisis de los límites de operación y los cursos temporales de conversión de cada enzima. *Panel A:* Gamma ( $\gamma$ ) vs sustrato principal (mM). *Panel B:* Conversión (%) frente a tiempo adimensional.  $[O_2]=0.25$  mM,  $[S_0]=100$  mM,  $[E]=0.1$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $Act_{max}=500$  U·mg<sup>-1</sup>.

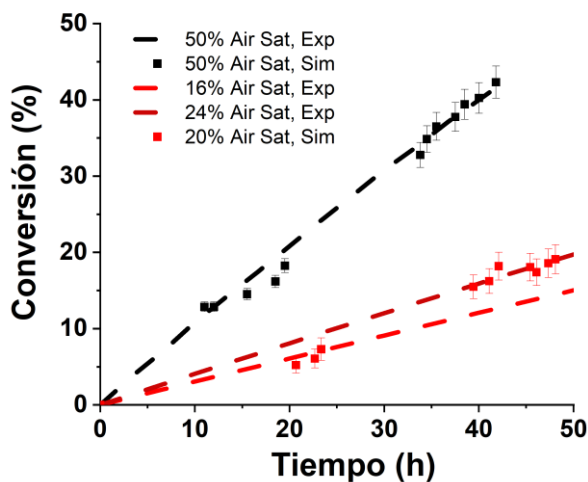
La **Figura 4.10A** muestra el valor máximo de  $\gamma$  ( $Act/Act_{max}$ ) para cada enzima, que depende de su limitación por oxígeno ( $O_2^*$ ), es decir, a menor  $K_{O_2}$ , aumenta el límite operacional de la enzima ( $\gamma$ ). Por otro lado, la variación de  $\gamma$  con el sustrato principal depende del  $K_S$  de cada enzima, de forma que, a mayor dependencia del sustrato principal, es decir, a mayor  $K_S$ , el límite operacional de la enzima ( $\gamma$ ) se alcanzará a mayores concentraciones. En la **Figura 4.10B** se puede observar cómo la conversión de cada enzima varía con el tiempo y que cuanto mayores son las constantes  $K_{O_2}$  y  $K_S$ , más lento es el consumo del sustrato a la misma concentración de enzima. La tirosinasa alcanza la mayor conversión prácticamente en el menor tiempo posible ya que opera casi a su máxima actividad. La lacasa, al tener un  $K_{O_2}$  ligeramente superior a la concentración de oxígeno de trabajo, empieza a estar limitada por el  $O_2$ , mientras que tanto la GOX como la GalOx están limitadas por ambos sustratos, siendo el  $K_{O_2}$  de la GOX inferior al de la GalOx, y, por tanto, alcanzando mayores conversiones al mismo tiempo. El tiempo adimensional se definió en la Ec 4.2, y corresponde a la relación entre el tiempo operacional y el tiempo característico de reacción, este último viene dado por el tiempo en el que se alcanza la conversión completa si la reacción ocurre a máxima velocidad (orden cero de reacción).

Para validar el modelo cinético propuesto, se aplicó un factor de escala de 1:100, es decir, los parámetros cinéticos se obtuvieron en 5 mL, mientras que la validación del modelo cinético se llevó a cabo en 500 mL de volumen de reacción. Además, este sistema de validación es más adecuado tanto desde el punto de vista industrial (similar a los tanques operados por lotes en la industria) como en el plano geométrico o fluidodinámico. La oxidación de la glucosa por la GOX se implementó en un reactor tipo tanque agitado de 1.0 L de capacidad con suministro continuo de aire. Como evaluación preliminar del proceso, se midió la concentración de ácido glucónico aplicando aireación superficial en reactores de 50 mL de volumen y 5 mL de líquido en un agitador rotatorio. La cantidad de enzima se ajustó para garantizar la saturación completa de aire mediante aireación superficial. Los experimentos preliminares se muestran en la **Figura 4.11A**. En la siguiente etapa, las reacciones se realizaron en un reactor tipo tanque agitado instrumentado. La saturación de aire se ajustó y controló a dos niveles: 50% y 25%. La **Figura 4.11B** muestra los resultados. Como se puede observar en la **Figura 4.11**, se consigue una buena predicción de los datos experimentales por el modelo cinético, incluso variando la cantidad de enzima y la  $[O_2]$ , validando así los parámetros del modelo cinético obtenidos previamente.



**Figura 4.11.** Rendimiento de ácido glucónico frente a tiempo para GOX. *Panel A:* con aireación superficial variando  $[E]$ .  $[Glucosa]_0 = 100$  mM,  $[Catalasa] = 0.10$  mg·mL<sup>-1</sup>, *Panel B:* variando la saturación de aire en reactor instrumentado,  $[Glucosa]_0 = 100$  mM,  $[GOX] = 0.0015$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $[Catalasa] = 0.15$  mg·mL<sup>-1</sup>. Simulación (líneas discontinuas) frente a datos experimentales (puntos). El rendimiento de ácido glucónico se define como la concentración de AG dividida por  $[Glucosa]_0$ .

Para continuar con la validación del modelo, se llevó a cabo el mismo procedimiento para la galactosa oxidasa. En primer lugar, como experimento preliminar, se efectuó la oxidación de galactosa con GalOx la mediante aireación superficial empleando reactores de 50 mL de volumen en un agitador rotatorio. Con esto se optimizaron las concentraciones de catalasa y activador. La cantidad de enzima se ajustó para garantizar la saturación completa de aire. Luego, se implementó la oxidación en un reactor de tanque agitado de 500 mL de volumen con suministro continuo de oxígeno y  $K_3Fe(CN)_6$  como activador. Estas pruebas preliminares se muestran en la **Figura 11.17**. La **Figura 4.12** muestra los cursos temporales experimentales y simulados para el reactor instrumentado. Cabe mencionar que no se logró mantener constante el % de saturación en aire a valores bajos debido a problemas en el control del caudal de gas, por lo que se dividió la simulación en los dos valores en que osciló la saturación. Finalmente, se observa una buena predicción de los datos experimentales mediante el modelo cinético, validando así los parámetros cinéticos obtenidos previamente para GalOx.



**Figura 4.12.** Conversión de galactosa frente a tiempo para GalOx variando la saturación de aire.  $[Galactosa]_0 = 20$  mM,  $[GalOx] = 0.05$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $[K_3Fe(CN)_6] = 0.05$  mg·mL<sup>-1</sup>,  $[Catalasa] = 0.2$  mg·mL<sup>-1</sup>. Simulación (líneas discontinuas) frente a datos experimentales (puntos).



---

---

**CAPÍTULO 5.**

**ANÁLISIS CINÉTICO DE**

**ENZIMAS**

**INMOVILIZADAS**

**OXIDATIVAS**

**DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>**

---

---



## **5. ANÁLISIS CINÉTICO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>**

En este capítulo, se aplica el análisis cinético a las enzimas inmovilizadas, añadiendo la variable de la carga enzimática en el biocatalizador. Ciertamente, en la bibliografía existe una ausencia muy clara de este tipo de estudios en enzimas inmovilizadas. Normalmente, se tiende a reportar únicamente los valores de las constantes de afinidad respecto al sustrato principal en su forma libre e inmovilizada [422–426] y muchas veces no se discute detalladamente el porqué de estos valores. Mucho menos común es la existencia de estudios cinéticos analizando las restricciones difusionales provocadas por la carga enzimática inmovilizada. Este capítulo profundiza sobre los efectos de variar la carga de oxidasa en las constantes de afinidad observables, apoyándonos en simulaciones y finalmente comparándolas con estudios experimentales.

Como soporte sólido se utilizó la agarosa 4BCL en todos los casos. En cuanto a las químicas de inmovilización empleadas, éstas fueron reversibles por adsorción iónica, basada en el intercambio aniónico sobre polietilenimina (PEI) [301] para GOX, lacasa y tirosinasa. Mientras que en GalOx se empleó una inmovilización iónica reversible por intercambio catiónico sobre dextrán sulfato (DS) [302,334], debido a la mayor densidad de cargas positivas en la superficie de la enzima.

Ciertamente, la inmovilización de la GalOx fue mucho más problemática que la de las otras enzimas. En primer lugar, se probó la misma estrategia que con las demás, la inmovilización empleando PEI. Sin embargo, los rendimientos de inmovilización fueron muy bajos (~ 20%) por lo que se exploraron otras alternativas. Posteriormente, se exploró la técnica de inmovilización irreversible multipuntual usando grupos glioxil. Este método otorgó rendimientos de inmovilización muy elevados (~ 95%), pero en la etapa de reducción de los enlaces [275] se reducía considerablemente la actividad recuperada (~ 30%). Por tanto, se decidió explorar otro método que no contara con este paso de reducción, el cual podría estar reduciendo también el cobre del centro activo. Se optó por la inmovilización irreversible multipuntual con grupos vinil-sulfona. Este método permite al soporte reaccionar con otros grupos diferentes al amino terminal y las lisinas, por lo que podría ser ventajoso [286,287]. Sin embargo, se requiere una etapa de bloqueo de los grupos vinil-sulfona remanentes y a una alta concentración de nucleófilo (1 M) lo que

disminuía también la actividad recuperada del biocatalizador. Finalmente, se decidió probar una inmovilización reversible por intercambio catiónico con dextrán-sulfato, aprovechando el elevado PI de esta enzima y la mayor densidad de cargas positivas en su superficie. Los resultados se muestran más adelante.

Los resultados en detalle de las inmovilizaciones de la GalOx se verán en el siguiente capítulo, mientras que este capítulo se centra en el análisis cinético.

### **5.1. LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO COMO PRINCIPAL PARÁMETRO DE CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA OXIDASA**

Como punto de partida, se han realizado simulaciones para estudiar la importancia del cálculo de las constantes de afinidad intrínsecas en la intensificación del proceso. Estas simulaciones se han realizado en estado estacionario utilizando como ejemplos oxidasas con la misma actividad máxima, pero con diferentes constantes de afinidad de oxígeno,  $K_{O_2}$ . Para aproximarnos a la perspectiva más realista, no se han considerado limitaciones cinéticas del sustrato principal,  $[S]/K_S=10$ , y la concentración de oxígeno es su valor de saturación en disolución acuosa a 30°C,  $[O_2]=0.23$  mM. Por otro lado, se ha considerado un radio medio de partícula de 75  $\mu\text{m}$ , y una difusividad del oxígeno en la partícula de 300  $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

Si una partícula de biocatalizador no se ve afectada por limitaciones a la transferencia de materia, la concentración de sustrato en el interior de la partícula es constante e igual a la concentración en la superficie,  $[O_{2S}]$ . Pero si existen limitaciones difusionales, este valor disminuye en función del balance de oxígeno correspondiente en el interior de la partícula, que depende de la difusividad, del radio de la partícula y de la cinética de la enzima. La relación entre las dos concentraciones viene definida por el factor de eficacia, que es, por tanto, una medida de limitación por transferencia de materia que posee el catalizador [407].

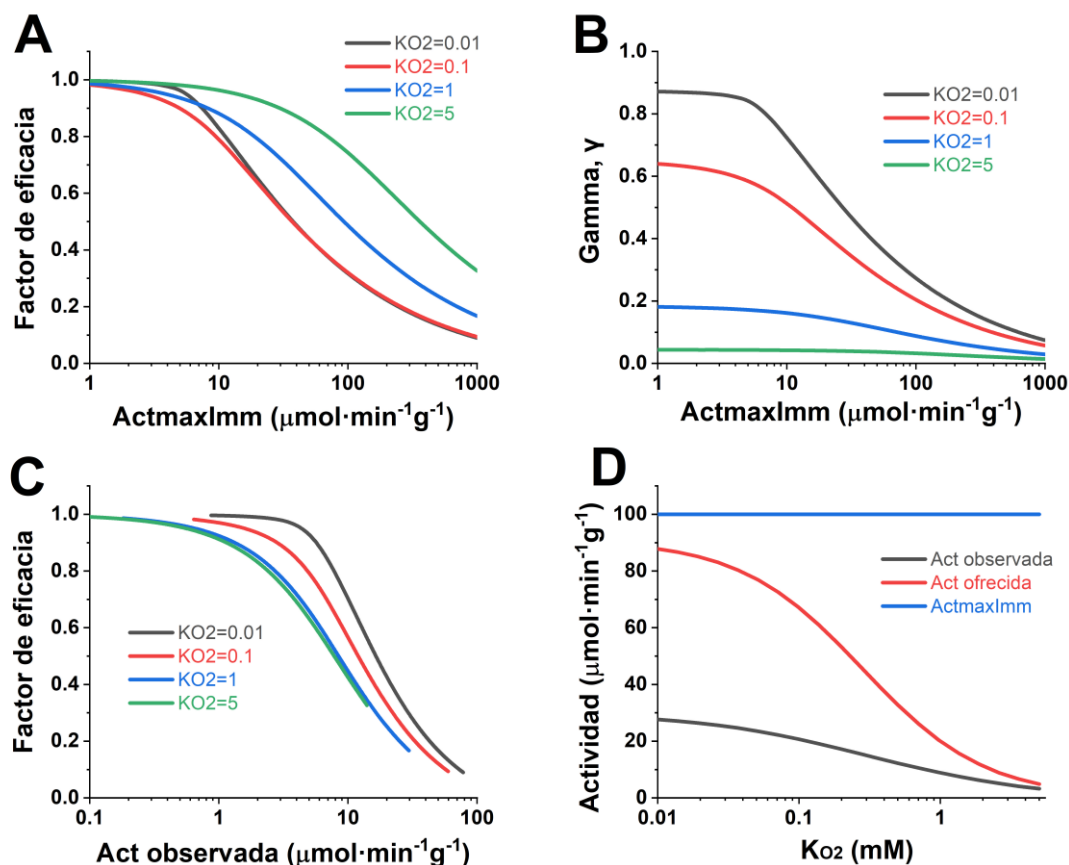
Por lo tanto, es interesante observar la variación del factor de eficacia con la carga enzimática a diferentes valores de la constante de afinidad para el oxígeno,  $K_{O_2}$ , **Figura 5.1A**. Esta figura sería equivalente a la ilustración típica mostrada en varios libros de ingeniería de la reacción química, donde el factor de eficacia disminuye a medida que aumenta el módulo de Thiele [406,407]. Puesto que el módulo de Thiele engloba la constante cinética de la reacción, y ésta depende de la carga de enzima, el efecto neto es similar. A medida que se aumenta la carga de enzima en la partícula, se incrementan las

restricciones difusionales, haciendo que el oxígeno medio al que trabaja la partícula sea inferior al medido en el seno de la disolución.

Por otro lado, la relación  $Act_{obs}/Act_{max}$ , conocida como gamma ( $\gamma$ ), se analizó con la variación de la carga enzimática a diferentes valores de la constante de afinidad del oxígeno, **Figura 5.1B**. Este caso, como se trabaja con enzimas inmovilizadas se ha definido como  $Act_{maxImm}$ , pero es la homóloga a la  $Act_{max}$  en enzimas inmovilizadas.  $\gamma$  es una medida del grado de aprovechamiento de la actividad enzimática y está fuertemente determinada por la constante de afinidad de oxígeno ( $K_{O_2}$ ). Este parámetro,  $\gamma$ , disminuye con la carga de enzima inmovilizada debido al aumento de las restricciones difusionales sobre la actividad observable, mientras que la actividad máxima inmovilizada aumenta proporcionalmente a la carga de enzima inmovilizada. Sin embargo, en este caso son las enzimas con menor dependencia del oxígeno, menor  $K_{O_2}$ , las que alcanzan un mayor valor absoluto de  $\gamma$ , ya que la concentración de oxígeno necesaria para su saturación es menor.

La **Figura 5.1C** muestra la variación del factor de eficacia con la actividad observada. En primer lugar, se observa una región dónde el factor de eficacia se mantiene constante en su valor máximo, dónde la actividad todavía es muy baja, y no existen restricciones difusionales. Posteriormente, esos valores van disminuyendo paulatinamente, comenzando por aquellos de  $K_{O_2}$  elevada. Los valores de factor de eficacia más altos se obtienen a  $K_{O_2}$  bajas, puesto que ahora se varía  $Act_{obs}$ , y ésta aumenta más de lo que aumenta la actividad ofrecida al disminuir la  $K_{O_2}$ . Esto puede ser contraintuitivo, puesto que es el comportamiento contrario a la **Figura 5.1A**, pero la diferencia reside en la actividad representada en el eje de abscisas.

La **Figura 5.1D** se ha diseñado para comprender mejor el comportamiento tanto del factor de eficacia como de  $\gamma$  con la constante de afinidad de oxígeno, ya que puede resultar algo contraintuitivo. Esta ilustración muestra actividades enzimáticas inmovilizadas características. En primer lugar, la actividad observable o medida,  $Act_{obs}$ ; a continuación, la actividad en la fase líquida de la inmovilización medida en condiciones estándar,  $Act_{ofrecida}$ ; y, por último, la actividad máxima alcanzable de la enzima inmovilizada,  $Act_{maxImm}$ . La relación entre  $Act_{obs}$  y  $Act_{ofrecida}$  es el factor de eficacia, que aumenta a medida que se incrementa  $K_{O_2}$ , ya que ambas actividades se aproximan al mismo valor. La relación entre  $Act_{obs}$  y  $Act_{maxImm}$  es  $\gamma$ , que disminuye al aumentar  $K_{O_2}$ , ya que cada vez se necesita más  $O_2$  para saturar la enzima. Así, para una misma carga enzimática, el aumento de la constante de afinidad del oxígeno aumenta el valor del factor de eficacia, pero al mismo tiempo disminuye el valor de gamma.



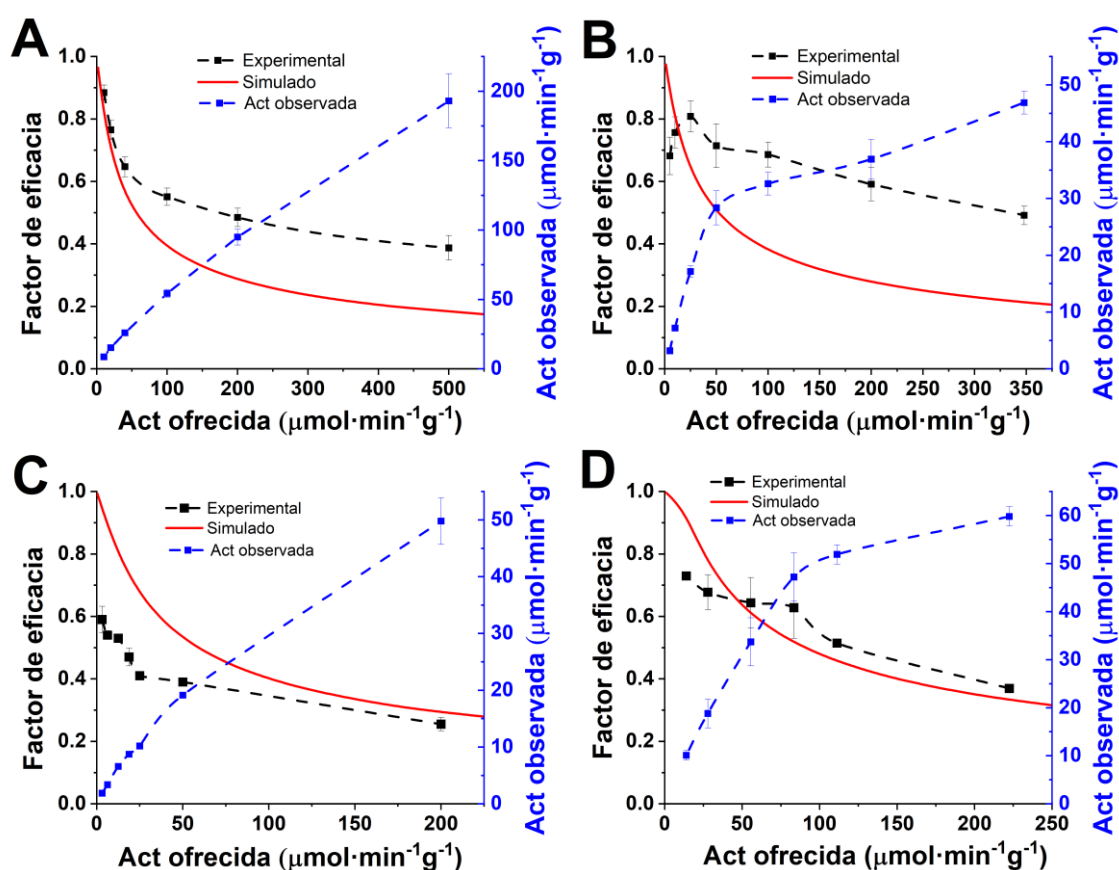
**Figura 5.1.** Ejemplo de una simulación del factor de eficacia y  $\gamma$  con la carga enzimática y  $K_{O_2}$ . *Panel A:* Variación del factor de eficacia con la actividad máxima de la enzima inmovilizada a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel B:* Variación de  $\gamma$  con la actividad máxima de la enzima inmovilizada a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel C:* Variación del factor de eficacia con la actividad observada de la enzima inmovilizada a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel D:* Actividad máxima inmovilizada, actividad ofrecida y actividad observable en función de la constante de oxígeno,  $K_{O_2}$  (mM),  $Act_{maxImm}=100 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ , condiciones estándar:  $[O_2]=0.23 \text{ mM}$ ,  $[S]/K_S=10$ ; Condiciones comunes a todos los paneles:  $[O_2]=0.23 \text{ mM}$ ,  $[S]/K_S=10$ ,  $Act_{max}=100 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{enzima}^{-1}$ ,  $m_{cat}=0.1 \text{ mg soporte/mL reactor}$ ,  $radio \text{ de partícula}=75 \mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

## 5.2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA OBSERVABLE DE LAS OXIDASAS INMOVILIZADAS

A la hora del diseño del biocatalizador, lo ideal es una máxima expresión de actividad manteniendo una elevada estabilidad, sin embargo, a veces hay que priorizar la maximización de una u otra. Esto puede ocurrir en los casos de inmovilización covalente, dónde la rigidificación de la estructura de la enzima es muy positiva para mejorar su estabilidad, pero en algunos casos esto provoca una disminución de la actividad expresada

[219]. Por otro lado, el uso de cargas enzimáticas elevadas dará lugar a una mayor actividad, pero a costa del aumento de restricciones difusionales. Por tanto, es interesante encontrar un equilibrio entre la actividad observable y la actividad ofrecida, y estudiar cada caso para saber en qué región de efectividad catalítica nos encontramos. En la **Figura 5.2** se muestran las ilustraciones de factor de eficacia frente a actividad observada y ofrecida para cada enzima.

Con esas químicas superficiales los rendimientos de inmovilización alcanzados fueron superior al 90% excepto en la GalOx, que fue menor, los detalles se encuentran en las **Tabla 11.1-11.4**.



**Figura 5.2.** Valores experimentales y simulados del factor de eficacia frente a la actividad ofrecida. *Panel A:* GOX en PEI-Ag,  $Act_{standard}=100 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{enzima}^{-1}$ ,  $[S]/K_S=0.95$ ; *Panel B:* GalOx en DS-Ag,  $Act_{standard}=1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{enzima}^{-1}$ ,  $[S]/K_S=0.87$ ; *Panel C:* lacasa en PEI-Ag,  $Act_{standard}=0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{enzima}^{-1}$ ,  $[S]/K_S=4.59$ ; *Panel D:* tirosinasa en PEI-Ag,  $Act_{standard}=2.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{enzima}^{-1}$ ,  $[S]/K_S=6.67$ . Los rendimientos de inmovilización se muestran en las **Tabla 11.1-11.4**. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7, excepto para la lacasa, que se realizó en 100 mM de acetato sódico a pH 5. El radio de partícula de la agarosa era de 50-150  $\mu\text{m}$ .

Condiciones para las simulaciones:  $[O_2]=0.23$  mM, carga enzimática= $0.1$  mg·g<sub>supp</sub><sup>-1</sup>,  $m_{cat}=0.1$  mg soporte·mL<sup>-1</sup> reactor,  $radio\ de\ partícula=75$  μm,  $Deff_{O_2}=900$  μm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>. Los valores de  $K_S$  y  $K_{O_2}$  para la simulación de cada enzima se obtuvieron de [208]).

La **Figura 5.2A**, para GOX, muestra un gráfico muy típico del factor de eficacia, comenzando casi en la unidad y disminuyendo gradualmente a medida que aumenta la carga enzimática. Muy interesante es, que la curva de factor de eficacia experimental se sitúa significativamente por encima de la simulada, indicando un  $Deff_{O_2}$  superior (seguramente) al empleado en la simulación, además de la ausencia prácticamente de efectos de inmovilización (modificación de la estructura terciaria de la enzima) [174,269].

Para la GalOx, **Figura 5.2B**, se observan unos valores de factor de eficacia bastante elevados, lo que indica una buena conservación estructural de la enzima, posiblemente debido a la naturaleza suave de la inmovilización reversible. Además, se observa una tendencia a la saturación de la cantidad inmovilizada dentro de la matriz polimérica, como demuestra la disminución del rendimiento de inmovilización (**Tabla 11.2**). En consecuencia, el factor de eficacia presenta una tendencia decreciente más suave en comparación con la GOX, mostrando una menor dependencia de la actividad enzimática ofrecida. Este comportamiento puede atribuirse a la menor actividad volumétrica dentro del soporte y/o al menor impacto de las restricciones difusionales en esta química de inmovilización, que se estudiará más adelante. El tamaño relativamente grande del polímero de sulfato de dextrano podría impedir que la enzima se distribuyera homogéneamente dentro de la partícula y/o permitiendo un mejor acceso del oxígeno al interior, contribuyendo a estas observaciones [203,427].

Para lacasa y tirosinasa, **Figura 5.2C-D** respectivamente, se observa que a cargas enzimáticas muy bajas el factor de eficacia no alcanza la unidad, indicando la existencia de efectos de inmovilización y/o impedimentos de accesibilidad del oxígeno (sobre todo en lacasa). Esto puede deberse a modificación estructural como el desplegamiento de la proteína o, dado que esta inmovilización no es muy invasiva, es más probable que se deba a una falta de accesibilidad al centro activo por parte del sustrato debido a que la capa polimérica podría actuar como barrera. Asimismo, en ambos casos se puede observar que la tendencia al aumento de la carga enzimática ofrecida es una disminución exponencial del factor de eficacia, aunque de forma más lineal quizás para la tirosinasa.

Estos resultados muestran la importancia de tener en cuenta tanto la carga enzimática como las variables que influyen en las limitaciones difusionales (soporte,

tamaño de partícula, tamaño de poro...) a la hora del diseño del biocatalizador. Estos aspectos también son fundamentales en la elucidación de los parámetros del modelo cinético y una posterior predicción de cursos de reacción.

### **5.3. SIMULACIÓN DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD EN FUNCIÓN DE LA CARGA ENZIMÁTICA EN ENZIMAS INMOVILIZADAS**

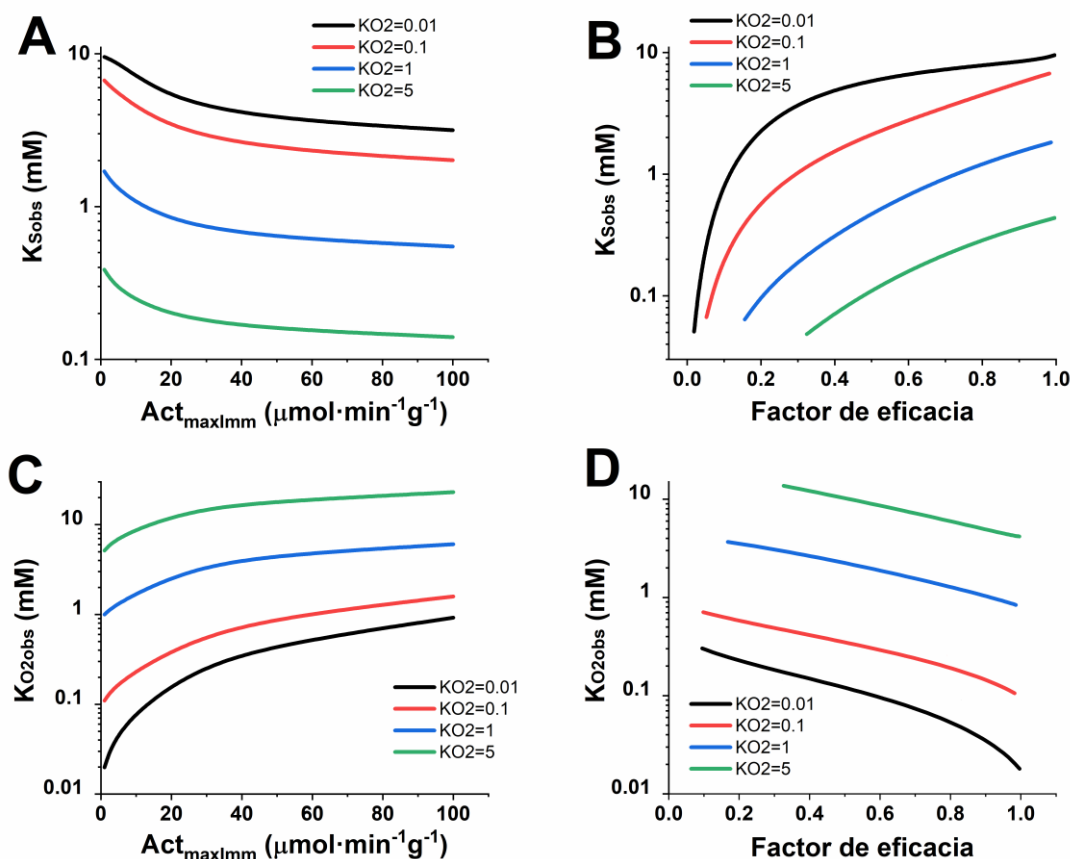
Por lo tanto, para establecer el modelo cinético de una enzima inmovilizada, habrá que tener en cuenta su efectividad catalítica, ya que ésta no operará al máximo de su actividad como enzima soluble. Para ello, habría que incluir en el modelo el factor de eficacia o la actividad máxima de la enzima inmovilizada (con lo que el factor de eficacia no partiría de la unidad), así como el cálculo de las constantes cinéticas observables a las diferentes cargas de enzima.

Midiendo la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de oxígeno o de sustrato principal, pueden obtenerse las constantes de afinidad aparentes, según las Ec 3.7 y 3.10. Estos parámetros informan de la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la actividad máxima de una enzima cuando la concentración del otro sustrato es constante. Pero en enzimas inmovilizadas estos parámetros pueden variar en función de la carga enzimática del catalizador. Esto se debe al efecto de las restricciones difusionales, que disminuyen la concentración de oxígeno en el interior de la partícula y, por tanto, se trabaja a  $[O_2]$  distintas en cada caso. Para una mejor aclaración de los términos se ha desarrollado la **Tabla 5.1** dónde se muestra la nomenclatura de las constantes de afinidad en función de los términos que varían. Las constantes aparentes se calculan variando  $[S]$  a  $[O_2]$  inicial (0.23 mM), hacen referencia a la enzima libre, por lo que no dependen de la carga enzimática. Mientras que, en las constantes observables, además se introduce la variable de la carga enzimática a un valor fijo, por lo que habrá una constante observable para cada carga enzimática estudiada.

**Tabla 5.1.** Nomenclatura de las constantes de afinidad en función de la variación del sustrato principal, el oxígeno y la carga enzimática.

	[S]	[O <sub>2</sub> ]	Carga enzimática	Modelo
<b>K<sub>Sapp</sub></b>	Variable	Fijo	-	Ping-Pong bi-sustrato
<b>K<sub>Sobs</sub></b>	Variable	Fijo	Fijo	Ping-Pong bi-sustrato
<b>K<sub>O<sub>2</sub>app</sub></b>	Fijo	Variable	-	Ping-Pong bi-sustrato
<b>K<sub>O<sub>2</sub>obs</sub></b>	Fijo	Variable	Fijo	Ping-Pong bi-sustrato
<b>K<sub>Mapp</sub></b>	Variable	Fijo	-	Ping-Pong simplificado
<b>K<sub>Mobs</sub></b>	Variable	Fijo	Fijo	Ping-Pong simplificado

Posteriormente, se simuló el comportamiento de las constantes de afinidad aparentes a diferentes concentraciones tanto de oxígeno como de sustrato principal para estudiar la influencia de la carga enzimática en enzimas con diferentes constantes de afinidad intrínsecas respecto al oxígeno,  $K_{O_2}$ , como se muestra en la **Figura 5.3**. Además, se ha incorporado el factor de eficacia en las gráficas para tener en cuenta el rendimiento de inmovilización experimental, ya que la actividad ofrecida no lo hace.



**Figura 5.3.** Variación de las constantes observables del modelo cinético en función de la actividad máxima inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) y del factor de eficacia a diferentes valores del  $K_{O_2}$  intrínseco (mM). *Panel A:*  $K_{Sobs}$  vs actividad ofrecida,  $K_S=10$  mM; *Panel B:*  $K_{Sobs}$  vs factor de eficacia; *Panel C:*  $K_{O_2obs}$  vs actividad ofrecida,  $K_S=10$  mM; *Panel D:*  $K_{O_2obs}$  vs factor de eficacia,  $K_S=10$  mM. Condiciones para las simulaciones:  $[O_2]_0=0.23$  mM,  $[S]/K_S=10$ ;  $Act_{max}=100 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}_{\text{enzyme}}^{-1}$ ,  $m_{cat}=0.1$  mg soporte/mL reactor,  $\text{radio de partícula}=75 \mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

Las **Figura 5.3A-B** muestran un descenso de los valores de  $K_{Sobs}$  cuándo aumenta la actividad máxima inmovilizada (o cuándo disminuye el de factor de eficacia). Este descenso además es más pronunciado cuándo más alta es la dependencia de oxígeno ( $K_{O_2}$  altas). Esto significa que, si se realiza un experimento para calcular la dependencia del sustrato principal de una enzima inmovilizada, teóricamente se verá cómo ésta disminuye con la carga de enzima. Esto se puede entender mucho mejor observando la Ec 3.8. A medida que aumenta la carga enzimática, disminuye la  $[O_2]$  en la partícula, y, esta disminución afecta más a la  $K_{Sobs}$  cuándo la  $K_{O_2}$  tiene valores más bajos. Es interesante resaltar, que, en las condiciones de la simulación, para enzimas con muy baja dependencia

de  $O_2$ , la  $K_{Sobs}$  de una enzima inmovilizada con muy alta carga puede ser hasta 100 menor que el  $K_{Sapp}$  de la enzima soluble. Esto, por otro lado, se puede confundir con un aumento de afinidad del sustrato por la enzima inmovilizada, como se menciona en algunos estudios [425,426,428].

El comportamiento de la  $K_{O2obs}$  frente la actividad máxima inmovilizada y el factor de eficacia se muestra en las **Figura 5.3C-D**. En este caso la tendencia es la contraria a la que ocurre con la  $K_{Sobs}$ . Se observa un incremento de la  $K_{O2obs}$  cuando aumenta la carga enzimática, que es más pronunciada cuanto menor es la dependencia de oxígeno ( $K_{O2}$  bajas). Esto cobra sentido si se considera que un aumento de carga enzimática conlleva a un descenso de la concentración de oxígeno dentro de la partícula en estado estacionario, a causa de las limitaciones difusionales, y, por tanto, se requiere una mayor concentración de oxígeno en el líquido para saturar la partícula. Para un mejor entendimiento, se ha desarrollado la **Figura 11.20**, en la que se muestra la variación de  $\gamma$  ( $Act/Act_{max}$ ) con el oxígeno a distintos valores de  $K_{O2}$ , carga enzimática y  $[S]/K_S$  (limitación del sustrato principal); y, cuanto más curva es la tendencia, menor es la  $K_{O2obs}$ .

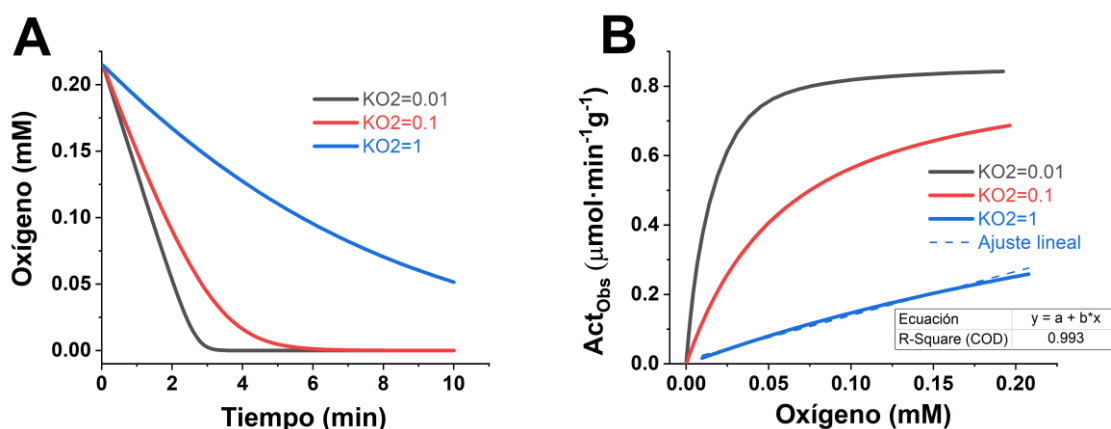
#### **5.4. SIMPLIFICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO PARA LOS CASOS DE ALTA DEPENDENCIA DEL OXÍGENO**

En los casos en los que se tiene una elevada dependencia de oxígeno,  $K_{O2} \gg \gg 0.215$  mM (concentración de oxígeno en medio acuoso a 100 mM de tampón fosfato) el modelo cinético Ping-Pong bi-sustrato puede simplificarse para ser de orden 1 respecto al oxígeno, Ec 4.7, ya que nuestro montaje experimental no permite alcanzar valores más altos de  $[O_2]$ . Además, esta simplificación es interesante cuando se trabaja con aire en medio acuoso. La **Figura 5.4** muestra que, en nuestra ventana de operación, la concentración de oxígeno sigue una tendencia lineal. Esto ocurre en los casos de GOX y GalOx, basándonos en los valores de  $K_{O2}$  calculados previamente para la enzima libre [208].

$$R = \frac{-dS}{dt} = \frac{-dO_2}{dt} = \frac{Act_{max} \cdot [E] \cdot [S] \cdot [O_2]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ec 5.1})$$

Esta simplificación se realiza para facilitar el cálculo de las constantes del modelo cinético, ya que, en estos casos, las gráficas actividad frente  $[O_2]$  siguen una tendencia lineal y falta información experimental a mayores  $[O_2]$  para determinar el valor de  $K_{O2}$  y  $K_S$  con precisión. De este modo, simplificamos el modelo cinético para tener una sola

constante de afinidad,  $K_M$ . Esta constante sólo se puede obtener variando la concentración de sustrato principal a  $[O_2]$  fijas, ya que la tendencia respecto al oxígeno es siempre lineal (excepto si limita el sustrato principal,  $S \lll K_S$ ).



**Figura 5.4.** Justificación de la simplificación del modelo cinético para los casos de alta  $K_{O_2}$  (GOX y GalOx). *Panel A:* Cursos de oxígeno-tiempo para diferentes  $K_{O_2}$ . *Panel B:* Perfil de actividad observable frente al oxígeno, a diferentes  $K_{O_2}$ . El perfil  $K_{O_2}=1$  se ajustó a una línea recta, obteniéndose un coeficiente  $R^2$  elevado. Condiciones de simulación:  $[O_2]_{initial}=0.215$  mM,  $K_S=100$  mM,  $[S]_{initial}=100$  mM  $Act_{max}=10 \mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{enzyma}})^{-1}$ , Carga enzimática= $0.1 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{supp}}^{-1}$ ,  $m_{cat}=10 \text{ mg soporte}\cdot\text{mL}_{\text{reactor}}^{-1}$ , *radio de partícula*=  $75 \mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

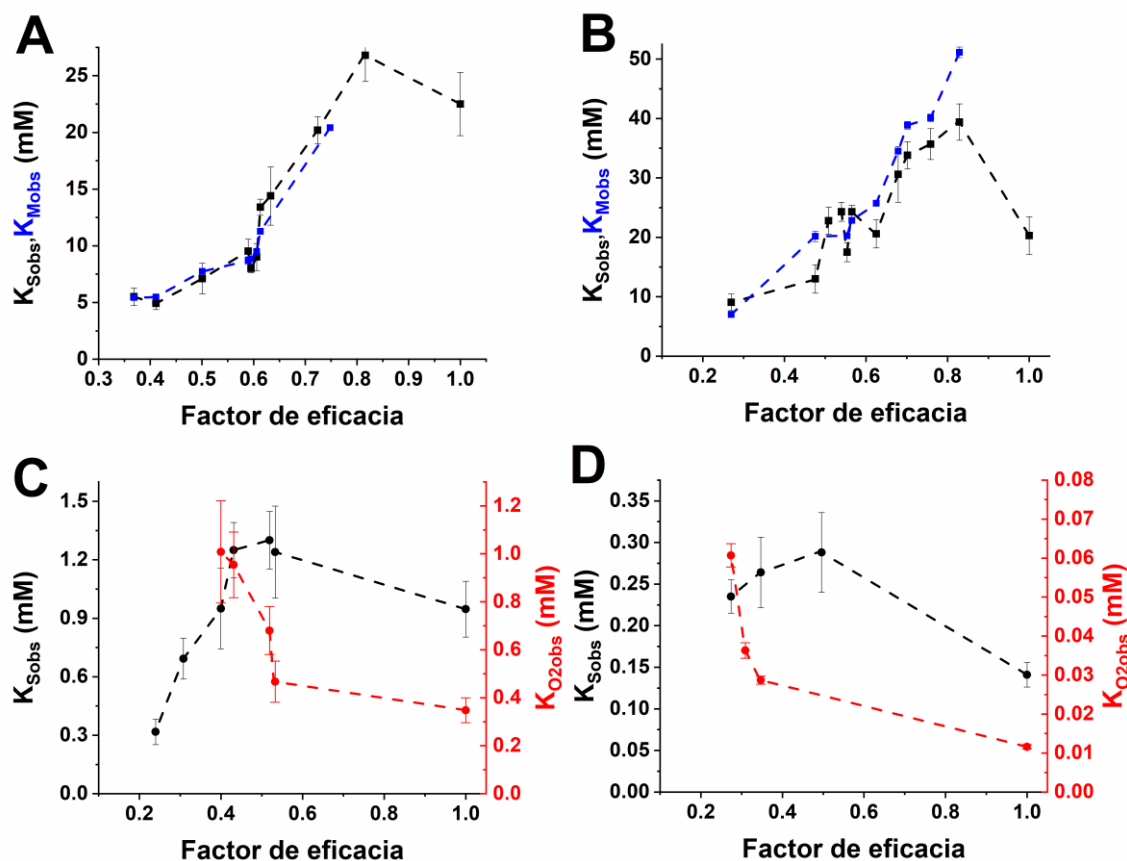
## 5.5. EVALUACIÓN DE LAS CONSTANTES EXPERIMENTALES DE AFINIDAD OBSERVABLES EN FUNCIÓN LA CARGA ENZIMÁTICA

A continuación, se investiga lo que ocurre con las constantes experimentales de afinidad observables desde el punto de vista del sustrato principal y del  $O_2$ , cuando se varía la carga enzimática, **Figura 5.5**, para corroborar las hipótesis obtenidas de las simulaciones realizadas en el apartado 5.3. Para el estudio de  $K_{Sobs}$  se preparan biocatalizadores a varias cargas de enzima y se mide la tasa inicial de consumo de oxígeno a distintas  $[S]$ . Después, se realiza el ajuste hiperbólico de tipo Michaelis-Menten para obtener las constantes de afinidad, **Figura 11.21-11.24**.

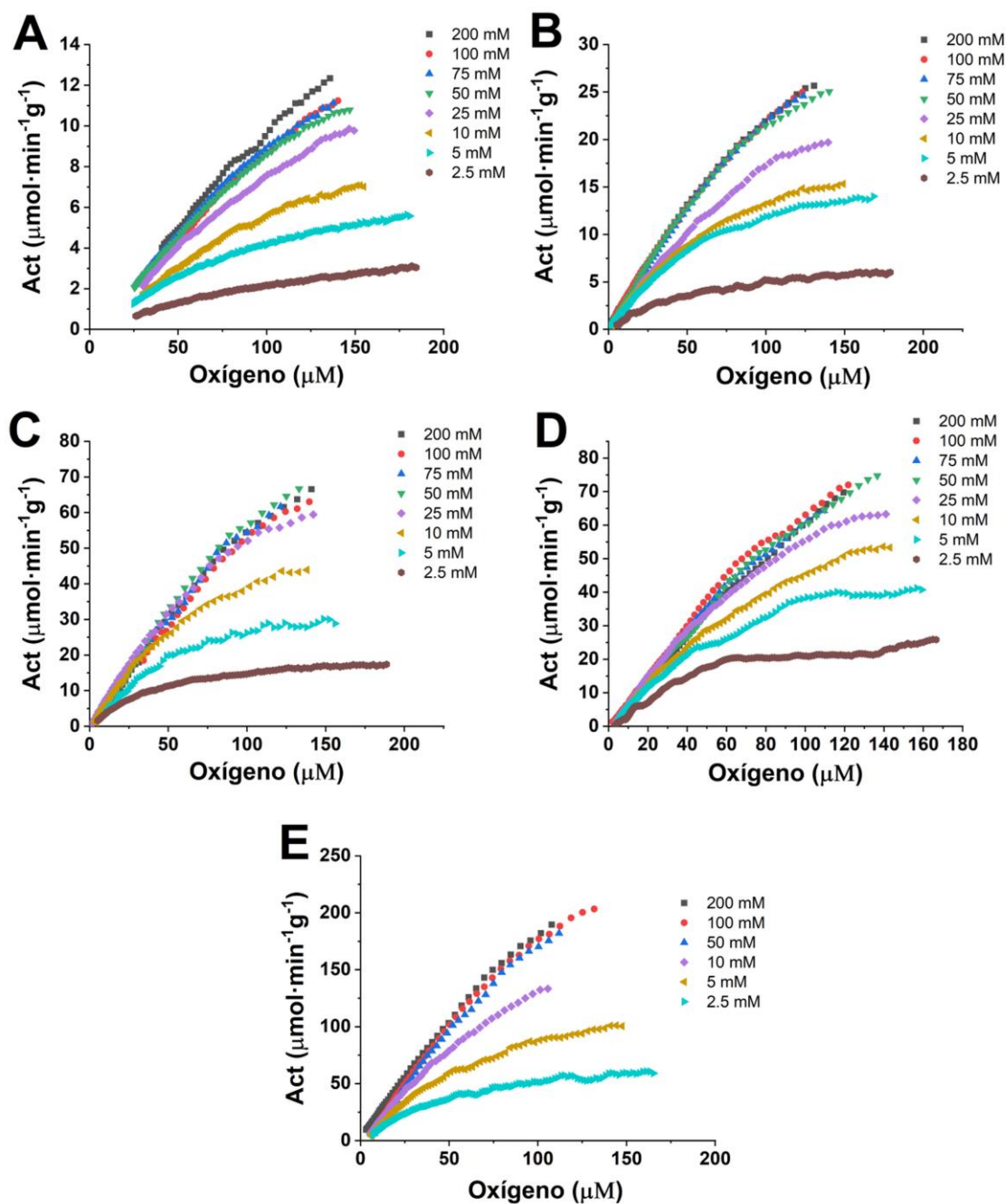
Para el estudio de la  $K_{O_2obs}$ , se preparan biocatalizadores a varias cargas de enzima (como anteriormente) y se mide el curso completo de consumo de oxígeno a distintas  $[S]$ . Después, se correlacionan las  $K_{O_2app}$  obtenidas a varias  $[S]$  mediante la Ec 3.11. En este paso es importante modular la carga de catalizador en la reacción para obtener un consumo completo del oxígeno, sino el ajuste perderá precisión. Después, se realiza el ajuste hiperbólico de tipo Michaelis-Menten para obtener las constantes de afinidad. En

la **Figura 5.6** se muestra el análisis diferencial para la GOX a modo de ejemplo, el resto se muestran en los Anexos (**Figura 11.25-11.27**). Como se dice anteriormente, para los casos de alta  $K_{O_2}$  (GOX y GalOx) se realiza el ajuste al modelo simplificado para obtener sólo  $K_{Mobs}$  como constante de afinidad. Esto se realizó mediante el análisis integral de los cursos de oxígeno a distintas  $[S]$  y cargas enzimáticas.

La **Figura 5.6** muestra la dependencia de la actividad de GOX del oxígeno para distintas cargas de enzima inmovilizada. Debido al tiempo de respuesta del sensor de  $O_2$  robusto utilizado, que es bajo, pero no despreciable, se observa cierta curvatura en la tendencia de la  $[O_2]$  cerca de la saturación con aire. Por tanto, se intentó usar un sensor con un tiempo de respuesta inferior, pero la respuesta fue demasiado inestable, con demasiado ruido. A simple vista no se aprecian diferencias significativas entre los paneles, lo cual es normal puesto que la ventana de operación de oxígeno es muy reducida (0-200  $\mu M$ ) para esta enzima ( $K_{O_2} \approx 0.8$  mM). Sin embargo, observando más en detalle, se aprecian líneas más divergentes y curvas a bajas cargas de enzima, mientras que más convergentes y rectas a altas cargas, similar a lo que ocurre en la **Figura 11.28**. Este cambio a veces es bastante sutil y en la simulación se observa bien, pero experimentalmente es mucho más complicado, ya que requiere una modificación considerable de la actividad observada (y de la carga de enzima inmovilizada) y, además, a cargas de enzimas bajas es necesario aumentar considerablemente la carga de catalizador en la reacción. Por ello, posteriormente se aplica un análisis más detallado, el análisis integral.



**Figura 5.5.** Valores experimentales de las constantes cinéticas en función del factor de eficacia.  $K_{Sobs}$  calculada a partir de un ajuste hiperbólico de la actividad frente a la concentración de sustrato, y tanto  $K_{O2obs}$  como  $K_{Mobs}$  obtenidas a partir del análisis integral de cada carga enzimática. *Panel A:*  $K_{Sobs}$ ,  $K_{Mobs}$  vs factor de eficacia para GOX en PEI-Ag; *Panel B:*  $K_{Sobs}$ ,  $K_{Mobs}$  vs factor de eficacia para GalOx en VS-Ag. *Panel C:*  $K_{Sobs}$ ,  $K_{O2obs}$  vs factor de eficacia para la lacasa en PEI-Ag; *Panel D:*  $K_{Sobs}$ ,  $K_{O2obs}$  vs factor de eficacia para tirosinasa en PEI-Ag.



**Figura 5.6.** Análisis diferencial de la actividad de GOX ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la concentración de oxígeno (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* 20  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel B:* 40  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:* 100  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:* 200  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:* 500  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Las **Figura 5.5A-B** muestran la disminución de  $K_{Sobs}$  con la reducción del factor de eficacia (aumento de la carga enzimática inmovilizada) a excepción de los valores de la enzima libre (factor de eficacia 1.0). Este resultado es coherente con las simulaciones

realizadas (**Figura 5.3A-B**) ya que, según la Ec 3.8, la  $K_{Sapp}$  depende directamente de la  $[O_2]$ , y ésta disminuye en la partícula a medida que aumenta la carga de enzima. Además, la  $K_{Mobs}$  sigue la misma tendencia puesto que el modelo simplificado es homólogo a la Ec 3.7, con la salvedad de la dependencia lineal del oxígeno. En ambos casos se observa una disminución de las constantes aparentes de hasta un 25% del valor de la enzima libre. La singularidad del incremento puntual de la  $K_{Sobs}$  de la enzima inmovilizada responde a una disminución de la accesibilidad al centro activo por parte del sustrato principal, algo muy común en inmovilización enzimática.

En el caso de las **Figura 5.5C-D** se observa también una disminución de  $K_{Sobs}$  (a excepción de los valores de la enzima libre), pero un aumento de la  $K_{O2obs}$  con la bajada del factor de eficacia o aumento de la carga enzimática inmovilizada. Esta  $K_{O2obs}$  sería la constante a introducir en el modelo cinético sin tener en cuenta las restricciones difusionales en dicho modelo. Además, la  $K_{O2obs}$  se ve más afectada cuanto menor es la  $K_{O2}$  (aumento de 6 veces en la tirosinasa por unas 3 veces en la lacasa). En este caso también ocurre que al inmovilizar se aprecia una reducción de la accesibilidad al centro activo, manifestado en un aumento puntual de la  $K_{Sobs}$ .

Una vez presentados los resultados, se considera necesario discutirlos con trabajos similares en la literatura. No obstante, no hay mucha variedad en los estudios cinéticos encontrados sobre oxidasas inmovilizadas ya que casi todos son relativos a la GOX, y no estudian la cinética desde el punto de vista del sustrato limitante, el oxígeno. En muchos de ellos comparan la  $K_{Sapp}$  de la enzima inmovilizada y libre frente la glucosa por métodos colorimétricos midiendo el incremento inicial de la absorbancia. Además, calculan la  $K_{Sapp}$  según la ecuación de Lineweaver-Burk, en lugar de ajustar directamente los datos a una hipérbola como se hizo en este estudio, lo que confiere menos error. Sin embargo, se van a comentar los más relevantes.

Zhou et al [429] inmovilizaron la GOX en nanopartículas de óxido de grafeno mediante adsorción física. Posteriormente evaluaron la cinética de la enzima, obteniendo valores de  $K_{Sapp}$  de 45.7 y 22.6 para la enzima inmovilizada y libre, respectivamente. Estos resultados indicaban que la inmovilización dificultaba el acceso de la glucosa al centro activo. Resultados muy similares fueron obtenidos por Altun et al [430] al inmovilizar la GOX sobre nanopartículas de hierro por adsorción física y atribuir este efecto a fuerzas repulsivas que disminuyen la concentración de la glucosa en las proximidades del centro activo de la enzima. El estudio más similar al nuestro fue realizado por Morshed et al [423] inmovilizando GOX sobre poliéster con PEI.

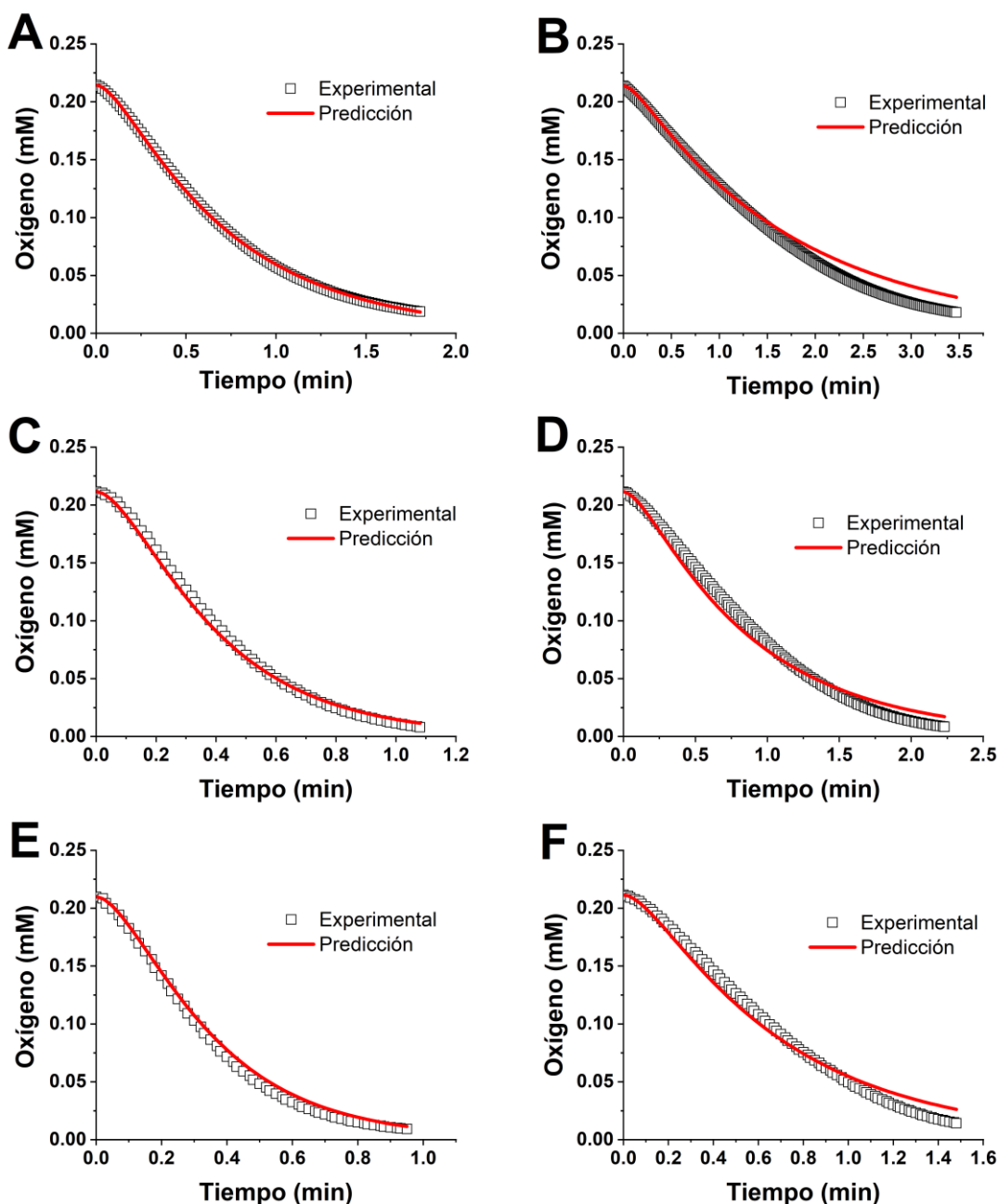
Obtuvieron una  $K_{Sapp}$  de la enzima inmovilizada 1.2 veces superior a la de la enzima libre, atribuyéndolo a problemas de difusión. Goldhahn et al [422] inmovilizaron lacasa sobre partículas de madera-oro, obteniendo incrementos en el  $K_{Sapp}$  de la enzima inmovilizada de 3-6 veces respecto a la enzima libre, posiblemente debido a cambios estructurales en la enzima o a problemas de difusión. Estos estudios hacen alusión a aumentos de la  $K_{Sapp}$  de la enzima inmovilizada frente a la enzima libre, pero también se han encontrado resultados opuestos.

En el estudio de Begum et al. [425] se inmovilizó la GOX mediante encapsulación en microesferas. En este caso la  $K_{Sapp}$  de la enzima inmovilizada fue de 2 a 3 veces menor que la de la enzima libre, argumentando una mejora en la afinidad enzima-sustrato debido a efectos de partición o cambios en el microentorno. En este caso, debido al estudio realizado, podemos plantear que esta disminución del valor aparente puede deberse también a restricciones difusionales. El oxígeno tendría dificultades para penetrar en la matriz encapsulada, suponiendo una  $D_{effO_2}$  baja, y por tanto se reflejaría en el  $K_{Sobs}$ . Además, cabe destacar que, en los estudios comentados anteriormente, se obtuvo el mismo valor de  $K_{Sapp}$  para GOX libre, lo que indica alta fiabilidad en los métodos de análisis empleados. En el trabajo de Gao et al. [426] también se obtienen  $K_{Sapp}$  menores a la calculada para la enzima libre, aludiendo a una mejora en la afinidad hacia el sustrato, pero sin contemplar la posibilidad de las limitaciones difusionales.

## **5.6. ELUCIDACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA MEDIANTE ANÁLISIS INTEGRAL**

El empleo directo de cursos temporales de oxígeno, datos integrales, también es útil para llevar a cabo un análisis cinético. La inspección cualitativa de los cursos temporales es muy útil para situar el rango significativo de las constantes cinéticas [208]. Para la cuantificación, se emplea el análisis integral de múltiple respuesta con el software Aspen Custom Modeler. Con este programa, todos los cursos temporales de oxígeno pueden ajustarse simultáneamente modificando los parámetros iniciales de cada experimento (como la concentración de catalizador o sustrato principal). En este caso, se incluyen dos o tres variables independientes al mismo tiempo en el ajuste,  $K_S$ ,  $K_{O_2}$  (o  $K_M$ ) y  $Act_{max}$ , introduciendo efectos cruzados de estas variables y conduciendo a valores más precisos de los parámetros a estimar. En estos ajustes se ha incluido también el tiempo de respuesta del sensor (a diferencia de los ajustes para la enzima libre), fijado en 6 segundos (según nuestros cálculos experimentales). Sin incluir el tiempo de respuesta del sensor se

complica el ajuste de los datos al comienzo del experimento. Los datos de oxígeno-tiempo se ajustan al modelo Ping-Pong propuesto minimizando los residuos al cuadrado. Un ejemplo de los ajustes realizados se muestra en la **Figura 5.7**, el conjunto completo de ajustes se muestra en las **Figura 11.29-11.44**.



**Figura 5.7.** Ajuste de los datos integrales mediante múltiple respuesta en Aspen para la GOX. En cada fila se muestran distintas actividades ofrecidas ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ). *Panel A:*  $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 100 mM glucosa; *Panel B:*  $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 mM glucosa; *Panel C:*  $100 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 100 mM glucosa; *Panel D:*  $100 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 mM glucosa; *Panel E:*  $500 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 100 mM glucosa; *Panel F:*  $500 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 mM glucosa.

Es interesante remarcar la falta de ajuste a  $[O_2]$  muy bajas en algunos casos. Esto puede deberse a dos razones. La primera, fenomenológica, consiste en una tasa de consumo de oxígeno inferior a la esperada, probablemente debido a las dificultades para alcanzar niveles de anoxia en reactores no herméticos o a características más profundas del mecanismo cinético. El segundo factor es específico del mecanismo de ajuste. El programa tiende a ajustar mejor los datos del comienzo porque poseen un peso específico más alto, es decir, los residuos al cuadrado de los valores a concentraciones más altas son más altos y, por lo tanto, el software los minimiza más. Por lo tanto, la elección de la cantidad de enzima utilizada debe adaptarse en función de la región relevante para la significación de las constantes intrínsecas.

En los cursos de oxígeno-tiempo es difícil de apreciar a simple vista el orden de reacción respecto al oxígeno excepto para la tirosinasa, dónde se observa una tendencia lineal muy clara hasta concentraciones muy bajas de oxígeno dónde exhibe una leve curvatura. En los casos de GOX y GalOx se observa una gran curvatura desde el comienzo, mientras que en la lacasa se observa una curvatura menos pronunciada. Por otro lado, generalmente se observa un mejor ajuste a concentraciones elevadas de sustrato principal en GOX y GalOx. Esto se debe a que el modelo Ping-Pong simplificado se adapta mejor a concentraciones elevadas de S, dónde se observan tendencias lineales en las gráficas actividad vs  $[O_2]$ .

En los Anexos (**Tabla 11.5-11.8**) muestran los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos en el ajuste integral de respuesta múltiple realizado en Aspen. En el caso de los parámetros estadísticos, se han calculado por separado para cada concentración de sustrato principal, y luego se han promediado para obtener los parámetros de cada actividad ofrecida. Además, se ha incluido el factor de eficacia determinado experimentalmente para contextualizar la tendencia observada en los parámetros cinéticos.

## **5.7. OPORTUNIDADES DE INTENSIFICACIÓN DE PROCESOS**

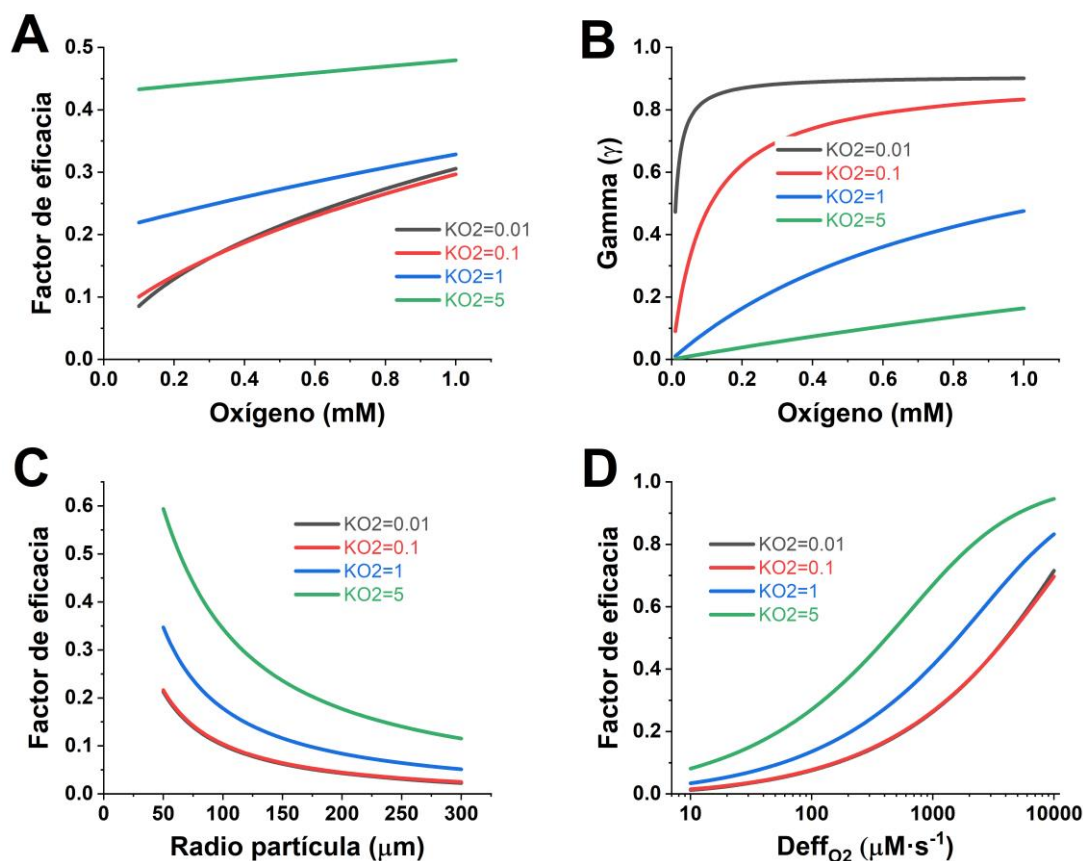
La **Figura 5.8** muestra las perspectivas de mejora de las enzimas inmovilizadas con dependencia de oxígeno. En la **Figura 5.8A**, las enzimas que muestran una dependencia pronunciada del oxígeno presentan un factor de eficacia absoluto más elevado. Por el contrario, las enzimas con baja dependencia del oxígeno experimentan un aumento notablemente mayor del factor de eficacia cuando se eleva la concentración inicial de oxígeno. Por lo tanto, cuando se busca mejorar un proceso limitado por la

difusión, existirá una mayor mejora en las enzimas con mayor afinidad al  $O_2$  (es decir,  $K_{O_2}$  más bajo).

Esto puede ser bastante contraintuitivo si se piensa en la dependencia de oxígeno de las enzimas. Lo normal es pensar que un aumento de la  $[O_2]$  beneficiará más a las enzimas con mayor dependencia de  $O_2$ , ( $K_{O_2}$  más altas). Sin embargo, cuando el biocatalizador está afectado por restricciones difusionales esto es un poco distinto. En este caso hay que poner el foco en el gradiente de oxígeno. Este gradiente es mayor cuanto más rápida es la reacción, y este es el caso de  $K_{O_2}$  bajas. Por tanto, un aumento en la  $[O_2]$  disminuye más el gradiente de oxígeno en estos casos, y, consecuentemente, hay un mayor aumento en el factor de eficacia.

Para analizar el grado de eficiencia de las enzimas, es decir, el cociente entre actividad observada y actividad máxima alcanzable ( $\gamma$ ), se graficó la relación entre ésta y la concentración de oxígeno en el líquido en condiciones estacionarias, considerando diversos valores de  $K_{O_2}$  (como se representa en la **Figura 5.8B**). Cabe destacar que, si bien el valor absoluto de  $\gamma$  es mayor para las enzimas con menor dependencia del oxígeno ( $K_{O_2}$  más bajo), el aumento de  $\gamma$  es más pronunciado para las enzimas con valores de  $K_{O_2}$  más altos. En este escenario, dado que la actividad máxima de la oxidasa es intrínseca a su naturaleza, el único medio de mejorar  $\gamma$  sería elevando la concentración de oxígeno.

Además de aumentar la concentración de oxígeno disuelto para mejorar el factor de eficacia, pueden implantarse otras alternativas como el empleo de menores tamaños de partícula o poros de menor diámetro. Esto se trata de ilustrar en las **Figura 5.8C-D**, donde se muestra la variación del factor de eficacia con el radio de partícula y la difusividad efectiva del oxígeno. En estos casos, al contrario que al variar la  $[O_2]$ , enzimas con distintas dependencias de oxígeno muestran un comportamiento y tendencias muy similares. Como es lógico, el factor de eficacia se maximiza en partículas de menor tamaño, ya que la distancia que recorre el sustrato por difusión es menor; y también en sistemas donde la difusividad efectiva del oxígeno es mayor. Es principalmente se debe al tamaño de poro, aunque otros parámetros como la tortuosidad o la naturaleza del tipo de material soportado pueden tener un peso importante [431,432].



**Figura 5.8.** Oportunidades de intensificación para enzimas inmovilizadas dependientes de oxígeno. *Panel A:* Factor de eficacia vs  $[O_2]$  a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel B:* Gamma ( $\gamma$ ) vs  $[O_2]$  a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel C:* Factor de eficacia vs radio de partícula a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM); *Panel D:* Factor de eficacia vs difusividad del  $O_2$  a diferentes valores de  $K_{O_2}$  (mM). Condiciones para las simulaciones:  $[S]/K_S=10$ ,  $Act_{max}=100 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}_{\text{enzima}}^{-1}$ ,  $Act_{maxImm}=500 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ,  $m_{cat}=0.1 \text{mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}_{\text{reactor}}^{-1}$ ,  $radio \text{ de partícula}=75 \mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

El aumento del oxígeno disponible en la partícula puede lograrse por varios métodos [208]. Mientras que el aumento de la capacidad de transferencia de oxígeno puede mejorarse mediante el diseño del reactor [247,248,433], la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) también depende de la fuerza impulsora, escalando en proporción al  $O_2$  disponible y estando, por tanto, ligada a la cinética enzimática [205–207]. El burbujeo de aire en un reactor de tanque agitado es la forma más común de suministro de oxígeno, pero no la única [205]. Otras alternativas relacionadas con la ingeniería de reactores son el reactor tubular de flujo segmentado [258], el microrreactor continuo de película descendente [254,259] o la configuración tubo-en-tubo en la que la fase acuosa y la fase gaseosa están separadas físicamente por una membrana [247,256].

También se ha intentado aprovechar el peróxido de hidrógeno generado por muchas oxidasas para la generación *in situ* de oxígeno mediante catalasa [434]. Otra opción interesante es el incremento de la solubilidad del oxígeno, por ejemplo, seleccionando el disolvente o cosolvente adecuado o aumentando la presión del sistema [205,238,242,435]. Todas estas opciones tienen la misma finalidad, pero la selección de la más adecuada depende del estudio cuidadoso del sistema de reacción, la técnica de inmovilización y el diseño del reactor.



---

---

## **CAPÍTULO 6.**

# **ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA INMOVILIZADA**

---

---

## **6. ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA INMOVILIZADA**

### **6.1. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA**

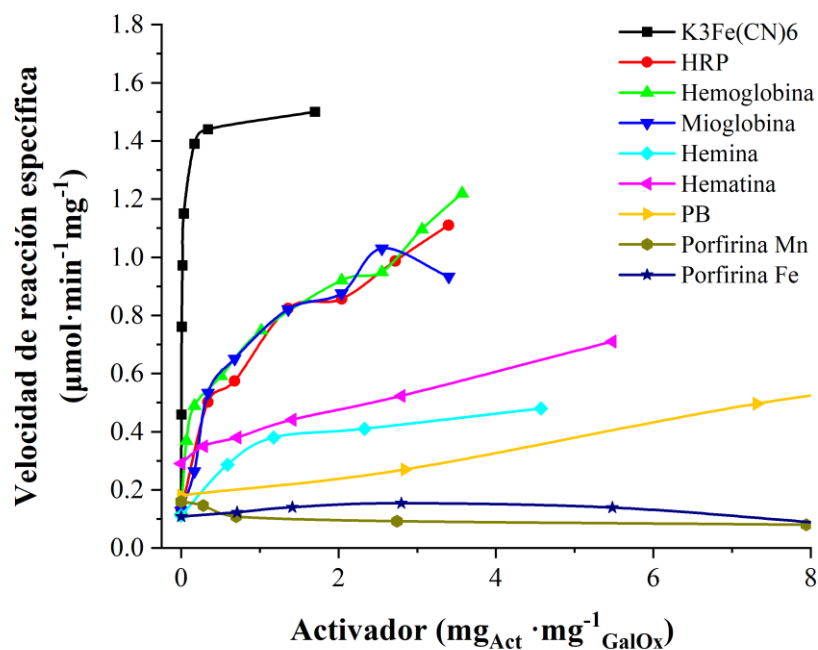
Dado que la galactosa oxidasa es la enzima que más se ha estudiado en esta tesis debido a su novedosa aplicación en biorrefinerías [93,102], es de gran interés dedicarle una sección a su mecanismo y necesidad de activación, así como a la búsqueda de nuevos activadores, ya que es un factor clave en su desempeño como catalizador inmovilizado.

#### **6.1.1. Estudio de la actividad enzimática con distintos activadores**

Debido a al elevado coste que genera el empleo de la peroxidasa de rábano picante (HRP) como activador de la GalOx [79,82,84], junto con las cantidades estequiométricas requeridas del  $K_3Fe(CN)_6$  y su potencial toxicidad [78,79,83], se decidió evaluar otros compuestos activadores.

Como se comentó anteriormente, las proteínas que contienen grupos hemo, como la hemoglobina o la mioglobina poseen un gran potencial en este papel, por lo que se las incluyó en el estudio. También se evaluaron porfirinas férricas de origen animal, como la hemina o la hematina y porfirinas inorgánicas de hierro y manganeso, buscando obtener resultados tan excelentes como los encontrados en este estudio [82]. Por último, investigó un compuesto inorgánico que imita el mecanismo de la HRP, el ferrocianuro de hierro (III), también conocido como azul de Prusia. Este compuesto también es barato, fácilmente disponible y ha sido estudiado en la literatura [436].

En primer lugar, se ha realizado un ensayo con diferentes activadores a distintas concentraciones para evaluar la velocidad de reacción específica de la enzima. El objetivo es elegir el que mejor responda a criterios como disponibilidad, precio, factor de activación o posibilidad de integración en el biocatalizador, para posteriormente estudiarlo en mayor detalle. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6.1** y se han recopilado, junto con parámetros adicionales, en la **Tabla 6.1**.



**Figura 6.1.** Velocidad de reacción inicial de GalOx variando las concentraciones de los distintos activadores. Las reacciones se llevaron a cabo en viales tipo tanque agitado de 7 mL, con un volumen de reacción variable de 5.1-5.5 mL. Condiciones de reacción: 250 mM de galactosa, 30°C de temperatura, agitación magnética a 250 rpm, 0.06 mg·mL<sup>-1</sup> de GalOx soluble.

**Tabla 6.1.** Caracterización de los activadores utilizados para evaluar las velocidades iniciales de consumo de oxígeno con GalOx.

Activador	[Activador] Óptima (mg <sub>Act</sub> mg <sup>-1</sup> GalOx) <sup>[a]</sup>	Actividad standard GalOx (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	Km Activador (mg <sub>Act</sub> mg <sup>-1</sup> GalOx) <sup>[b]</sup>	Factor de activación <sup>[c]</sup>	Factor de activación por mg de activador <sup>[d]</sup>
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub></b>	0.34	1.47 ± 0.035	8.27 · 10 <sup>-3</sup> ± 9.7 · 10 <sup>-4</sup>	11.5	22.5
<b>HRP</b>	3.40	1.24 ± 0.12	0.664 ± 0.223	9.69	1.90
<b>Hemoglobina</b>	3.57	1.14 ± 0.10	0.311 ± 0.130	8.91	1.66
<b>Mioglobina</b>	2.55	1.10 ± 0.075	0.440 ± 0.113	7.43	1.94
<b>Hemina</b>	4.57	0.517 ± 0.09	0.471 ± 0.334	4.66	5.83
<b>Hematina</b>	5.48	0.665 ± 0.15	-	5.19	5.41
<b>Azul de Prussia</b>	32.3	1.68 ± 0.15	16.2 ± 3.40	9.28	1.64

0.128 (μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) fue la actividad de GalOx sin activador. [a]. La [activador] óptima es la concentración en la que el aumento de la actividad es despreciable. [b]. La Km del activador se ha obtenido ajustando las curvas de la **Figura 6.1** a una hipérbola. [c]. El factor de activación es el aumento de la actividad enzimática (actividad máxima de GalOx) en comparación a su actividad sin activador. [d]. El factor de activación por mg de activador es el factor de activación dividido por los mg de activador en su concentración óptima. No se ha tenido en cuenta la cantidad de proteína del preparado comercial. No se han incluido las porfirinas de Mn y Fe debido a su escaso rendimiento.

En los resultados se observa un comportamiento casi hiperbólico para casi todos los activadores, excepto para las porfirinas de Mn y Fe, que presentan resultados muy desfavorables. Cabe señalar que en algunos casos (hemina y hematina) no se alcanza la región de saturación, porque los tiempos de reacción ya eran demasiado largos. En los Anexos (**Figura 11.18**) pueden verse los cursos completos de oxígeno frente a tiempo.

Está claro que el activador más eficiente en términos de velocidad de reacción inicial es el K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Pero su toxicidad, junto con los problemas de regeneración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no lo hacen a priori tan atractivo a tiempos de reacción elevados. Las siguientes opciones en términos de eficiencia son la HRP, la hemoglobina y la mioglobina, que se comportan de forma muy similar. Sin embargo, en términos económicos, la hemoglobina es mucho más rentable que las otras dos, por lo que sería más interesante trabajar con ella a gran escala. En cuanto a la hemina y la hematina, además de su menor eficacia, tienen

tiempos de activación bastante largos, como se observa en los Anexos (**Figura 11.18E-F**), y son compuestos relativamente caros. Por último, el PB requiere grandes dosis de compuesto para conseguir una activación suficiente, por lo que no es tan atractivo.

Al tratar de comparar estos resultados con la bibliografía disponible, se han encontrado otros métodos para obtener la eficacia del compuesto activador. En el estudio de Johnson et al [82] utilizaron la experimentación de alto rendimiento (en placas de 96 pocillos) para evaluar numerosos activadores oxidantes de un solo electrón. Emplearon una variante de GalOx para oxidar selectivamente a un aldehído deseado, utilizando HRP como control positivo y la enzima sin activador como control negativo. Por tanto, la medición se basó en el grado de oxidación de este compuesto, obteniendo un máximo del 60% con HRP. No se utilizaron los mismos activadores que en nuestro estudio, pero ninguno de ellos igualó la eficacia de la HRP, como es el caso de nuestro estudio.

En el estudio de Chen et al [84] analizaron la conversión de 5-HMF utilizando la variante M<sub>3-5</sub> GalOx encapsulada con un compuesto nanoactivador inorgánico de Cu(II) y Zr(IV). Los resultados obtenidos son excelentes, obteniéndose una conversión casi completa a las 10 horas. Sin embargo, estos resultados no se comparan con otros activadores clásicos como la HRP, ni con ninguno de los utilizados en nuestro estudio, por lo que no se pueden extraer demasiadas conclusiones.

### **6.1.2. Influencia del peróxido de hidrógeno en la activación de GalOx**

Además de que el activador sea eficaz (que aumente la velocidad de reacción con la menor concentración posible), también necesitamos que esta activación se prolongue en el tiempo, ya que anteriormente sólo hemos medido las velocidades de reacción iniciales. Esta regeneración del activador es más importante que la velocidad máxima inicial alcanzada por la enzima, ya que de lo contrario esta velocidad decaerá al reducirse el compuesto. Esta regeneración tiene lugar debido al poder oxidante del peróxido de hidrógeno (o más específicamente de los radicales hidroxilo), basado en la química de la reacción de Fenton [5].

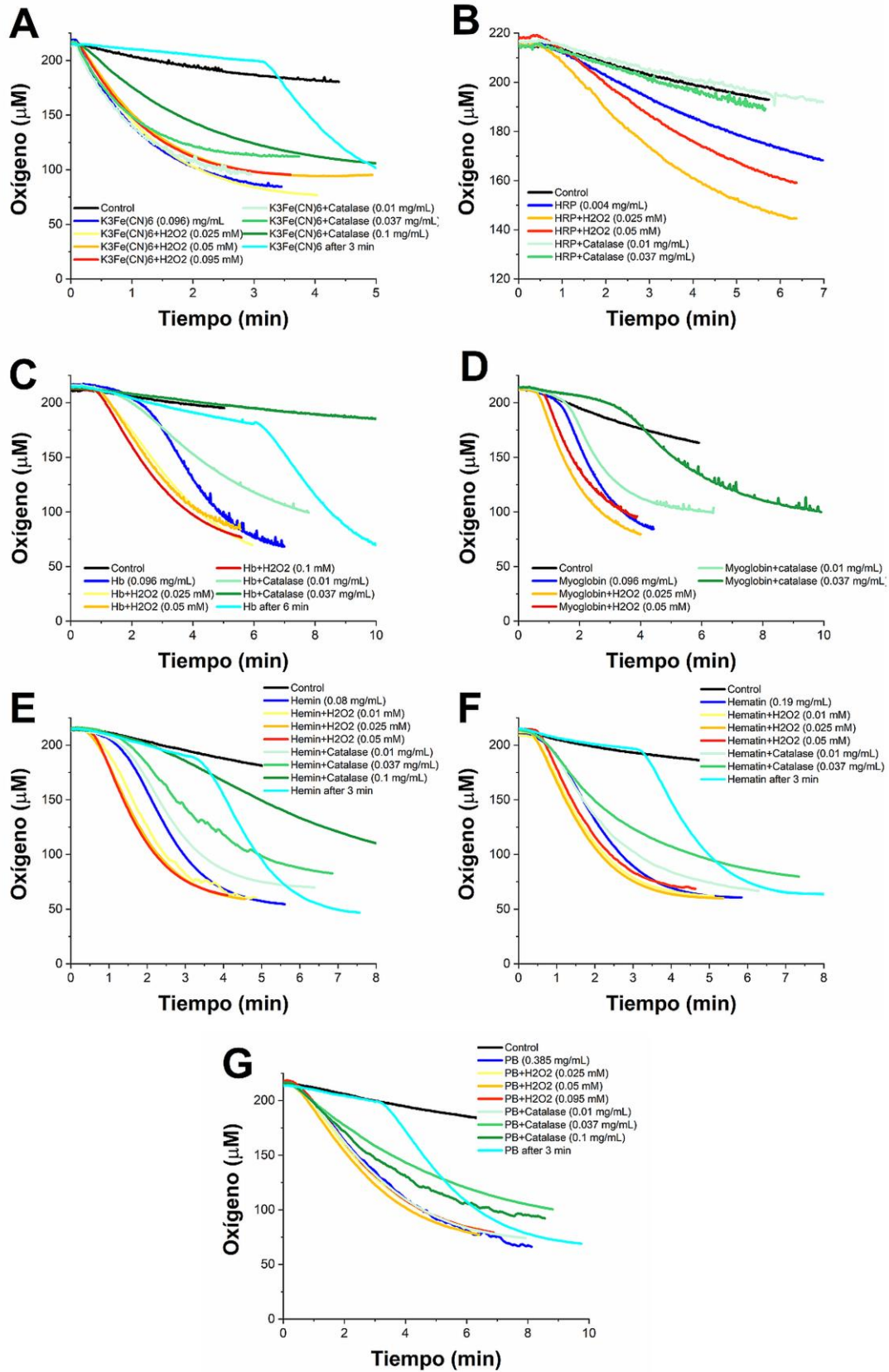


## Capítulo 6. Galactosa oxidasa

La Ec 6.3 representa la reacción neta de la reacción Fenton, en la que se forman dos tipos diferentes de radicales hidroxilo. Por lo tanto, la dependencia del peróxido de hidrógeno en la activación a velocidades de reacción iniciales puede ser un buen indicador de que el activador posee la capacidad de reoxidar y regenerar la forma activa del  $\text{Cu}^{2+}$  con el radical (Cys-Tyr) [75,84]. Con esta información, además se pudo proponer un modelo cinético sencillo que simula el mecanismo de activación de la galactosa oxidasa. En el trabajo publicado por Parodi et al [83], se propone un modelo cinético en el que se discute la importancia de mantener una concentración óptima de peróxido de hidrógeno para no desactivar la enzima pero suficiente para regenerar la capacidad activadora.

Con estos planteamientos en mente, se llevaron a cabo experimentos a distintas condiciones. En primer lugar, se añadió peróxido de hidrógeno al comienzo de la reacción a diferentes concentraciones, que no fueron demasiado altas para minimizar la descomposición espontánea en oxígeno. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de catalasa al comienzo de la reacción, esperando que la reacción se ralentizara para aquellos activadores dependientes de cierta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al principio. Finalmente, en algunos casos, se inició la reacción con la enzima sin activador y se esperó un cierto tiempo a que se generara  $\text{H}_2\text{O}_2$  (que sería igual al consumo estequiométrico de oxígeno en ese tiempo), y después se añadió el activador.

La **Figura 6.2** muestra los cursos de oxígeno-tiempo con los distintos activadores. La **Figura 6.3** muestra la velocidad de reacción específica con el tiempo, dilucidando así tanto la variación de la velocidad de activación (antes de que la velocidad alcance su máximo) como la velocidad máxima que se alcanza.



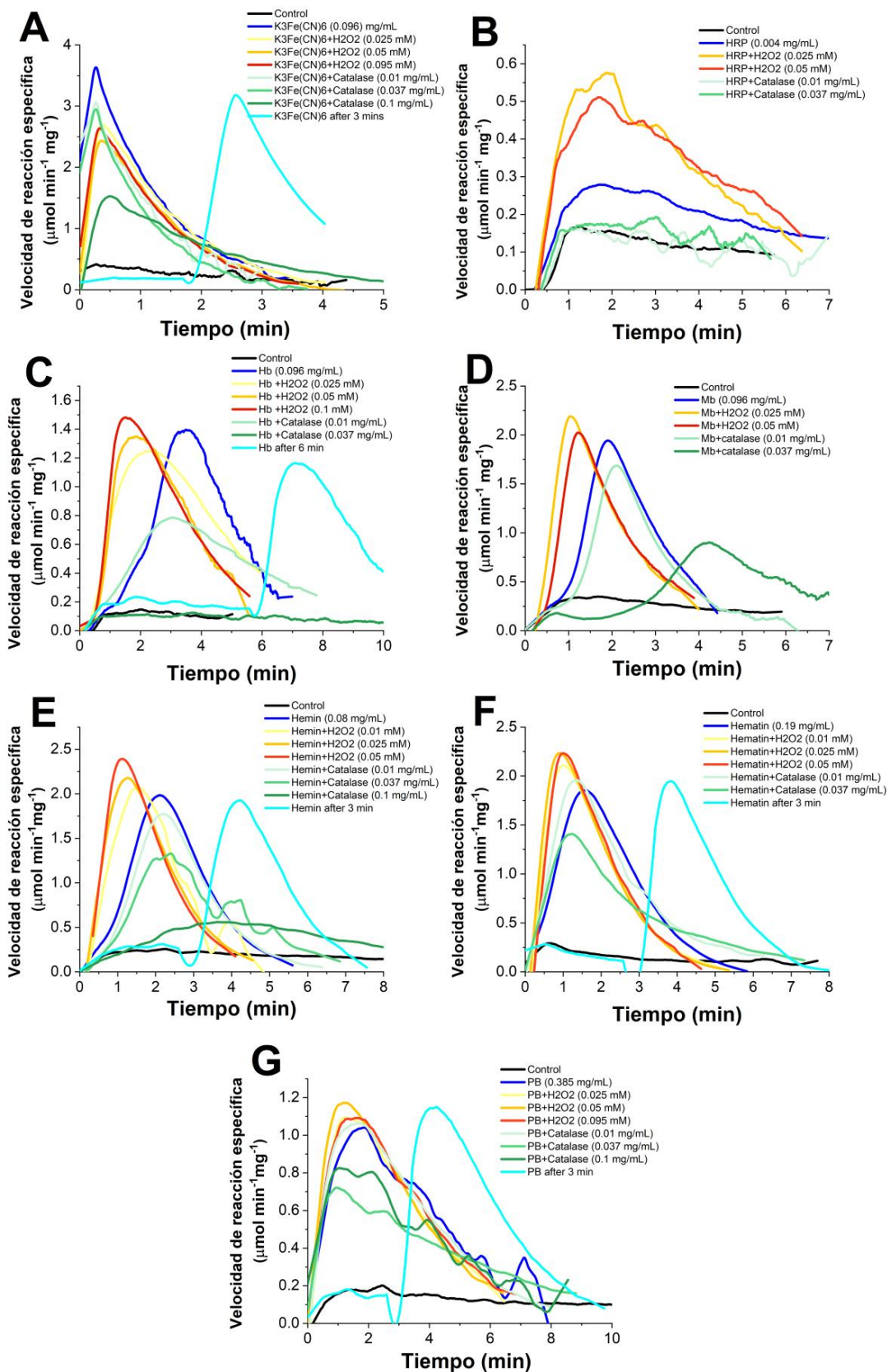
**Figura 6.2.** Cursos temporales de oxígeno para diferentes compuestos activadores junto con la adición de catalasa o peróxido de hidrógeno. Las reacciones se llevaron a cabo en

## Capítulo 6. Galactosa oxidasa

viales de tanque agitado de 7 mL, con un volumen de reacción variable de 5.1-5.5 mL. Condiciones de reacción: 250 mM de galactosa, 30°C de temperatura, agitación magnética de 250 rpm, 0.030-0.035 mg·mL<sup>-1</sup> de GalOx soluble, dependiendo del volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o catalasa añadido. La reacción sin activador (control) se muestra con líneas negras. La reacción sólo con activador se muestra con líneas azul oscuro. Las reacciones con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestran con líneas en gama de color cálido, mientras que la adición de catalasa se muestra en gama de color verde. Las reacciones en las que el activador se añade después de un cierto tiempo se muestran con líneas cian. *Panel A:* K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. *Panel B:* HRP. *Panel C:* Hemoglobina. *Panel D:* Mioglobina. *Panel E:* Hemina. *Panel F:* Hematina. *Panel G:* Azul de Prusia.

Los resultados obtenidos permiten mostrar qué compuestos activadores dependen del peróxido de hidrógeno y en qué medida éste afecta a la activación. En cuanto al K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, se observa en la **Figura 6.3A** que la velocidad máxima se alcanza con sólo añadir activador, y que al incluir tanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como catalasa no hay variaciones significativas en la misma. Además, la velocidad de activación (o tiempo de latencia) no varía con la adición de estos compuestos, siendo bastante evidente que este compuesto no depende del peróxido de hidrógeno, y, por tanto, no es posible su regeneración durante la reacción.

El otro activador clásico estudiado, la HRP, se muestra en la **Figura 6.3B**. En este caso, la velocidad máxima se ve claramente favorecida a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la velocidad de activación apenas varía. Esto puede deberse a que en la HRP el hierro ya se encuentra en su estado oxidado (Fe<sup>3+</sup>) preparado para generar el radical en Cu<sup>2+</sup>, y por tanto sólo aumenta la velocidad máxima de reacción con la ayuda de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y no la velocidad de activación. También es evidente cómo la adición de catalasa afecta negativamente a la reacción.



**Figura 6.3.** Velocidad de reacción específica en función del tiempo para diferentes compuestos activadores junto con la adición de catalasa o peróxido de hidrógeno. Las reacciones se llevaron a cabo en viales de tanque agitado de 7 mL, con un volumen de

## Capítulo 6. Galactosa oxidasa

reacción de 5.1 mL. Condiciones de reacción: 250 mM de galactosa, 30°C de temperatura, agitación magnética de 250 rpm, 0.030-0.035 mg·mL<sup>-1</sup> de GalOx soluble, dependiendo del volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o catalasa añadido. La reacción sin activador (control) se muestra con líneas negras. La reacción sólo con activador se muestra con líneas azul oscuro. Las reacciones con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestran con líneas en gama de color cálido, mientras que la adición de catalasa se muestra en gama de color verde. Las reacciones en las que el activador se añade después de un cierto tiempo se muestran con líneas cian. *Panel A:* K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. *Panel B:* HRP. *Panel C:* Hemoglobina. *Panel D:* Mioglobina. *Panel E:* Hemina. *Panel F:* Hematina. *Panel G:* Azul de Prusia.

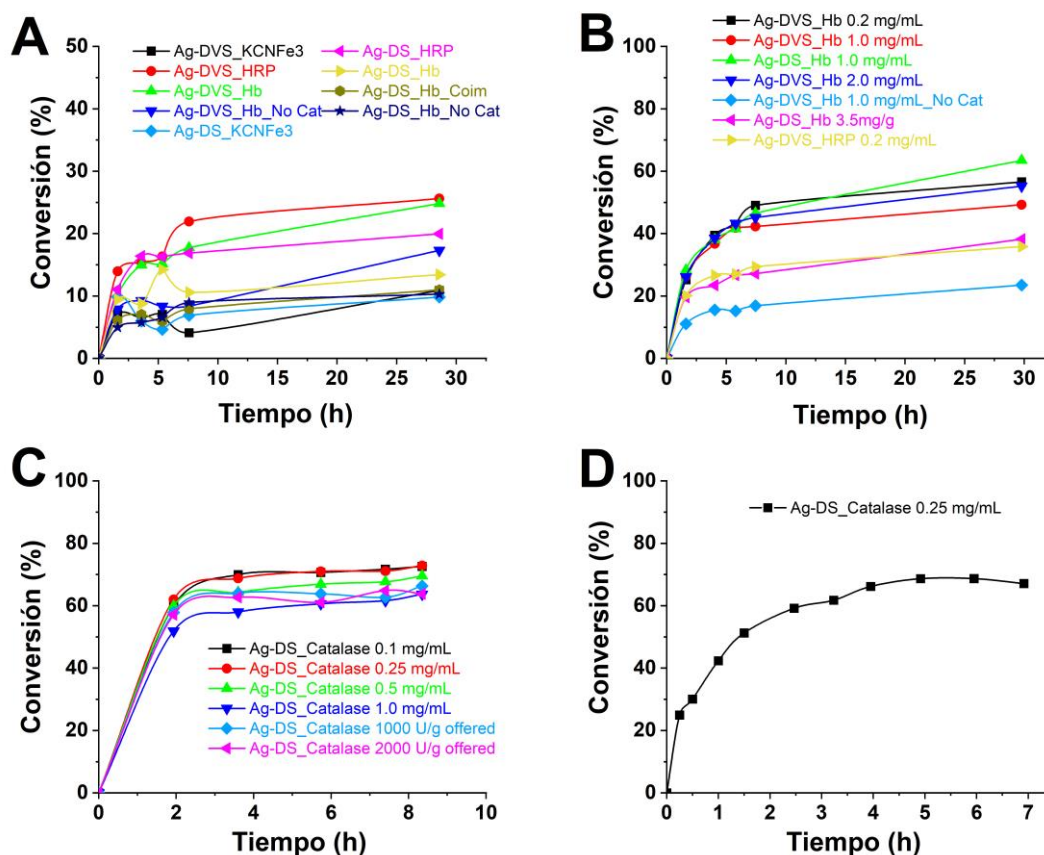
Las **Figura 6.3C-G** muestran hemoglobina, mioglobina, hemina, hematina y PB, respectivamente. Se han agrupado porque parecen responder de forma muy similar tanto a la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como de catalasa. Se observa un aumento considerable de la velocidad de activación y, en algunos casos, de la velocidad máxima con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno a una concentración fija de activador. Mientras que se observa una disminución progresiva de la velocidad máxima y en algunos casos de la velocidad de activación al aumentar la concentración de catalasa. En algunos casos, la influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor, como en el caso de la hemoglobina. Este compuesto, que contiene un grupo hemo, con Fe<sup>2+</sup>, requiere primero la oxidación del hierro a Fe<sup>3+</sup> para la posterior formación del radical cobre. Esta puede ser una de las explicaciones del incremento de la velocidad de activación en este caso.

### **6.1.3. Estudio de activadores y condiciones de reacción a media escala**

En vista de que la galactosa oxidasa requiere un compuesto activador (oxidante de un solo electrón), pero también necesita la adición de catalasa en la mezcla de reacción para eliminar el peróxido de hidrógeno producido, se llevó a cabo una etapa preliminar de cribado para determinar las mejores condiciones de reacción.

Esta etapa se ha dividido en otras subetapas. En primer lugar, se estudió qué compuesto activador se iba a utilizar. Posteriormente, se estudió la concentración de este compuesto activador y, por último, se estudió la concentración óptima de catalasa. Esto último es muy importante ya que se estima que a pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno la enzima puede sufrir una inactivación suicida. Pero al mismo tiempo, una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno es necesaria en el mecanismo de activación de la enzima. Por lo tanto, es fundamental mantener una concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Sin embargo, esto es complicado de conseguir sin analizar este compuesto. Lo que es seguro, es que se requiere una adición de catalasa en varias etapas.



**Figura 6.4.** Reacciones de cribado para seleccionar las mejores condiciones de reacción para la oxidación de galactosa. Las reacciones se realizaron en reactores tanque agitado tipo falcon de diferente volumen, con agitación por inversión a 25 rpm, a temperatura ambiente y 100 mM de NaPi pH 7. *Panel A:* Cribado de activadores utilizando dos químicas de inmovilización, VS-Ag y DS-Ag. Condiciones de reacción: 15 mL de volumen de reactor, 11 mL de volumen de reacción, galactosa 100 mM,  $33.3 \text{ mg}_{\text{GalOx}} \cdot \text{g}_{\text{sop}}^{-1}$ ,  $18 \text{ mg}_{\text{sop}} \cdot \text{mL}^{-1}$  y catalasa  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  se utilizó en todos los experimentos excepto en dos. La concentración de activadores fue:  $\text{K}_3\text{FeCN}_6$   $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , HRP  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y hemoglobina  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . En un experimento se coinmovilizó Hb  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{sop}}^{-1}$  en DS-Ag. *Panel B:* Cribado de la concentración de activador utilizando dos químicas de inmovilización, VS-Ag y DS-Ag. Condiciones de reacción: 50 mL de volumen de reactor, 11 mL de volumen de reacción, galactosa 50 mM,  $16.7 \text{ mg}_{\text{GalOx}} \cdot \text{g}_{\text{sop}}^{-1}$ ,  $18 \text{ mg}_{\text{sop}} \cdot \text{mL}^{-1}$  y catalasa de  $0.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  en todos los experimentos excepto en uno. La concentración de activadores se especifica en la figura. *Panel C:* Cribado de la concentración de catalasa utilizando DS-Ag. Condiciones de reacción: 50 mL de volumen de reactor, 12 mL de

## Capítulo 6. Galactosa oxidasa

volumen de reacción, galactosa 50 mM, 40  $\text{mg}_{\text{GalOx}} \cdot \text{g}_{\text{sop}}^{-1}$ , Hb 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y 23  $\text{mg}_{\text{sop}} \cdot \text{mL}^{-1}$  en todos los experimentos. La catalasa se coinmovilizó en dos experimentos, en los que se ofrecieron 16.7 y 33.3  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . *Panel D*: La reacción se realizó utilizando DS-Ag, catalasa y Hb como activador. Condiciones de reacción: 50 mL de volumen de reactor, 12 mL de volumen de reacción, galactosa 50 mM, 40  $\text{mg}_{\text{GalOx}} \cdot \text{g}_{\text{sop}}^{-1}$ , Hb 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y 16.7  $\text{mg}_{\text{sop}} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Como se muestra en la **Figura 6.4A**, la conversión de galactosa cuando se utiliza  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  como activador es bastante menor que en los otros casos. Este compuesto, aunque no tiene fase de latencia y ofrece la mayor tasa de consumo inicial de oxígeno, no se regenera con peróxido de hidrógeno a medida que avanza la reacción, como ocurre en el caso de la HRP o la hemoglobina, por lo que se descarta para reacciones en las que se busque una alta conversión del sustrato principal. Tanto con la HRP como con la Hb se obtienen buenos resultados en VS-Ag, pero como se ha comentado, se prefiere usar la Hb por su significativo menor coste (alrededor de 200 veces menos).

En la **Figura 6.4B** se evalúa la concentración de hemoglobina óptima, tanto para VS-Ag como para DS-Ag. Se observan resultados similares en el rango de 0.2-2.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , por lo que se escoge una concentración intermedia de 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para experimentos sucesivos. Por otro lado, se observan los mejores resultados con DS-Ag, a pesar de lo observado en el experimento anterior, por lo que se continúa estudiando este derivado. Además, en este caso la conversión alcanzada con Hb supera claramente a la alcanzada con HRP. Por último, se continúan observando resultados muy pobres cuando no se emplea catalasa en el medio de reacción, afirmando la necesidad de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el siguiente experimento se trata de identificar una concentración óptima, aunque, como se ha mencionado, lo ideal sería añadirla de forma semicontinua.

En la **Figura 6.4C** se evalúa la concentración de catalasa óptima, empleando DS-Ag como química de inmovilización y una concentración fija de Hb (0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Se observan resultados similares de conversión en el rango de 0.1-1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de [catalasa], aunque ligeramente mejores a valores bajos de concentración, indicando que existe una concentración óptima. Por otro lado, se utilizó también catalasa coinmovilizada como prueba preliminar. Aunque el rendimiento de inmovilización de ésta fue bajo ( $\approx 10\%$ ), la elevada actividad de la catalasa, junto con la proximidad de ambas enzimas esperaba mejorar la capacidad de eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, debido a la necesidad de una  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  óptima, los resultados con la catalasa coinmovilizada fueron similares a los

obtenidos con catalasa soluble, por lo que se continuó empleando ésta en fase líquida. Finalmente, se escogió una [catalasa] de  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el siguiente experimento.

Finalmente, en la **Figura 6.4D** se observa la conversión de galactosa con las condiciones de reacción previamente estudiadas, y tomando muestras a tiempos más tempranos para obtener el perfil de conversión completo. Se alcanza una conversión máxima cercana al 70%. Es posible que una manera de aumentar esta conversión sea el suplemento de un caudal de aire continuo a la reacción, en vez de usar aireación superficial por inversión, y así aumentar la  $[\text{O}_2]$  en estado estacionario, reduciendo también el tiempo de reacción. Otra opción que puede limitar la conversión es la desactivación de la catalasa. La naturaleza tetramérica de esta enzima provoca su rápida inactivación en condiciones diluidas debido a la disociación de las subunidades, un hecho que puede descartar su uso industrial, y cuya inmovilización ha sido ampliamente estudiada en el grupo de J.M. Guisán [437–439]. Puede ser, por tanto, que el empleo de catalasa soluble, aún a altas concentraciones, se vea afectada por la prolongada agitación por inversión, causando su desactivación, y la consecuente inactivación de la GalOx por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, esta cuestión merece un estudio mucho más profundo y detallado que no se ha acometido en este trabajo.

## 6.2. DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR AUTOSUFICIENTE DE GALACTOSA OXIDASA

Esta parte del capítulo 6 corresponde a un artículo científico publicado por el autor y el director de esta tesis doctoral en la revista “ChemBioChem”, cuya primera página se muestra a continuación.

Check for updates

ChemBioChem

Research Article  
doi.org/10.1002/cbic.202300421

Chemistry Europe  
European Chemical Society Publishing

www.chembiochem.org



### Overcoming Biochemical Limitations of Galactose Oxidase through the Design of a Solid-Supported Self-Sufficient Biocatalyst

Alvaro Lorente-Arevalo,<sup>[a]</sup> Guillermo Orellana,<sup>[b]</sup> Miguel Ladero,<sup>[a]</sup> and Juan M. Bolivar<sup>\*[a]</sup>

Galactose Oxidase (GalOx) has gained significant interest in biocatalysis due to its ability for selective oxidation beyond the natural oxidation of galactose, enabling the production of valuable derivatives. However, the practical application of GalOx has been hindered by the limited availability of active and stable biocatalysts, as well as the inherent biochemical limitations such as oxygen (O<sub>2</sub>) dependency and the need for activation. In this study, we addressed these challenges by immobilizing GalOx into agarose-based and PuroLite supports to enhance its activity and stability. Additionally, we identified and quantified the oxygen supply limitation into solid catalysts by intraparticle oxygen sensing showing a trade-off between the amount of protein loaded onto the solid support and the

catalytic effectiveness of the immobilized enzyme. Furthermore, we coimmobilized a heme-containing protein along with the enzyme to function as an activator. To evaluate the practical application of the immobilized GalOx, we conducted the oxidation of galactose in an instrumented aerated reactor. The results showcased the efficient performance of the immobilized enzyme in the 8 h reaction cycle. Notably, the GalOx immobilized into dextran sulfate-activated agarose exhibited improved stability, overcoming the need for a soluble activator supply, and demonstrated exceptional performance in galactose oxidation. These findings offer promising prospects for the utilization of GalOx in technical biocatalytic applications.

#### Introduction

Enzymes, as oxidative biocatalysts, have revolutionized various fields by enabling selective and efficient transformations of target substrates.<sup>[1–4]</sup> Among these enzymes, galactose oxidase (GalOx) stands out as a prominent example, garnering significant attention for its ability to oxidize a broad range of primary and secondary alcohols to their corresponding products.<sup>[5–7]</sup> Recent applications of GalOx have showcased its potential in diverse contexts.<sup>[8–11]</sup> The exploitation of the benefits offered by biooxidations necessitates a concerted effort in optimal catalyst design, reaction engineering, and process intensification.<sup>[12–15]</sup>

This entails enhancing the kinetics of the catalyst to improve its productivity, optimizing space-time yield at the reactor level, and ensuring process stability.

However, the practical utilization of GalOx is often hindered by inherent biochemical limitations. One primary limitation is its dependency on oxygen (O<sub>2</sub>), which may restrict its effectiveness under specific operational conditions.<sup>[16–18]</sup> The availability of oxygen plays a crucial role in achieving productive reactions catalyzed by GalOx, necessitating efficient and rapid oxygen supply.<sup>[11–14]</sup> Furthermore, to utilize GalOx as a biocatalyst, continuous (re)activation of the enzyme is required.<sup>[12,13,15–17]</sup> This involves the regeneration of its radical state in the active site through single-electron oxidants. This reactivation can be achieved through the action of sacrificial substrates or by employing radical formation catalysts in parallel reactivation reactions.<sup>[7,13,18]</sup> Finally, to enable prolonged and reliable utilization of GalOx as a biocatalyst, enzyme stability must be ensured across a broad range of operational conditions.<sup>[11,13,19]</sup> This encompasses maintaining the enzyme structural integrity and activity over an extended period, even under varying temperatures, solvent concentrations, and substrate conditions. By addressing these challenges associated with oxygen dependency, continuous reactivation, and enzyme stability, the practical utilization of GalOx as a biocatalyst can be dramatically improved.<sup>[9–11,13]</sup> This, in turn, will enhance the efficiency and effectiveness of the biooxidation processes, leading to their successful implementation.

Fortunately, recent advances in protein engineering, enzyme immobilization, analytical sensing, and process engineering have provided valuable tools to overcome the limitations of galactose oxidase. These advancements have opened new

[a] A. Lorente-Arevalo, Dr. M. Ladero, Dr. J. M. Bolivar  
FQPIIMA Group  
Chemical and Materials Engineering Department  
Faculty of Chemistry  
Complutense University of Madrid  
Madrid 28040 (Spain)  
E-mail: juanmbol@ucm.es

[b] Dr. G. Orellana  
Chemical Optosensors & Applied Photochemistry Group (GSOLFA)  
Department of Organic Chemistry  
Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid  
Madrid 28040 (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbic.202300421>

This article is part of the Special Collection “ChemBioTalents 2022”. Please see our homepage for more articles in the collection.

© 2023 The Authors. ChemBioChem published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

En esta sección, el objetivo principal fue desarrollar un biocatalizador activo y estable de GalOx en un soporte sólido. Se ha utilizado una preparación comercial de la galactosa oxidasa ampliamente estudiada en ejemplos recientes [102,440,441]. Para lograrlo, se realizó un cribado exhaustivo de diversos materiales y químicas de inmovilización para identificar la combinación óptima que exhibiera tanto una alta actividad como estabilidad. Para abordar el reto de la activación enzimática sin depender de reactivos externos, se adoptó un enfoque innovador incorporando la hemoglobina al catalizador. Finalmente, para evaluar el rendimiento del catalizador autosuficiente, se realizaron experimentos de oxidación utilizando galactosa como sustrato y con un suministro continuo de oxígeno.

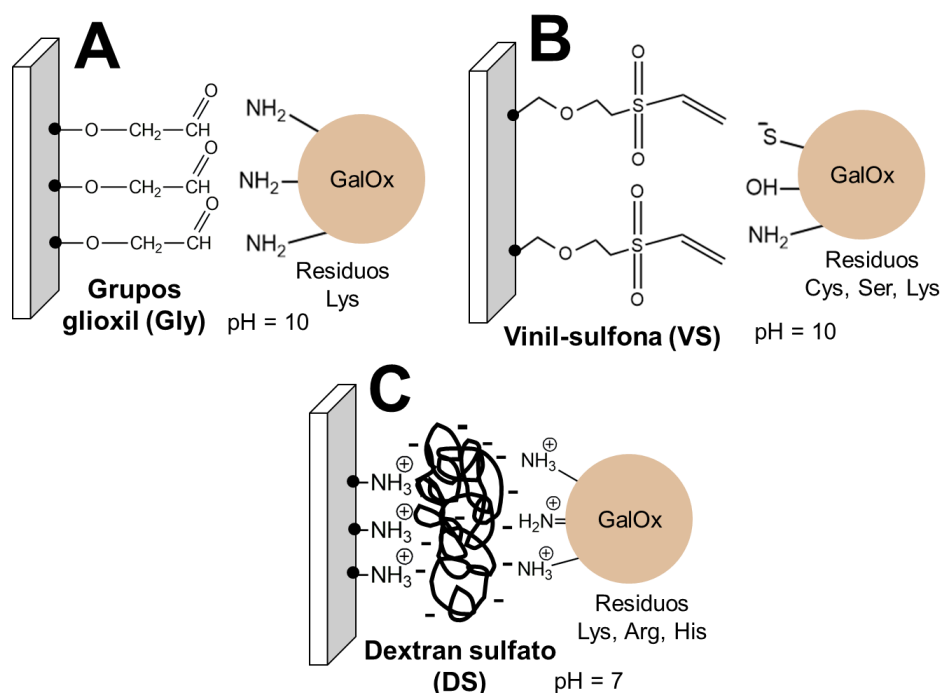
### **6.2.1. Evaluación de la actividad enzimática y la eficacia de la inmovilización**

En primer lugar, se estudió la inmovilización de GalOx en dos materiales de soporte porosos de uso común, a saber, partículas porosas de agarosa entrecruzada (Ag) y partículas porosas de polimetacrilato epóxido (Purolite). Estos materiales se han utilizado ampliamente en biocatálisis debido a sus propiedades deseables para la inmovilización de enzimas [195,354,442,443]. Las características técnicas específicas de los materiales de soporte utilizados se pueden encontrar en la **Tabla 3.1**.

Para conseguir una inmovilización eficaz de GalOx, se exploraron diferentes estrategias basadas en procedimientos de inmovilización anteriores que habían tenido éxito [440]. La primera estrategia estudiada fue la unión covalente a través de grupos glioxil. Este proceso se lleva a cabo a un pH ligeramente superior a 10 y está dirigido a la unión con zonas de alta densidad de grupos amino [275,442]. Sin embargo, en el proceso de la posterior reducción del enlace C=N con NaBH<sub>4</sub>, se observó una disminución significativa de la actividad (posiblemente por la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> en el centro activo), por lo que se exploraron otras rutas.

La siguiente estrategia consistió en la unión covalente de la enzima a superficies del soporte activadas con vinil-sulfona (VS). Este enfoque aprovecha los grupos reactivos presentes en el material del soporte, lo que permite la formación de enlaces covalentes fuertes y estables entre la enzima y el soporte [286,287,444]. Otra estrategia empleada en este estudio fue la adsorción iónica por intercambio catiónico en superficies activadas con dextrán-sulfato. En este último enfoque, las interacciones (reversibles) entre la enzima y los grupos sulfato del material portador impulsan el proceso de inmovilización [445]. La

**Figura 6.5** resume los procesos de inmovilización, ilustrando las diferentes estrategias empleadas para la inmovilización de GalOx en los materiales portadores porosos.



**Figura 6.5.** Estrategias empleadas para inmovilizar galactosa oxidasa (GalOx) en soportes activados. *Panel A:* Fijación covalente de GalOx al soporte mediante sus grupos glioxilo. La reacción se produce entre los grupos aldehído y los grupos amino de la enzima, principalmente residuos de lisina, dando lugar a una unión covalente multipuntual. *Panel B:* Reacción del soporte activado, que contiene grupos vinil sulfona, con varios aminoácidos de GalOx, incluido el amino terminal primario. La inmovilización se facilita en condiciones alcalinas (pH elevado), lo que favorece una unión más rápida. *Panel C:* Intercambio iónico del soporte activado, con grupos dextrán-sulfato, con aminoácidos de GalOx cargados positivamente. Este proceso implica el intercambio de cationes entre el soporte y la enzima, lo que conduce a la inmovilización.

Se realizó una primera evaluación del procedimiento de inmovilización para determinar el tiempo de inmovilización y la conservación de la actividad enzimática durante el proceso. Por lo general, la inmovilización se extendió durante 2-3 h (los resultados se muestran en los Anexos (**Figura 11.45-11.50**)). Para comparar los procedimientos de inmovilización, se estableció una carga enzimática inicial de 100 U de GalOx (equivalente a 7.14 mg de enzima en forma de polvo comercial) por gramo de

material sólido. Los resultados del proceso de inmovilización se resumen en la **Tabla 6.2**. La inmovilización covalente de GalOx en ambos soportes porosos mostró altos rendimientos de inmovilización, lo que indica una unión eficiente de la enzima a sus superficies. Sin embargo, el método de inmovilización reversible dio lugar a una inmovilización incompleta de la enzima en los soportes. La actividad catalítica observada de la GalOx inmovilizada varió en función del método de inmovilización empleado. La fijación covalente mostró una menor actividad catalítica en comparación con el enfoque electrostático, que demostró un rendimiento superior.

Para evaluar cuantitativamente la eficacia de los sistemas enzimáticos inmovilizados, se calculó el factor de eficacia. El biocatalizador obtenido mediante inmovilización reversible mostró un factor de eficacia significativamente mayor en comparación con la técnica de fijación covalente. Esto sugiere que el método de inmovilización reversible dio lugar a una utilización más eficiente de la enzima inmovilizada, mejorando su rendimiento catalítico. En esta primera evaluación, los resultados indican que la inmovilización reversible de GalOx mostró resultados prometedores en términos de actividad y factor de eficacia. Esto sugiere que el enfoque de inmovilización reversible puede ser un método preferible para obtener biocatalizadores de soporte sólido altamente activos y eficientes utilizando GalOx, aunque cierta cantidad de enzima no quede inmovilizada durante el procedimiento.

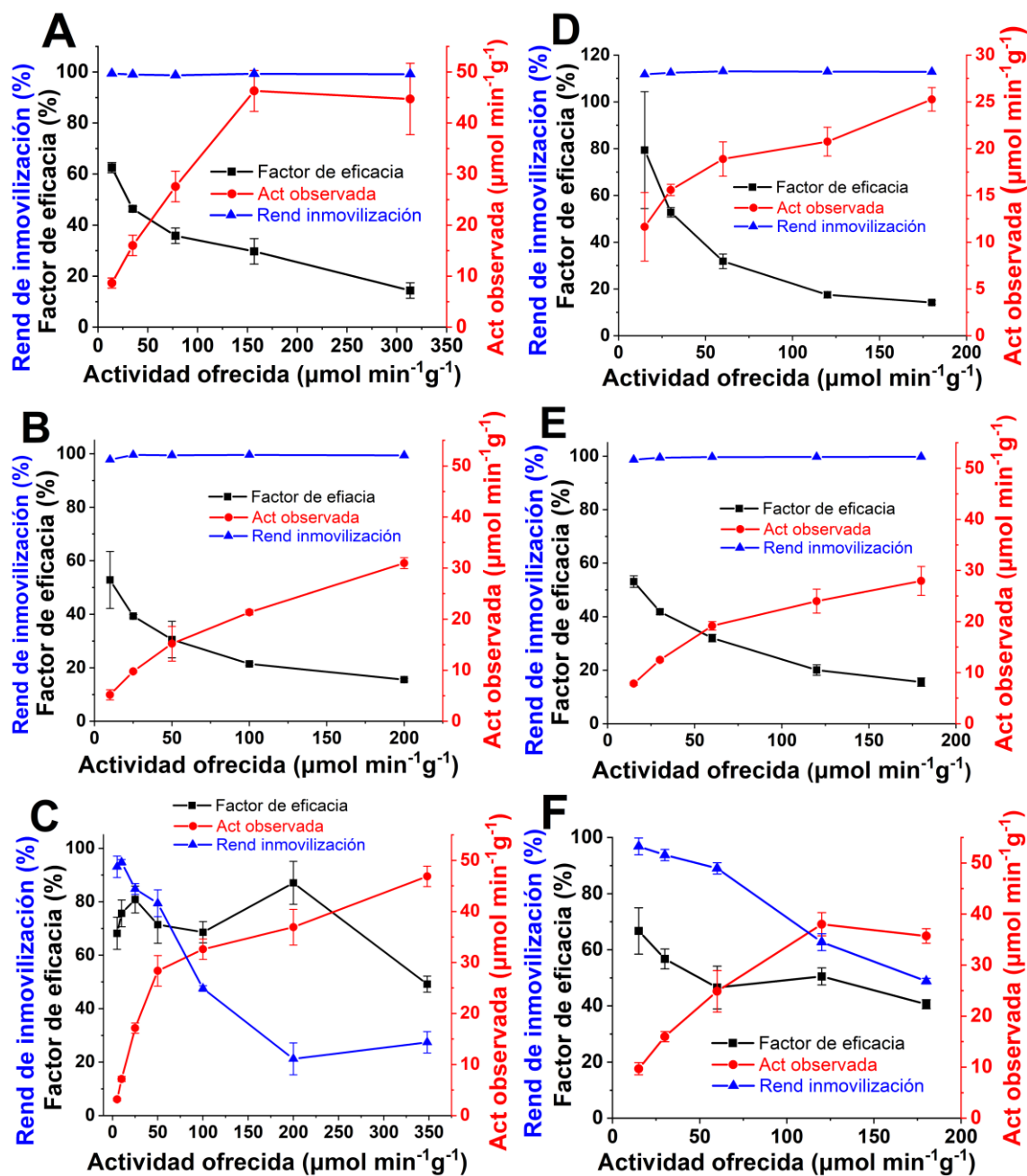
**Tabla 6.2.** Resumen de los resultados de la inmovilización de GalOx en diferentes soportes sólidos activados.

Química-soporte	Actividad ofrecida ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	Rendimiento de inmovilización (%)	Actividad observada ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	Factor de eficacia (%)
<b>Glioxil-Agarosa</b>	100	99.3 $\pm$ 1.6	36.9 $\pm$ 2.2	37.2 $\pm$ 2.2
<b>VS-Agarosa</b>	100	98.7 $\pm$ 0.44	32.2 $\pm$ 1.5	32.7 $\pm$ 1.5
<b>DS-Agarosa</b>	100	69.8 $\pm$ 3.3	54.1 $\pm$ 6.6	77.5 $\pm$ 9.5
<b>Aldehído-Purolite</b>	100	99.0 $\pm$ 1.4	38.7 $\pm$ 1.8	39.1 $\pm$ 1.9
<b>VS-Purolite</b>	100	99.9 $\pm$ 0.33	32.9 $\pm$ 2.5	33.0 $\pm$ 2.5
<b>DS-Purolite</b>	100	82.8 $\pm$ 2.2	56.2 $\pm$ 1.5	67.8 $\pm$ 1.8

## Capítulo 6. Galactosa oxidasa

Comparando con los datos de la bibliografía sobre la inmovilización de GalOx, se encontraron resultados interesantes. Matthey et al. lograron un rendimiento de inmovilización del 80% [197], pero no se ofrecieron valores de eficiencia catalítica o de factor de eficacia, por lo que no se pueden extraer más conclusiones. En el prometedor trabajo de Wu et al [441], se inmovilizaron conjuntamente GalOx, HRP y catalasa, y se obtuvieron rendimientos de inmovilización extraordinarios (96%) en nanoflores de Cu. Además, se obtuvieron rendimientos del 96% para DFF (2,5-diformilfurano) con las enzimas co-inmovilizadas, muy superiores al 53% obtenido con enzimas solubles sin co-inmovilización. En el estudio de Medina-Castillo et al. [440], los rendimientos de inmovilización fueron moderados (40-70%) tanto por unión covalente como por adsorción iónica; sin embargo, los factores de eficacia fueron significativamente bajos (1-10%), mostrando la dificultad de inmovilizar con éxito esta enzima sobre soportes activados.

A continuación, se investiga el efecto de la carga enzimática sobre la inmovilización de la enzima. Se midieron el rendimiento de inmovilización, la actividad observada y el factor de eficacia (**Figura 6.6**).



**Figura 6.6.** Caracterización de las preparaciones inmovilizadas de GalOx al variar la actividad ofrecida sobre soporte sólido. Las reacciones se realizaron en viales tipo tanque agitado con un volumen de reacción de 5 mL, 30 °C de temperatura, 250 rpm de agitación, 250 mM de galactosa,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  como activador, y 2-4  $\text{mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$  de biocatalizador (GalOx inmovilizado) en el medio de reacción. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. *Panel A:* GalOx en glioxil-agarosa; *Panel B:* GalOx en vinil sulfona-agarosa; *Panel C:* GalOx en dextrán sulfato-agarosa; *Panel D:* GalOx en aldehído-Purolita; *Panel E:* GalOx en vinil sulfona-Purolita; *Panel F:* GalOx en dextrán sulfato-Purolita.

Las **Figura 6.6A-D**, que muestran los resultados de GalOx inmovilizada covalentemente, muestran tendencias similares. Los rendimientos de inmovilización son consistentemente altos, superando el 95%, lo que indica una fuerte afinidad entre la enzima y el material de soporte activado. Sin embargo, el factor de eficacia, que mide la eficiencia de la enzima inmovilizada en comparación con su forma libre, es significativamente inferior al 100% a bajas cargas de enzima. Esto sugiere que pueden haberse producido modificaciones estructurales durante el proceso de inmovilización, dando lugar a una disminución de la actividad enzimática [173,185,196,202]. Además, a medida que aumenta la actividad enzimática ofrecida, se produce una clara disminución del factor de eficacia, lo que sugiere la presencia de restricciones difusionales dentro del sistema [408,446]. Estas restricciones parecen ser ligeramente más pronunciadas en los soportes de Purolita.

En las **Figura 6.6E-F**, que corresponden a una inmovilización reversible por intercambio catiónico, se observa una tendencia a la saturación de la cantidad inmovilizada dentro de la matriz polimérica, evidenciada por la disminución del rendimiento de inmovilización. En consecuencia, el factor de eficacia presenta una tendencia decreciente más suave en comparación con los casos anteriores, mostrando una menor dependencia de la actividad enzimática ofrecida. Este comportamiento puede atribuirse a la menor actividad volumétrica dentro del soporte y/o al menor impacto de las restricciones difusionales en esta química de inmovilización, que se estudiará más adelante. El tamaño relativamente grande del polímero de dextrano sulfato podría impedir que la enzima se distribuyera homogéneamente dentro de la partícula, contribuyendo a estas observaciones. Cabe destacar que, en comparación con la inmovilización covalente, se observan factores de eficacia más elevados con cargas bajas, lo que indica que se minimiza la modificación estructural de la enzima, ya que se sabe que este tipo de método de inmovilización es más suave por naturaleza [173,196,201,203].

### **6.2.2. Estudio de la estabilidad enzimática**

La estabilidad de las preparaciones enzimáticas inmovilizadas se investigó mediante una serie de experimentos destinados a analizar su estabilidad en condiciones de reposo. Para evaluar la estabilidad, los biocatalizadores se incubaron en diversas condiciones y se extrajeron alícuotas para medir la actividad evaluando el consumo inicial de oxígeno en reactores tipo tanque agitado (**Figura 3.3**) en condiciones estándar. La estabilidad de la enzima se caracterizó cuantificando la vida media ( $t_{1/2}$ ) y la actividad

retenida a un determinado tiempo de incubación. La actividad retenida se refiere al porcentaje de actividad de la enzima en relación con su actividad inicial. La vida media ( $t_{1/2}$ ) representa el tiempo necesario para que la enzima pierda el 50% de su actividad inicial. El primer aspecto que se analizó fue el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima. Las preparaciones enzimáticas con soporte sólido se sometieron a condiciones de incubación a temperatura ambiente y a 40°C, y los resultados se presentan en la **Tabla 6.3**. En la **Figura 11.51** se muestran de los cursos de inactivación más en detalle.

**Tabla 6.3.** Estabilidad de la galactosa oxidasa soluble e inmovilizada a temperatura ambiente y en condiciones de inactivación térmica (40 °C). La actividad ofrecida en todas las preparaciones fue de 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ .

		GalOx soluble, 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Gly-Ag	VS-Ag	DS-Ag
RT	$t_{1/2}$ (h) <sup>[a]</sup>	166	209	481	>300
	Actividad retenida a 234 h	28%	44%	73%	65%
	$t_{1/2}$ (h) <sup>[a]</sup>	57.8	110	165	78.4
40 °C	Actividad retenida a 142 h	16%	51%	66%	26%

[a] Para obtener el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ), los datos se ajustaron a una función de decaimiento exponencial y se extrapolaron en caso necesario.

Para investigar el impacto de los medios no acuosos en la estabilidad del biocatalizador, se incubó la enzima inmovilizada en presencia de diferentes cosolventes. Se eligieron el etanol y la acetona por su alta disponibilidad, bajo coste y respeto al medio ambiente. En la **Tabla 6.3** se presenta un resumen de los resultados, mientras que en la **Figura 11.52** se ofrece un análisis detallado de los cursos de inactivación. Los resultados revelan una mejora significativa en la estabilidad del derivado inmovilizado a base de dextrán-sulfato en comparación con la enzima soluble. Este hallazgo es particularmente interesante para la aplicación práctica teniendo en cuenta que la solubilidad del oxígeno

en estos cosolventes es considerablemente mayor que en el agua [26,27]. Publicaciones recientes han destacado las ventajas de trabajar con medios no convencionales [102,205,242], lo cual es especialmente relevante cuando la enzima de interés muestra una fuerte dependencia de la concentración de oxígeno. Curiosamente, el derivado inmovilizado a base de vinil sulfona exhibe una estabilidad similar e inesperadamente menor en comparación con la enzima libre en acetona. La estabilidad de los derivados en etanol es notablemente baja, por lo que resulta difícil extraer conclusiones fiables sobre el rendimiento de los distintos derivados. Futuras investigaciones deberían considerar la monitorización de los resultados en etanol a tiempos de incubación más bajos para una comprensión más completa.

**Tabla 6.4.** Estabilidad de la galactosa oxidasa soluble e inmovilizada a temperatura ambiente y variando el medio de incubación. La actividad ofrecida fue de  $54 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  en ambos casos.

		<b>GalOx soluble, 2 mg·mL<sup>-1</sup></b>	<b>VS-Ag</b>	<b>DS-Ag</b>
<b>NaPi 10 mM</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)<sup>[a]</sup></b>	94.4	>168	239
	<b>Actividad retenida a 168 h</b>	27%	53%	73%
<b>50%(v/v) EtOH en 10 mM NaPi</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)<sup>[a]</sup></b>	16.2	11.2	18.5
	<b>Actividad retenida a 24 h</b>	35%	14%	45%
<b>50%(v/v) acetona en 10 mM NaPi</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)<sup>[a]</sup></b>	33.0	17.5	75.9
	<b>Actividad retenida a 24 h</b>	64%	43%	76%

<sup>[a]</sup> Para obtener el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ), los datos se ajustaron a una función de decaimiento exponencial y se extrapolaron en caso necesario.

Basándose en los resultados obtenidos, puede concluirse que la GalOx inmovilizada en soportes activados con vinil sulfona y dextrán sulfato muestran un

rendimiento significativamente superior al de la enzima libre. Además, el derivado basado en dextrán sulfato muestra resultados particularmente prometedores, exhibiendo una mayor estabilidad y actividad a temperatura ambiente, así como en presencia de disolventes. Esto hace que el biocatalizador basado en dextrán sulfato sea un candidato favorable para su futura aplicación en un biorreactor de oxidación de galactosa, ya que ofrece un mejor rendimiento y fiabilidad durante periodos prolongados. La capacidad de la enzima inmovilizada a base de dextrán sulfato para mantener su actividad a temperatura ambiente y en presencia de disolventes destaca aún más su potencial para aplicaciones prácticas en las que se utilicen tales condiciones. Sin embargo, los resultados bajo condiciones de inactivación térmica son favorables al material de vinil sulfona, seguramente debido a su carácter covalente con una mayor fuerza de enlace.

Revisando los estudios de estabilidad con GalOx inmovilizada encontramos de nuevo el relevante trabajo de Matthey et al. [197]. Se estudió la estabilidad de GalOx inmovilizada sobre soportes epoxy-Purolita para la oxidación de lactosa a 25 °C durante 3h y se repitió hasta 20 días, obteniéndose una actividad retenida de casi el 100%. También se realizaron estudios de estabilidad en condiciones de inactivación térmica, obteniéndose resultados significativamente mejores con la enzima inmovilizada. En este caso, se ha complementado su estudio con diferentes químicas de inmovilización y mayores tiempos de inactivación térmica.

### **6.2.3. Investigación y caracterización de los factores que limitan la actividad**

Como se ha comentado, una de las principales limitaciones de las enzimas inmovilizadas en materiales porosos es la existencia de restricciones difusionales. Éstas además varían según el tipo de material de inmovilización, el tamaño de poro, el radio de partícula o la carga enzimática. En la bibliografía, existen algunos estudios de las restricciones difusionales en oxidasas inmovilizadas, aunque hasta ahora esta cuantificación sólo se ha realizado en soportes hidrófobos [202,381], donde la inmovilización del indicador luminiscente es directa. Sin embargo, esta cuantificación no se ha realizado en materiales hidrofílicos como la agarosa, a pesar de ser un material ampliamente utilizado en inmovilización de enzimas.

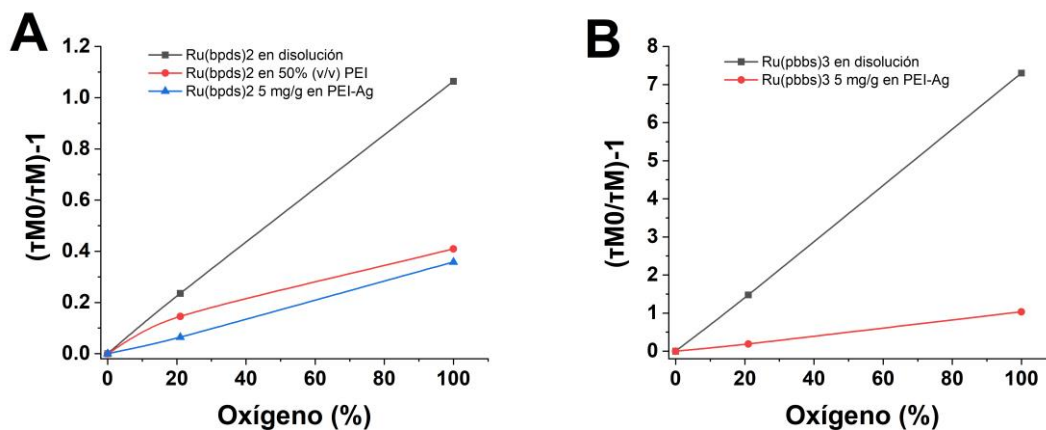
El objetivo de esta sección es la identificación y análisis del gradiente de oxígeno de la GalOx en partículas porosas de agarosa y Purolite. Para ello, en primer lugar, se realiza la caracterización de indicadores luminiscentes y se escoge el más adecuado para su co-inmovilización con la enzima. Posteriormente, se analizan los gradientes de

oxígeno variando la carga enzimática y se investiga la relación entre el gradiente obtenido y eficiencia catalítica midiendo la limitación de la accesibilidad restringida del sustrato a la GalOx inmovilizada.

### ***Caracterización de indicadores luminiscentes mediante TCSPC***

El objetivo de la caracterización del complejo luminiscente es la selección del indicador más adecuado según su sensibilidad en nuestra ventana de operación (0-21% O<sub>2</sub>). Se analizaron los tiempos de vida medios ( $\tau$ ) de dos complejos de rutenio distintos, Na<sub>2</sub>[Ru(bpds)<sub>2</sub>(F<sub>15</sub>ap)] y Na<sub>4</sub>[Ru(pbbs)<sub>3</sub>], en disolución e inmovilizados en PEI-agarosa a cierta concentración. La concentración empleada fue la misma de ambos compuestos, aunque este parámetro no influye en el valor del tiempo de vida. Además, se analizaron a distintos valores de saturación en oxígeno (en presencia de argón al 0%, 21% en saturación con aire y al 100% de O<sub>2</sub> con suplemento externo) para la obtención del rango dinámico de cada indicador. Es interesante mencionar que los tiempos de vida de los indicadores en disolución obedecían a un decaimiento monoexponencial, mientras que al introducir el polímero de PEI en el microambiente de los indicadores el decaimiento de los tiempos de vida se ajustó mejor a una función biexponencial. Esto indica la existencia de dos grupos o poblaciones del indicador cuando hay presencia de PEI.

Una vez adquiridos los tiempos de vida de los indicadores en los distintos medios y condiciones de saturación de O<sub>2</sub>, aquellos que se ajustaron a un decaimiento biexponencial poseen dos tiempos de vida que caracterizan la función ( $\tau_1$  y  $\tau_2$ ). Éstos se transforman en uno sólo ( $\tau_M$ ) y se referencia frente a su tiempo de vida en nula presencia de oxígeno ( $\tau_{M0}$ ). En la **Figura 6.7** se muestra el tiempo de vida normalizado ( $\tau_{M0}/\tau_M$ )-1 frente al % de oxígeno en que se midió el indicador para cuantificar el rango dinámico de medida de ambos compuestos. En las **Tabla 11.9-11.11** se muestra la caracterización completa por TCSPC de los indicadores luminiscentes y las condiciones de medida.



**Figura 6.7.** Rango dinámico de medida del [Ru(bpds)<sub>2</sub>] y [Ru(pbbs)<sub>3</sub>] en distintas condiciones de % oxígeno e incubados tanto en disolución como inmovilizados en PEI-Ag. *Panel A:* [Ru(bpds)<sub>2</sub>]; *Panel B:* [Ru(pbbs)<sub>3</sub>].

En la **Figura 6.7** se observa claramente que el compuesto [Ru(pbbs)<sub>3</sub>] posee un rango dinámico bastante superior al [Ru(bpds)<sub>2</sub>], también en la ventana de operación de interés (0-21% O<sub>2</sub>). Muy llamativo es descenso del rango dinámico cuándo el indicador está en presencia de la PEI. Esto disminuye significativamente la relación señal/ruido de nuestro indicador, pero es la forma escogida de inmovilización del compuesto luminiscente. Quizás en otros estudios es interesante profundizar en la investigación de otro método de inmovilización del indicador en vista de los resultados obtenidos.

### **Gradientes de oxígeno para demostrar restricciones difusionales**

Se ha analizado el impacto de la carga de biocatalizador en las restricciones difusionales dentro del sistema, manifestadas por los gradientes de concentración de oxígeno entre la fase líquida y las partículas de biocatalizador. La magnitud de estos gradientes depende de factores tales como el tamaño de partícula, el tamaño de poro y la distribución de proteína dentro de la partícula [201–203,396]. En primer lugar, se muestra la inmovilización de galactosa oxidasa (GalOx) sobre vinil sulfona-Ag. Mediante el análisis de la interacción de la carga enzimática, los gradientes de oxígeno y las limitaciones difusionales, pretendemos mejorar nuestra comprensión de la optimización del acceso al sustrato en sistemas biocatalizadores porosos.

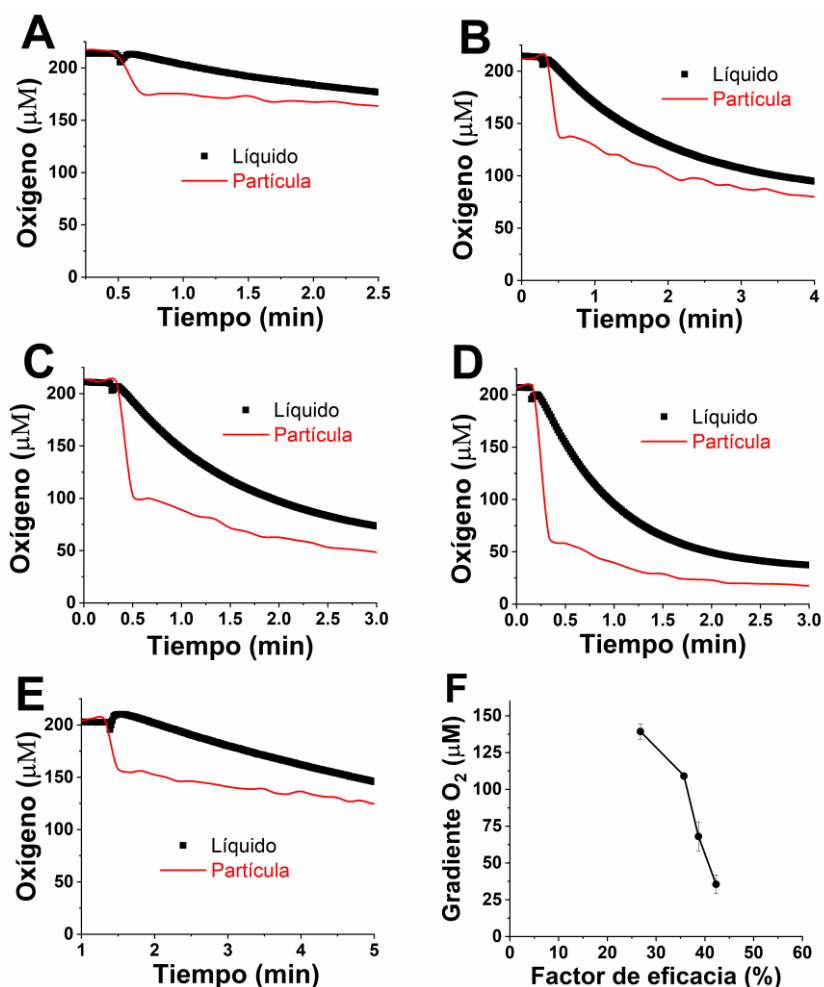
En primer lugar, se comprobó que el indicador luminiscente respondía correctamente en fase líquida. Esto se realizó desoxigenando un medio con galactosa mediante GalOx soluble. Se midió la concentración de oxígeno tanto con el sensor de oxígeno comercial de Pyroscience como con el complejo de Rutenio en el equipo

OPTOSEN. Los resultados se muestran en los Anexos (**Figura 11.53**), donde se muestra un solapamiento de ambos cursos de oxígeno, siendo el tiempo de respuesta del equipo comercial ligeramente superior. Por tanto, es posible medir los gradientes de O<sub>2</sub> si los hubiera.

Posteriormente, se analizó la distribución espacial del indicador luminiscente en la partícula mediante microscopía de fluorescencia, para asegurar que éste se localizaba de forma homogénea en la partícula, Anexos (**Figura 11.54**). Es cierto que observando el gradiente de oxígeno producido podíamos intuir que la inmovilización del indicador se realizaba de forma homogénea, si no, se observaría un curso de oxígeno muy similar al medido en la fase líquida, pero igualmente se observó fácilmente con esta técnica aprovechando la fluorescencia intrínseca del complejo de rutenio.

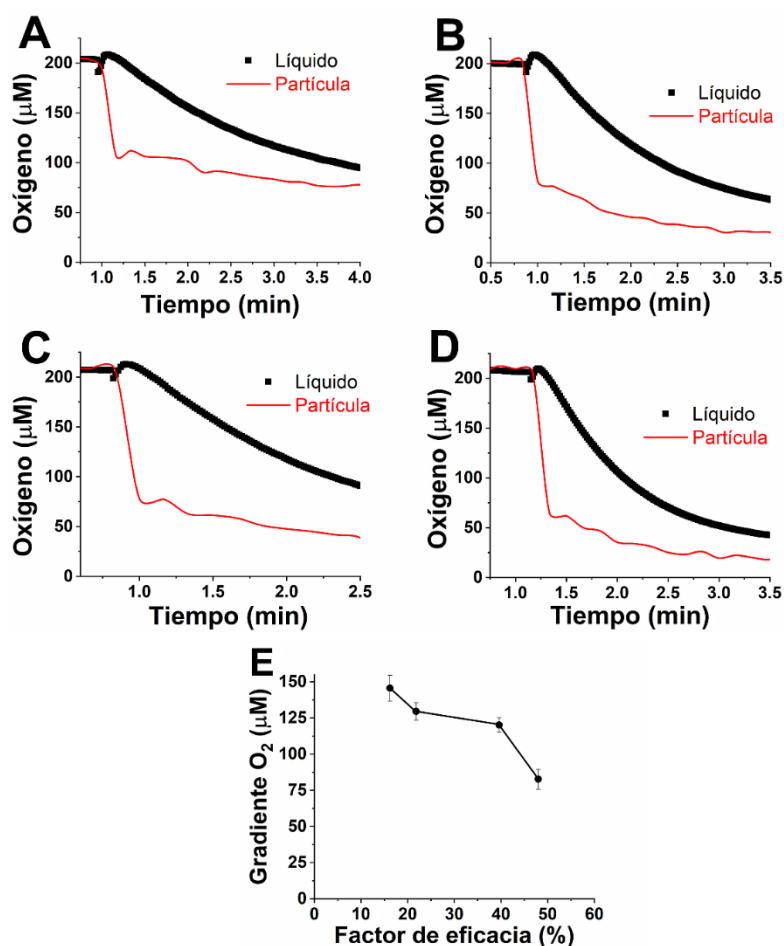
Las **Figura 6.8-6.10** muestran el consumo de oxígeno en reactores tipo tanque agitado (**Figura 3.3**), tanto en el líquido como en la partícula a diferentes cargas de enzima. El último panel de estas figuras ilustra el gradiente de oxígeno medido en función del factor de eficacia. Concretamente, la **Figura 6.8** representa la influencia de la carga creciente de GalOx en el gradiente de oxígeno dentro del soporte de VS-Ag. El gradiente muestra una curva ligeramente descendente, partiendo de valores relativamente bajos. Los paneles A-D proceden de experimentos en los que se utilizó HRP como activador, que es un método tradicional de activación enzimática. Sin embargo, la HRP es cara y difícil de inmovilizar en el biocatalizador. Para explorar métodos de activación alternativos, investigamos proteínas con grupos hemo como posibles activadores. Se realizó un cribado preliminar de compuestos activadores, cuyos resultados se resumen en la **Tabla 6.1**. Resultó alentador que la hemoglobina (Hb) mostrara un poder de activación comparable al de la HRP, al tiempo que resultaba más económica, lo que la convertía en un sustituto prometedor. En el experimento con Hb como activador (**Figura 6.8E**), se observa un comportamiento muy similar al obtenido con HRP. Además, no se observaron interferencias en la detección analítica del oxígeno debido al apagado del indicador luminiscente por el activador. Por lo tanto, se decidió emplear Hb como activador en los siguientes experimentos. En el panel F se recogen los valores de los gradientes de oxígeno máximos (o iniciales) y se grafican frente a los factores de eficacia, para observar su influencia. Es muy interesante advertir la pequeña variación del factor de eficacia ante la notable diferencia en los gradientes de oxígeno. Esto se puede deber a que el factor de eficacia ya se encuentra bastante limitado por modificaciones estructurales de la enzima, comenzando en un valor ~40%, y por tanto su sensibilidad al gradiente de O<sub>2</sub> se ve

bastante reducida. Pero se puede concluir que en este caso el factor de eficacia no está tan afectado por las restricciones difusionales respecto al oxígeno.



**Figura 6.8.** Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre VS-agarosa. Las reacciones se llevaron a cabo con 250 mM de galactosa a 30°C en 6 mL de volumen de reacción. Se utilizó HRP (0.03 mg·mL<sup>-1</sup>) en la reacción para activar la GalOx en los paneles A-D. El indicador de oxígeno [Ru(pbbs)<sub>3</sub>]<sup>4+</sup> se inmovilizó a 1.0 mg·g<sub>soporte</sub><sup>-1</sup> en todos los casos. La concentración de biocatalizador en la reacción fue de 4.3 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup> en los paneles A-D. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. En cada panel se muestra una actividad ofrecida distinta. *Panel A:* 10 U·g<sup>-1</sup>; *Panel B:* 19 U·g<sup>-1</sup>; *Panel C:* 38 U·g<sup>-1</sup>; *Panel D:* 78 U·g<sup>-1</sup>; *Panel E:* 10 U·g<sup>-1</sup>, 0.4 mg·mL<sup>-1</sup> de Hb como activador, concentración del biocatalizador 17 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup>. *Panel F:* Gradiente de oxígeno frente a factor de eficacia para los paneles A-D.

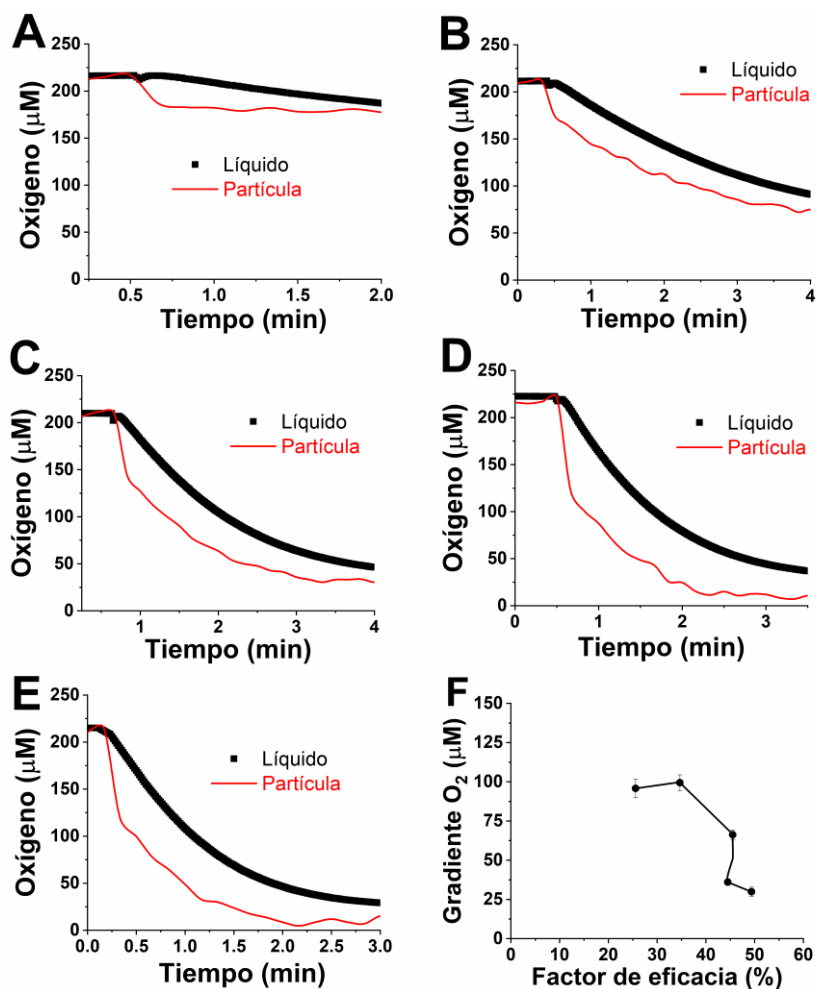
La **Figura 6.9** ilustra el análisis de los biocatalizadores GalOx con vinil sulfona-Purolite. Como se puede observar, los gradientes de oxígeno son relativamente elevados incluso a bajas cargas de enzima. En este caso, se esperaban gradientes de  $O_2$  superiores en los materiales de Purolite frente a agarosa debido a su mayor tamaño de partícula, concretamente el doble. No se conoce con exactitud el tamaño de poro de la agarosa, sólo su grado de entrecruzamiento, pero según Benítez-Mateos y Contente [342] la porosidad de ambos materiales es similar. Dado que el tamaño de partícula y el tamaño de poro tienen un efecto opuesto en la limitación difusional, es lógico observar mayores gradientes en el material de metacrilato. Enfocándonos ahora en el panel E, en este caso el factor de eficacia es bastante más dependiente del gradiente de  $O_2$  que en el caso anterior de VS-Ag. Estos resultados ponen de manifiesto que la Purolite es un material más afectado por restricciones difusionales que la agarosa 4BCL empleada, principalmente por su mayor radio de partícula.



**Figura 6.9.** Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre VS-Purolite. La reacción se llevó a cabo con 250 mM de galactosa a 30°C en 6 mL de volumen de reacción. Se utilizó hemoglobina

libre  $0.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la reacción para activar la GalOx. Se inmovilizó  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{soporte}}^{-1}$  de indicador de oxígeno  $\text{Ru}(\text{dpp})_3$  en todos los casos. La concentración de biocatalizador en la reacción fue de  $4.3 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$  en todos los casos. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. En cada panel se muestra una actividad ofrecida distinta. *Panel A*:  $25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel B*:  $50 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C*:  $100 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D*:  $200 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel E*: Gradiente de oxígeno frente a factor de eficacia.

La **Figura 6.10** muestra los resultados obtenidos con la GalOx soportada mediante química de inmovilización reversible en dextrán-sulfato. Al igual que en las observaciones anteriores, se observa un aumento del gradiente de oxígeno con la carga de enzima. Sin embargo, se observa una disminución significativa del valor absoluto del gradiente en comparación a la inmovilización en VS (**Figura 6.9**). Dado que el material soportado permanece inalterado, este fenómeno puede atribuirse a la química de inmovilización específica empleada. El uso de dextrán sulfato puede contribuir a reducir las limitaciones difusionales y a mejorar la eficiencia de utilización del sustrato, como demuestra también el mayor factor de eficacia observado con este polímero (**Figura 6.6**). La hipótesis en este caso es que el dextrán-sulfato, al ser un polímero relativamente grande, se podría adsorber en las capas más externas de la Purolita. Esto ocasionaría una localización heterogénea de la enzima inmovilizada, situándose en las capas más externas, generando así menores problemas de difusión [203,204,427]. Además, es interesante observar que en este caso el gradiente de  $\text{O}_2$  máximo parece que se mantiene durante más tiempo, a diferencia de los casos anteriores. Centrándonos en el panel F, se puede observar una menor incidencia del gradiente de  $\text{O}_2$  en el factor de eficacia que en el caso anterior (**Figura 6.9E**), pero aún así mayor que en el caso de la inmovilización sobre agarosa (**Figura 6.8F**).



**Figura 6.10.** Cursos de consumo de oxígeno tanto en el líquido como en la partícula para diferentes actividades ofrecidas de GalOx sobre dextrán sulfato-Purolita. La reacción se llevó a cabo con 250 mM de galactosa a 30°C en 6 mL de volumen de reacción. Se utilizó hemoglobina libre 0.06 mg·mL<sup>-1</sup> en la reacción para activar el GalOx. Se inmovilizó 1.0 mg·g<sub>soporte</sub><sup>-1</sup> de indicador de oxígeno Ru(dpp)<sub>3</sub> en todos los casos. La concentración de biocatalizador en la reacción fue de 5.1 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup> en todos los casos. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. En cada panel se muestra una actividad ofrecida distinta. *Panel A:* 10 U·g<sup>-1</sup>. *Panel B:* 20 U·g<sup>-1</sup>. *Panel C:* 40 U·g<sup>-1</sup>. *Panel D:* 75 U·g<sup>-1</sup>. *Panel E:* 100 U·g<sup>-1</sup>. *Panel F:* Gradiente de oxígeno frente a factor de eficacia.

Lamentablemente, en el caso del biocatalizador de dextrán sulfato-Ag, no se consiguió inmovilizar el indicador de oxígeno y aplicar la técnica de modulación de fase. Los requisitos específicos del complejo indicador de oxígeno para la adsorción iónica y la combinación de polímeros (PEI y DS) no dieron lugar a una señal estable del compuesto luminiscente. No obstante, es probable que el biocatalizador inmovilizado sobre dextrán sulfato-Ag muestre la mayor eficiencia con respecto a las limitaciones

difusionales, en base a los buenos resultados de factor de eficacia mostrados en la **Figura 6.6C**, similar al caso del DS-Purolite.

#### 6.2.4. Caracterización de la coinmovilización del activador

Puesto que se ha propuesto el diseño de un biocatalizador inmovilizado y estable, pero esta enzima tiene la particularidad de que necesita un compuesto auxiliar como activador, se ha estudiado su integración en el soporte para que el biocatalizador sea lo más autosuficiente posible.

Para ello, se caracterizó su inmovilización mediante la obtención de sobrenadantes y el análisis de su concentración por espectrofotometría. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.5**. El calibrado de hemoglobina en el espectrofotómetro se muestra en los Anexos (**Figura 11.19**). En resumen, se ofreció una concentración de hemoglobina de  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  en 100 mg de soporte, obteniendo un rendimiento de inmovilización del 20% y una carga proteica máxima en el soporte de  $8.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de soporte.

**Tabla 6.5.** Caracterización de la inmovilización de hemoglobina en DS-Ag. Se ofrecieron  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de hemoglobina a 100 mg de DS-Ag.

Nº Sobrenadante	Absorbancia	Conc ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	0.1224	2.13
2	0.0528	0.91
3	0.0274	0.46
4	0.0188	0.31
5	0.0096	0.15
<b>Total</b>		3.96
		<b><math>\text{mg Hb} \cdot \text{g}_{\text{supp}}^{-1}</math></b>
<b>Rdto inmovilización=</b>	20.8%	8.30

Por último, la **Tabla 6.6** muestra una comparación de los resultados de la actividad de GalOx inmovilizada utilizando hemoglobina soluble y coinmovilizada.

**Tabla 6.6.** Comparación de los resultados de actividad de GalOx inmovilizada con hemoglobina soluble y coinmovilizada.

	<b>Hemoglobina soluble</b>	<b>Hemoglobina coinmovilizada</b>
<b>Hemoglobina (mg·mL<sup>-1</sup>) =</b>	0.6	-
<b>Hemoglobina (mg·g<sub>supp</sub><sup>-1</sup>) =</b>	104	8.3
<b>Act DS-Ag (μmol·min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>) =</b>	24.5	11.8
<b>Act DS-Pur (μmol·min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>) =</b>	17.5	15.4
<b>Act recuperada, DS-Ag =</b>	76.6%	37.0%
<b>Act recuperada, DS-Pur =</b>	54.6%	48.0%

Se ofrecieron 32 μmol·min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> de GalOx. La actividad se midió a 250 mM de galactosa, 30°C, 100 mM de NaPi pH 7 y 250 rpm de agitación magnética.

Observando la **Tabla 6.6** es llamativa la diferencia que existe entre la actividad del biocatalizador de agarosa y Purolite. Parece que el derivado de DS-Pur se beneficia mucho más de la coinmovilización que el de DS-Ag. En el derivado de DS-Ag se observa una reducción aproximadamente del 50% de la actividad cuándo se emplea la Hb coinmovilizada, siendo la concentración de ésta unas 10 veces menor que la empleada en la Hb soluble. Esta reducción parece ser bastante baja, pero es bastante similar a la que se observa en la **Figura 6.1**, por lo que este derivado no se vería muy beneficiado de las ventajas de la coinmovilización. Esto no ocurre con el derivado de DS-Pur, el cual ve mínimamente reducida su actividad con la coinmovilización de Hb, y, por tanto, se ve mucho más beneficiado de esta técnica. Esto seguramente se deba a la localización de la Hb cuando se realiza la coinmovilización. A pesar de emplearse la misma química de inmovilización (dextrán-sulfato), es posible que este polímero penetre mejor en el material de Purolite debido a su mayor tamaño de poro y de partícula, viéndose así mucho más beneficiado de la proximidad de la Hb. Sin embargo, la suposición con la DS-Ag es que tanto el DS como la Hb queden coinmovilizados de forma más superficial, y, por tanto, sigan tan restringidos difusionalmente como la Hb soluble. Hubiese sido muy interesante indagar en este fenómeno y comprobar estas suposiciones, mediante, por ejemplo, microscopía de fluorescencia, como se hace más adelante en otro estudio. Pero tanto los recursos como el tiempo son limitados, así que estas suposiciones no se pudieron comprobar.

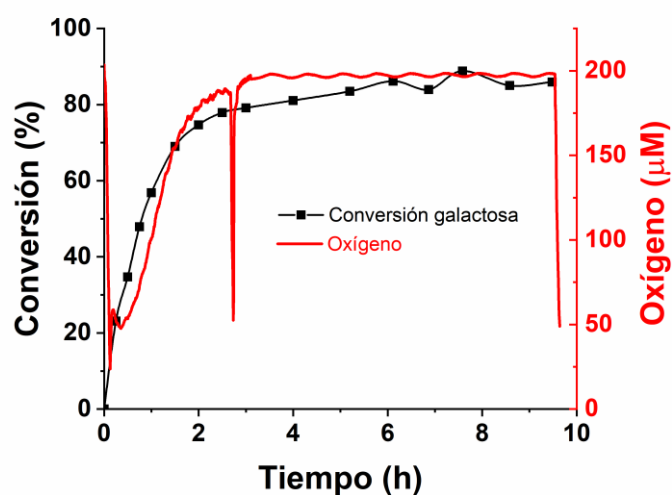
### **6.2.5. Aplicación de un biocatalizador sólido autosuficiente para la oxidación de galactosa en reactor aireado**

En el contexto de la oxidación de galactosa como aplicación biocatalítica, se empleó la coinmovilización de hemoglobina y GalOx sobre soporte de DS-Ag. La elección del dextrán sulfato-Ag como material activado se basó en evidencias previas que destacaban sus características favorables, incluyendo una alta actividad recuperada y restricciones difusionales reducidas (comentado en el apartado anterior). Además, se demostró una inmovilización sencilla de la hemoglobina en el mismo soporte (**Tabla 6.5**). Además, la coinmovilización de hemoglobina ofrece notables ventajas al eliminar eficazmente la necesidad de un suministro externo de activador integrándolo al soporte. No se observó lixiviación de GalOx ni de hemoglobina. Nuestra hipótesis consiste en que la coinmovilización electrostática de GalOx y hemoglobina sobre el dextrán sulfato polimérico en los materiales porosos conduce al confinamiento de las dos proteínas en los poros del portador, pero la ausencia de unión irreversible a la superficie permite el acceso sin restricciones de la hemoglobina como activador. Un enfoque similar se ha aplicado últimamente a la retención de cofactores de nicotinamida en catalizadores porosos en la catálisis de deshidrogenasas y al diseño de biocatalizadores heterogéneos autosuficientes [447,448]. No obstante, es esencial reconocer que existe un límite práctico de cantidad de hemoglobina que puede unirse al soporte activado. Esta limitación puede causar una reducción de la actividad máxima exhibida por el biocatalizador, siendo el grado de reducción dependiente de la concentración de hemoglobina empleada. En la **Tabla 6.6** se ofrecen más detalles al respecto.

Para evaluar el rendimiento del biocatalizador diseñado a mayor escala, se realizaron experimentos empleando un reactor aireado de 500 mL. El objetivo era alcanzar una alta conversión de galactosa mediante un suministro externo de aire, promoviendo así una cinética de reacción eficiente. Obsérvese que se utilizó catalasa libre para mantener una concentración de peróxido de hidrógeno suficientemente baja. En estos experimentos, se empleó deliberadamente una carga enzimática baja de aproximadamente  $32 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida, teniendo en cuenta la reducción del rendimiento de inmovilización observado con cargas enzimáticas más altas. La decisión de elegir una carga baja de enzima fue impulsada por el objetivo de mejorar la velocidad de reacción específica mediante el ajuste de la concentración del biocatalizador en el volumen de reacción ( $\text{g}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}_{\text{reacción}}^{-1}$ ), en lugar de aumentar la carga de enzima en la partícula

( $\text{mg}_{\text{GalOx}} \cdot \text{g}_{\text{soporte}}^{-1}$ ). Este enfoque estratégico se eligió para minimizar el impacto de las restricciones difusionales, que han sido reconocidas por su capacidad para disminuir el factor de eficacia del biocatalizador. Al adoptar esta metodología, se busca un equilibrio entre la carga enzimática y la cinética de reacción, con el objetivo último de alcanzar valores de conversión elevados y mitigar al mismo tiempo los efectos adversos causados por las limitaciones difusionales. La carga de biocatalizador sólido se fijó para obtener una velocidad de reacción en torno a  $0.24 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ , sin tener en cuenta el posible efecto negativo de la catalasa sobre la velocidad de reacción. Bajo las condiciones de aireación elegidas, se midió un  $k_{\text{La}}$  (coeficiente volumétrico de transferencia de materia) de  $0.27 \text{ min}^{-1}$ . Esta velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), unida al oxígeno producido por la catalasa en la reacción, nos llevó a estimar un caudal volumétrico de oxígeno de unos  $0.19 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ . Estos cálculos indican que el proceso estaba teóricamente limitado en parte por la transferencia de oxígeno.

La **Figura 6.11** muestra la evolución de la conversión de galactosa y de la concentración de oxígeno. Además, se analizó la velocidad de consumo de oxígeno en determinados puntos para evaluar la actividad *in situ* del biocatalizador, que puede apreciarse en la repentina caída instantánea de la concentración de oxígeno en condiciones de anulación de la OTR. Los resultados de la actividad observada a diferentes tiempos se muestran en los Anexos (**Tabla 11.12**), donde se demuestra la gran conservación de actividad durante la reacción.



**Figura 6.11.** Reacción de oxidación de galactosa en biorreactor con biocatalizador/activador coinmovilizado. La reacción se llevó a cabo en un biorreactor tipo tanque agitado de 500 ml con suministro de aire, control de temperatura a  $30^\circ\text{C}$  y

tampón 100 mM NaPi pH 7.0. Como biocatalizador se empleó dextrán sulfato-Ag con una carga enzimática de  $32 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . La hemoglobina se coinmovilizó a  $8 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{soporte}}^{-1}$  como activador. Condiciones de reacción: volumen de reacción de 165 mL, galactosa inicial de 25 mM, carga de GalOx de  $25.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , concentración de biocatalizador de  $24.2 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$ , catalasa libre de  $0.61 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , agitación a 200 rpm y velocidad de flujo de aire de  $0.2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

En la **Figura 6.11**, se observa una rápida conversión progresiva de galactosa que se aproxima al 80% al cabo de 3 h, lo que corresponde a una velocidad de reacción media de  $0.110 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  en este intervalo de tiempo. La conversión máxima de reacción alcanza un satisfactorio 90% al cabo de unas 8 horas. Es posible apreciar que, en el periodo de reacción inicial, la tasa de conversión observada es más elevada mientras que la concentración de oxígeno disminuye debido al control OTR de la reacción. A medida que la tasa de conversión disminuye, la concentración de oxígeno aumenta mostrando la transición a un control total de la reacción. Debe tenerse en cuenta que el oxígeno también se genera por la reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno, lo que daría lugar a una subestimación de la actividad observada mediante el consumo de oxígeno.

Tras realizar los cálculos, se obtuvo un número de recambio total (TTN) de  $4.43\cdot 10^5$  ( $\text{mol}_{\text{producto}}/\text{mol}_{\text{GalOx utilizado}}$ ) y una frecuencia de recambio (TOF) de  $41 \text{ s}^{-1}$  en el primer intervalo de 3 h, considerando la concentración de proteína en la preparación comercial. Por último, conviene destacar el notable rendimiento del biocatalizador en el intervalo de 9 h de reacción. Durante este periodo, a pesar de la considerable disminución de la concentración de galactosa, el biocatalizador mostró una actividad sostenida a la mitad de la velocidad de reacción observada a las 3 horas. Este hallazgo confirma la notable estabilidad operativa y la actividad duradera de nuestro biocatalizador durante todo el proceso de reacción. Sin embargo, para confirmar la estabilidad operacional del biocatalizador, deberían realizarse experimentos de reutilización en varios ciclos o de adición de galactosa adicional a determinados tiempos de reacción. Además, emplear el biocatalizador en un reactor de flujo continuo añadiría más interés, ya que permitiría un funcionamiento continuo a elevadas concentraciones de galactosa aumentando la productividad [254,449,450].



---

---

**CAPÍTULO 7.**

**CONTROL Y PREDICCIÓN  
DE LA DISTRIBUCIÓN DE  
PROTEÍNA EN  
BIOCATALIZADORES  
SÓLIDOS POROSOS**

---

---



## **7. CONTROL Y PREDICCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNA EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS POROSOS**

En el campo de la ingeniería de la reacción química, se reconoce ampliamente que la distribución del catalizador en una partícula tiene un impacto significativo en las propiedades finales del catalizador. La actividad catalítica y la estabilidad operativa se ven muy influidas por la localización de la enzima, principalmente de forma heterogénea (en la superficie) u homogénea. En las reacciones con un solo catalizador, las ventajas e inconvenientes se derivan del control de las restricciones difusionales y la modulación de la estabilidad operativa del catalizador. Sin embargo, en las reacciones multienzimáticas, la localización de los catalizadores desempeña un papel fundamental para lograr un rendimiento óptimo. Por ejemplo, en las cascadas ortogonales, la colocación de las enzimas es crucial para una catálisis eficaz. En las reacciones consecutivas, la distribución de los catalizadores en la partícula puede manipularse para modular el perfil de formación de productos [399,451–453].

Los investigadores han desarrollado múltiples estrategias para ejercer un control preciso sobre la química de la inmovilización, permitiendo actuar en mayor detalle sobre la química de las reacciones superficiales [203,204,454]. En esta sección, se revisan los conceptos de las reacciones dentro de partículas porosas para modelizar el proceso de inmovilización y estudiarlo en mayor profundidad. El objetivo es proporcionar una rápida cuantificación y comprensión de la distribución de proteínas basada únicamente en parámetros de inmovilización fácilmente accesibles.

### **7.1. EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN: TRANSFERENCIA DE MATERIA Y PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS**

En la preparación de biocatalizadores en soporte sólido mediante la inmovilización enzimática, el procedimiento experimental implica la incubación de soluciones proteicas en partículas activadas con grupos funcionales reactivos. Este proceso implica la transferencia de materia de las moléculas de proteína en la superficie de la partícula, seguido en paralelo de su difusión a través de los poros y las reacciones entre la proteína y el soporte. Para describir la distribución de la concentración de proteína dentro de la partícula, se emplea la Ec 3.22 (pero siendo el sustrato dicha proteína), que

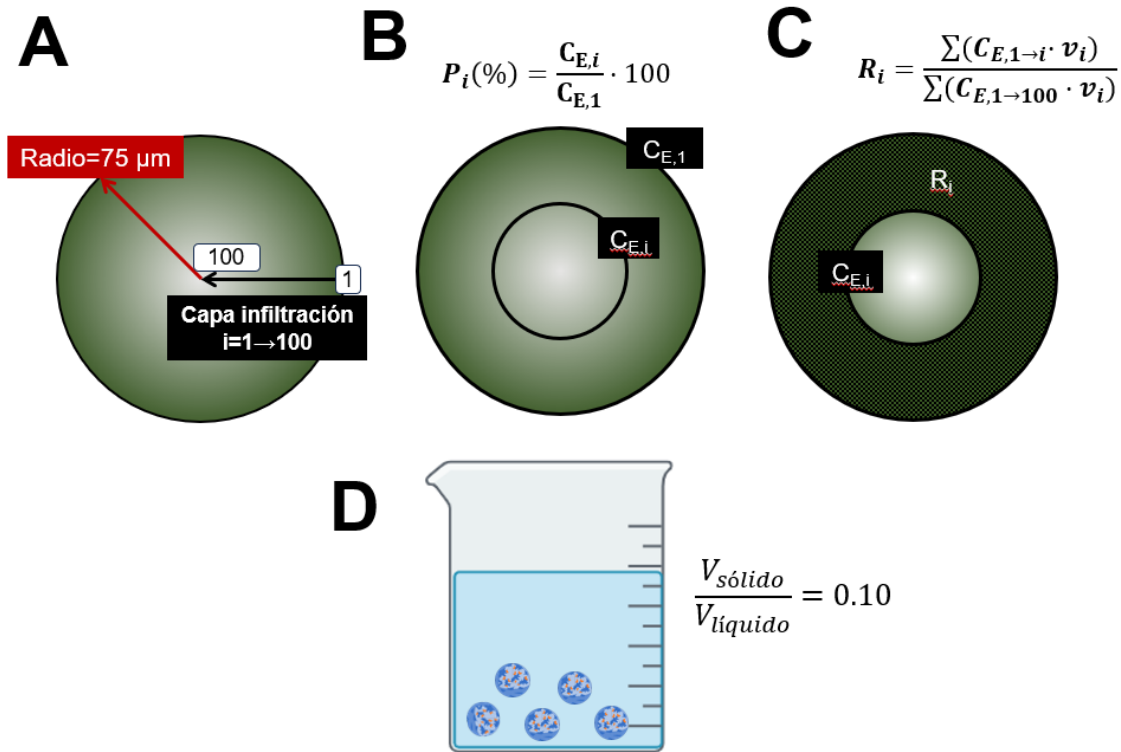
relaciona el perfil local de concentración de proteína con la posición a lo largo del radio y el tiempo. Además, se considera que la velocidad de inmovilización es proporcional a la concentración de proteína,

$$R_E = k \cdot C_E \quad (\text{Ec 7.1})$$

Dónde  $R_E$  es la velocidad de inmovilización de la enzima en  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $k$  es la constante cinética de primer orden en  $\text{min}^{-1}$  y  $C_E$  es la concentración de enzima en  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

La Ec 3.24 describe el perfil de concentración de proteína en el seno del líquido con el tiempo. Estas ecuaciones permiten comprender la dinámica y el comportamiento de la inmovilización de proteínas en partículas esféricas porosas.

El método experimental consiste en el estudio de la inmovilización de proteínas midiendo la actividad enzimática en el sobrenadante y calculando el rendimiento de la inmovilización como un balance de materia. Para evaluar el proceso, se seleccionan partículas de agarosa entrecruzadas de  $75 \mu\text{m}$  de radio como modelo, un soporte comúnmente utilizado para la inmovilización de enzimas. Esta partícula, a su vez, se divide en 100 capas de  $0.75 \mu\text{m}$ , correspondiendo la capa de infiltración 1 a la más superficial, **Figura 7.1A**. Utilizando estos datos y un sistema proteína-partícula definido, se observa que la velocidad de inmovilización viene determinada principalmente por la constante cinética de la reacción superficial de primer orden ( $k$ ).



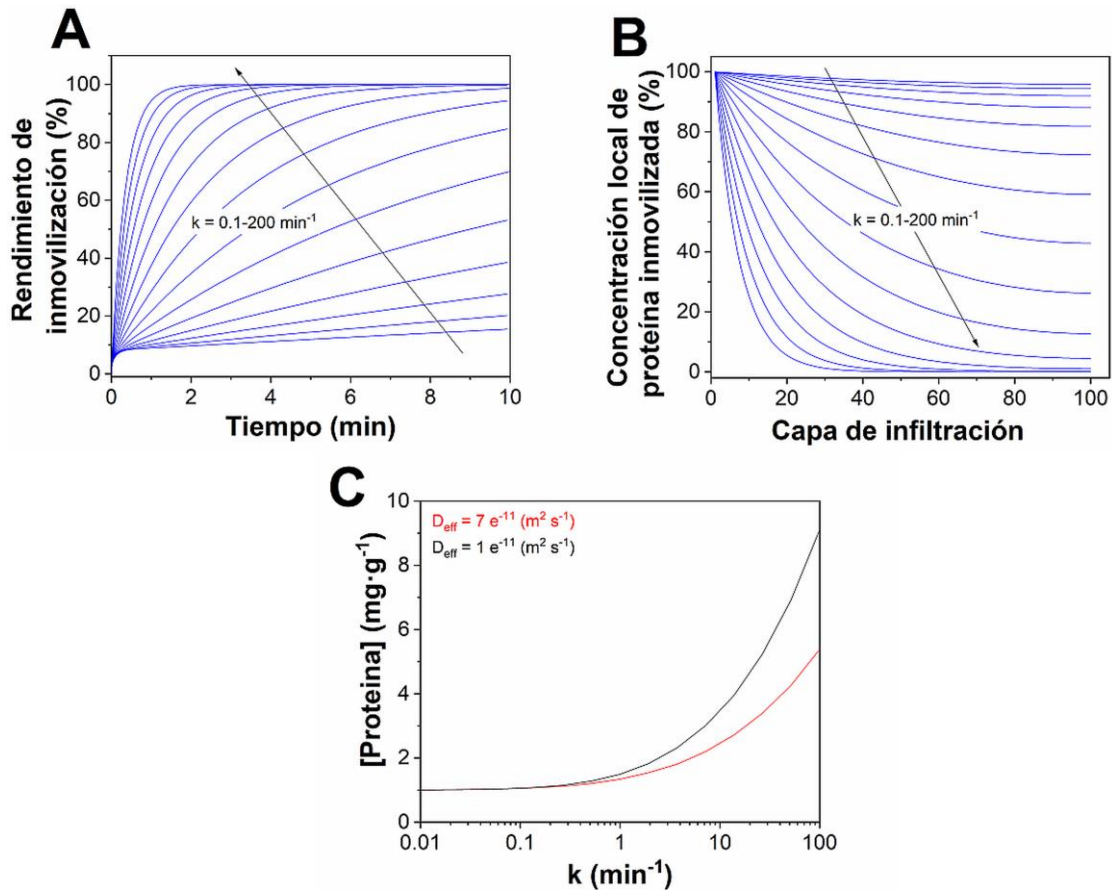
**Figura 7.1.** Esquema de la nomenclatura de la distribución de proteína en la partícula. *Panel A:* La capa de infiltración 1 es la más externa y 100 la más interna. *Panel B:*  $P_i$  representa la concentración local de proteína en la capa  $i$  en comparación con la concentración máxima (la más superficial,  $C_{E,1}$ ). *Panel C:*  $R_i$  representa el porcentaje de proteína acumulada desde la capa  $i$  hasta la capa más superficial. *Panel D:* Representación gráfica de la relación entre el volumen de soporte (sólido) y volumen de reacción (líquido) en la inmovilización.

El proceso de inmovilización puede estar controlado bien por la reacción química de la enzima con el soporte o bien por la difusión de la enzima en el soporte. Si la velocidad de reacción química es limitante (más lenta) la enzima podrá difundirse por toda la partícula, alcanzando las capas más internas y dando lugar a una distribución homogénea. Si por el contrario es la difusión la etapa controlante, la enzima reaccionará rápidamente con el soporte, quedándose localizada en las capas más externas, dando lugar a una distribución más heterogénea.

La **Figura 7.2** ilustra simulaciones de diferentes experimentos de preparación de catalizadores, considerando varias químicas intrínsecas de superficie. En este caso se ha variado la velocidad de reacción entre enzima-soporte en vez de la difusividad efectiva en la partícula, aproximándonos al caso más realista de explorar distintas químicas de inmovilización de una enzima en cierto soporte. La figura muestra el impacto de las

constantes cinéticas intrínsecas características en el proceso de inmovilización. El panel A muestra la progresión del rendimiento de inmovilización a lo largo del tiempo, destacando las variaciones observadas con diferentes constantes cinéticas. El panel B presenta el perfil de distribución de la concentración de proteína inmovilizada a lo largo del radio de la partícula, y proporcionando información sobre los patrones de distribución espacial. Por último, el panel C muestra la concentración de proteína en la capa externa de la partícula una vez que la inmovilización se ha completado. Estas simulaciones contribuyen a comprender la relación entre las constantes cinéticas intrínsecas y los resultados del proceso de inmovilización.

Volviendo a la figura, las velocidades de inmovilización lentas ( $\sim 0.1 \text{ min}^{-1}$ ), que corresponden a tiempos de inmovilización de varias horas, dan lugar a distribuciones uniformes del catalizador, mientras que las velocidades de inmovilización rápidas ( $> 10 \text{ min}^{-1}$ , que completan la inmovilización en cuestión de minutos) dan lugar a distribuciones no uniformes. Además, la velocidad de inmovilización influye en la concentración de proteína en la capa externa del soporte (**Figura 7.2C**), lo que demuestra su influencia en las características del catalizador. Para explorar en mayor profundidad los efectos de la difusión impedida, se realizan simulaciones con un coeficiente de difusión de  $7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , como se muestra en los Anexos (**Figura 11.55**). Estos resultados ayudan a entender el papel de la velocidad de inmovilización y las limitaciones difusionales en la determinación de la distribución del catalizador.



**Figura 7.2.** Simulación de cursos de inmovilización a diferentes constantes cinéticas intrínsecas. *Panel A:* Curso temporal del rendimiento de inmovilización. *Panel B:* Perfil de concentración de proteína inmovilizada en las capas de la partícula. *Panel C:* Concentración final en la capa externa de la partícula una vez completada la inmovilización.

La fenomenología de la inmovilización de proteínas en el interior de soportes porosos puede asemejarse a una reacción sólido-líquido en la que el sustrato líquido es la proteína y el sustrato sólido son los grupos reactivos en la superficie del soporte. Este proceso es posible evaluarlo cuantitativamente utilizando parámetros clásicos de la ingeniería de reacciones químicas, como el factor de eficacia o el módulo de Thiele. En Anexos (**Figura 11.56**) se muestra que el factor de eficacia se mantiene próximo a la unidad para una distribución uniforme de proteínas ( $k$  bajo), pero disminuye significativamente para distribuciones no uniformes ( $k$  alto). El módulo de Thiele, que está relacionado con el factor de eficacia y la uniformidad de la distribución, proporciona información adicional sobre el proceso de inmovilización. Sin embargo, sigue abierta la cuestión de la cuantificación de la magnitud del gradiente en la distribución de proteínas

y su correlación con parámetros experimentales fácilmente accesibles. Es necesario seguir investigando para establecer una conexión entre estas mediciones del gradiente y los parámetros experimentales pertinentes.

## **7.2. VELOCIDAD APARENTE DE INMOVILIZACIÓN COMO PARÁMETRO PREDICTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CATALIZADOR EN LA PARTÍCULA**

Mientras que el radio de la partícula y la difusividad efectiva ( $D_{eff}$ ) pueden medirse fácilmente en montajes experimentales, la velocidad intrínseca de inmovilización suele ser difícil de determinar directamente. Para establecer una correlación entre el gradiente de distribución de proteína y un parámetro fácilmente accesible, nos enfocamos en la velocidad aparente de inmovilización, que depende de su constante cinética ( $k_{iapp}$ ) definida en la Ec 7.2.

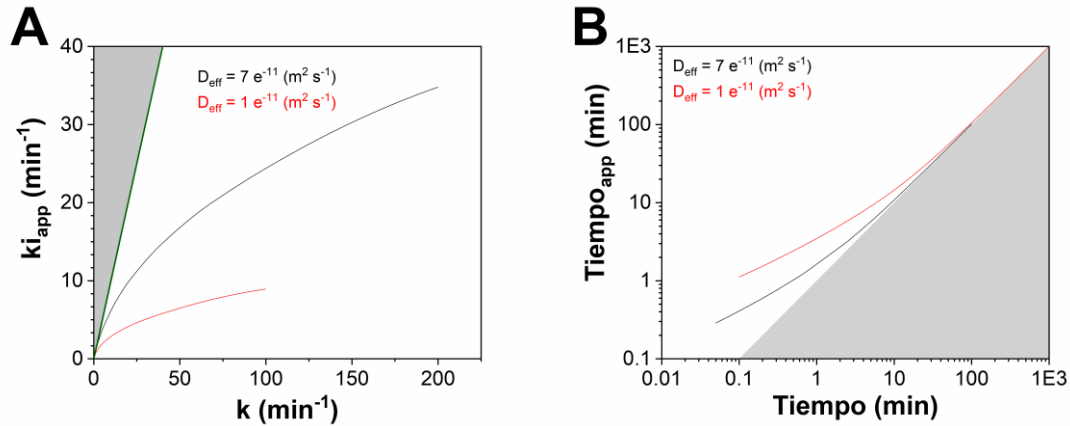
$$k_{iapp} = \frac{\ln(1 - \frac{R_{immo}}{100})}{time} \cdot (1 + solid) \cdot 10 \quad (Ec\ 7.2)$$

$$R_{immo}(\%) = \frac{\left( \frac{C_{E,0,ini}}{1 - solid} \right) - C_{E,0}}{C_{E,0,ini}} \cdot 100 \quad (Ec\ 7.3)$$

Dónde  $R_{immo}$  es el rendimiento de inmovilización real (que considera la disminución de concentración de proteína en el líquido cuando se añade el volumen de soporte),  $time$  es el tiempo de inmovilización en minutos,  $solid$  es el tanto por 1 de volumen del soporte en el total de volumen de la reacción de inmovilización (**Figura 7.1D**), el factor de 10 se refiere a la relación entre volumen de líquido/sólido en la reacción (manteniéndose constante en las simulaciones).  $C_{E,0}$  es la concentración de proteína en la fase líquida y  $C_{E,0,ini}$  es la concentración de proteína en la fase líquida inicial, en  $mg \cdot mL^{-1}$ . Por tanto, el  $R_{immo}$  se puede calcular midiendo la actividad del sobrenadante al principio y al final de la inmovilización.

Para estudiar este parámetro, se realizan simulaciones con varias velocidades intrínsecas de inmovilización y se representa la constante cinética aparente frente a la velocidad intrínseca, así como el tiempo de inmovilización característico frente al aparente. Los resultados de estas simulaciones se presentan en la **Figura 7.3**, con las regiones sin sentido físico sombreadas. En ambos paneles la región blanca representa las

zonas de control difusional, y a medida que se aproxima a la región sombreada este control va disminuyendo. La recta que separa ambas regiones representa la ausencia de control difusional.



**Figura 7.3.** Relación entre las constantes de inmovilización intrínseca y aparente obtenidas a partir de simulaciones de varios procesos de inmovilización con diferentes difusividades efectivas de proteína. *Panel A:* Inmovilización cuantificada en términos de la constante cinética, que representa la velocidad de inmovilización. *Panel B:* Cuantificación de la inmovilización en términos del tiempo necesario para que la enzima alcance el 50% de inmovilización.

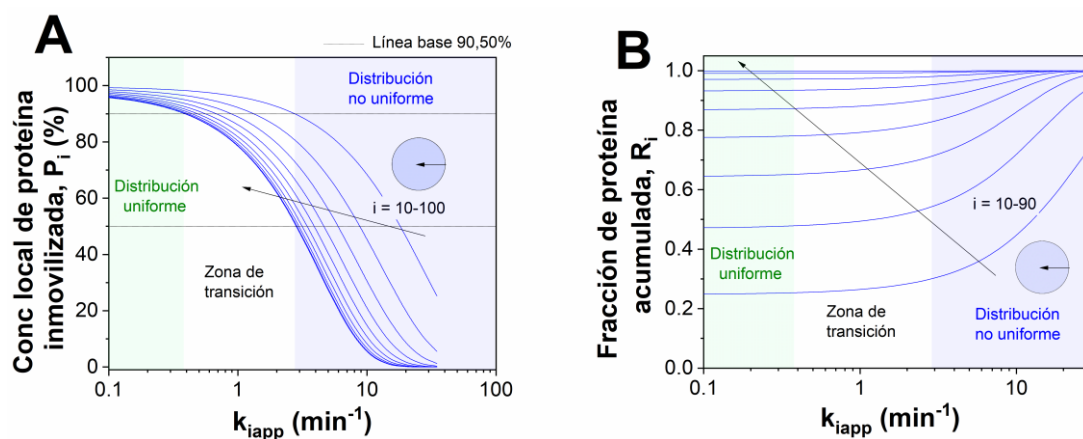
Justo en la interfase de la región sombreada es dónde se obtiene una inmovilización totalmente homogénea. Puede observarse que la transición de la distribución no uniforme a uniforme se produce en un intervalo más amplio de constantes cinéticas aparentes en comparación con las constantes cinéticas intrínsecas observables. Para las partículas de agarosa estándar, el tiempo crítico se sitúa en aproximadamente 60 minutos (tiempo en el que se produce una desviación apreciable de ambas regiones,  $X=Y$ ). Para caracterizar cuantitativamente la distribución, se han definido dos números característicos,  $P_i$  y  $R_i$ .  $P_i$  representa la concentración local de proteína en la capa  $i$  en comparación con la concentración máxima (Ec 7.4), mientras que  $R_i$  es un balance acumulativo de proteína definido por la Ecuación 7.5 como la fracción de proteína presente desde la capa  $i$  hasta la capa más externa. En la **Figura 7.1** paneles B y C se muestran esquemas explicativos de estos parámetros que ayudan a entender su definición.

$$P_i = \frac{C_{E,n}}{C_{E,1}} \cdot 100 \quad (\text{Ec 7.4})$$

$$R_i = \frac{\sum (C_{E,1 \rightarrow i} \cdot v_i)}{\sum (C_{E,1 \rightarrow 100} \cdot v_i)} \quad (\text{Ec 7.5})$$

Dónde  $C_{E,n}$  es la concentración de proteína en la capa  $n$  y  $C_{E,1}$  es la concentración de proteína en la capa más externa.  $\sum C_{E,1 \rightarrow i}$  es el sumatorio de concentración de proteína desde la capa más externa (1) hasta la capa interna  $i$ .  $\sum C_{E,1 \rightarrow 100}$  es el sumatorio de concentración de proteína en todas las capas de la partícula.

Estos resultados se muestran en la **Figura 7.4**. Cuando el tiempo de inmovilización es suficientemente largo y la difusión interna no es limitante ( $k_{iapp}$  bajas), los valores de  $R_i$  alcanzan una meseta correspondiente a la distribución de masa acumulativa en una esfera, que depende del radio. Sin embargo, cuando la difusión interna controla el proceso ( $k_{iapp}$  altas), el valor de  $R_i$  aumenta y se aproxima a 1, lo que indica la fracción de capas externas en las que la proteína está totalmente localizada. Se puede percibir que la distribución comienza a ser no uniforme a partir de valores de  $k_{iapp}$  en torno a  $3 \text{ min}^{-1}$ . Se observa una tendencia similar para  $P_i$ : para tiempos de inmovilización largos ( $k_{iapp}$  bajas), los valores de  $P_i$  alcanzan una meseta en la unidad, lo que indica una homogeneidad completa. Por el contrario, cuando la difusión interna controla el proceso ( $k_{iapp}$  altas), los valores de  $P_i$  disminuyen y las diferentes líneas divergen, indicando una gran dependencia de  $P_i$  de la posición radial. Cada línea vertical representa el gradiente de concentración de proteína a lo largo del radio, proporcionando una representación visual de la transición de homogeneidad completa a distribuciones más heterogéneas.

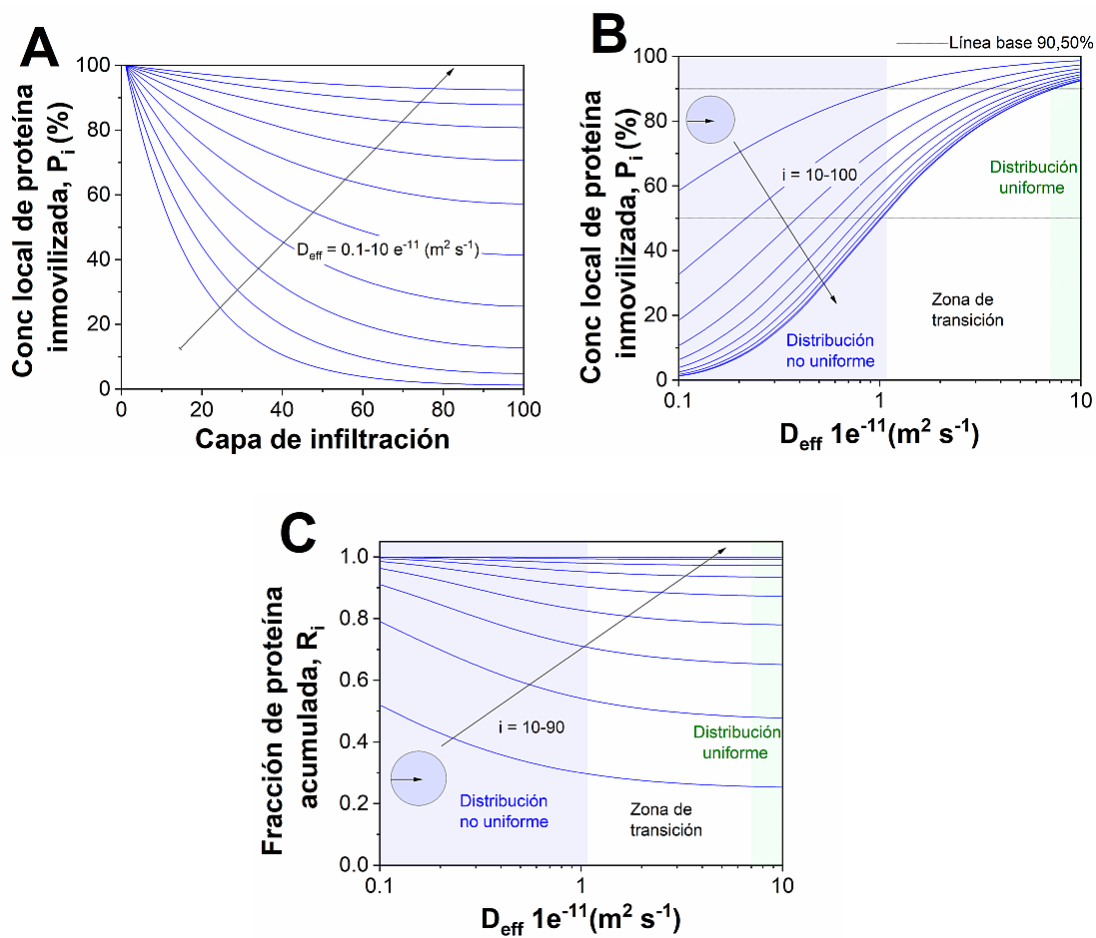


**Figura 7.4.** Parametrización del gradiente de proteínas en cursos de inmovilización. *Panel A:* Concentración de proteína a lo largo de la partícula,  $P_i$ . Se muestra la cuantificación de la concentración de proteína a lo largo del radio de partícula, revelando la presencia de distribuciones uniformes o en gradiente. *Panel B:* Fracción de proteína

acumulada,  $R_i$ . Se muestra la cuantificación de proteína acumulada, que indica el grado de distribución de las proteínas en el soporte poroso.

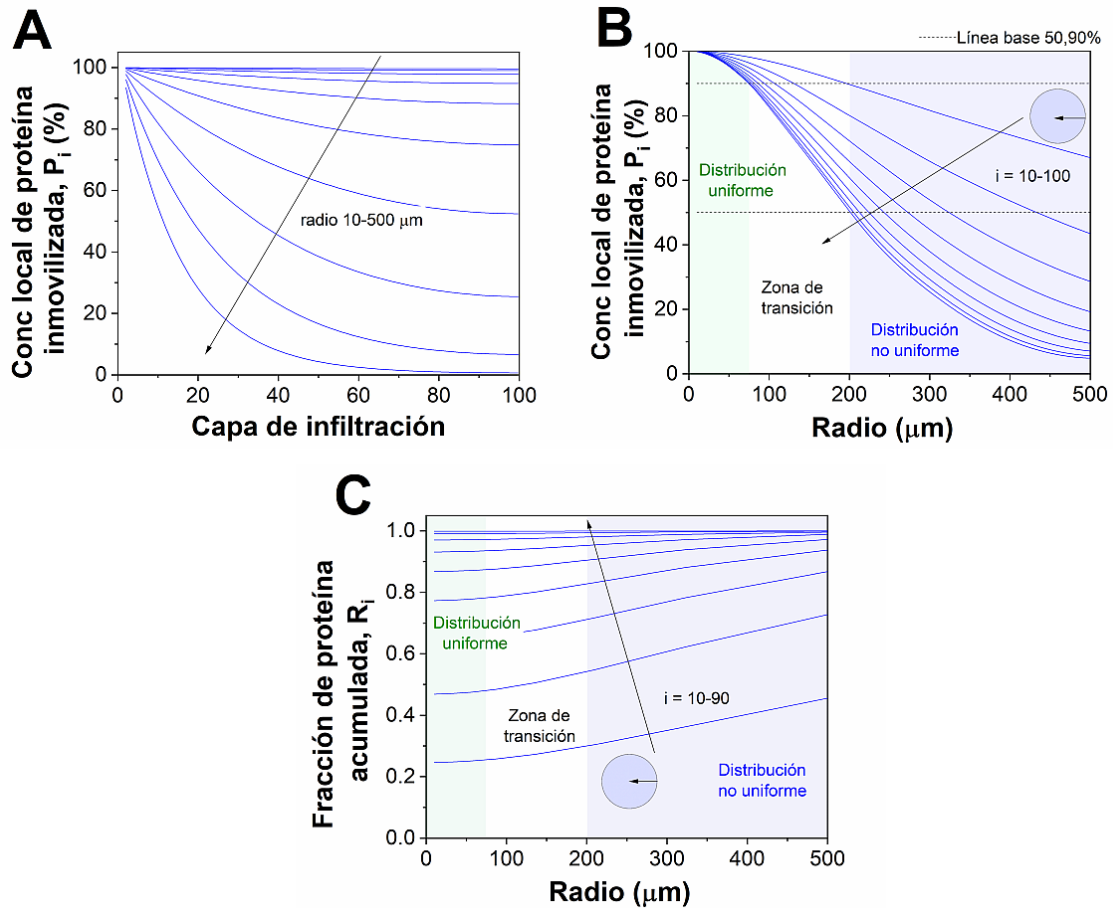
### **7.3. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y LA DIFUSIVIDAD EFECTIVA EN LA DISTRIBUCIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN LA PARTÍCULA**

A continuación, se analizó la influencia del radio de partícula y la difusividad en la distribución de proteína. Se realizaron simulaciones en las que la cinética intrínseca se mantuvo constante en una región intermedia ( $k=0.5 \text{ min}^{-1}$ ), y se variaron  $D_{eff}$  y el radio de partícula. La **Figura 7.5** muestra la influencia de  $D_{eff}$  para una partícula estándar (radio=75  $\mu\text{m}$ ). La disminución de  $D_{eff}$  origina un control por parte de la transferencia de materia (Anexos, **Figura 11.57** y 11.58), provocando que la reacción química ocurra en las capas más superficiales y conduciendo a una distribución heterogénea de partícula. En los paneles B y C se puede apreciar que a valores de  $D_{eff} \approx 1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  las distribuciones de proteína comienzan a ser no uniformes. Este análisis es especialmente significativo, ya que los valores de  $D_{eff}$  de las proteínas en materiales porosos pueden variar ampliamente y constituyen un parámetro crucial. Teniendo en cuenta la cinética intrínseca y el radio de partícula conocido, este análisis permite predecir la influencia del diseño del material en el proceso de inmovilización.



**Figura 7.5.** Influencia de la difusividad efectiva en la distribución de proteína en la partícula. *Panel A:* Perfil de la concentración de proteína inmovilizada en la partícula a diferentes  $D_{eff}$ . *Panel B:* Parametrización del gradiente de proteína resultante de la simulación de diferentes cursos de inmovilización a diferentes  $D_{eff}$ . *Panel C:* Cuantificación en términos de fracción de proteína acumulada,  $R_i$ , de diferentes cursos de inmovilización a diferentes  $D_{eff}$ .

La **Figura 7.6** muestra la influencia del radio para la región de sensibilidad cinética ( $k=0.5 \text{ min}^{-1}$ ) y un  $D_{eff}$  intermedio ( $D_{eff} = 7 \cdot 10^{-11}$ ). En estas condiciones, para radios inferiores a 100 micras, la proteína se distribuye principalmente de forma uniforme, y, cuando el radio aumenta, se produce una distribución más heterogénea. Los paneles B y C son útiles para visualizar el radio crítico para obtener una distribución uniforme a unas condiciones de inmovilización dadas. El aumento del radio acaba controlando la transferencia de materia, aumentando el tiempo de aplicación y provocando distribuciones menos uniformes y, finalmente, muy superficiales.



**Figura 7.6.** Influencia del tamaño de partícula en la distribución de proteína en la partícula. *Panel A:* Influencia del radio de partícula en la distribución de proteínas para una constante cinética intrínseca y una difusión impedida. Los paneles B y C muestran la parametrización del gradiente de proteína resultante según el radio de partícula. Se visualiza el radio crítico para lograr una distribución uniforme y, a medida que aumenta el radio, las distribuciones no uniformes y heterogéneas se vuelven predominantes.

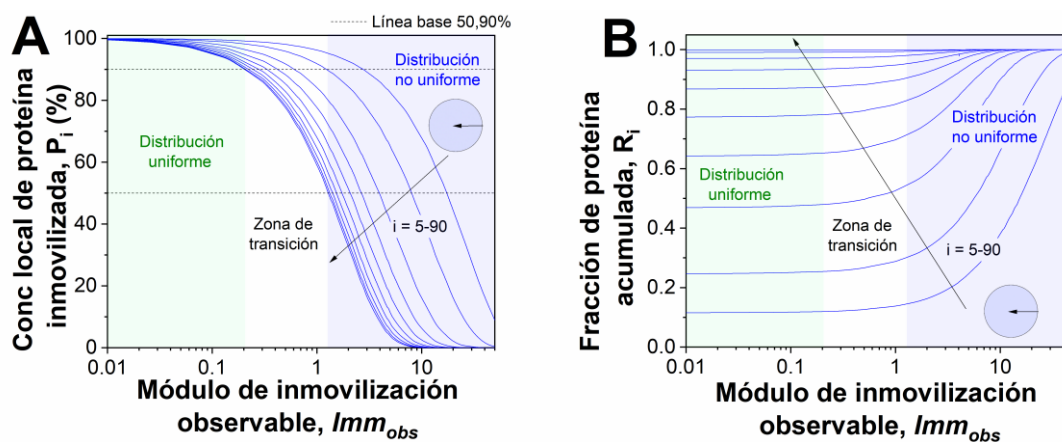
#### 7.4. MÓDULO DE INMOVILIZACIÓN OBSERVABLE COMO MAGNITUD ÚTIL PARA PREDECIR LA DISTRIBUCIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN LA PARTÍCULA

Una vez analizados los parámetros clave, se han tratado de unificar en un único número más accesible, dado que la constante intrínseca de inmovilización,  $k$ , no es fácilmente calculable. Se confeccionó un módulo adimensional ( $Imm_{Obs}$ ) homólogo al módulo de Thiele observable [407], que engloba el radio de partícula ( $R$ ),  $D_{eff}$  y el tiempo de inmovilización observable (expresado en  $k_{iapp}$ ), Ec 7.6, y se comparó con un módulo de inmovilización teórico ( $Imm_{Teo}$ ) dependiente de las mismas variables y el tiempo de inmovilización teórico (expresado en la constante intrínseca,  $k$ ).

$$Imm_{Obs} = \left(\frac{R}{3}\right)^2 \cdot \frac{k_{iapp}}{D_{eff}} \quad (\text{Ec } 7.6)$$

$$Imm_{Teo} = \left(\frac{R}{3}\right)^2 \cdot \frac{k}{D_{eff}} \quad (\text{Ec } 7.7)$$

Para analizar la utilidad del módulo de inmovilización observable ( $Imm_{Obs}$ ) para describir y, en última instancia, predecir la distribución del catalizador, se realizó secuencialmente un lote de 1000 simulaciones variando el radio de partícula,  $D_{eff}$  y  $k$ , y los resultados se representaron gráficamente. Éstos se muestran en la **Figura 7.7**. La distribución del catalizador se parametrizó utilizando  $P_i$  y  $R_i$ . En el panel A, se muestra el perfil de la proteína en distintas capas de la partícula para varios módulos de inmovilización, coloreando el cambio notable de la zona de transición hacia una distribución no uniforme. Se han marcado además dos líneas base horizontales a 50 y 90% de concentración local de proteína inmovilizada para ayudar a comprender el gradiente de distribución en dos concentraciones críticas. El panel B muestra el gradiente de acumulación de proteínas dentro de la partícula, lo que permite una apreciación más detallada de la zona de distribución uniforme (zona verde). Se puede observar cómo varía el gradiente de concentraciones a medida que cambia el  $Imm_{Obs}$ . Se observa una primera región de distribución bastante uniforme hasta 0.2 de  $Imm_{Obs}$ , posteriormente, una región de transición hasta 1.5 aproximadamente, donde comienzan a existir gradientes de distribución, mientras que a partir de 1.5 el gradiente de proteína se hace muy heterogéneo y superficial a medida que aumenta el  $Imm_{Obs}$ .



**Figura 7.7.** Parametrización del gradiente de proteína resultante de la simulación de diferentes cursos de inmovilización variando parámetros clave. *Panel A:* Cuantificación

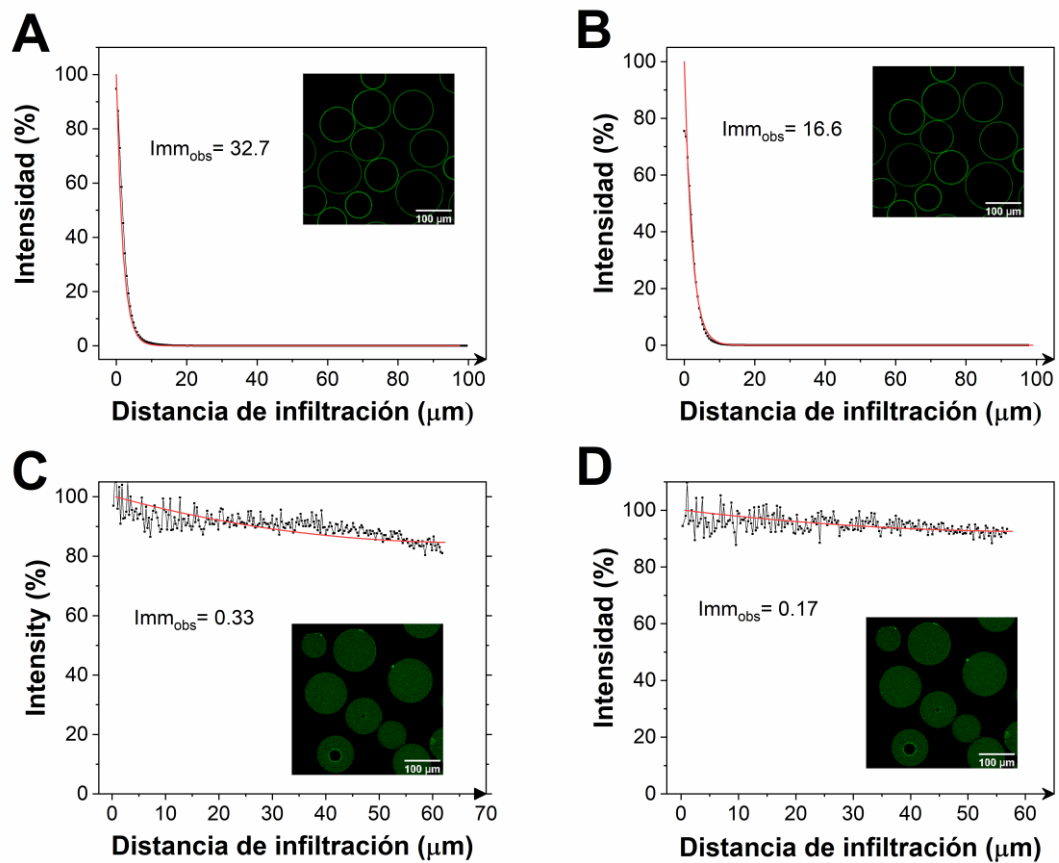
en términos de concentración de proteína a lo largo de la partícula,  $P_i$ . *Panel B*: Cuantificación en términos de fracción de proteína acumulada a lo largo de la partícula,  $R_i$ .

Por tanto, queda demostrado que el módulo de inmovilización observable es un parámetro suficiente para para caracterizar la localización de proteína en un proceso de inmovilización.

Para analizar la utilidad práctica del modelado, se analizaron diferentes distribuciones de enzimas experimentales (ver apartado 3.1.4) cuya velocidad de inmovilización se modificó mediante la adición de un agente retardante como el imidazol. En primer lugar, se ajustaron los perfiles de concentración de proteína (intensidad vs distancia de infiltración) para obtener la constante cinética ( $k$ ) que mejor los explica. Los resultados de los ajustes se muestran en las **Figura 7.8-7.9**, dónde se observa una tendencia muy similar del gradiente de proteína experimental y simulado. Por tanto, el modelo cinético exponencial de primer orden respecto a la concentración de enzima es un modelo cinético muy sencillo capaz de explicar las inmovilizaciones en este caso.

Posteriormente se obtuvo la  $k_{iapp}$ , con el tiempo y el rendimiento de inmovilización, según la Ec 7.2 Los módulos de inmovilización se calcularon de acuerdo con la información disponible en la literatura (en apartado 3.1.4, el tiempo de inmovilización y radio de partícula), un  $D_{eff}=7e^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  y las constantes cinéticas,  $k$  y  $k_{iapp}$  obtenidas según el ajuste a los datos experimentales. En las figuras también se incluye una imagen de la fluorescencia de la proteína en la partícula según la microscopía confocal de barrido láser. En consecuencia, los módulos de inmovilización observables permiten predecir la distribución de la proteína y la profundidad del gradiente según la **Figura 7.7**.

Finalmente, en la **Figura 7.10** se representan todos los módulos de inmovilización teóricos y observables, correspondiendo a gradientes uniformes a aquellos situados en la diagonal, y, a medida que la desviación de la diagonal aumenta es mayor su grado de heterogeneidad.



**Figura 7.8.** Perfil de concentración de la proteína GlyDH en la partícula. Los paneles A y B muestran el perfil de concentración en dos partículas diferentes sin utilizar imidazol. Los paneles C y D muestran el perfil de concentración en dos partículas diferentes utilizando 200 mM de imidazol como retardante de la inmovilización. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación con línea roja continua.

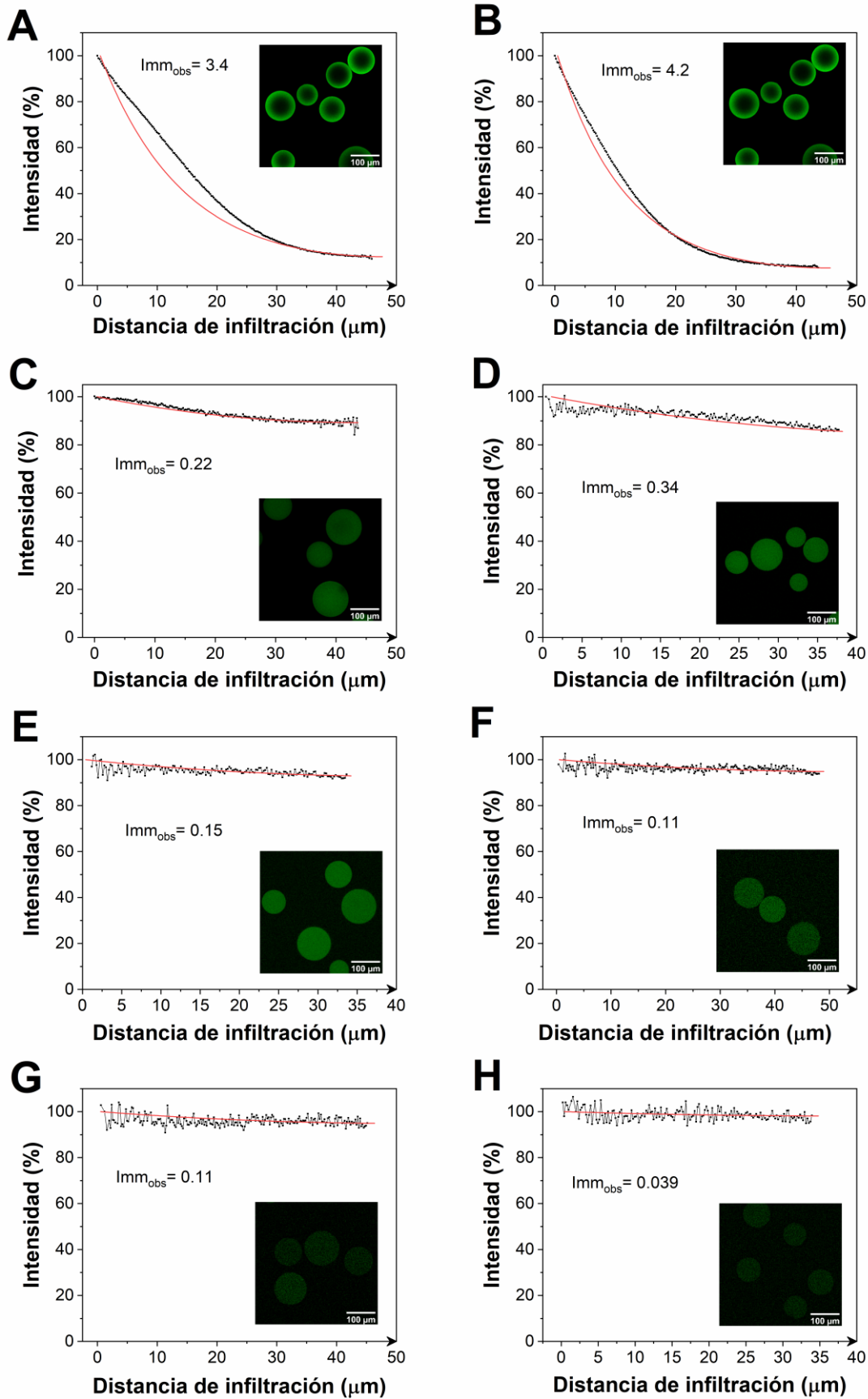
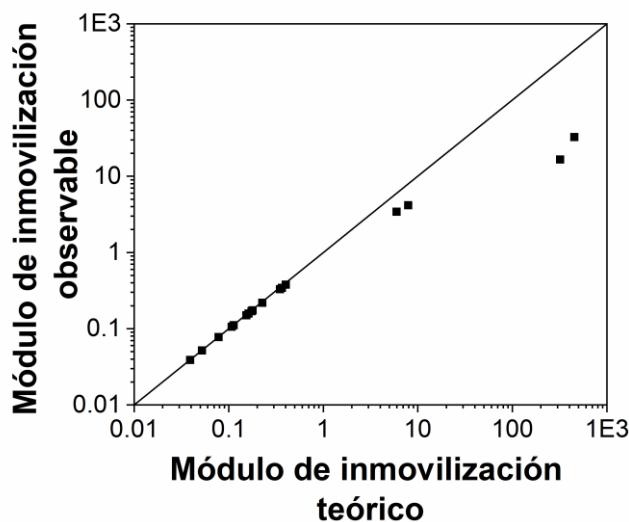


Figura 7.9. Perfil de concentración de la proteína GFP en la partícula. Los paneles A y B muestran el perfil de concentración en dos partículas diferentes sin utilizar imidazol.

*Panel C:* imidazol 5 mM; *Panel D:* imidazol 10 mM; *Panel E:* imidazol 20 mM; *Panel F:* imidazol 40 mM; *Panel G:* imidazol 100 mM; *Panel H:* imidazol 150 mM. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación con línea roja continua.



**Figura 7.10.** Parametrización de la distribución de las proteínas GlyDH y GFP en la partícula utilizando los módulos de inmovilización teórico y observable.

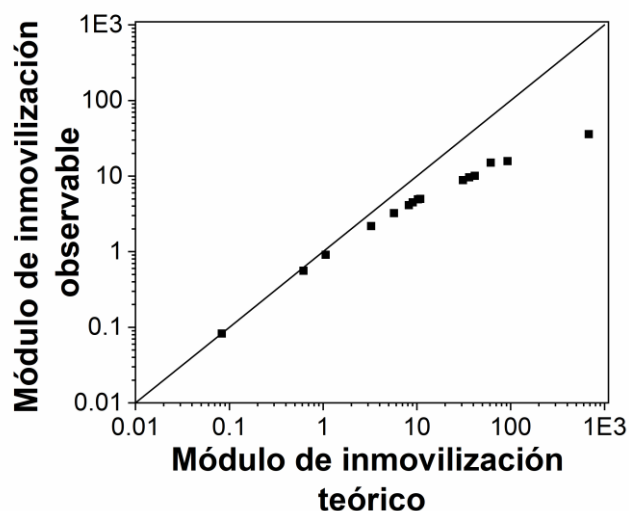
Una vez comprobada la utilidad del modelo de reacción-difusión, y su capacidad para predecir el gradiente de proteína en la partícula, es interesante aplicarlo en un mayor número de inmobilizaciones enzimáticas para así poder validarlo de forma más general. Para ello, se ajustaron los perfiles de concentración de proteínas de ciertas publicaciones [399–401,455] modulando la velocidad de inmobilización mediante imidazol. Los resultados se muestran en la **Tabla 7.1**. En los Anexos (**Figura 11.59-11.63**) se muestran los resultados de los ajustes de los perfiles de proteína, y en la **Figura 7.11** se ilustran los módulos de inmobilización teóricos y observables. En las figuras también se incluye una imagen de la fluorescencia de la proteína en la partícula según la microscopía confocal de barrido láser. Los modelos muestran una buena predicción en la mayoría de los casos, especialmente en las capas externas. Los únicos datos experimentales que no pudieron explicarse fueron la meseta de concentración de catalizador encontrada en las figuras de los Anexos (**Figura 11.59, Figura 11.60A, Figura 11.61A, Figura 11.62ABC, Figura 11.63**). Para explicar este resultado, se pensó en la fenomenología de la inmobilización. En esos casos, la inmobilización de la enzima consiste en un primer paso de adsorción física reversible seguido de una escisión covalente irreversible. En tales casos, se especula que se produce un salto molecular de las enzimas traducido en una migración en la

dirección del gradiente. Para modelizar y cuantificar ese fenómeno, incluimos en el término de migración del producto un flujo de difusión superficial, ajustando los datos simulados a la variación de  $D_{eff}$ , los perfiles podrían explicarse como se muestra en las líneas continuas azules de los Anexos (**Figura 11.59-11.63**).

**Tabla 7.1.** Parametrización del proceso de inmovilización de diversas proteínas mediante sus módulos de inmovilización ( $Imm_{Teo}$ ,  $Imm_{Obs}$ ). El soporte de inmovilización utilizado fue agarosa 4BCL en todos los casos excepto en los dos últimos, que se empleó una agarosa comercial al 6% (Sepharose) activada con grupos epóxido. La química de inmovilización empleada fue con grupos gioxil para las TtADH, EGFP y NOX\_1, mientras que para el resto se usó grupos de quelatos metálicos. En la última columna se describe cualitativamente el grado de distribución de la proteína.

Enzima	Velocidad inmov (mg·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Carga enzimática (mg·g <sup>-1</sup> )	$Imm_{Teo}$	$Imm_{Obs}$	Radio (μm)	Distribución proteína
TtADH_1 <sup>[a]</sup>	0.017	0.31	10.3	4.92	43	Cierto gradiente
TtADH_2 <sup>[a]</sup>	0.017	0.31	5.71	3.23	60	Cierto gradiente
His-GluDH_1 <sup>[a]</sup>	6.52	1.63	41.4	10.1	59	Muy superficial
His-GluDH_2 <sup>[a]</sup>	6.52	1.63	3.25	2.18	64	Cierto gradiente
Fab_1 <sup>[b]</sup>	7.63	-	92.6	15.8	54	Muy superficial
Fab_2 <sup>[b]</sup>	3.23	-	1.07	0.908	58	Uniforme
IgG_1 <sup>[c]</sup>	2	2	681	35.8	65	Muy superficial
IgG_2 <sup>[c]</sup>	0.8	2	8.22	4.11	45	Cierto gradiente
IgG_3 <sup>[c]</sup>	-	2	61.2	15.0	62	Muy superficial
IgG_4 <sup>[c]</sup>	0.0875	2	0.619	0.560	72	Uniforme
EGFP_1 <sup>[d]</sup>	40	1	10.9	4.97	55	Muy superficial
EGFP_2 <sup>[d]</sup>	40	5	9.02	4.47	33	Muy superficial
NOX_1 <sup>[b]</sup>	0.8	1	36.0	9.63	45	Muy superficial
NOX_2 <sup>[b]</sup>	0.3	0.9	0.0835	0.0823	32	Muy uniforme
Transaminasa <sup>[b]</sup>	0.25	1	31.0	8.85	88	Muy superficial

Datos de velocidad de inmovilización, carga enzimática, radio, material y química obtenidos de [399] para [a], [400] para [b], [401] para [c] y aún no publicados para [d].



**Figura 7.11.** Parametrización de la distribución de diversas proteínas en la partícula utilizando los módulos de inmovilización teórico y observable.

Estos resultados indican que el módulo de inmovilización observable ( $Imm_{Obs}$ ), que depende de parámetros intrínsecos de la partícula como  $R$ , un parámetro más complejo que mide la facilidad de transporte del sustrato a través de la partícula como  $D_{eff}$  (que también depende de la química de inmovilización, el tamaño de poro...) y la velocidad de inmovilización del proceso, cuantificado como la constante de velocidad de primer orden  $k$ , es un buen predictor de la distribución del catalizador en la partícula. Además, a partir del valor crítico de 1 para el  $Imm_{Obs}$ , la distribución comienza a tornarse no uniforme, pudiéndose cuantificar el gradiente de proteína y su concentración acumulada mediante la **Figura 7.7**.

Si se trata de modular la distribución de proteína con un agente retardante, como se ha realizado en muchos de los experimentos mostrados, y se mantienen constantes el resto de los parámetros, tanto el radio de partícula ( $R$ ), como el tipo de soporte, la química de inmovilización y el tamaño de poro (englobados en  $D_{eff}$ ) el tipo de distribución sólo dependerá del tiempo y del rendimiento de esa inmovilización. Este método de control de la distribución de proteína puede tener un gran potencial en el campo de la inmovilización de oxidasas y ha sido notablemente estudiado por el grupo de Fernando López-Gallego. En 2021 se publicó un artículo que demostraba la influencia de la distribución de la enzima y el cofactor en la partícula en sus constantes cinéticas observables, así como su variación con el radio de partícula [204]. En otro interesante artículo de 2023 estudió el efecto de la distribución de enzimas en una cascada multienzimática para la

deracemización de éteres alquilglicerílicos, dónde se probaban distintas configuraciones espaciales de las enzimas coinmovilizadas y analizando su desempeño [454]. Por tanto, existe un gran potencial, principalmente en sistemas multienzimáticos, para analizar distintas configuraciones espaciales, y, gracias al análisis realizado en este capítulo, estas distribuciones se podrían predecir.



---

---

**CAPÍTULO 8.**

**APLICACIÓN DE ENZIMAS  
INMOVILIZADAS  
OXIDATIVAS  
DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub> EN  
REACTORES AIREADOS**

---

---



## **8. APLICACIÓN DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub> EN REACTORES AIREADOS**

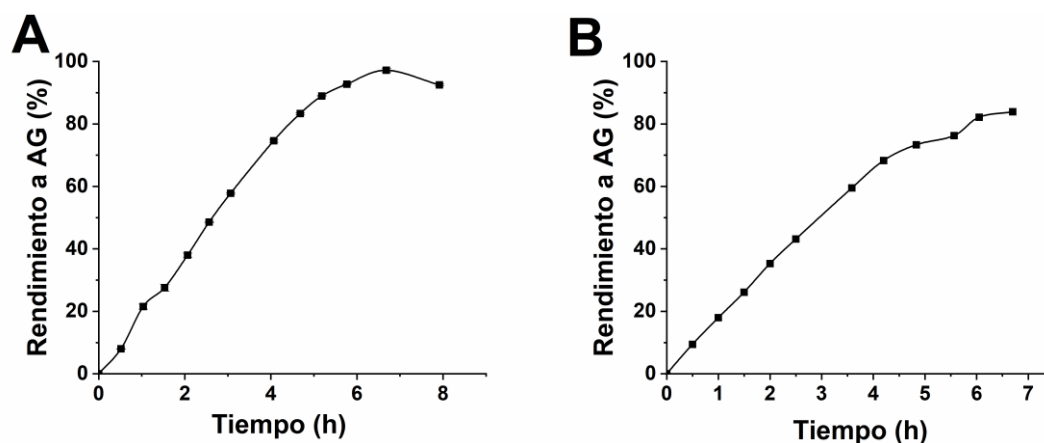
En el caso de las reacciones catalizadas por oxidasas inmovilizadas, dada la limitada solubilidad del oxígeno en medio acuoso es imprescindible un aporte de éste de forma continua si se pretende alcanzar una elevada conversión del sustrato principal. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, esta etapa de transferencia del oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida es más lenta que la propia reacción de consumo de oxígeno, limitando la velocidad global del proceso. Por tanto, como se ha comentado en la introducción, la ingeniería de reactores busca aumentar esta velocidad de transferencia de O<sub>2</sub> mediante distintas estrategias como la maximización de la superficie de contacto entre fases o la generación de O<sub>2</sub> “in situ” (**Figura 1.17**). De las distintas configuraciones posibles de reactor, en este capítulo se empleó la configuración de tipo tanque agitado, probablemente la más empleada por su simplicidad de operación y control.

En el presente apartado se realizan reacciones de oxidación con las carbohidrato oxidasas (GOX y GalOx) en distintos volúmenes de reacción y variando tanto las condiciones de agitación y burbujeo (velocidad de transferencia de oxígeno, OTR) como la carga de biocatalizador en la reacción (velocidad de consumo de oxígeno, OUR). El objetivo es observar y explicar el efecto que producen estos parámetros en el desempeño de la reacción, cuantificando la velocidad de la reacción entre otras variables.

### **8.1. PRUEBA DE CONCEPTO EN REACTORES NO INSTRUMENTADOS DE BAJO VOLUMEN**

En primer lugar, se realizan pruebas de concepto para comprobar la viabilidad de la reacción de oxidación de la glucosa mediante la GOX. Esta primera etapa es muy importante para la puesta a punto de la técnica de análisis (HPLC), el proceso de toma de muestras y la constatación de que se puede observar el curso completo de conversión y/o producto de interés en el tiempo deseado. En primer lugar, se realizaron reacciones en recipientes tipo falcon de 15 mL de volumen total y 11.2 mL de volumen de reacción. Se empleó una agitación y aireación por inversión en agitador rotatorio a 25 rpm sin control de temperatura (a T<sup>a</sup> de laboratorio ≈ 22°C). El catalizador empleado fue agarosa activada

con grupos PEI, una inmovilización iónica reversible que obtiene unos rendimientos de inmovilización muy elevados y un factor de eficacia considerable para la GOX (**Tabla 11.1**). Los cursos temporales de producto se muestran en la **Figura 8.1**.

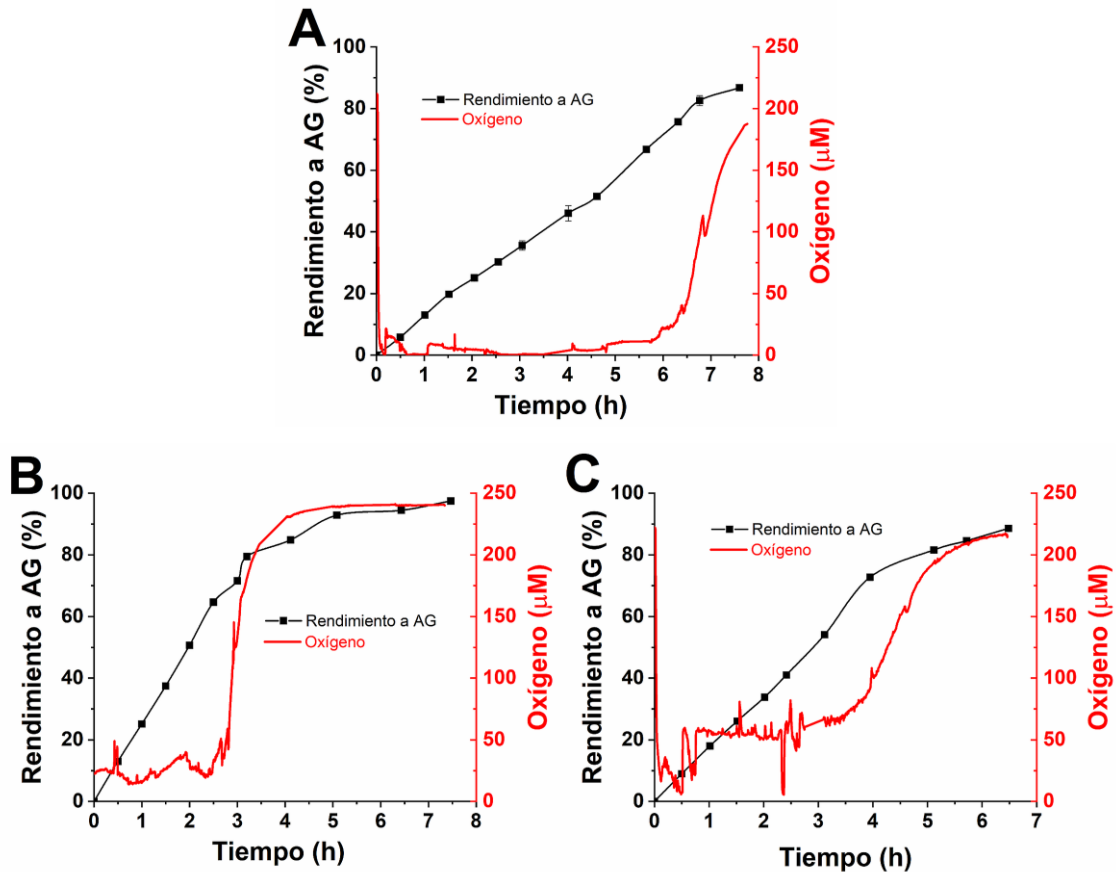


**Figura 8.1.** Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) en reacciones en el agitador rotativo. *Panel A:* 73 mM de glucosa inicial,  $17.8 \text{ mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $0.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de catalasa soluble; *Panel B:* 84 mM de glucosa inicial,  $18.1 \text{ mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de catalasa coinmovilizada. Condiciones comunes a ambos paneles: 11.2 mL de volumen de reacción,  $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida de GOX, 25 rpm de agitación por inversión, temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) y 100 mM de NaPi pH 7 como tampón.

La diferencia entre ambos paneles radica en el empleo de catalasa soluble (**Figura 8.1A**) y catalasa coinmovilizada (**Figura 8.1B**), pero en ambos casos se alcanzan rendimientos a ácido glucónico (AG) bastante satisfactorios. Además, las velocidades iniciales de producción de AG en ambos casos son muy parecidas ( $\sim 0.23 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ ). En esta configuración de reacción no se midió la  $[O_2]$ , pero, debido a la gran diferencia entre la velocidad teórica alcanzable ( $1.25 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y la experimental, se puede deducir que se trabajó con bastante limitación por OTR. Aunque la aireación por inversión suele ser un método bastante efectivo de transferencia de oxígeno, puesto que ambas fases están en contacto continuamente, la velocidad de consumo de  $O_2$  en este caso es mucho mayor. Además, considerando que la velocidad de producción de AG es igual a la de consumo de  $O_2$  por estequiometría de la reacción, y suponiendo que la velocidad del proceso global está controlada por la OTR, es decir,  $OUR=OTR$ , se puede concluir que este sistema operó con un  $k_{La} \approx 1 \text{ min}^{-1}$ .

A continuación, se realizaron experimentos en el siguiente nivel de escalado, en un reactor aireado tipo Erlenmeyer de 100 mL de volumen total. Este tampoco es un

reactor instrumentado, pero sí se controló la temperatura, se empleó una agitación magnética, junto con la adición de distintos caudales de aire y se midió la  $[O_2]$  en la fase líquida. Además, se utilizó catalasa coimmobilizada en todos los casos. Los resultados se muestran en la **Figura 8.2**.



**Figura 8.2.** Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y  $[O_2]$  en reacciones en reactor no instrumentado de 100 mL con GOX en PEI-Ag. *Panel A:* 101 mM de glucosa inicial,  $18.9 \text{ mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 120 rpm y  $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  de caudal de aire; *Panel B:* 118 mM de glucosa inicial,  $18.9 \text{ mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 240 rpm y  $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  de caudal de aire; *Panel C:* 120 mM de glucosa inicial,  $5.7 \text{ mg}_{\text{soporte}} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 240 rpm y  $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  de caudal de aire. Condiciones comunes a todos los paneles: 53 mL de volumen de reacción,  $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida de GOX,  $50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de catalasa coimmobilizada, temperatura constante a  $30^\circ\text{C}$  y 100 mM de NaPi pH 7 como tampón.

En los cursos de reacción se pueden observar dos regiones bien definidas en este caso. La primera, una región lineal de producción de AG que se ve acompañada de una  $[O_2]$  constante en lo que se podría llamar un estado pseudo-estacionario. Posteriormente, se observa el cambio brusco a la segunda región, donde se supone está casi agotada la

glucosa, se termina la producción de AG, lo cual se ve reflejado en un aumento de la [O<sub>2</sub>] a valores de saturación donde no hay consumo de O<sub>2</sub>. En todos los casos se obtienen elevados rendimientos a ácido glucónico (sobre 90%) y se pueden observar diferencias en el valor de [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario (valor constante de O<sub>2</sub> en la primera región). Sin embargo, para facilitar la discusión, se recoge en la **Tabla 8.1** un resumen de los experimentos con sus variables más significativas.

**Tabla 8.1.** Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en reactor no instrumentado.

Exp	A	B	C
<b>N (rpm)</b>	120	240	240
<b>Q (L·min<sup>-1</sup>)</b>	0.2	0.8	0.8
<b>O<sub>2</sub> en estado pseudo-estacionario (μM)</b>	~ 4	~ 25	~ 50
<b>Velocidad teórica<sup>[a]</sup> (mM·min<sup>-1</sup>)</b>	1.33	1.33	0.412
<b>Velocidad exp<sup>[b]</sup> (mM·min<sup>-1</sup>)</b>	0.197	0.482	0.342
<b>Eficiencia catalítica<sup>[c]</sup></b>	0.148	0.362	0.830

a: Velocidad calculada según el consumo de oxígeno inicial en condiciones estándar sin considerar el factor de eficacia del catalizador.

b: Velocidad inicial de producción de ácido glucónico.

c: Calculada como el cociente de la velocidad experimental y teórica

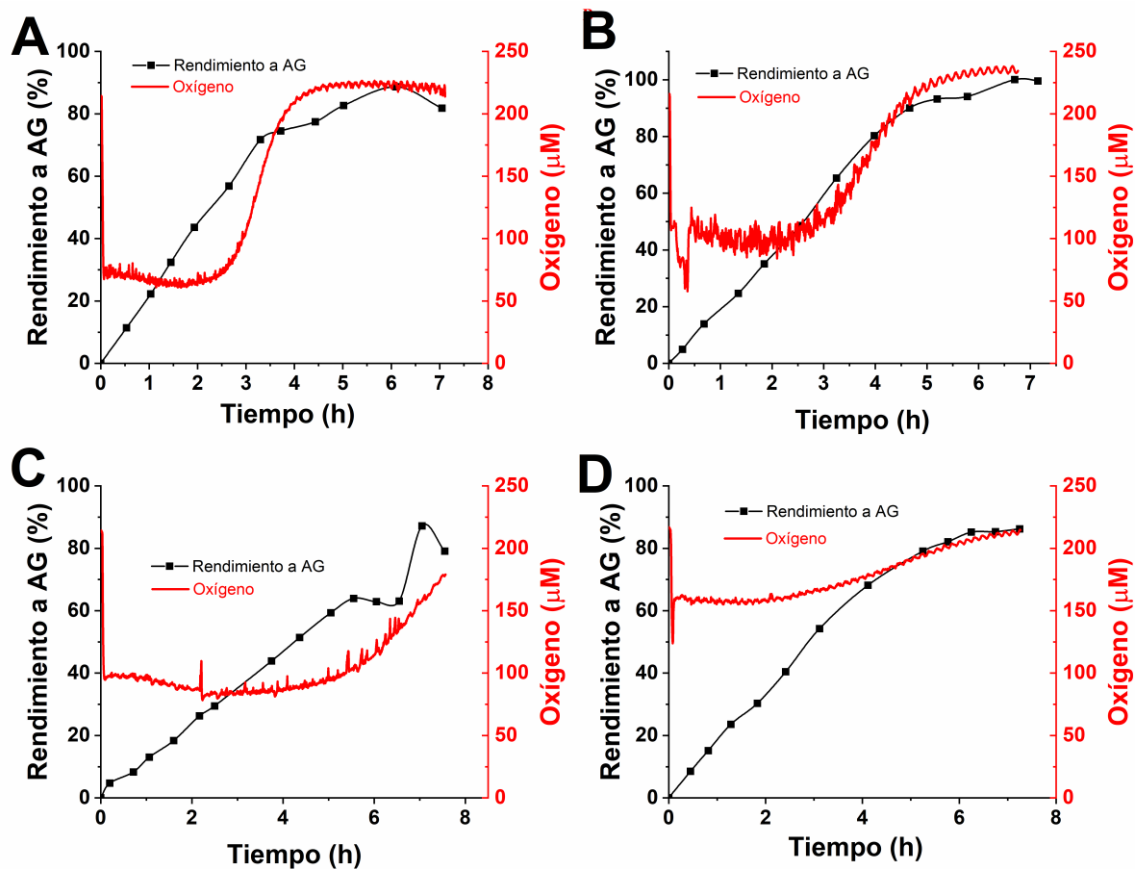
En la **Tabla 8.1** se observan las consecuencias de emplear distintas agitaciones y caudales de aire, así como concentración de catalizador. Se puede ver un aumento gradual de la [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario que es proporcional a la eficiencia del catalizador (relación entre velocidad experimental y teórica). El Exp A está claramente muy limitado por la baja OTR del sistema, mientras que el Exp B, al aumentarse el OTR, se observa un aumento considerable de la velocidad experimental, todavía limitado por OTR. En el Exp C se redujo la demanda de oxígeno (OUR) pero no se varió OTR, por lo que la velocidad experimental se aproxima más a la teórica, a pesar de que [O<sub>2</sub>] en estado estacionario no aumentó todo lo esperado.

A continuación, se aplica esta metodología en reactores instrumentados de mayor volumen, ya que en este tipo de recipiente se observaron problemas de evaporación al no poseer condensador el sistema. Además, se puede hacer un estudio más detallado

englobando tanto la agitación como el caudal de aire en el coeficiente de volumétrico de transferencia de materia ( $k_L a$ ).

## 8.2. REACCIONES DE OXIDACIÓN EN REACTORES INSTRUMENTADOS DE MEDIA ESCALA

Una vez puesto a punto el método de análisis y observado cualitativamente que hay un efecto de la agitación y el caudal de aire en la productividad del catalizador, este efecto se estudia más en detalle en reactores instrumentados. En primer lugar, se emplea el reactor my-Control MiniBio de 500 mL de volumen total, mostrado en la **Figura 3.4B**. Se realizan reacciones de oxidación de glucosa con GOX en PEI-Aga variando velocidad de agitación y el caudal de aire, junto con la concentración de biocatalizador en el medio. De esta manera se obtendrán distintos valores de productividad y  $[O_2]$  en estado estacionario. Los resultados se muestran en la **Figura 8.3**. Como complemento y para una mejor discusión de resultados, en la **Tabla 8.2** se muestra un resumen de los principales parámetros de cada reacción.



**Figura 8.3.** Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y  $[O_2]$  en reacciones en biorreactor de 500 mL con GOX en PEI-Ag. *Panel A:* 110 mM de glucosa

inicial, 4.92 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup>, 136 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 400 rpm y 2.0 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire; *Panel B*: 102 mM de glucosa inicial, 4.93 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup>, 104 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 400 rpm y 3.0 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire; *Panel C*: 97 mM de glucosa inicial, 3.92 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup>, 100 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 400 rpm y 0.3 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire; *Panel D*: 90 mM de glucosa inicial, 2.45 mg<sub>soporte</sub>·mL<sup>-1</sup>, 101 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 600 rpm y 1.0 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire. Condiciones comunes a todos los paneles: 203 mL de volumen de reacción, 50 mg·g<sup>-1</sup> de catalasa coimmobilizada, temperatura constante a 30°C y 100 mM de NaPi pH 7.0 como tampón.

**Tabla 8.2.** Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en PEI-Ag con biorreactor de 500 mL.

Exp	A	B	C	D
<b>N (rpm)</b>	240	400	400	600
<b>Q (L·min<sup>-1</sup>)</b>	2	3	0.3	1
<b>O<sub>2</sub> estado pseudo-estacionario (μM)</b>	~ 70	~ 100	~ 100	~ 160
<b>Velocidad teórica <sup>[a]</sup> (mM·min<sup>-1</sup>)</b>	0.670	0.513	0.392	0.247
<b>Velocidad exp <sup>[b]</sup> (mM·min<sup>-1</sup>)</b>	0.395	0.316	0.180	0.251
<b>Eficiencia catalítica <sup>[c]</sup></b>	0.590	0.612	0.460	1.02
<b>k<sub>L</sub>a (min<sup>-1</sup>)</b>	1.975	2.61	0.536	1.57
<b>OTR máxima (mM·min<sup>-1</sup>) <sup>[d]</sup></b>	0.760	0.818	0.311	0.461

a: Velocidad calculada según el consumo de oxígeno inicial en condiciones estándar sin considerar el factor de eficacia del catalizador.

b: Velocidad inicial de producción de ácido glucónico

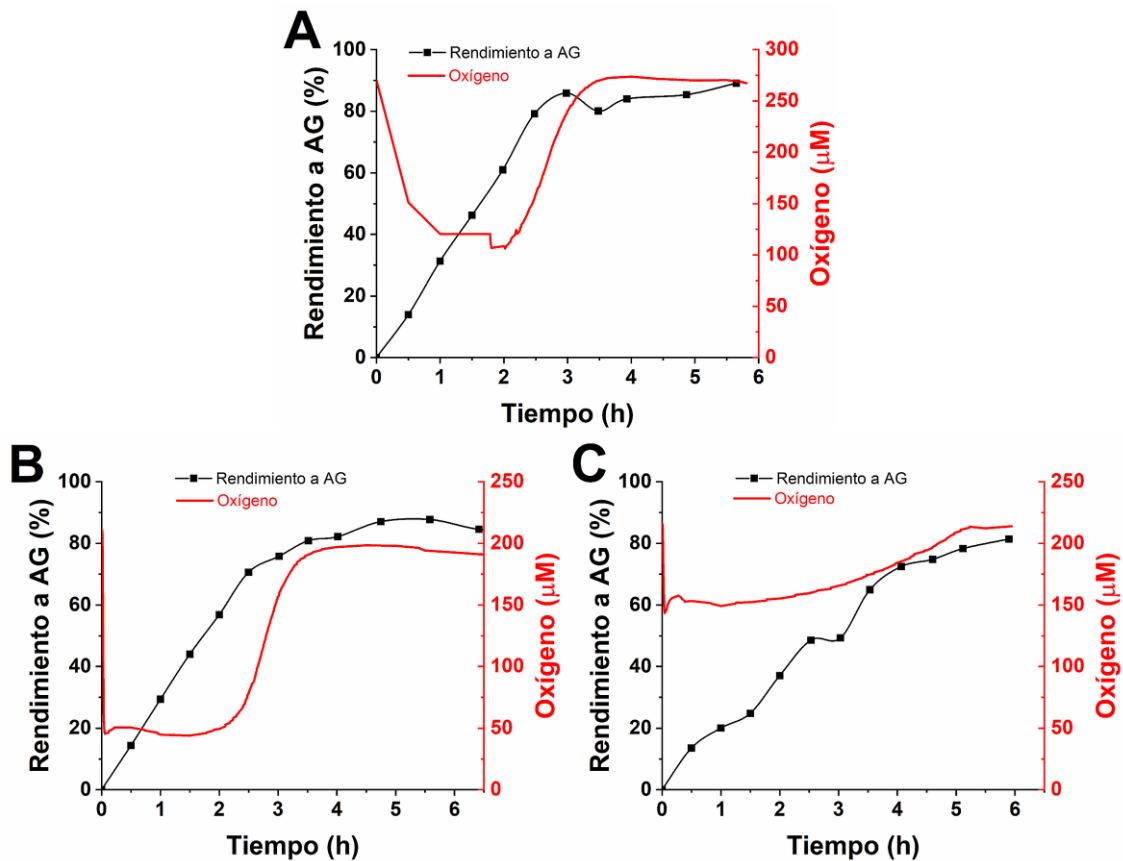
c: Calculada como el cociente de la velocidad experimental y teórica

d: OTR máx= k<sub>L</sub>a·[O<sub>2</sub>]<sub>inicial</sub> + 1/2·Velocidad teórica (O<sub>2</sub> producido por la catalasa)

En la **Figura 8.3** se puede observar que los rendimientos a AG son muy cercanos al 90% a las 7 h de reacción en todos los casos. Esto manifiesta una conversión casi completa del sustrato y una elevada irreversibilidad de la reacción. Por otro lado, observando la **Tabla 8.2**, existe cierta correlación entre la [O<sub>2</sub>] en estado estacionario y la eficiencia catalítica, exceptuando el experimento C. El experimento C es el único que está limitado por OTR según la OTR máxima (menor a la velocidad teórica) sin embargo, su [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario es más elevada de lo esperado. Esto indica que no está tan limitado por la OTR como parecía de forma teórica, aunque se produce una disminución lógica de eficiencia catalítica. Por último, el panel D emplea la mitad de concentración de catalizador que los paneles A y B (por tanto, obteniendo la mitad de la velocidad

teórica), pero su velocidad experimental es muy similar a la teórica, indicando una efectividad catalítica del 100%. Además, su [O<sub>2</sub>] en estado estacionario es bastante elevada, justificando esta gran eficiencia. Dado que la velocidad experimental es ligeramente superior a la teórica, esto advierte de una subestimación de la velocidad teórica calculada (en condiciones no operacionales).

A continuación, se realiza el mismo tipo de estudio, pero en el biorreactor de 1.0 L de volumen total, el equipo BIOSTAT® B plus mostrado en la **Figura 3.4A**. Se ha tratado de diseñar los experimentos de forma que se den casos paradigmáticos, elevada limitación del oxígeno, sin limitación por oxígeno y un caso intermedio. Los resultados se muestran en la **Figura 8.4**. Para una mejor discusión de resultados, en la **Tabla 8.3** se muestra un resumen de los principales parámetros de cada reacción.



**Figura 8.4.** Cursos temporales de rendimiento a ácido glucónico (AG) y [O<sub>2</sub>] en reacciones en biorreactor de 1.0 L con GOX en PEI-Ag. *Panel A:* 95 mM de glucosa inicial, 4.69 mg<sub>sopORTE</sub>·mL<sup>-1</sup>, 100 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 500 rpm y 0.4 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire; *Panel B:* 99 mM de glucosa inicial, 6.83 mg<sub>sopORTE</sub>·mL<sup>-1</sup>, 100 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 500 rpm y 0.2 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire; *Panel C:* 102 mM de glucosa inicial, 3.92 mg<sub>sopORTE</sub>·mL<sup>-1</sup>, 85 U·g<sup>-1</sup> de GOX ofrecida, 650 rpm y 1.5 L·min<sup>-1</sup> de caudal de aire. Condiciones comunes a todos los paneles: 511 mL de volumen de reacción, 50 mg·g<sup>-1</sup> de

catalasa coinmovilizada, temperatura constante a 30°C y 100 mM de NaPi pH 7.0 como tampón.

**Tabla 8.3.** Resumen de las reacciones de oxidación de glucosa con GOX en PEI-Ag en biorreactor de 1.0 L.

Panel	A	B	C
N (rpm)	500	500	650
Q (L·min <sup>-1</sup> )	0.4	0.2	1.5
O <sub>2</sub> en estado pseudo-estacionario (μM)	~ 120	~ 45	~ 150
Velocidad teórica <sup>[a]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	0.469	0.687	0.334
Velocidad exp <sup>[b]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	0.504	0.468	0.307
Eficiencia catalítica <sup>[c]</sup>	1.07	0.681	0.920
k <sub>La</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.882	0.489	2.38
OTR máxima (mM·min <sup>-1</sup> ) <sup>[d]</sup>	0.425	0.449	0.707

a: Velocidad calculada según el consumo de oxígeno inicial en condiciones estándar sin considerar el factor de eficacia del catalizador.

b: Velocidad inicial de producción de ácido glucónico.

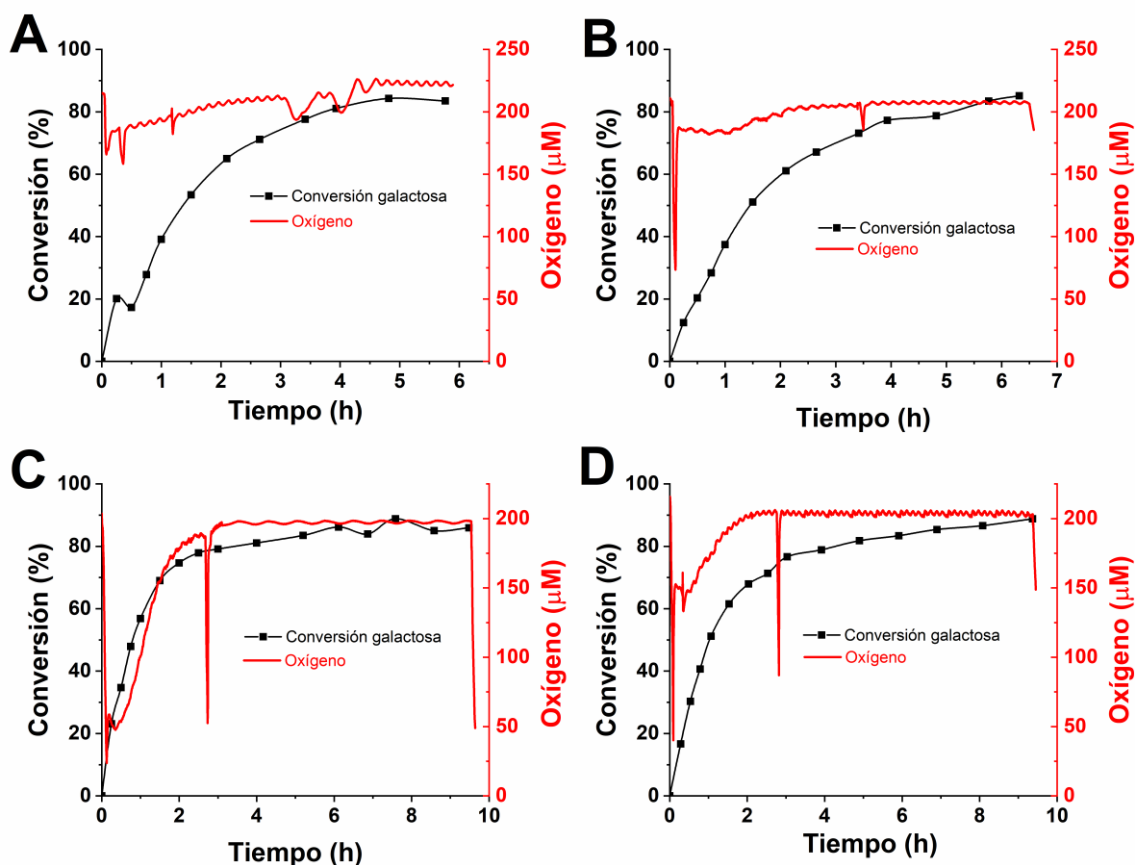
c: Calculada como el cociente de la velocidad experimental y teórica

d: OTR máx= k<sub>La</sub>·[O<sub>2</sub>]<sub>inicial</sub> + 1/2·Velocidad teórica (O<sub>2</sub> producido por la catalasa)

De nuevo, en la **Figura 8.4** se observa que los rendimientos a AG se encuentran entre 80-90% a las 6 h de reacción, manifestando una conversión casi completa del sustrato. Observando la **Tabla 8.3**, en el experimento A se obtiene una velocidad experimental superior tanto a la velocidad teórica como a la OTR máxima, indicando una subestimación tanto de la actividad teórica del catalizador como del k<sub>La</sub>. Por otro lado, se obtiene una reacción no tan limitada por O<sub>2</sub> como indica el valor de OTR máxima comparada con la velocidad teórica calculada. En el panel B se encuentra el caso más limitado por oxígeno, en el que la velocidad experimental supera incluso a la OTR máxima (advirtiendo de subestimación del k<sub>La</sub> y/o actividad teórica del catalizador). Sin embargo, aquí si se observa también una baja [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario, provocando la disminución de la velocidad de producción de AG. Por último, se muestra el experimento menos limitado por OTR, panel C, con un k<sub>La</sub> considerablemente elevado y una velocidad experimental bastante cercana a la teórica calculada. Esto además se justifica también por el valor de [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario.

También se realizó el estudio con GalOx inmovilizada en DS-Ag en el biorreactor de 500 mL. En este caso, el sistema varía un poco. Se coinmovilizó la Hb junto a la GalOx

en vez de la catalasa. Debido a la dependencia de la enzima de una baja  $[H_2O_2]$  en la activación, se optó por la catalasa soluble en vez de la coinmovilizada. De esta forma el  $H_2O_2$  formado continuamente en la reacción puede ser utilizado por la Hb debido a su mayor proximidad, en vez de agotado completamente por la catalasa. Este sistema, como se ha mencionado es un poco más complejo y requiere de un estudio más profundo de, por ejemplo, la concentración de  $H_2O_2$  óptima en estado pseudo-estacionario o de la posible desactivación de la GalOx a elevadas condiciones de agitación y/o burbujeo. Sin embargo, en esta primera aproximación, se han obtenido conversiones satisfactorias (~80%) a relativamente bajos tiempos de reacción, **Figura 8.5**. El Panel A muestra la reacción con Hb soluble y se añadió toda la catalasa al comienzo de la reacción, mientras que en los demás paneles se empleó Hb coinmovilizada y se añadió la catalasa a partes iguales en el comienzo y a las 3 h de reacción. En la **Tabla 8.4** se muestra un resumen de los experimentos con sus condiciones de operación y parámetros más importantes. En este caso no se muestra la  $[O_2]$  en estado pseudo-estacionario ya que esta región no está bien definida a simple vista.



**Figura 8.5.** Cursos temporales de conversión de galactosa y  $[O_2]$  en reacciones en biorreactor de 500 mL con GalOx en DS-Ag. *Panel A:* 10 mM de galactosa inicial,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Hb soluble,  $25.0 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $35 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de GalOx ofrecida, 600 rpm y  $1.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de caudal de aire; *Panel B:* 25 mM de glucosa inicial,  $0.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Hb coinmovilizada,  $22.4 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de GalOx ofrecida, 600 rpm y  $1.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de caudal de aire; *Panel C:* 25 mM de glucosa inicial,  $0.19 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Hb coinmovilizada,  $24.2 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de GalOx ofrecida, 200 rpm y  $0.2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de caudal de aire. *Panel D:* 25 mM de galactosa inicial,  $0.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Hb coinmovilizada,  $21.2 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25.7 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de GalOx ofrecida, 400 rpm y  $0.6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de caudal de aire. Condiciones comunes a todos los paneles: 165 mL de volumen de reacción,  $0.60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa soluble, temperatura constante a  $30^\circ\text{C}$  y 100 mM de NaPi pH 7.0 como tampón.

**Tabla 8.4.** Resumen de las reacciones de oxidación de galactosa con GalOx en biorreactor de 500 mL.

Panel	A	B	C	D
N (rpm)	600	600	200	400
Q (L·min <sup>-1</sup> )	1.0	1.0	0.2	0.6
Velocidad teórica <sup>[a]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	0.292	0.336	0.363	0.327
Velocidad exp <sup>[b]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	0.0632	0.150	0.260	0.205
Velocidad exp <sup>[c]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	-	0.080	0.040	0.042
Velocidad exp final <sup>[d]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	-	0.0043	0.0195	0.0135
k <sub>La</sub> (min <sup>-1</sup> )	1.57	1.57	0.266	0.863
OTR máxima <sup>[e]</sup> (mM·min <sup>-1</sup> )	0.483	0.506	0.239	0.349

a: Velocidad calculada según el consumo de oxígeno inicial a 10 o 25 mM de galactosa.

b: Velocidad inicial de consumo de galactosa.

c: Velocidad inicial de consumo de oxígeno, suprimiendo el OTR del biorreactor.

d: Velocidad final de consumo de oxígeno, suprimiendo el OTR del biorreactor.

e:  $OTR_{m\acute{a}x} = k_{La} \cdot [O_2]_{inicial} + 1/2 \cdot \text{Velocidad teórica}$  (O<sub>2</sub> producido por la catalasa)

Al revisar los resultados obtenidos, cabe destacar varios aspectos. En primer lugar, en lo que respecta a la aplicación del compuesto activador, puede deducirse que su co-inmovilización presenta un rendimiento notable, ya que la velocidad inicial del experimento B es considerablemente mayor al del A, considerando sus velocidades teóricas. Además, la co-inmovilización facilita la integración directa del activador en la matriz del biocatalizador, lo que puede reducir en diez veces la cantidad de activador necesaria y mitigar las restricciones difusionales.

En segundo lugar, el aspecto crucial de la discusión gira en torno a las variaciones de OTR influidas por la agitación y el caudal de aire a lo largo de los experimentos (sin olvidar el efecto de la catalasa). Se estima que la constante de afinidad para el O<sub>2</sub> como sustrato limitante de la reacción supera los 2 mM (**Tabla 4.4**). Dado que este valor supera con creces la solubilidad del O<sub>2</sub> en soluciones acuosas en condiciones ambientales, pequeñas fluctuaciones en la [O<sub>2</sub>] afectan significativamente a la velocidad de conversión de la reacción. Esta limitación se hace más pronunciada a altas cargas de sustrato principal, donde las concentraciones de éste y oxígeno pueden diferir hasta en un factor de 100 [235]. Para abordar este problema, a pesar de los hallazgos previos que indican una actividad enzimática máxima a concentraciones de galactosa en torno a 250 mM, el uso intencionado de una cantidad inicial de galactosa inferior tiene como objetivo lograr

una elevada conversión en un intervalo de tiempo razonable. Sin embargo, esta estrategia da lugar a un sistema que impide que la enzima funcione a su máximo rendimiento.

Teniendo en cuenta la gran dependencia de la GalOx del oxígeno, cabría esperar diferencias sustanciales al variar la OTR en el reactor. Contrariamente a lo previsto, los resultados arrojan un resultado inesperado: los experimentos con una menor OTR aplicada alcanzan una tasa de conversión más alta en menos tiempo (y unas mayores velocidades experimentales inicial y final). Varias explicaciones podrían justificar esta observación. La primera es que la enzima podría desactivarse en condiciones de gran agitación y flujo de aire. Sin embargo, esta hipótesis parece poco probable, dada la alta estabilidad operativa prevista de la enzima inmovilizada en la matriz de agarosa. Una explicación más plausible gira en torno a la desactivación de la catalasa, bien debido a las condiciones de agitación intensa y burbujeo de aire o por exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto de reacción.

La catalasa, al ser una enzima tetramérica, presenta una menor estabilidad en condiciones de funcionamiento agresivas, por eso es que existen numerosos trabajos dedicados a su inmovilización [437,438,456]. Adicionalmente, hay estudios que han observado que esta desactivación se debe a una exposición prolongada a ciertas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aunque éstas varían en función de la fuente de obtención de la catalasa [457–461]. En consecuencia, el aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno debido a la ausencia de actividad de catalasa puede provocar una rápida desactivación de la GalOx, como está ampliamente reportado [79,82,214,462]. Y este efecto se hace más pronunciado en tiempos de reacción prolongados.

El estudio de cada sistema biocatalítico en profundidad se torna muy necesario. Lo que a priori puede ser una variable que maximizar, como era en este caso el OTR se convierte en un parámetro a optimizar. Sin embargo, este sistema es especialmente interesante porque requiere de un equilibrio entre la [O<sub>2</sub>] y [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] en estado estacionario, así como de cierto conocimiento acerca de las cinéticas y concentraciones de desactivación de ambas enzimas con el peróxido de hidrógeno, aún trabajo por explorar.

### **8.3. SIMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO A REACCIONES CON SUMINISTRO DE O<sub>2</sub>**

Una vez expuestos los resultados experimentales en reactores instrumentados variando la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), en esta sección se aplica un

modelo cinético para dilucidar cómo afectan las variables clave de la reacción y observar capacidad de predicción de los resultados experimentales.

Como las oxidasas estudiadas en la sección previa fueron GOX y GalOx, y se ha visto que poseen una elevada dependencia del oxígeno, se puede emplear el modelo cinético doble hiperbólico simplificado (**Figura 5.4**) para predecir sus cursos de reacción. En este caso, los parámetros obtenidos del resultado del análisis cinético de las enzimas inmovilizadas serían ( $K_M$  y  $Act_{max}$ ), mostrados en las **Tabla 11.5-11.6**.

### 8.3.1. Presentación del modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de O<sub>2</sub>

El modelo cinético aplicado describe el curso de reacción de la oxidasa inmovilizada en cuestión (sistema bifásico sólido-líquido) de la reacción de dos sustratos:



Y la posterior conversión del peróxido de hidrógeno por la catalasa para generar más O<sub>2</sub>:



Por tanto, la velocidad de reacción de cada compuesto se puede expresar como:

$$\frac{d(O_2)}{dt} = -R_1 + \frac{1}{2} R_2 + OTR \quad (\text{Ec } 8.3)$$

$$\frac{d(S)}{dt} = -R_1 \quad (\text{Ec } 8.4)$$

$$\frac{d(P)}{dt} = R_1 \quad (\text{Ec } 8.5)$$

$$\frac{d(H_2O_2)}{dt} = \frac{1}{2} R_1 - R_2 \quad (\text{Ec } 8.6)$$

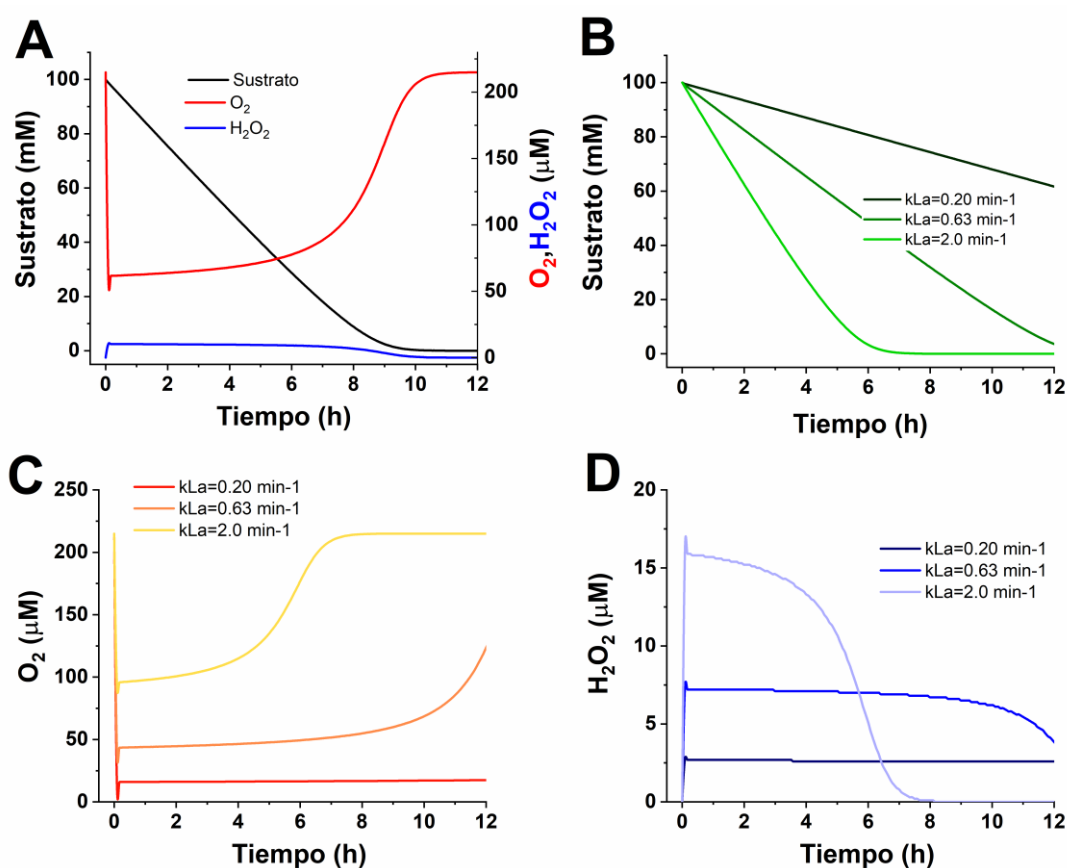
Dónde  $R_1$  es la ecuación cinética del modelo doble hiperbólico simplificado (Ec 5.1),  $R_2$  es la velocidad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la catalasa y OTR es la velocidad de transferencia de oxígeno determinada por las Ecuaciones 3.16-3.17. Se ha considerado  $R_2$  una ecuación cinética lineal respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dadas las bajas concentraciones de trabajo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, [460].

$$R_2 = [E]_{\text{catalasa}} \cdot Act_{\text{max}2} \cdot [H_2O_2] \quad (\text{Ec } 8.7)$$

Aplicando este modelo cinético se puede observar el efecto de las variables más importantes y simular los cursos de sustrato principal y oxígeno con el tiempo.

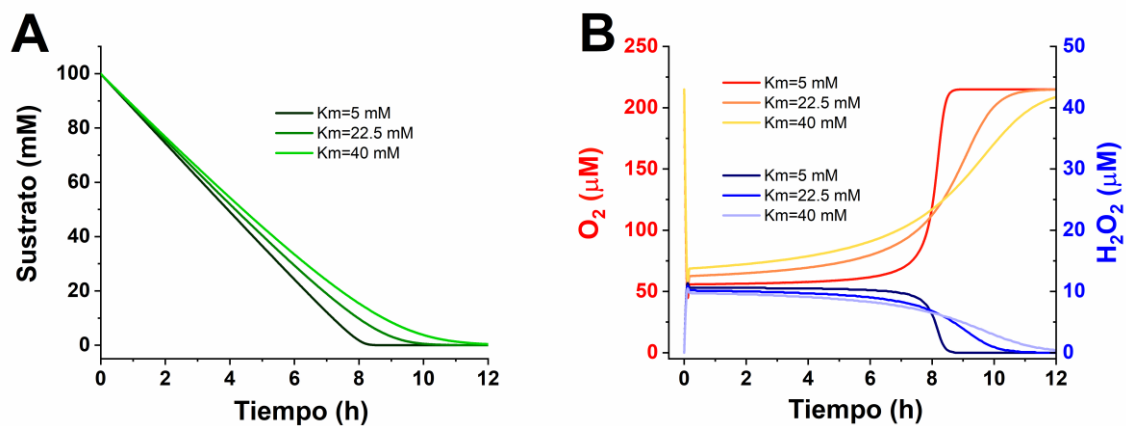
### 8.3.2. Simulación de cursos de reacción y análisis de sensibilidad

Mediante la simulación de los cursos de reacción y examinando el comportamiento del modelo ante la variación de ciertos parámetros críticos como  $k_{LA}$  o  $K_M$  se puede comprobar su funcionamiento. Para ello, se han desarrollado las **Figura 8.6** y **8.7** dónde se muestra la evolución del sustrato principal, el oxígeno y el peróxido de hidrógeno con el tiempo, variando el coeficiente volumétrico de transferencia de materia ( $k_{LA}$ ) y la constante de afinidad ( $K_M$ ) respectivamente. Ciertamente, hay muchas otras variables que se pueden interrogar, como la cantidad de catalizador en la reacción ( $m_{cat}$ ) o la concentración de catalasa, pero su efecto es más intuitivo. Cabe recordar que el valor de la constante de afinidad,  $K_M$  en este caso, o su afinidad por el oxígeno, es intrínseco a la enzima en cuestión; mientras que el  $k_{LA}$  es un parámetro fundamental de control en reacciones oxidativas.



**Figura 8.6.** Simulación de los cursos de reacción con el tiempo empleando el modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de oxígeno y variando  $k_{LA}$ . *Panel A:* Cursos de reacción del sustrato principal, oxígeno y peróxido de hidrógeno,  $k_{LA}=1.0$

$\text{min}^{-1}$ ; *Panel B*: Curso de reacción del sustrato principal a distintos  $k_{LA}$ ; *Panel C*: Curso de reacción del oxígeno a distintos  $k_{LA}$ ; *Panel D*: Curso de reacción del  $H_2O_2$  a distintos  $k_{LA}$ . Condiciones comunes a todos los paneles: 200 mL de volumen de reacción, 100 mM inicial de sustrato principal,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de carga enzimática,  $5.0 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$  de concentración de biocatalizador,  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa libre, 5.35 cm de radio de biorreactor,  $Act_{max1}=800 \text{ mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $Act_{max2}=100 \text{ mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $K_M=20 \text{ mM}$ ,  $[O_2]_0=0.215 \text{ mM}$ .



**Figura 8.7.** Simulación de los cursos de reacción con el tiempo empleando el modelo cinético doble hiperbólico simplificado con suministro de oxígeno y variando  $K_M$ . *Panel A*: Curso de reacción del sustrato principal a distintas  $K_M$ ; *Panel B*: Cursos de reacción del oxígeno y  $H_2O_2$  a distintos  $k_{LA}$ . Condiciones comunes a todos los paneles: 200 mL de volumen de reacción, 100 mM inicial de sustrato principal,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de carga enzimática,  $5.0 \text{ mg}_{\text{soporte}}\cdot\text{mL}^{-1}$  de concentración de biocatalizador,  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa libre,  $k_{LA}=1.0 \text{ min}^{-1}$ , 5.35 cm de radio de biorreactor,  $Act_{max1}=800 \text{ mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $Act_{max2}=100 \text{ mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $[O_2]_0=0.215 \text{ mM}$ .

En la **Figura 8.6** se puede observar la crucial importancia del  $k_{LA}$  o la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en el curso de reacción de una oxidasa con elevada dependencia de oxígeno. En el Panel A se muestra la simulación con los dos sustratos y el  $H_2O_2$  en la misma gráfica, con un tiempo de reacción cercano a las 10 h. Se observa un consumo lineal del sustrato durante la reacción hasta que se empieza a desacelerar a concentraciones bajas, y una  $[O_2]$  casi constante en estado estacionario. El panel B muestra el cambio en la velocidad de consumo del sustrato principal, disminuyendo el tiempo de reacción a la mitad con un incremento de  $k_{LA}$  de  $0.63$  a  $2.0 \text{ min}^{-1}$ . El panel C muestra la razón del cambio de velocidad observado en el panel B, que es la  $[O_2]$  durante

la reacción, el parámetro más limitante de la reacción. El panel D muestra la  $[H_2O_2]$  durante la reacción a una concentración fija de catalasa. Esto es muy interesante puesto que el  $H_2O_2$  es uno de los potenciales inhibidores de la reacción. Y se observa que el incremento del  $k_{LA}$  y su consecuente aumento de la velocidad de reacción tiene un efecto considerable en la  $[H_2O_2]$ . Esto se puede controlar con la adición sucesiva de catalasa. Pero igualmente, es importante señalar que el riesgo de inhibición de la enzima aumenta en ciertos casos.

En la **Figura 8.7** se muestra la variación de los cursos de reacción con el cambio en la constante de afinidad  $K_M$ . En esencia, una enzima con mayor afinidad (menor  $K_M$ ) mostrará un curso de consumo de sustrato principal más lineal, mientras que su  $[O_2]$  en estado estacionario será más constante. Esto no ocurre cuando la afinidad es más baja, la  $[O_2]$  durante la reacción se incrementa de forma más paulatina a tiempos finales, coincidiendo con la curvatura más temprana del curso de consumo de sustrato principal.

A partir de este análisis se pueden extraer dos conclusiones importantes. La primera es que, si la enzima no sufre desactivación por estrés hidrodinámico o por peróxido de hidrógeno es siempre conveniente trabajar al mayor  $k_{LA}$  posible, ya que esto proporcionará una mayor  $[O_2]$  en la reacción, y, por tanto, se aumenta la velocidad de reacción. Sin embargo, raramente se da este caso tan ideal. Cuando se trabaja con oxidasas es común que éstas se desactiven fácilmente por la acumulación de  $H_2O_2$ , cuya concentración crítica depende de la oxidasa en concreto, e incluso la catalasa puede sufrir esta desactivación a ciertas concentraciones de  $H_2O_2$  [459,460]. Además, la tensión hidrodinámica que se produce durante la agitación y/o burbujeo de gas también puede modificar la estructura de una enzima, y, por tanto, desactivarla. Se han realizado ciertos estudios sobre esta temática [463–465], pero dada su complejidad, es necesario evaluar esta desactivación para cada caso concreto. Es cierto que la inmovilización enzimática ayudaría a paliar este efecto, sin embargo, dado que la inmovilización empleada ha sido reversible por intercambio iónico, podría no ser tan efectiva como otros tipos de inmovilización más enfocadas en la estabilización estructural.

Por tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, y, por ejemplo, la **Figura 8.6D**, donde la  $[H_2O_2]$  aumenta notablemente a medida que aumenta el  $k_{LA}$ , en algunos casos lo óptimo no será trabajar a la máxima velocidad de transferencia de oxígeno (maximizando  $k_{LA}$ ) sino escoger un valor más intermedio para controlar tanto la  $[H_2O_2]$  como la tensión hidrodinámica. Esta discusión está provocada principalmente por los

resultados obtenidos en la **Figura 8.5**. En esta figura, donde se muestran cursos de reacción de galactosa y oxígeno con GalOx inmovilizada, se obtienen unos valores mayores de velocidad de consumo de galactosa a menores coeficientes volumétricos de transferencia de materia ( $k_{La}$ ), lo cual fueron resultados inesperados para nosotros.

Sería muy interesante en los siguientes pasos de la investigación estudiar este fenómeno de forma meticulosa y en profundidad, dada su importancia en la fase de integración de la enzima inmovilizada en el reactor.



---

---

# **CAPÍTULO 9.**

## **CONCLUSIONES**

---

---



## **9. CONCLUSIONES**

En este capítulo se muestran las principales conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral.

### **9.1. ANÁLISIS CINÉTICO EN FASE HOMOGÉNEA DE ENZIMAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>**

- Se ha desarrollado una metodología para calcular los parámetros de enzimas dependientes de O<sub>2</sub> que siguen un modelo cinético doble hiperbólico mediante la combinación de datos diferenciales e integrales.
- Este marco de análisis también es aplicable a otros sistemas enzimáticos limitados por un sustrato si se adquieren suficientes datos diferenciales y/o integrales.
- Se ha demostrado que no es necesario el uso de complejas instalaciones experimentales para la estimación de estos parámetros, aunque sí lo es la adquisición de numerosos datos en distintas condiciones y un cuidadoso trabajo de procesamiento de datos.
- Gracias al cálculo de los parámetros cinéticos se pudieron identificar oportunidades de intensificación y limitaciones operacionales de las enzimas.
- Se validaron los resultados del modelo cinético mediante la predicción de cursos de oxidación de glucosa y galactosa con GOX y GalOx.

### **9.2. ANÁLISIS CINÉTICO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS OXIDATIVAS DEPENDIENTES DE O<sub>2</sub>**

- Se consiguió inmovilizar la GOX, lacasa y tirosinasa en soportes porosos de agarosa mediante intercambio aniónico con PEI, obteniendo rendimientos de inmovilización muy elevados y factores de eficacia intermedios.
- Se consiguió inmovilizar la GalOx en soporte poroso de agarosa mediante intercambio catiónico con DS y por enlace covalente con grupos Gly y VS, obteniendo rendimientos de inmovilización elevados y factores de eficacia intermedios.
- Se desarrolló un modelo matemático integrando los fenómenos de reacción-difusión para explicar el gradiente de oxígeno en la partícula y su efecto en el factor de eficacia.

- Se ha demostrado que la ecuación doble hiperbólica que siguen las enzimas oxidativas estudiadas se puede simplificar para los casos de elevada dependencia de oxígeno.
- Existe una variación considerable de las constantes de afinidad observables con el incremento de la carga enzimática inmovilizada, disminuyendo la  $K_{Sobs}$  y aumentando la  $K_{O2obs}$  a medida que disminuye el factor de eficacia.
- Gracias al análisis cinético, se han mostrado las oportunidades de intensificación de las enzimas inmovilizadas en función de su dependencia de oxígeno.

### **9.3. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA GALACTOSA OXIDASA**

- Se realizó un cribado de varios compuestos activadores de la GalOx, concluyendo que la hemoglobina es el más interesante según criterios de activación, precio y capacidad de regeneración.
- Se demostró la influencia del peróxido de hidrógeno en el mecanismo de activación, requiriéndose una  $[H_2O_2]$  óptima de operación considerando también la posible desactivación de la enzima.
- Mediante un estudio de diversas  $[catalasa]$  y  $[Hb]$  se consiguió optimizar la reacción de oxidación de galactosa con GalOx inmovilizada en DS-Ag.

### **9.4. DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR AUTOSUFICIENTE DE GALACTOSA OXIDASA**

- Según criterios de actividad expresada y estabilidad en condiciones no reactivas se concluyó que biocatalizador que mejor se adaptaba las condiciones de reacción era el inmovilizado en dextrán-sulfato.
- Se consiguieron cuantificar las restricciones difusionales en varios biocatalizadores porosos mediante la incorporación de un indicador luminiscente sensible a la concentración de oxígeno dentro de la partícula.
- Se demostró que las variaciones en la carga enzimática y el factor de eficacia están directamente relacionadas con la disponibilidad de  $O_2$  en el interior de la partícula.
- Se diseñó un biocatalizador de GalOx con el activador co-inmovilizado demostrando un gran desempeño en la oxidación de galactosa en un reactor aireado.

### **9.5. CONTROL Y PREDICCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNA EN BIOCATALIZADORES SÓLIDOS POROSOS**

- Se desarrolló un modelo matemático de reacción-difusión para explicar la localización de proteína en la partícula y su efecto en la eficacia del catalizador.
- Se estudió la influencia tanto del radio de partícula como de la difusividad efectiva ( $D_{eff}$ ) en el perfil de distribución de proteína en la partícula.
- Se definió un módulo aparente de inmovilización para la identificación de regímenes de distribución de proteína según parámetros como radio de partícula, difusividad efectiva y tiempo de inmovilización.
- Se validó el modelo matemático mediante la predicción de la distribución de proteína en varias inmovilizaciones enzimáticas donde se modificó la velocidad de inmovilización.
- Es posible cuantificar el gradiente de distribución de proteína en una partícula porosa sabiendo parámetros como tiempo y rendimiento de inmovilización, radio de partícula y difusividad efectiva.

### **9.6. APLICACIÓN DE BIOCATALIZADORES ENZIMÁTICOS EN REACTORES CON SUMINISTRO DE O<sub>2</sub>**

- Se logró un gran desempeño de los biocatalizadores oxidativos inmovilizados en los reactores con suministro de aire, con elevados valores de conversión y/o rendimiento a producto.
- Se demostró que la eficiencia catalítica está directamente relacionada con la disponibilidad de O<sub>2</sub> en la reacción, obteniéndose mayores eficiencias cuanto mayor es la [O<sub>2</sub>] en estado pseudo-estacionario en la reacción.
- Se propuso un modelo cinético para simular los cursos de reacciones con suministro de aire, realizándose un análisis de sensibilidad de las variables más importantes.
- Del análisis de sensibilidad se puede concluir que elevados valores de OTR originan velocidades de reacción más elevadas, pero también [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] más altas, aumentando la posible desactivación enzimática. Por tanto, es necesario un estudio más profundo de la desactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para cada enzima.



---

---

# **CAPÍTULO 10.**

## **REFERENCIAS**

---

---



## 10. REFERENCIAS

1. Sheldon RA: **Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design.** *Chem Soc Rev* 2012, **41**:1437–1451.
2. United States Environmental Protection Agency: **Summary of the Pollution Prevention Act.** 1990,
3. Sheldon RA: **Atom utilisation, E factors and the catalytic solution.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* 2000, **3**:541–551.
4. Anastas P, Eghbali N: **Green Chemistry: Principles and Practice.** *Chem Soc Rev* 2010, **39**:301–312.
5. Oxford University Press: **Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future.** 1987,
6. Graedel TE: **Green Chemistry and Sustainable Development.** In *Handbook of Green Chemistry and Technology.* Edited by Clark JH, Macquarrie D. Wiley; 2002:56–61.
7. Clark JH, Farmer TJ, Herrero-Davila L, Sherwood J: **Circular economy design considerations for research and process development in the chemical sciences.** *Green Chem* 2016, **18**:3914–3934.
8. Sheldon RA, Woodley JM: **Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry.** *Chem Rev* 2018,
9. Alcántara AR, Domínguez De María P, Littlechild JA, Schürmann M, Sheldon RA, Wohlgemuth R: **Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry.** *ChemSusChem* 2022, **15**:e202102709.
10. Domínguez De María P: **Biocatalysis, sustainability, and industrial applications: Show me the metrics.** *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2021, **31**:100514.
11. Bruggink A, Schoevaart R, Kieboom T: **Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert.** *Org Process Res Dev* 2003, **7**:622–640.
12. Wender PA, Verma VA, Paxton TJ, Pillow TH: **Function-Oriented Synthesis, Step Economy, and Drug Design.** *Acc Chem Res* 2008, **41**:40–49.
13. Metzker ML: **Sequencing technologies — the next generation.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:31–46.
14. Beloqui A, De María PD, Golyshin PN, Ferrer M: **Recent trends in industrial microbiology.** *Current Opinion in Microbiology* 2008, **11**:240–248.

15. Hilterhaus L, Liese A: **Building Blocks**. In *White Biotechnology*. Edited by Ulber R, Sell D. Springer Berlin Heidelberg; 2007:133–173.
16. Renata H, Wang ZJ, Arnold FH: **Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution**. *Angew Chem Int Ed* 2015, **54**:3351–3367.
17. Sun Z, Wikmark Y, Bäckvall J, Reetz MT: **New Concepts for Increasing the Efficiency in Directed Evolution of Stereoselective Enzymes**. *Chemistry A European J* 2016, **22**:5046–5054.
18. Valetti F, Gilardi G: **Improvement of Biocatalysts for Industrial and Environmental Purposes by Saturation Mutagenesis**. *Biomolecules* 2013, **3**:778–811.
19. Reetz M: **Making Enzymes Suitable for Organic Chemistry by Rational Protein Design**. *ChemBioChem* 2022, **23**:e202200049.
20. G. W. Huisman, J. Lalonde: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC Press; 2006.
21. Sheldon RA, Brady D: **Streamlining Design, Engineering, and Applications of Enzymes for Sustainable Biocatalysis**. *ACS Sustainable Chem Eng* 2021, **9**:8032–8052.
22. Sheldon RA, Basso A, Brady D: **New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy**. *Chem Soc Rev* 2021, **50**:5850–5862.
23. Bolivar JM, Woodley JM, Fernandez-Lafuente R: **Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization**. *Chem Soc Rev* 2022, **51**:6251–6290.
24. Wahart AJC, Staniland J, Miller GJ, Cosgrove SC: **Oxidase enzymes as sustainable oxidation catalysts**. *R Soc open sci* 2022, **9**:211572.
25. Heath RS, Turner NJ: **Recent advances in oxidase biocatalysts: Enzyme discovery, cascade reactions and scale up**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022, **38**:100693.
26. Vernet G, Hobisch M, Kara S: **Process intensification in oxidative biocatalysis**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022, **38**:100692.
27. Al-Shameri A, Schmermund L, Sieber V: **Engineering approaches for O<sub>2</sub>-dependent enzymes**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2023, **40**:100733.
28. Cárdenas-Moreno Y, González-Bacerio J, García Arellano H, del Monte-Martínez A: **Oxidoreductase enzymes: Characteristics, applications, and challenges as a biocatalyst**. *Biotechnol Appl Biochem* 2023, **70**:2108–2135.

29. Sellés Vidal L, Kelly CL, Mordaka PM, Heap JT: **Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2018, **1866**:327–347.
30. May SW: **Applications of oxidoreductases.** *Current Opinion in Biotechnology* 1999, **10**:370–375.
31. Guan Z-B, Luo Q, Wang H-R, Chen Y, Liao X-R: **Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications.** *Cell Mol Life Sci* 2018, **75**:3569–3592.
32. Monti D, Ottolina G, Carrea G, Riva S: **Redox Reactions Catalyzed by Isolated Enzymes.** *Chem Rev* 2011, **111**:4111–4140.
33. Kleppe K: **The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* \*.** *Biochemistry* 1966, **5**:139–143.
34. Wilson R, Turner APF: **Glucose oxidase: an ideal enzyme.** *Biosensors and Bioelectronics* 1992, **7**:165–185.
35. Mirón J, González MP, Vázquez JA, Pastrana L, Murado MA: **A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions.** *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **34**:513–522.
36. Bao J, Furumoto K, Fukunaga K, Nakao K: **A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate.** *Biochemical Engineering Journal* 2001, **8**:91–102.
37. Bao J, Furumoto K, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K: **Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase.** *Biochemical Engineering Journal* 2003, **13**:69–72.
38. Swoboda BEP, Massey V: **Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*.** *Journal of Biological Chemistry* 1965, **240**:2209–2215.
39. Nakamura S, Fujiki S: **Comparative Studies on the Glucose Oxidases of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*.** *The Journal of Biochemistry* 1968, **63**:51–58.
40. Tsuge H, Natsuaki O, Ohashi K: **Purification, Properties, and Molecular Features of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*.** *The Journal of Biochemistry* 1975, **78**:835–843.
41. Nakamura S, Ogura Y: **Action Mechanism of Glucose Oxidase of *Aspergillus niger*.** *The Journal of Biochemistry* 1968, **63**:308–316.
42. Gouda MD, Singh SA, Rao AGA, Thakur MS, Karanth NG: **Thermal Inactivation of Glucose Oxidase.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**:24324–24333.

43. Pazur JH, Kleppe K: **The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* \***. *Biochemistry* 1964, **3**:578–583.
44. Tiina M: **Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms**. *International Journal of Food Microbiology* 1989, **8**:165–174.
45. Dobbenie D, Uyttendaele M, Debevere J: **Antibacterial Activity of the Glucose Oxidase/Glucose System in Liquid Whole Egg**. *Journal of Food Protection* 1995, **58**:273–279.
46. Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM: **Disease Resistance Conferred by Expression of a Gene Encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generating Glucose Oxidase in Transgenic Potato Plants**. *The Plant Cell* 1995, **7**:1357.
47. Leiter E, Marx F, Pusztahelyi T, Haas H, Pocsí I: ***Penicillium chrysogenum* glucose oxidase - a study on its antifungal effects**. *J Appl Microbiol* 2004, **97**:1201–1209.
48. Leskovac V, Trivić S, Wohlfahrt G, Kandrač J, Peričin D: **Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005, **37**:731–750.
49. Fiedurek J, Gromada A: **Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase**. *Enzyme and Microbial Technology* 1997, **20**:344–347.
50. Codex, General Standard for Food Additives (GSFA): **Glucose oxidase (*Aspergillus niger* var.) (1102). Food additive details**. *Codex Alimentarius Commission* 2007,
51. Witteveen CFB, Veenhuis M, Visser J: **Localization of Glucose Oxidase and Catalase Activities in *Aspergillus niger***. *Appl Environ Microbiol* 1992, **58**:1190–1194.
52. Seifu E, Buys EM, Donkin EF: **Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review**. *Trends in Food Science & Technology* 2005, **16**:137–154.
53. Vemulapalli V, Miller KA, Hoseney RC: **Glucose Oxidase in Breadmaking Systems**. *Cereal Chem* 1998, **75**:439–442.
54. Rasiah IA, Sutton KH, Low FL, Lin H-M, Gerrard JA: **Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants**. *Food Chemistry* 2005, **89**:325–332.
55. Sisak C, Csanádi Z, Rónay E, Szajáni B: **Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase**. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:1002–1007.

56. Labuza TP, Breene WM: **Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods.** *J Food Processing Preservation* 1989, **13**:1–69.
57. Pickering GJ, Heatherbell DA, Barnes MF: **Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase.** *Food Research International* 1998, **31**:685–692.
58. Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C: **Fed-batch Production of Gluconic Acid by Terpene-treated *Aspergillus niger* Spores.** *Appl Biochem Biotechnol* 2008, **151**:413–423.
59. Yu RJ, Wan EJ: **Method of using gluconic acid or gluconolactone for treating wrinkles.** 1997,
60. Erick Vandamme, Wim Soetaert: *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success.* John Wiley & Sons; 2010.
61. Graham Brookes, Neville Craddock, Professor Bärbel Kniel: **An analysis of labelling requirements, market dynamics and cost implications. The Global GM Market—implications for the European food chain.** 2005,
62. Standard for Food Additives (GSFA)n: **Glucono delta-lactone (575). Food additive details.** *Codex Alimentarius Commission* 2007,
63. Singh OV, Kapur N, Singh RP: **Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410.** *World J Microbiol Biotechnol* 2005, **21**:519–524.
64. EuropaBio, ESAB: **Input to the SusChem strategic research agenda.** 2005,
65. Nakao K, Kiefner A, Furumoto K, Harada T: **Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors.** *Chemical Engineering Science* 1997, **52**:4127–4133.
66. Vroemen Albert Joseph, Beverini Marc: **Enzymatic production of gluconic acid or its salts.** 1996,
67. Shetty JK, Oreste J. Lantero: **Process for the preparation of gluconic acid and gluconic acid produced thereby.** 2004,
68. Godjevargova T, Dayal R, Turmanova S: **Gluconic Acid Production in Bioreactor with Immobilized Glucose Oxidase Plus Catalase on Polymer Membrane Adjacent to Anion-Exchange Membrane.** *Macromolecular Bioscience* 2004, **4**:950–956.
69. Newman JD, Turner APF: **Home blood glucose biosensors: a commercial perspective.** *Biosensors and Bioelectronics* 2005, **20**:2435–2453.
70. Mello LD, Kubota LT: **Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries.** *Food Chemistry* 2002, **77**:237–256.

71. Terry LA, White SF, Tigwell LJ: **The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry.** *J Agric Food Chem* 2005, **53**:1309–1316.
72. Steiner M-S, Duerkop A, Wolfbeis OS: **Optical methods for sensing glucose.** *Chem Soc Rev* 2011, **40**:4805.
73. Yu Z, Jiang N, Kazarian SG, Tasoglu S, Yetisen AK: **Optical sensors for continuous glucose monitoring.** *Prog Biomed Eng* 2021, **3**:022004.
74. Cooper JAD, Smith W, Bacila M, Medina H: **Galactose Oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr.** *Journal of Biological Chemistry* 1959, **234**:445–448.
75. Whittaker JW: **The radical chemistry of galactose oxidase.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005, **433**:227–239.
76. Whittaker JW: **Free Radical Catalysis by Galactose Oxidase.** *Chem Rev* 2003, **103**:2347–2364.
77. Whittaker MM, Whittaker JW: **The active site of galactose oxidase.** *Journal of Biological Chemistry* 1988, **263**:6074–6080.
78. Kwiatkowski LD, Adelman M, Pennelly R, Kosman DJ: **Kinetic mechanism of the Cu(II) enzyme galactose oxidase.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 1981, **14**:209–222.
79. Toftgaard Pedersen A, Birmingham WR, Rehn G, Charnock SJ, Turner NJ, Woodley JM: **Process Requirements of Galactose Oxidase Catalyzed Oxidation of Alcohols.** *Org Process Res Dev* 2015, **19**:1580–1589.
80. Forget SM, Xia F (Roderick), Hein JE, Brumer H: **Determination of biocatalytic parameters of a copper radical oxidase using real-time reaction progress monitoring.** *Org Biomol Chem* 2020, **18**:2076–2084.
81. Humphreys KJ, Mirica LM, Wang Y, Klinman JP: **Galactose Oxidase as a Model for Reactivity at a Copper Superoxide Center.** *J Am Chem Soc* 2009, **131**:4657–4663.
82. Johnson HC, Zhang S, Fryszkowska A, Ruccolo S, Robaire SA, Klapars A, Patel NR, Whittaker AM, Huffman MA, Strotman NA: **Biocatalytic oxidation of alcohols using galactose oxidase and a manganese( III ) activator for the synthesis of islatravir.** *Org Biomol Chem* 2021, **19**:1620–1625.
83. Parodi A, Asteasuain M, Magario I: **Kinetic analysis and evaluation of galactose oxidase activation by hematin in the green oxidation of glycerol.** *Biochemical Engineering Journal* 2021, **176**:108203.
84. Chen Y, Zou J, Sun J, Qin Q, Ji P, Feng W: **Immobilization using Cu(II) and Zr(IV): Persistent and highly efficient activation of galactose oxidase by in-situ generation of hydroxyl radicals in concert with in-situ generation of O<sub>2</sub>.** *Chemical Engineering Journal* 2022, **435**:134819.

85. Córdoba A, Alasino N, Asteasuain M, Magario I, Ferreira ML: **Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction.** *Chemical Engineering Science* 2015, **129**:249–259.
86. Ögel ZB, Brayford D, McPherson MJ: **Cellulose-triggered sporulation in the galactose oxidase-producing fungus *Cladobotryum (Dactylium) dendroides* NRRL 2903 and its re-identification as a species of *Fusarium*.** *Mycological Research* 1994, **98**:474–480.
87. Rogers MS, Hurtado-Guerrero R, Firbank SJ, Halcrow MA, Dooley DM, Phillips SEV, Knowles PF, McPherson MJ: **Cross-Link Formation of the Cysteine 228–Tyrosine 272 Catalytic Cofactor of Galactose Oxidase Does Not Require Dioxigen.** *Biochemistry* 2008, **47**:10428–10439.
88. Paukner R, Staudigl P, Choosri W, Haltrich D, Leitner C: **Expression, purification, and characterization of galactose oxidase of *Fusarium sambucinum* in *E. coli*.** *Protein Expression and Purification* 2015, **108**:73–79.
89. Faria CB, De Castro FF, Martim DB, Abe CAL, Prates KV, De Oliveira MAS, Barbosa-Tessmann IP: **Production of Galactose Oxidase Inside the *Fusarium fujikuroi* Species Complex and Recombinant Expression and Characterization of the Galactose Oxidase GaoA Protein from *Fusarium subglutinans*.** *Mol Biotechnol* 2019, **61**:633–649.
90. Gasparotto EPL, Abrão SCC, Inagaki SY, Tessmann DJ, Kimmelmeier C, Tessmann IPB: **Production and characterization of galactose oxidase produced by four isolates of *Fusarium graminearum*.** *Braz arch biol technol* 2006, **49**:557–564.
91. Werpy T, Petersen G: *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas.* 2004.
92. Elaine Barnard, Jose Jonathan Rubio Arias, Wim Thielemans: **Chemolytic depolymerisation of PET: a review.** *Green Chemistry* 2021, **11**:3765–3789.
93. Yuan H, Liu H, Du J, Liu K, Wang T, Liu L: **Biocatalytic production of 2,5-furandicarboxylic acid: recent advances and future perspectives.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2020, **104**:527–543.
94. Troiano D, Orsat V, Dumont M-J: **Status of Biocatalysis in the Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid.** *ACS Catal* 2020, **10**:9145–9169.
95. Cajnko MM, Novak U, Grilc M, Likozar B: **Enzymatic conversion reactions of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) to bio-based 2,5-diformylfuran (DFF) and 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) with air: mechanisms, pathways and synthesis selectivity.** *Biotechnol Biofuels* 2020, **13**:66.
96. Krystof M, Pérez-Sánchez M, Domínguez de María P: **Lipase-Mediated Selective Oxidation of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural.** *ChemSusChem* 2013, **6**:826–830.

97. Wang X, Zhang X-Y, Zong M-H, Li N: **Sacrificial Substrate-Free Whole-Cell Biocatalysis for the Synthesis of 2,5-Furandicarboxylic Acid by Engineered *Escherichia coli***. *ACS Sustainable Chem Eng* 2020, **8**:4341–4345.
98. Dijkman WP, Groothuis DE, Fraaije MW: **Enzyme-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to Furan-2,5-dicarboxylic Acid**. *Angew Chem Int Ed* 2014, **53**:6515–6518.
99. Gwen Tjallinks, Alessandro Boverio, Amarins W. Jager, Saniye G. Kaya, Andrea Mattevi, Marco W. Fraaije: **Efficient Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural Using a Flavoprotein Oxidase from the *Honeybee Apis mellifera***. *ChemBioChem* 2023, doi:10.1002/cbic.202300588.
100. J. Carro, P. Ferreira, L. Rodríguez, A. Prieto, Ana Serrano, B. Balcells, A. Ardá, Jesús Jiménez-Barbero, A. Gutiérrez, R. Ullrich, et al.: **5-hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxigenase**. *FEBS Journal* 2014, doi:10.1111/febs.13177.
101. McKenna SM, Leimkühler S, Herter S, Turner NJ, Carnell AJ: **Enzyme cascade reactions: synthesis of furandicarboxylic acid (FDCA) and carboxylic acids using oxidases in tandem**. *Green Chem* 2015, **17**:3271–3275.
102. Milić M, Byström E, Domínguez de María P, Kara S: **Enzymatic Cascade for the Synthesis of 2,5-Furandicarboxylic Acid in Biphasic and Microaqueous Conditions: ‘Media-Agnostic’ Biocatalysts for Biorefineries**. *ChemSusChem* 2022, **15**.
103. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR: **Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences**. *FEBS Journal* 2006,
104. Mayer AM, Staples RC: **Laccase: new functions for an old enzyme**. *Phytochemistry* 2002, **60**:551–565.
105. Claus H: **Laccases and their occurrence in prokaryotes**. *Arch Microbiol* 2003, **179**:145–150.
106. Kawal S, Umezawa T, Shimada M, Higuchi T: **Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by lactase of *Coriolus versicolor***. *FEBS LETTERS* 1988, **236**.
107. Hoopes JT, Dean JFD: **Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera***. *Plant Physiology and Biochemistry* 2004, **42**:27–33.
108. McCaig BC, Meagher RB, Dean JFD: **Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana***. *Planta* 2005, **221**:619–636.
109. Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T: **Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis:**

- purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies.** *Microbiology* 2003, **149**:2455–2462.
110. Diamantidis G: **Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*.** *Soil Biology & Biochemistry* 2000, **32**:919–927.
  111. Thorp HH, Pecoraro VL (Eds): *Mechanistic Bioinorganic Chemistry*. American Chemical Society; 1996.
  112. Bento I, Carrondo MA, Lindley PF: **Reduction of dioxygen by enzymes containing copper.** *J Biol Inorg Chem* 2006, **11**:539–547.
  113. Malhotra M, Suman SK: **Laccase-mediated delignification and detoxification of lignocellulosic biomass: removing obstacles in energy generation.** *Environ Sci Pollut Res* 2021, **28**:58929–58944.
  114. Baldrian P: **Fungal laccases – occurrence and properties.** *FEMS Microbiol Rev* 2006, **30**:215–242.
  115. Sterjiades R, Dean JFD, Eriksson K-EL: **Laccase from Sycamore Maple ( *Acer pseudoplatanus* ) Polymerizes Monolignols.** *Plant Physiol* 1992, **99**:1162–1168.
  116. O'Malley DM, Whetten R, Sederoff RR: **A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem.** *Science* 1993, **260**.
  117. Bourbonnais R, Paice MG: **Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation.** *FEBS Letters* 1990, **267**:99–102.
  118. Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Monti D: **Biocatalysis with Laccases: An Updated Overview.** *Catalysts* 2020, **11**:26.
  119. Gavnholt B, Larsen K, Rasmussen SK: **Isolation and characterisation of laccase cDNAs from meristematic and stem tissues of ryegrass ( *Lolium perenne* ).** *Plant Science* 2002, **162**:873–885.
  120. Wood DA: **Production, Purification and Properties of Extracellular Laccase of *Agaricus bisporus*.** *Microbiology* 1980, **117**:327–338.
  121. Hajdok S, Conrad J, Leutbecher H, Strobel S, Schleid T, Beifuss U: **The Laccase-Catalyzed Domino Reaction between Catechols and Heterocyclic 1,3-Dicarbonyls and the Unambiguous Structure Elucidation of the Products by NMR Spectroscopy and X-ray Crystal Structure Analysis.** *J Org Chem* 2009, **74**:7230–7237.
  122. Frasconi M, Favero G, Boer H, Koivula A, Mazzei F: **Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2010, **1804**:899–908.

123. Mayolo-Deloisa K, Trejo-Hernández MDR, Rito-Palomares M: **Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems.** *Process Biochemistry* 2009, **44**:435–439.
124. Widsten P, Kandelbauer A: **Adhesion improvement of lignocellulosic products by enzymatic pre-treatment.** *Biotechnology Advances* 2008, **26**:379–386.
125. Ehlers GA, Rose PD: **Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation.** *Bioresource Technology* 2005, **96**:1264–1275.
126. Aggelis G, Iconomou D, Christou M, Bokas D, Kotzailias S, Christou G, Tsagou V, Papanikolaou S: **Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process.** *Water Research* 2003, **37**:3897–3904.
127. Petersen BR, Mathiasen TE: **Deoxygenation of a food item using laccase.** 1996,
128. Agematu H, Tsuchida T, Kominato K, Shibamoto N, Yoshioka T, Nishida H, Okamoto R, Shin T, Murao S: **Enzymatic dimerization of penicillin X.** *J Antibiot* 1993, **46**:141–148.
129. Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell Salazar M, Hessel S, J&uuml;lich W-D, et al.: **Novel Cephalosporins Synthesized by Amination of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives Using Fungal Laccases II.** *Chem Pharm Bull* 2007, **55**:412–416.
130. Galai S, Limam F, Marzouki MN: **A New *Stenotrophomonas maltophilia* Strain Producing Laccase. Use in Decolorization of Synthetics Dyes.** *Appl Biochem Biotechnol* 2009, **158**:416–431.
131. Mikolasch A, Schauer F: **Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, **82**:605–624.
132. Jeon J-R, Chang Y-S: **Laccase-mediated oxidation of small organics: bifunctional roles for versatile applications.** *Trends in Biotechnology* 2013, **31**:335–341.
133. Rodríguez-Delgado MM, Alemán-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martínez-Chapa SO, Barceló D, Parra R: **Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2015, **74**:21–45.
134. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D: **Recent developments and applications of immobilized laccase.** *Biotechnology Advances* 2013, **31**:1808–1825.
135. Daronch NA, Kelbert M, Pereira CS, De Araújo PHH, De Oliveira D: **Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review.** *Chemical Engineering Journal* 2020, **397**:125506.

136. Yang X, Wu Y, Zhang Y, Yang E, Qu Y, Xu H, Chen Y, Irbis C, Yan J: **A Thermo-Active Laccase Isoenzyme From *Trametes trogii* and Its Potential for Dye Decolorization at High Temperature.** *Front Microbiol* 2020, **11**:241.
137. Si J, Ma H, Cao Y, Cui B, Dai Y: **Introducing a Thermo-Alkali-Stable, Metallic Ion-Tolerant Laccase Purified From White Rot Fungus *Trametes hirsuta*.** *Front Microbiol* 2021, **12**:670163.
138. Min K, Park GW, Yoo YJ, Lee J-S: **A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase.** *Bioresource Technology* 2019, **289**:121730.
139. Faccio G, Kruus K, Saloheimo M, Thöny-Meyer L: **Bacterial tyrosinases and their applications.** *Process Biochemistry* 2012, **47**:1749–1760.
140. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Saboury AA: **A comprehensive review on tyrosinase inhibitors.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2019, **34**:279–309.
141. Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-L JN, Garcia-Carmona F: **Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1995,
142. Itoh S, Fukuzumi S: **Monooxygenase Activity of Type 3 Copper Proteins.** *Acc Chem Res* 2007, **40**:592–600.
143. Jus S, Kokol V, Guebitz GM: **Tyrosinase-catalysed coupling of functional molecules onto protein fibres.** *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **42**:535–542.
144. Hossain KhMG, González MD, Lozano GR, Tzanov T: **Multifunctional modification of wool using an enzymatic process in aqueous–organic media.** *Journal of Biotechnology* 2009, **141**:58–63.
145. Marín-Zamora ME, Rojas-Melgarejo F, García-Cánovas F, García-Ruiz PA: **Stereospecificity of Mushroom Tyrosinase Immobilized on a Chiral and a Nonchiral Support.** *J Agric Food Chem* 2007, **55**:4569–4575.
146. Valero E, Varón R, García-Carmona F: **Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o- Benzoquinone.** *Biological Chemistry* 2002, **383**.
147. Selinheimo E, NiEidhin D, Steffensen C, Nielsen J, Lomascolo A, Halaouli S, Record E, O’Beirne D, Buchert J, Kruus K: **Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases.** *Journal of Biotechnology* 2007, **130**:471–480.
148. Kim Y-J, Uyama H: **Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future.** *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:1707–1723.

149. Pretzler M, Bijelic A, Rompel A: **Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (AbPPO4)**. *Sci Rep* 2017, **7**:1810.
150. Baek YS, Ryu YB, Curtis-Long MJ, Ha TJ, Rengasamy R, Yang MS, Park KH: **Tyrosinase inhibitory effects of 1,3-diphenylpropanes from *Broussonetia kazinoki***. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, **17**:35–41.
151. Zaidi KU, Ali AS, Ali SA: **Purification and Characterization of Melanogenic Enzyme Tyrosinase from Button Mushroom**. *Enzyme Research* 2014, **2014**:1–6.
152. Abdollahi K, Yazdani F, Panahi R, Mokhtarani B: **Biotransformation of phenol in synthetic wastewater using the functionalized magnetic nano-biocatalyst particles carrying tyrosinase**. *3 Biotech* 2018, **8**:419.
153. Liu N, Liang G, Dong X, Qi X, Kim J, Piao Y: **Stabilized magnetic enzyme aggregates on graphene oxide for high performance phenol and bisphenol A removal**. *Chemical Engineering Journal* 2016, **306**:1026–1034.
154. Reza KK, Ali MdA, Srivastava S, Agrawal VV, Biradar AM: **Tyrosinase conjugated reduced graphene oxide based biointerface for bisphenol A sensor**. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, **74**:644–651.
155. Cerrato-Alvarez M, Bernalte E, Bernalte-García MJ, Pinilla-Gil E: **Fast and direct amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors**. *Talanta* 2019, **193**:93–99.
156. Min K, Yoo YJ: **Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode**. *Talanta* 2009, **80**:1007–1011.
157. Min K, Park D-H, Yoo YJ: **Electroenzymatic synthesis of l-DOPA**. *Journal of Biotechnology* 2010, **146**:40–44.
158. Min K, Park K, Park D-H, Yoo YJ: **Overview on the biotechnological production of l-DOPA**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, **99**:575–584.
159. Wu R, Zhu Z: **Self-Powered Enzymatic Electrosynthesis of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine in a Hybrid Bioelectrochemical System**. *ACS Sustainable Chem Eng* 2018, **6**:12593–12597.
160. Min K, Yum T, Kim J, Woo HM, Kim Y, Sang B-I, Yoo YJ, Kim YH, Um Y: **Perspectives for biocatalytic lignin utilization: cleaving 4-O-5 and C $\alpha$ -C $\beta$  bonds in dimeric lignin model compounds catalyzed by a promiscuous activity of tyrosinase**. *Biotechnol Biofuels* 2017, **10**:212.
161. Sheldon RA: **Catalytic Oxidations in a Bio-Based Economy**. *Front Chem* 2020, **8**:132.
162. Winkler CK, Schrittwieser JH, Kroutil W: **Power of Biocatalysis for Organic Synthesis**. *ACS Cent Sci* 2021, **7**:55–71.

163. Dong J, Fernández-Fueyo E, Hollmann F, Paul CE, Pesic M, Schmidt S, Wang Y, Younes S, Zhang W: **Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective**. *Angew Chem Int Ed* 2018, **57**:9238–9261.
164. Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UT: **Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications**. *Angew Chem Int Ed* 2021, **60**:88–119.
165. Milagre CDF, Milagre HMS: **Alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidation**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022, **38**:100694.
166. Puetz H, Puchřová E, Vranková K, Hollmann F: **Biocatalytic Oxidation of Alcohols**. *Catalysts* 2020, **10**:952.
167. Romero E, Gómez Castellanos JR, Gadda G, Fraaije MW, Mattevi A: **Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes**. *Chem Rev* 2018, **118**:1742–1769.
168. Kornecki JF, Carballares D, Tardioli PW, Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, Alcántara AR, Fernandez-Lafuente R: **Enzyme production of D -gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions**. *Catal Sci Technol* 2020, **10**:5740–5771.
169. Koschorreck K, Alpdagtas S, Urlacher VB: **Copper-radical oxidases: A diverse group of biocatalysts with distinct properties and a broad range of biotechnological applications**. *Engineering Microbiology* 2022, **2**:100037.
170. Herter S, McKenna SM, Frazer AR, Leimkühler S, Carnell AJ, Turner NJ: **Galactose Oxidase Variants for the Oxidation of Amino Alcohols in Enzyme Cascade Synthesis**. *ChemCatChem* 2015, **7**:2313–2317.
171. Huffman MA, Fryszkowska A, Alvizo O, Borra-Garske M, Campos KR, Canada KA, Devine PN, Duan D, Forstater JH, Grosser ST, et al.: **Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir**. *Science* 2019, **366**:1255–1259.
172. Woodley JM: **Reaction Engineering for the Industrial Implementation of Biocatalysis**. *Top Catal* 2019, **62**:1202–1207.
173. Lorente-Arevalo A, Ladero M, Bolivar JM: **Intensification of oxygen-dependent biotransformations catalyzed by immobilized enzymes**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2021, **32**:100544.
174. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R: **Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization**. *Chem Soc Rev* 2013, **42**:6290–6307.
175. Bernal C, Rodríguez K, Martínez R: **Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts**. *Biotechnology Advances* 2018, **36**:1470–1480.

176. Burek BO, Dawood AWH, Hollmann F, Liese A, Holtmann D: **Process Intensification as Game Changer in Enzyme Catalysis**. *Front Catal* 2022, **2**:858706.
177. Žnidaršič-Plazl P: **Biocatalytic process intensification via efficient biocatalyst immobilization, miniaturization, and process integration**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2021, **32**:100546.
178. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R: **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:1451–1463.
179. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC: **Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance**. *Adv Synth Catal* 2011, **353**:2885–2904.
180. Rodríguez-Núñez K, Bernal C, Martínez R: **Immobilized Biocatalyst Engineering: High throughput enzyme immobilization for the integration of biocatalyst improvement strategies**. *International Journal of Biological Macromolecules* 2021, **170**:61–70.
181. Mathieu Y, Cleveland ME, Brumer H: **Active-Site Engineering Switches Carbohydrate Regiospecificity in a Fungal Copper Radical Oxidase**. *ACS Catal* 2022, **12**:10264–10275.
182. Boudrant J, Woodley JM, Fernandez-Lafuente R: **Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation**. *Process Biochemistry* 2020, **90**:66–80.
183. Bolivar JM, López-Gallego F: **Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow reactors**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2020, **25**:100349.
184. Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, Gardossi L: **Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods**. *Chem Soc Rev* 2013, **42**:6262.
185. Bolivar JM, Gascon V, Marquez-Alvarez C, Blanco RM, Nidetzky B: **Oriented Co-immobilization of Oxidase and Catalase On Tailor-made Ordered Mesoporous Silica**. *Langmuir* 2017, **33**:5065–5076.
186. Mayoral Á, Gascón V, Blanco RM, Márquez-Álvarez C, Díaz I: **Location of laccase in ordered mesoporous materials**. *APL Materials* 2014, **2**:113304.
187. Benítez-Mateos AI, Contente ML, Roura Padrosa D, Paradisi F: **Flow biocatalysis 101: design, development and applications**. *React Chem Eng* 2021, **6**:599–611.
188. Bolivar JM, Eisl I, Nidetzky B: **Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts**. *Catalysis Today* 2016, **259**:66–80.
189. Solé J, Brummund J, Caminal G, Schürman M, Álvaro G, Guillén M: **Trimethyl-ε-caprolactone synthesis with a novel immobilized glucose dehydrogenase and**

- an immobilized thermostable cyclohexanone monooxygenase.** *Applied Catalysis A: General* 2019, **585**:117187.
190. Hernandez K, Fernandez-Lafuente R: **Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:107–122.
  191. Valikhani D, Bolivar JM, Dennig A, Nidetzky B: **A tailor-made, self-sufficient and recyclable monooxygenase catalyst based on coimmobilized cytochrome P450 BM3 and glucose dehydrogenase.** *Biotechnology and Bioengineering* 2018, **115**:2416–2425.
  192. Solé J, Caminal G, Schürmann M, Álvaro G, Guillén M: **Co-immobilization of P450 BM3 and glucose dehydrogenase on different supports for application as a self-sufficient oxidative biocatalyst: Co-immobilization of P450 BM3 and glucose dehydrogenase on different supports.** *J Chem Technol Biotechnol* 2019, **94**:244–255.
  193. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R: **Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts.** *Biotechnology Advances* 2015, **33**:435–456.
  194. García-García P, Guisan JM, Fernandez-Lorente G: **A mild intensity of the enzyme-support multi-point attachment promotes the optimal stabilization of mesophilic multimeric enzymes: Amine oxidase from *Pisum sativum*.** *Journal of Biotechnology* 2020, **318**:39–44.
  195. Basso A, Serban S: **Industrial applications of immobilized enzymes—A review.** *Molecular Catalysis* 2019, **479**:110607.
  196. Bolivar JM, Schelch S, Mayr T, Nidetzky B: **Dissecting Physical and Biochemical Factors of Catalytic Effectiveness in Immobilized D -Amino Acid Oxidase by Real-Time Sensing of O<sub>2</sub> Availability Inside Porous Carriers.** *ChemCatChem* 2014, **6**:981–986.
  197. Matthey AP, Sangster JJ, Ramsden JI, Baldwin C, Birmingham WR, Heath RS, Angelastro A, Turner NJ, Cosgrove SC, Flitsch SL: **Natural heterogeneous catalysis with immobilised oxidase biocatalysts.** *RSC Adv* 2020, **10**:19501–19505.
  198. García-Bofill M: **Biocatalytic synthesis of vanillin by an immobilised eugenol oxidase: High biocatalyst yield by enzyme recycling.** 2021,
  199. Bolivar JM, Nidetzky B: **The Microenvironment in Immobilized Enzymes: Methods of Characterization and Its Role in Determining Enzyme Performance.** *Molecules* 2019, **24**:3460.
  200. Lorente-Arevalo A, Orellana G, Ladero M, Bolivar JM: **Overcoming Biochemical Limitations of Galactose Oxidase through the Design of a Solid-Supported Self-Sufficient Biocatalyst.** *ChemBioChem* 2023, doi:10.1002/cbic.202300421.

201. Bolivar JM, Schelch S, Mayr T, Nidetzky B: **Mesoporous Silica Materials Labeled for Optical Oxygen Sensing and Their Application to Development of a Silica-Supported Oxidoreductase Biocatalyst.** *ACS Catal* 2015, **5**:5984–5993.
202. Bolivar JM, Consolati T, Mayr T, Nidetzky B: **Quantitating intraparticle O<sub>2</sub> gradients in solid supported enzyme immobilizates: Experimental determination of their role in limiting the catalytic effectiveness of immobilized glucose oxidase.** *Biotechnol Bioeng* 2013, **110**:2086–2095.
203. Benítez-Mateos AI, Huber C, Nidetzky B, Bolivar JM, López-Gallego F: **Design of the Enzyme–Carrier Interface to Overcome the O<sub>2</sub> and NADH Mass Transfer Limitations of an Immobilized Flavin Oxidase.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2020, **12**:56027–56038.
204. Diamanti E, Santiago-Arcos J, Grajales-Hernández D, Czarniewicz N, Comino N, Llarena I, Di Silvio D, Cortajarena AL, López-Gallego F: **Intraparticle Kinetics Unveil Crowding and Enzyme Distribution Effects on the Performance of Cofactor-Dependent Heterogeneous Biocatalysts.** *ACS Catal* 2021, **11**:15051–15067.
205. Lindeque RM, Woodley JM: **The Effect of Dissolved Oxygen on Kinetics during Continuous Biocatalytic Oxidations.** *Org Process Res Dev* 2020, **24**:2055–2063.
206. Meissner MP, Nordblad M, Woodley JM: **Online Measurement of Oxygen-Dependent Enzyme Reaction Kinetics.** *ChemBioChem* 2018, **19**:106–113.
207. Ringborg RH, Toftgaard Pedersen A, Woodley JM: **Automated Determination of Oxygen-Dependent Enzyme Kinetics in a Tube-in-Tube Flow Reactor.** *ChemCatChem* 2017, **9**:3285–3288.
208. Lorente-Arevalo A, Ladero M, Bolivar JM: **Framework of the kinetic analysis of O<sub>2</sub> -dependent oxidative biocatalysts for reaction intensification.** *React Chem Eng* 2021, **6**:2058–2074.
209. Bommarius AS: **Developments on oxidase stability.** *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2023, **41**:100787.
210. Colpa DI, Lončar N, Schmidt M, Fraaije MW: **Creating oxidase-peroxidase fusion enzymes as toolbox for cascade reactions.** *ChemBioChem* 2017, **18**:7.
211. de Santos PG, Glieder A, Hollmann F, Alcalde M: **Evolved Peroxygenase–Aryl Alcohol Oxidase Fusions for Self- Sufficient Oxyfunctionalization Reactions.** *ACS Catal* 2020,
212. García-García P, Rocha-Martin J, Fernandez-Lorente G, Guisan JM: **Co-localization of oxidase and catalase inside a porous support to improve the elimination of hydrogen peroxide: Oxidation of biogenic amines by amino oxidase from *Pisum sativum*.** *Enzyme and Microbial Technology* 2018, **115**:73–80.

213. García-García P, Rocha-Martin J, Guisan JM, Fernandez-Lorente G: **Co-Immobilization and Co-Localization of Oxidases and Catalases: Catalase from Bordetella Pertussis Fused with the Zbasic Domain.** *Catalysts* 2020, **10**:810.
214. Mendonça MH, Zancan GT: **Purification and characterization of intracellular galactose oxidase from Dactylium dendroides.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1987, **252**:507–514.
215. Greenfield PF, Kittrell JR, Laurence RL: **Inactivation of immobilized glucose oxidase by hydrogen peroxide.** *Analytical Biochemistry* 1975, **65**:109–124.
216. Guisan JM, López-Gallego F, Bolivar JM, Rocha-Martín J, Fernandez-Lorente G: **The Science of Enzyme Immobilization.** In *Immobilization of Enzymes and Cells*. Edited by Guisan JM, Bolivar JM, López-Gallego F, Rocha-Martín J. Springer US; 2020:1–26.
217. Delgove MAF, Valencia D, Solé J, Bernaerts KV, De Wildeman SMA, Guillén M, Álvaro G: **High performing immobilized Baeyer-Villiger monooxygenase and glucose dehydrogenase for the synthesis of  $\epsilon$ -caprolactone derivative.** *Applied Catalysis A: General* 2019, **572**:134–141.
218. Buergler M, Dennig A, Nidetzky B: **Process intensification for cytochrome P450 BM3-catalyzed oxy-functionalization of dodecanoic acid.** *Biotechnology and Bioengineering* 2020, **117**:12.
219. Weltz JS, Kienle DF, Schwartz DK, Kaar JL: **Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off.** *J Am Chem Soc* 2020, **142**:3463–3471.
220. Hoschek A, Bühler B, Schmid A: **Overcoming the Gas–Liquid Mass Transfer of Oxygen by Coupling Photosynthetic Water Oxidation with Biocatalytic Oxyfunctionalization.** *Angew Chem Int Ed* 2017, **56**:15146–15149.
221. Garcia-Ochoa F, Gomez E: **Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview.** *Biotechnology Advances* 2009, **27**:153–176.
222. Xing W, Yin M, Lv Q, Hu Y, Liu C, Zhang J: **Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity.** In *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts*. Elsevier; 2014:1–31.
223. Sato T, Hamada Y, Sumikawa M, Araki S, Yamamoto H: **Solubility of Oxygen in Organic Solvents and Calculation of the Hansen Solubility Parameters of Oxygen.** *Ind Eng Chem Res* 2014, **53**:19331–19337.
224. Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC: **Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview.** *Biochemical Engineering Journal* 2010, **49**:289–307.
225. Roldan-Cruz C, Garcia-Hernandez A, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ: **Effect of the stirring speed in the in vitro activity of  $\alpha$ -amylase.** *Food Hydrocolloids* 2021, **110**:106127.

226. Bhagia S, Dhir R, Kumar R, Wyman CE: **Deactivation of Cellulase at the Air-Liquid Interface Is the Main Cause of Incomplete Cellulose Conversion at Low Enzyme Loadings.** *Sci Rep* 2018, **8**:1350.
227. Pennati A, Gadda G: **Involvement of Ionizable Groups in Catalysis of Human Liver Glycolate Oxidase.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:31214–31222.
228. Nordkvist M, Nielsen PM, Villadsen J: **Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: Kinetics and operational stability.** *Biotech & Bioengineering* 2007, **97**:694–707.
229. Capyk JK, Kalscheuer R, Stewart GR, Liu J, Kwon H, Zhao R, Okamoto S, Jacobs WR, Eltis LD, Mohn WW: **Mycobacterial Cytochrome P450 125 (Cyp125) Catalyzes the Terminal Hydroxylation of C27 Steroids.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:35534–35542.
230. Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, Milo R: **The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters.** *Biochemistry* 2011, **50**:4402–4410.
231. Holtmann D, Hollmann F: **The Oxygen Dilemma: A Severe Challenge for the Application of Monooxygenases?** *ChemBioChem* 2016, **17**:1391–1398.
232. Chen K, Arnold FH: **Engineering new catalytic activities in enzymes.** *Nat Catal* 2020, **3**:203–213.
233. Paul CE, Eggerichs D, Westphal AH, Tischler D, Van Berkel WJH: **Flavoprotein monooxygenases: Versatile biocatalysts.** *Biotechnology Advances* 2021, **51**:107712.
234. Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J: **Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents.** *ACS Catal* 2013, **3**:2823–2836.
235. Birmingham WR, Toftgaard Pedersen A, Dias Gomes M, Bøje Madsen M, Breuer M, Woodley JM, Turner NJ: **Toward scalable biocatalytic conversion of 5-hydroxymethylfurfural by galactose oxidase using coordinated reaction and enzyme engineering.** *Nat Commun* 2021, **12**:4946.
236. Escalettes F, Turner NJ: **Directed Evolution of Galactose Oxidase: Generation of Enantioselective Secondary Alcohol Oxidases.** *ChemBioChem* 2008, **9**:857–860.
237. Seo E-J, Kim M-J, Park S-Y, Park S, Oh D-K, Bornscheuer UT, Park J-B: **Enzyme Access Tunnel Engineering in Baeyer-Villiger Monooxygenases to Improve Oxidative Stability and Biocatalyst Performance.** *Advanced Synthesis and Catalysis* 2021, **364**:555–564.
238. Ramesh H, Mayr T, Hobisch M, Borisov S, Klimant I, Krühne U, Woodley JM: **Measurement of oxygen transfer from air into organic solvents.** *J Chem Technol Biotechnol* 2016, **91**:832–836.

239. Sheldon RA, Bode ML, Mathebula N: **Green and sustainable solvents for biocatalytic oxidations.** *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2023, **39**:100741.
240. Zhang J, Yang X, Dong R, Gao L, Li J, Li X, Huang S, Zhang C, Chang H: **Cascade Biocatalysis for Regio- and Stereoselective Aminohydroxylation of Styrenyl Olefins to Enantiopure Arylglycinols.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2020, **8**:18277–18285.
241. de Gonzalo G, Martin C, Fraaije MW: **Positive Impact of Natural Deep Eutectic Solvents on the Biocatalytic Performance of 5-Hydroxymethyl-Furfural Oxidase.** *Catalysts* 2020, **10**:447.
242. Zhang N, Steininger F, Meyer L-E, Koren K, Kara S: **Can Deep Eutectic Solvents Sustain Oxygen-Dependent Bioprocesses?—Measurements of Oxygen Transfer Rates.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2021, **9**:8347–8353.
243. Toftgaard Pedersen A, de Carvalho TM, Sutherland E, Rehn G, Ashe R, Woodley JM: **Characterization of a continuous agitated cell reactor for oxygen dependent biocatalysis: Biocatalytic Oxidation in a Continuous Agitated Cell Reactor.** *Biotechnol Bioeng* 2017, **114**:1222–1230.
244. Kaluzna I, Schmitges T, Straatman H, van Tegelen D, Müller M, Schürmann M, Mink D: **Enabling Selective and Sustainable P450 Oxygenation Technology. Production of 4-Hydroxy- $\alpha$ -isophorone on Kilogram Scale.** *Org Process Res Dev* 2016, **20**:814–819.
245. Tomaszewski B, Lloyd RC, Warr AJ, Buehler K, Schmid A: **Regioselective Biocatalytic Aromatic Hydroxylation in a GasLiquid Multiphase TubeinTube Reactor.** 2014,
246. Pedersen AT, Rehn G, Woodley JM: **Oxygen transfer rates and requirements in oxidative biocatalysis.** In *Computer Aided Chemical Engineering.* . Elsevier; 2015:2111–2116.
247. Han S, Kashfipour MA, Ramezani M, Abolhasani M: **Accelerating gas–liquid chemical reactions in flow.** *Chem Commun* 2020, **56**:10593–10606.
248. Gemoets HPL, Su Y, Shang M, Hessel V, Luque R, Noël T: **Liquid phase oxidation chemistry in continuous-flow microreactors.** *Chem Soc Rev* 2016, **45**:83–117.
249. Frey LJ: **3D-printed micro bubble column reactor with integrated microsensors for biotechnological applications: From design to evaluation.** *Scientific Reports* 2021,
250. Stone KA, Hilliard MV, He QP, Wang J: **A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion.** *Biochemical Engineering Journal* 2017, **128**:83–92.
251. Utikar RP, Ranade VV: **Intensifying Multiphase Reactions and Reactors: Strategies and Examples.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2017, **5**:3607–3622.

252. Yue J: **Multiphase flow processing in microreactors combined with heterogeneous catalysis for efficient and sustainable chemical synthesis.** *Catalysis Today* 2018, **308**:3–19.
253. Tomaszewski B, Schmid A, Buehler K: **Biocatalytic Production of Catechols Using a High Pressure Tube-in-Tube Segmented Flow Microreactor.** *Org Process Res Dev* 2014, **18**:1516–1526.
254. Bolivar JM, Krämer CEM, Ungerböck B, Mayr T, Nidetzky B: **Development of a fully integrated falling film microreactor for gas-liquid-solid biotransformation with surface immobilized O<sub>2</sub>-dependent enzyme: Biocatalytic Falling Film Microreactor.** *Biotechnol Bioeng* 2016, **113**:1862–1872.
255. Wohlgemuth R, Plazl I, Žnidaršič-Plazl P, Gernaey KV, Woodley JM: **Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis.** *Trends in Biotechnology* 2015, **33**:302–314.
256. Karande R, Schmid A, Buehler K: **Applications of Multiphasic Microreactors for Biocatalytic Reactions.** *Org Process Res Dev* 2016, **20**:361–370.
257. Hone CA, Roberge DM, Kappe CO: **The Use of Molecular Oxygen in Pharmaceutical Manufacturing: Is Flow the Way to Go?** *ChemSusChem* 2017, **10**:32–41.
258. Van Schie MMCH, Pedroso De Almeida T, Laudadio G, Tieves F, Fernández-Fueyo E, Noël T, Arends IWCE, Hollmann F: **Biocatalytic synthesis of the Green Note *trans*-2-hexenal in a continuous-flow microreactor.** *Beilstein J Org Chem* 2018, **14**:697–703.
259. Illner S, Hofmann C, Löb P, Kragl U: **A Falling-Film Microreactor for Enzymatic Oxidation of Glucose.** *ChemCatChem* 2014, **6**:1748–1754.
260. Jones E, McClean K, Housden S, Gasparini G, Archer I: **Biocatalytic oxidase: Batch to continuous.** *Chemical Engineering Research and Design* 2012, **90**:726–731.
261. Wang X-T, Wen Z-N, Luo Y, Sun B-C, Shao Y-Y, Chu G-W: **Oxygen mass transfer intensification in an inner-loop rotor-stator reactor: Production of sodium gluconate as an example.** *Chem Eng Proc - Process Intensification* 2021, **160**:108290.
262. Wong CH, Whitesides GM: *Enzymes in synthetic organic chemistry.* Oxford: Pergamon Press; 1994.
263. Koeller KM, Wong C-H: **Enzymes for chemical synthesis.** *Nature* 2001, **409**:232–240.
264. Chibata I, Tosa T, Sato T: **Biocatalysis: Immobilized cells and enzymes.** *Journal of Molecular Catalysis* 1986,

265. Hartmeier W: **Immobilized biocatalysts—from simple to complex systems.** *Trends in Biotechnology* 1985, **3**:149–153.
266. Katchalski-Katzir E: **Immobilized enzymes — learning from past successes and failures.** *Trends in Biotechnology* 1993, **11**:471–478.
267. Cao L, Langen LV, Sheldon RA: **Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?** *Current Opinion in Biotechnology* 2003, **14**:387–394.
268. Sheldon RA: **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance.** *Adv Synth Catal* 2007, **349**:1289–1307.
269. Fernandez-Lafuente R: **Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation.** *Enzyme and Microbial Technology* 2009, **45**:405–418.
270. Torres-Salas P, Del Monte-Martinez A, Cutiño-Avila B, Rodriguez-Colinas B, Alcalde M, Ballesteros AO, Plou FJ: **Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports.** *Advanced Materials* 2011, **23**:5275–5282.
271. Srere PA, Uyeda K: **Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices.** *Functional groups for binding* 1976,
272. Pedroche J, Del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisán JM, Millán F: **Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:1160–1166.
273. Klibanov AM: **Enzyme Stabilization by Immobilization.** *Analytical Biochemistry* 1979,
274. Klibanov AM: **Approaches to enzyme stabilization.** *Biochemical Society Transactions* 1983, **11**:19–20.
275. Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, Pessela BCC, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, et al.: **Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:274–280.
276. Bolivar JM, Rocha-Martin J, Mateo C, Cava F, Berenguer J, Vega D, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM: **Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2009, **58**:158–163.
277. Bolivar JM, López-Gallego F, Godoy C, Rodrigues DS, Rodrigues RC, Batalla P, Rocha-Martín J, Mateo C, Giordano RLC, Guisán JM: **The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment.** *Enzyme and Microbial Technology* 2009, **45**:477–483.

278. Guisán JoséM: **Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes.** *Enzyme and Microbial Technology* 1988, **10**:375–382.
279. Guisan JM, Bolivar JM, López-Gallego F, Rocha-Martín J (Eds): **Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Stabilization of Industrial Enzymes.** In *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols.* . Springer US; 2020:93–107.
280. Lopez-Jaramillo FJ, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F: **Vinyl Sulfone Functionalization: A Feasible Approach for the Study of the Lectin–Carbohydrate Interactions.** *Bioconjugate Chem* 2012, **23**:846–855.
281. Prikryl P, Lenfeld J, Horak D, Ticha M, Kucerova Z: **Magnetic Bead Cellulose as a Suitable Support for Immobilization of  $\alpha$ -Chymotrypsin.** *Appl Biochem Biotechnol* 2012, **168**:295–305.
282. Begara-Morales JC, López-Jaramillo FJ, Sánchez-Calvo B, Carreras A, Ortega-Muñoz M, Santoyo-González F, Corpas FJ, Barroso JB: **Vinyl sulfone silica: application of an open preactivated support to the study of transnitrosylation of plant proteins by S-nitrosoglutathione.** *BMC Plant Biol* 2013, **13**:61.
283. Medina-Castillo AL, Morales-Sanfrutos J, Megia-Fernandez A, Fernandez-Sanchez JF, Santoyo-Gonzalez F, Fernandez-Gutierrez A: **Novel Synthetic Route for Covalent Coupling of Biomolecules on Super-Paramagnetic Hybrid Nanoparticles.** *Journal of Polimer Science* 2012, doi:10.1002/pola.26203.
284. Labus K, Turek A, Liesiene J, Bryjak J: **Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers.** *Biochemical Engineering Journal* 2011, **56**:232–240.
285. Morales-Sanfrutos J, Lopez-Jaramillo J, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Perez-Balderas F, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F: **Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization.** *Org Biomol Chem* 2010, **8**:667–675.
286. dos Santos JCS, Rueda N, Barbosa O, Fernández-Sánchez JF, Medina-Castillo AL, Ramón-Márquez T, Arias-Martos MC, Millán-Linares MC, Pedroche J, Yust M del M, et al.: **Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin.** *RSC Adv* 2015, **5**:20639–20649.
287. dos Santos JCS, Rueda N, Barbosa O, Millán-Linares M del C, Pedroche J, del Mar Yuste M, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R: **Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2015, **117**:38–44.
288. Boller T, Meier C, Menzler S: **EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis.** *Org Process Res Dev* 2002, **6**:509–519.

289. Hilterhaus L, Minow B, Müller J, Berheide M, Quitmann H, Katzer M, Thum O, Antranikian G, Zeng AP, Liese A: **Practical application of different enzymes immobilized on sepabeads.** *Bioprocess Biosyst Eng* 2008, **31**:163–171.
290. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R: **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization.** *RSC Adv* 2014, **4**:1583–1600.
291. Turková J, Bláha K, Malaníková M, Vančurová D, Švec F, Kálal J: **Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 1978, **524**:162–169.
292. Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Grazu V, Pessela BCC, Giacomini C, et al.: **Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins.** *Enzyme and Microbial Technology* 2005, **37**:456–462.
293. Blanco RM, Guisán JoséM: **Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives.** *Enzyme and Microbial Technology* 1989, **11**:360–366.
294. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R: **Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties.** *Biomacromolecules* 2013, **14**:2433–2462.
295. Chen W-D, Tong X-D, Dong X-Y, Sun Y: **Expanded Bed Adsorption of Protein with DEAE Spherodex M.** *Biotechnol Prog* 2003, **19**:880–886.
296. Lyddiatt A: **Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts.** *Current Opinion in Biotechnology* 2002, **13**:95–103.
297. Rao CS: **Purification of large proteins using ion-exchange membranes.** *Process Biochemistry* 2001, **37**:247–256.
298. Kennedy JF, Melo EHM, Jumel K: **Immobilized enzymes and cells.** *Chemical engineering progress* 1990, **86**:81–89.
299. Field G, Royer P: **Immobilized Enzymes Catalysis Reviews. 1978.** *Catalysis Reviews* 1980, **22**:29–73.
300. Rosevear A: **Immobilised biocatalysts—a critical review.** *J Chem Technol Biotechnol* 1984, **34**:127–150.
301. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM: **Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites.** *Biotechnology and Bioengineering* 2000, **68**:8.

302. Fuentes M, Pessela BCC, Maquiese JV, Ortiz C, Segura RL, Palomo JM, Abian O, Torres R, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, et al.: **Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran.** *Biotechnol Prog* 2004, **20**:1134–1139.
303. Baumeister A, Vogelmann S, Fischer L: **Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system.** *Journal of Chromatography A* 2003, **1006**:261–265.
304. Iberer G, Schwinn H, Josić D, Jungbauer A, Buchacher A: **Improved performance of protein separation by continuous annular chromatography in the size-exclusion mode.** *Journal of Chromatography A* 2001, **921**:15–24.
305. Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B: **Polymer displacement / shielding in protein chromatography.** *Journal of Chromatography B* 2000,
306. Torres R, Pessela BCC, Fuentes M, Mateo C, Munilla R, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM: **Supports coated with PEI as a new tool in chromatography.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:711–716.
307. Brissault B, Kichler A, Guis C, Leborgne C, Danos O, Cheradame H: **Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection.** *Bioconjugate Chem* 2003, **14**:581–587.
308. Samal SK, Dash M, Van Vlierberghe S, Kaplan DL, Chiellini E, Van Blitterswijk C, Moroni L, Dubruel P: **Cationic polymers and their therapeutic potential.** *Chem Soc Rev* 2012, **41**:7147.
309. Yang Q, Sherbahn M, Runge T: **Basic Amino Acids as Green Catalysts for Isomerization of Glucose to Fructose in Water.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2016, **4**:3526–3534.
310. Zhang W, Liu H, Sun C, Drage TC, Snape CE: **Capturing CO<sub>2</sub> from ambient air using a polyethylenimine–silica adsorbent in fluidized beds.** *Chemical Engineering Science* 2014, **116**:306–316.
311. Yurlova LYu, Kryvoruchko AP, Yatsik BP: **Impact of polyethylenimine on ultrafiltration extraction of Cr(VI) from contaminated waters.** *J Water Chem Technol* 2014, **36**:115–119.
312. Dillon EP, Crouse CA, Barron AR: **Synthesis, Characterization, and Carbon Dioxide Adsorption of Covalently Attached Polyethylenimine-Functionalized Single-Wall Carbon Nanotubes.** *ACS Nano* 2008, **2**:156–164.
313. Gray ML, Hoffman JS, Hreha DC, Fauth DJ, Hedges SW, Champagne KJ, Pennline HW: **Parametric Study of Solid Amine Sorbents for the Capture of Carbon Dioxide** †. *Energy Fuels* 2009, **23**:4840–4844.
314. Boussif O, Lezoualc’h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:7297–7301.

315. Sajeesh S, Lee TY, Kim JK, Son DS, Hong SW, Kim S, Yun WS, Kim S, Chang C, Li C, et al.: **Efficient intracellular delivery and multiple-target gene silencing triggered by tripodal RNA based nanoparticles: A promising approach in liver-specific RNAi delivery.** *Journal of Controlled Release* 2014, **196**:28–36.
316. Virgen-Ortiz JJ, dos Santos JCS, Berenguer-Murcia Á, Barbosa O, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R: **Polyethyleneimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts.** *J Mater Chem B* 2017, **4**:1–95.
317. Bahulekar R, Ayyangar NR, Ponrathnam S: **Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts.** *Enzyme and Microbial Technology* 1991, **13**:858–868.
318. Pessela BCC, Munilla R, Betancor L, Fuentes M, Carrascosa AV, Vian A, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM: **Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1034**:155–159.
319. Fernandes BCM, Mateo C, Kiziak C, Chmura A, Wacker J, Van Rantwijk F, Stolz A, Sheldon RA: **Nitrile Hydratase Activity of a Recombinant Nitrilase.** *Adv Synth Catal* 2006, **348**:2597–2603.
320. Wilson L, Illanes A, Pessela BCC, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM: **Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media: Evaluation of a Novel Biocatalyst in Organic Media.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **86**:558–562.
321. Moss GP, Smith PAS, Tavernier D: **Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure.** *Pure and Applied Chemistry* 1995, **67**:1307–1375.
322. Sidebotham R: **Dextrans.** *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1974, **30**:371–444.
323. Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ: **Leuconostoc dextranucrase and dextran: production, properties and applications.** *J of Chemical Tech & Biotech* 2005, **80**:845–860.
324. Bounaix M-S, Gabriel V, Robert H, Morel S, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C: **Characterization of glucan-producing Leuconostoc strains isolated from sourdough.** *International Journal of Food Microbiology* 2010, **144**:1–9.
325. Fusco V, Quero GM, Cho G-S, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz CMAP: **The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential.** *Front Microbiol* 2015, **6**.
326. Bounaix M-S, Robert H, Gabriel V, Morel S, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C: **Characterization of dextran-producing Weissella strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextranucrase**

- expression: Characterization of dextran-producing Weissella strains.** *FEMS Microbiology Letters* 2010, **311**:18–26.
327. Van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, Van Geel-Schutten IGH: **Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:157–176.
328. Ahmed Z, Ahmad A: **Chapter 8 - Biopolymer Produced by the Lactic Acid Bacteria: Production and Practical Application.** In *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*. . Academic Press; 2017:217–257.
329. Stepanov NA, Senko OV, Efremenko EN: **Biocatalytic production of extracellular exopolysaccharide dextran synthesized by cells of Leuconostoc mesenteroides.** *Catal Ind* 2017, **9**:339–343.
330. Siddiqui NN, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A: **Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of Leuconostoc mesenteroides.** *Carbohydrate Polymers* 2014, **99**:331–338.
331. McCahon R, Hardman J: **Pharmacology of plasma expanders.** *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 2017, **18**:418–420.
332. Leung AD, Wong KHK, Tien J: **Plasma expanders stabilize human microvessels in microfluidic scaffolds.** *J Biomedical Materials Res* 2012, **100A**:1815–1822.
333. Khalikova E, Susi P, Korpela T: **Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, **69**:306–325.
334. Fuentes M, Maquiese JV, Pessela BCC, Torres R, Grazú V, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Mateo C: **Use of polyvalent cations to improve the adsorption strength between adsorbed enzymes and supports coated with dextran sulfate.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:332–336.
335. Sheldon RA, van Pelt S: **Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.** *Chem Soc Rev* 2013, **42**:6223–6235.
336. Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R: **Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes.** *Adv Synth Catal* 2011, **353**:2216–2238.
337. Cao L (Ed): *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. Wiley; 2005.
338. Wong LS, Khan F, Micklefield J: **Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications.** *Chem Rev* 2009, **109**:4025–4053.
339. Santos JCSD, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R: **Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes.** *ChemCatChem* 2015, **7**:2413–2432.
340. Zucca P, Sanjust E: **Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms.** *Molecules* 2014, **19**:14139–14194.

341. Hartmann M, Kostrov X: **Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges**. *Chem Soc Rev* 2013, **42**:6277.
342. Benítez-Mateos AI, Contente ML: **Agarose vs. Methacrylate as Material Supports for Enzyme Immobilization and Continuous Processing**. *Catalysts* 2021, **11**:814.
343. Epton R, Hibbert BL, Thomas TH: **[7] Enzymes covalently bound to polyacrylic and polymethacrylic copolymers**. In *Methods in Enzymology*. . Elsevier; 1976:84–107.
344. Mosbach R, Koch-Schmidt AC, Mosbach K: **Immobilization of enzymes to various acrylic copolymers**. *Methods in enzymology* 1976, **44**:53–65.
345. Nan C, Zhang Y, Zhang G, Dong C, Shuang S, Choi MMF: **Activation of nylon net and its application to a biosensor for determination of glucose in human serum**. *Enzyme and Microbial Technology* 2009, **44**:249–253.
346. Aranaz I, Mengíbar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras Á: **Functional Characterization of Chitin and Chitosan**. *Current Chemical Biology* 2009,
347. Krajewska B: **Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review**. *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **35**:126–139.
348. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS: **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials**. *3 Biotech* 2013, **3**:1–9.
349. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA: **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes**. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2015, **29**:205–220.
350. Porath J, Axén R: **Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports**. *Methods in enzymology* 1976,
351. Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H: **Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I $\beta$  from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction**. *J Am Chem Soc* 2002, **124**:9074–9082.
352. Liebert TF, Heinze TJ, Edgar KJ (Eds): *Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification*. American Chemical Society; 2010.
353. Aschenbrenner E, Bley K, Koynov K, Makowski M, Kappl M, Landfester K, Weiss CK: **Using the Polymeric Ouzo Effect for the Preparation of Polysaccharide-Based Nanoparticles**. *Langmuir* 2013, **29**:8845–8855.
354. Zucca P, Fernandez-Lafuente R, Sanjust E: **Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization**. *Molecules* 2016, **21**:1577.
355. Araki C: **Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar**. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1956, **29**:543–544.

356. Ball SG, Morell MK: **From Bacterial Glycogen to Starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule.** *Annu Rev Plant Biol* 2003, **54**:207–233.
357. Venturi F, Andrich G, Quartacci MF, Sanmartin C, Andrich L, Zinnai A: **A Kinetic Method to Identify the Optimum Temperature for  $\beta$ -glucanase Activity.** *SAJEV* 2013, **34**.
358. Hashem AM, Gamal AA, Hassan ME, Hassanein NM, Esawy MA: **Covalent immobilization of Enterococcus faecalis Esawy dextransucrase and dextran synthesis.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2016, **82**:905–912.
359. Fu XT, Kim SM: **Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications.** *Marine Drugs* 2010, **8**:200–218.
360. Chi W-J, Chang Y-K, Hong S-K: **Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, **94**:917–930.
361. Imeson A: **Agar.** In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Edited by Imeson A. Wiley; 2009:31–49.
362. Delattre C, Fenoradosoa TA, Michaud P: **Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides.** *Braz arch biol technol* 2011, **54**:1075–1092.
363. Armisen R, Galatas F: **Production, properties and uses of agar. Production and utilization of products from commercial seaweeds.** *FAO Fisheries & Aquaculture - Technical Papers* 1987,
364. Williams PA, Philips GO: *Introduction to food hydrocolloids*. Woodhead Publishing: Cambridge; 2009.
365. Lahaye M, Rochas C: **Chemical structure and physico-chemical properties of agar.** *Hydrobiologia* 1991,
366. Polson A: **Fractionation of protein mixtures on columns of granulated agar.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1961, **50**:565–567.
367. Hayashi A, Kanzaki T: **Swelling of agarose gel and its related changes.** *Food Hydrocolloids* 1987, **1**:317–325.
368. Hjertén S: **The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles.** *Biochim Biophys Acta* 1964,
369. Egorov AM, Vakhobov AK, Chernyak VY: **Isolation of agarose and granulation of agar and agarose gel.** *Journal of Chromatography* 1964,
370. Zhou Q-Z, Wang L-Y, Ma G-H, Su Z-G: **Preparation of uniform-sized agarose beads by microporous membrane emulsification technique.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2007, **311**:118–127.

371. Li X-Q, Li Q, Gong F-L, Lei J-D, Zhao X, Ma G-H, Su Z-G: **Preparation of large-sized highly uniform agarose beads by novel rotating membrane emulsification.** *Journal of Membrane Science* 2015, **476**:30–39.
372. Harms P, Kostov Y, Rao G: **Bioprocess monitoring.** *Current Opinion in Biotechnology* 2002, **13**:124–127.
373. Scheper T, Hitzmann B, Stärk E, Ulber R, Faurie R, Sosnitza P, Reardon KF: **Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses.** *Analytica Chimica Acta* 1999, **400**:121–134.
374. Schügerl K: **Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years.** *Journal of Biotechnology* 2001, **85**:149–173.
375. Beutel S, Henkel S: **In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **91**:1493–1505.
376. Vojinović V, Cabral JMS, Fonseca LP: **Real-time bioprocess monitoring.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 2006, **114**:1083–1091.
377. Bluma A, Höpfner T, Prediger A, Glindkamp A, Beutel S, Scheper T: **Process analytical sensors and image-based techniques for single-use bioreactors.** *Engineering in Life Sciences* 2011, **11**:550–553.
378. Borisov SM, Mayr T, Mistlberger G, Waich K, Koren K, Chojnacki P, Klimant I: **Precipitation as a simple and versatile method for preparation of optical nanochemosensors.** *Talanta* 2009, **79**:1322–1330.
379. Borisov SM, Klimant I: **Optical nanosensors—smart tools in bioanalytics.** *Analyst* 2008, **133**:1302.
380. Orellana G, Moreno-Bondi MC, Garcia-Fresnadillo D, Marazuela MD: **The Interplay of Indicator, Support and Analyte in Optical Sensor Layers.** In *Frontiers in Chemical Sensors*. . Springer; 2005:189–225.
381. Bolivar JM, Consolati T, Mayr T, Nidetzky B: **Shine a light on immobilized enzymes: real-time sensing in solid supported biocatalysts.** *Trends in Biotechnology* 2013, **31**:194–203.
382. Quaranta M, Borisov SM, Klimant I: **Indicators for optical oxygen sensors.** *Bioanal Rev* 2012, **4**:115–157.
383. Orellana G, Garcia-Fresnadillo D: **Environmental and Industrial Optosensing with Tailored Luminescent Ru(II) Polypyridyl Complexes.** In *Optical Sensors*. . Springer; 2004:309–357.
384. Orellana G: **Luminescent optical sensors.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **379**:344–346.
385. Urriza-Arsuaga I, Bedoya M, Orellana G: **Luminescent sensor for O<sub>2</sub> detection in biomethane streams.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 2019, **279**:458–465.

386. Valeur B: **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. *Molecular Fluorescence* 2001,
387. Lakowicz JR: **Time-Domain Lifetime Measurements**. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer; 2006:97–155.
388. Stich MIJ, Fischer LH, Wolfbeis OS: **Multiple fluorescent chemical sensing and imaging**. *Chem Soc Rev* 2010, **39**:3102.
389. Spiess AC, Kasche V: **Direct Measurement of pH Profiles in Immobilized Enzyme Carriers during Kinetically Controlled Synthesis Using CLSM**. *Biotechnology Progress* 2001, **17**:294–303.
390. Heinemann M, Limper U, Büchs J: **New insights in the spatially resolved dynamic pH measurement in macroscopic large absorbent particles by confocal laser scanning microscopy**. *Journal of Chromatography A* 2004, **1024**:45–53.
391. Kuwana E, Liang F, Sevick-Muraca EM: **Fluorescence Lifetime Spectroscopy of a pH-Sensitive Dye Encapsulated in Hydrogel Beads**. *Biotechnology Progress* 2004, **20**:1561–1566.
392. Huang HY, Shaw J, Yip C, Wu XY: **Microdomain pH Gradient and Kinetics Inside Composite Polymeric Membranes of pH and Glucose Sensitivity**. *Pharm Res* 2008, **25**:1150–1157.
393. Yamaguchi A, Namekawa M, Kamijo T, Itoh T, Teramae N: **Acid–Base Equilibria inside Amine-Functionalized Mesoporous Silica**. *Anal Chem* 2011, **83**:2939–2946.
394. Boniello C, Mayr T, Bolivar JM, Nidetzky B: **Dual-lifetime referencing (DLR): a powerful method for on-line measurement of internal pH in carrier-bound immobilized biocatalysts**. *BMC Biotechnol* 2012, **12**:11.
395. Boniello C, Mayr T, Klimant I, Koenig B, Riethorst W, Nidetzky B: **Intraparticle concentration gradients for substrate and acidic product in immobilized cephalosporin C amidase and their dependencies on carrier characteristics and reaction parameters**. *Biotech & Bioengineering* 2010, **106**:528–540.
396. Bolivar JM, Nidetzky B: **Oriented and selective enzyme immobilization on functionalized silica carrier using the cationic binding module Zbasic2: Design of a heterogeneous D-amino acid oxidase catalyst on porous glass**. *Biotechnol Bioeng* 2012, **109**:1490–1498.
397. Bolivar JM, Nidetzky B: **Positively Charged Mini-Protein Z<sub>basic2</sub> As a Highly Efficient Silica Binding Module: Opportunities for Enzyme Immobilization on Unmodified Silica Supports**. *Langmuir* 2012, **28**:10040–10049.
398. Tormo L, Bustamante N, Colmenarejo G, Orellana G: **Can Luminescent Ru(II) Polypyridyl Dyes Measure pH Directly?** *Anal Chem* 2010, **82**:5195–5204.

399. Rocha-Martin J, Rivas B de las, Muñoz R, Guisan JM, F. López-Gallego: **Rational Co-Immobilization of Bi-Enzyme Cascades on Porous Supports and their Applications in Bio-Redox Reactions with In Situ Recycling of Soluble Cofactors.** *ChemCatChem* 2012, **4**:1279–1288.
400. Ferrari M, Barreto R, Jackson E, Guisan JM, Lopez-Gallego F, Betancor L: **Optimizing the biological activity of Fab fragments by controlling their molecular orientation and spatial distribution across porous hydrogels.** *Process Biochemistry* 2015, **50**:1565–1571.
401. Batalla P, Bolívar JM, Lopez-Gallego F, Guisan JM: **Oriented covalent immobilization of antibodies onto heterofunctional agarose supports: A highly efficient immuno-affinity chromatography platform.** *Journal of Chromatography A* 2012, **1262**:56–63.
402. Sartorius: **Biostat® B.** *Biostat® B* 2023,
403. Pyroscience: **OXROB10.** *Pyroscience sensor technology* 2024,
404. Mateo C, Grazú V, Pessela BCC, Montes T, Palomo JM, Torres R, López-Gallego F, Fernández-Lafuente R, Guisán JM: **Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization.** *Biochemical Society Transactions* 2007, **35**:1593–1601.
405. Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisán JM: **Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method.** *Enzyme and Microbial Technology* 1993, **15**:546–550.
406. Levenspiel O: *Chemical reaction engineering.* Wiley; 1999.
407. Doran PM: **Heterogeneous Reactions.** In *Bioprocess Engineering Principles.* . Elsevier; 2013:705–759.
408. Illanes A, Altamirano C, Wilson L: **Homogeneous Enzyme Kinetics.** In *Enzyme Biocatalysis-Principles and Applications.* . Springer; 2008:107–153.
409. Lakowicz JR, Masters BR: **Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition.** *J Biomed Opt* 2008, **13**:029901.
410. Jain A, Blum C, Subramaniam V: **Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins.** In *Advances in Biomedical Engineering.* . Elsevier; 2009:147–176.
411. Bradford MM: **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–254.
412. Birch DJS, Imhof RE: **Time-Domain Fluorescence Spectroscopy Using Time-Correlated Single-Photon Counting.** In *Topics in Fluorescence Spectroscopy.* Edited by Lakowicz JR. Kluwer Academic Publishers; 2002:1–95.

413. Marcoline FV, Furth J, Nayak S, Grabe M, Macey RI: **Berkeley Madonna Version 10—A simulation package for solving mathematical models.** *CPT Pharmacom & Syst Pharma* 2022, **11**:290–301.
414. Dunn IJ, Heinzle E, Ingham J, Přenosil JE: *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples.* Wiley; 2003.
415. Malik SN, Bahri PA, Vu LTT: **Steady state optimization of design and operation of desalination systems using Aspen Custom Modeler.** *Computers & Chemical Engineering* 2016, **91**:247–256.
416. Shen M-T, Chen Y-H, Chang H: **Simulation of the Dynamics and Control Responses of the Carbon Dioxide Chemical Absorption Process using Aspen Custom Modeler.** *Energy Procedia* 2019, **158**:4915–4920.
417. Lehner FK: **On the validity of Fick's law for transient diffusion through a porous medium.** *Chemical Engineering Science* 1979, **34**:821–825.
418. Wu R, Zhu X, Liao Q, Wang H, Ding Y, Li J, Ye D: **Determination of oxygen effective diffusivity in porous gas diffusion layer using a three-dimensional pore network model.** *Electrochimica Acta* 2010, **55**:7394–7403.
419. Shirai Y, Hashimoto K, Yamaji H, Kawahara H: **Oxygen uptake rate of immobilized growing hybridoma cells.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1988, **29**:113–118.
420. Gigi O, Marbach I, Mayer AM: **Properties of gallic acid-induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea*.** *Phytochemistry* 1981, **20**:1211–1213.
421. Muñoz-Muñoz JL, Garcia-Molina F, Garcia-Molina M, Tudela J, García-Cánovas F, Rodríguez-Lopez JN: **Ellagic acid: Characterization as substrate of polyphenol oxidase.** *IUBMB Life* 2009, **61**:171–177.
422. Goldhahn C, Taut JA, Schubert M, Burgert I, Chanana M: **Enzyme immobilization inside the porous wood structure: a natural scaffold for continuous-flow biocatalysis.** *RSC Adv* 2020, **10**:20608–20619.
423. Morshed MN, Behary N, Guan J, Nierstrasz VA: **Immobilizing Redox Enzyme on Amino Functional Group-Integrated Tailor-Made Polyester Textile: High Loading, Stability, and Application in a Bio-Fenton System.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2021, **9**:8879–8894.
424. Vitola G, Mazzei R, Giorno L: **Biohybrid membranes for organophosphate pesticides degradation: Hyperactivation of immobilized phosphotriesterase by surfactants.** *Environmental Technology & Innovation* 2023, **30**:103053.
425. Begum G, Lalwani S, Rana RK: **Designing Microreactors Resembling Cellular Microenvironment via Polyamine-Mediated Nanoparticle-Assembly for Tuning Glucose Oxidase Kinetics.** *Bioconjugate Chem* 2018, **29**:2586–2593.
426. Gao X, Pan H, Tian S, Su L, Hu Z, Qiao C, Liu Q, Zhou C: **Co-immobilization of bienzyme HRP/GOx on highly stable hierarchically porous MOF with**

- enhanced catalytic activity and stability: Kinetic and thermodynamic studies.** *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2023, **11**:110684.
427. Muñoz-Morales E, Velasco-Lozano S, Benítez-Mateos AI, Marín MJ, Ramos-Cabrer P, López-Gallego F: **Deciphering the Effect of Microbead Size Distribution on the Kinetics of Heterogeneous Biocatalysts through Single-Particle Analysis Based on Fluorescence Microscopy.** *Catalysts* 2019, **9**:896.
428. Kim S, Lee J, Jang S, Lee H, Sung D, Chang JH: **High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles.** *Biochemical Engineering Journal* 2016, **105**:406–411.
429. Zhou L, Jiang Y, Gao J, Zhao X, Ma L: **Graphene Oxide as a Matrix for the Immobilization of Glucose Oxidase.** *Appl Biochem Biotechnol* 2012, **168**:1635–1642.
430. Altun S, Çakiroğlu B, Özacar M, Özacar M: **A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015, **136**:963–970.
431. Ghanbarian B, Hunt AG, Ewing RP, Sahimi M: **Tortuosity in Porous Media: A Critical Review.** *Soil Science Society of America Journal* 2013, **77**:1461–1477.
432. Khan MIH, Kumar C, Joardder MUH, Karim MA: **Determination of appropriate effective diffusivity for different food materials.** *Drying Technology* 2017, **35**:335–346.
433. Bolivar JM, Schelch S, Pfeiffer M, Nidetzky B: **Intensifying the O<sub>2</sub>-dependent heterogeneous biocatalysis: Superoxygenation of solid support from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a catalase tailor-made for effective immobilization.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2016, **134**:302–309.
434. Cosgrove SC, Matthey AP, Riese M, Chapman MR, Birmingham WR, Blacker AJ, Kapur N, Turner NJ, Flitsch SL: **Biocatalytic Oxidation in Continuous Flow for the Generation of Carbohydrate Dialdehydes.** *ACS Catal* 2019, **9**:11658–11662.
435. Pickl M, Jost E, Glueck SM, Faber K: **Improved biooxidation of Benzyl alcohols catalyzed by the flavoprotein (5-Hydroxymethyl)furfural oxidase in organic solvents.** *Tetrahedron* 2017, **73**:5408–5410.
436. Chen J, Wang Q, Huang L, Zhang H, Rong K, Zhang H, Dong S: **Prussian blue with intrinsic heme-like structure as peroxidase mimic.** *Nano Res* 2018, **11**:4905–4913.
437. Betancor L, Hidalgo A, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM: **Preparation of a Stable Biocatalyst of Bovine Liver Catalase Using Immobilization and Postimmobilization Techniques.** *Biotechnol Prog* 2003, **19**:763–767.
438. Hidalgo A, Betancor L, Lopez-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Fernández-Lafuente R, Guisán JM: **Design of an immobilized preparation of catalase from**

- Thermus thermophilus to be used in a wide range of conditions.** *Enzyme and Microbial Technology* 2003, **33**:278–285.
439. Kaddour S, López-Gallego F, Sadoun T, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM: **Preparation of an immobilized–stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: The effect of Zn<sup>2+</sup> on enzyme stability.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2008, **55**:142–145.
440. Medina-Castillo AL, Ruzic L, Nidetzky B, Bolivar JM: **Hydrophilic Nonwoven Nanofiber Membranes as Nanostructured Supports for Enzyme Immobilization.** *ACS Appl Polym Mater* 2022, **4**:6054–6066.
441. Wu Z, Shi L, Yu X, Zhang S, Chen G: **Co-Immobilization of Tri-Enzymes for the Conversion of Hydroxymethylfurfural to 2,5-Diformylfuran.** *Molecules* 2019, **24**:3648.
442. H. Orrego A, Romero-Fernández M, Millán-Linares MDC, Pedroche J, Guisán JM, Rocha-Martin J: **High Stabilization of Enzymes Immobilized on Rigid Hydrophobic Glyoxyl-Supports: Generation of Hydrophilic Environments on Support Surfaces.** *Catalysts* 2020, **10**:676.
443. Romero-Fernández M, Moreno-Perez S, H. Orrego A, Martins De Oliveira S, I. Santamaría R, Díaz M, Guisan JM, Rocha-Martin J: **Designing continuous flow reaction of xylan hydrolysis for xylooligosaccharides production in packed-bed reactors using xylanase immobilized on methacrylic polymer-based supports.** *Bioresource Technology* 2018, **266**:249–258.
444. Pinheiro BB, Rios NS, Rodríguez Aguado E, Fernandez-Lafuente R, Freire TM, Fechine PBA, dos Santos JCS, Gonçalves LRB: **Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2019, **130**:798–809.
445. Carballares D, Rocha-Martin J, Fernandez-Lafuente R: **Preparation of a Six-Enzyme Multilayer Combi-Biocatalyst: Reuse of the Most Stable Enzymes after Inactivation of the Least Stable One.** *ACS Sustainable Chem Eng* 2022, **10**:3920–3934.
446. Illanes A, Wilson L: **Parameters for the Evaluation of Immobilized Enzymes Under Process Conditions.** In *Immobilization of Enzymes and Cells*. . Humana; 2020.
447. Velasco-Lozano S, Benítez-Mateos AI, López-Gallego F: **Co-immobilized Phosphorylated Cofactors and Enzymes as Self-Sufficient Heterogeneous Biocatalysts for Chemical Processes.** *Angew Chem Int Ed* 2017, **56**:771–775.
448. Velasco-Lozano S, Santiago-Arcos J, Graza M, Lopez-Gallego F: **Cell-Free Biosynthesis of  $\omega$ -Hydroxy Acids Boosted by a Synergistic Combination of Alcohol Dehydrogenases.** *ChemSusChem* 2022, **15**.
449. Bolivar JM, Mannsberger A, Thomsen MS, Tekautz G, Nidetzky B: **Process intensification for O<sub>2</sub>-dependent enzymatic transformations in continuous**

- single-phase pressurized flow.** *Biotechnology and Bioengineering* 2019, **116**:503–514.
450. Bolivar JM, Tribulato MA, Petrasek Z, Nidetzky B: **Let the substrate flow, not the enzyme: Practical immobilization of D -amino acid oxidase in a glass microreactor for effective biocatalytic conversions: Immobilization of D -Amino Acid Oxidase in a Glass Microreactor.** *Biotechnol Bioeng* 2016, **113**:2342–2349.
451. Velasco-Lozano S, Santiago-Arcos J, Mayoral JA, Lopez-Gallego F: **Co-immobilization and Colocalization of Multi-Enzyme Systems for the Cell-Free Biosynthesis of Aminoalcohols.** *ChemCatChem* 2020, **12**:3030–3041.
452. Orrego AH, López-Gallego F, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Rocha-Martín J: **Co-Immobilization and Co-Localization of Multi-Enzyme Systems on Porous Materials.** In *Immobilization of Enzymes and Cells.* . Humana; [date unknown].
453. Schmidt-Dannert C, Lopez-Gallego F: **A roadmap for biocatalysis – functional and spatial orchestration of enzyme cascades.** *Microbial Biotechnology* 2016, **9**:601–609.
454. Grajales-Hernández DA, Diamanti E, Moro R, Velasco-Lozano S, Pires E, López-Gallego F: **Spatial Organization of Immobilized Multienzyme Systems Improves the Deracemization of Alkyl Glyceryl Ethers.** *ACS Catal* 2023, **13**:15620–15632.
455. Bolivar JM, Hidalgo A, Sánchez-Ruiloba L, Berenguer J, Guisán JM, López-Gallego F: **Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate.** *Journal of Biotechnology* 2011, **155**:412–420.
456. Mafra A, Ulrich L, Kornecki J, Fernandez-Lafuente R, Tardioli P, Ribeiro M: **Combi-CLEAs of Glucose Oxidase and Catalase for Conversion of Glucose to Gluconic Acid Eliminating the Hydrogen Peroxide to Maintain Enzyme Activity in a Bubble Column Reactor.** *Catalysts* 2019, **9**:657.
457. Brown-Peterson NJ, Salin ML: **Purification of a Catalase-Peroxidase from Halobacterium halobium: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzymet.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175**:4197–4202.
458. Dinçler A, Aydemir Tül: **Purification and Characterization of Catalase from Chard ( *Beta vulgaris var. cicla* ).** *Journal of Enzyme Inhibition* 2001, **16**:165–175.
459. Vasudevan PT, Weiland RH: **Deactivation of catalase by hydrogen peroxide.** *Biotech & Bioengineering* 1990, **36**:783–789.
460. Milek J: **Estimation of the kinetic parameters for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzymatic decomposition and for catalase deactivation.** *Braz J Chem Eng* 2018, **35**:995–1004.

Capítulo 10. Referencias

461. Kamat SS, Holmes-Hampton GP, Bagaria A, Kumaran D, Tichy SE, Gheyi T, Zheng X, Bain K, Groshong C, Emtage S, et al.: **The catalase activity of diiron adenine deaminase.** *Protein Science* 2011, **20**:2080–2094.
462. Zhao F, Brix AC, Lielpetere A, Schuhmann W, Conzuelo F: **On the Mediated Electron Transfer of Immobilized Galactose Oxidase for Biotechnological Applications.** *Chemistry A European J* 2022, **28**.
463. Ghadge RS, Patwardhan AW, Sawant SB, Joshi JB: **Effect of flow pattern on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors.** *Chemical Engineering Science* 2005, **60**:1067–1083.
464. Ghadge RS, Ekambara K, Joshi JB: **Role of hydrodynamic flow parameters in lipase deactivation in bubble column reactor.** *Chemical Engineering Science* 2006, **60**:6320–6335.
465. Elias CB, Joshi JB: **Role of hydrodynamic shear on activity and structure of proteins.** In *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*. . Springer Berlin Heidelberg; 1998:47–71.

---

---

# **CAPÍTULO 11.**

## **ANEXOS**

---

---



## 11. ANEXOS

### 11.3. TABLAS

**Tabla 11.1.** Caracterización de la inmovilización de GOX sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar.

Act ofrecida ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Act observada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Rendimiento inmovilización %	Factor de eficacia %	Act recuperada %
<b>10</b>	8.6 ± 0.12	96.1	88.4 ± 2.4	85.8 ± 2.5
<b>20</b>	15.2 ± 0.59	99.3	76.5 ± 3.0	76.0 ± 3.0
<b>40</b>	25.9 ± 1.23	99.9	64.7 ± 3.2	64.6 ± 3.2
<b>100</b>	54.3 ± 2.85	98.7	55.1 ± 2.8	54.3 ± 2.8
<b>200</b>	94.9 ± 5.74	97.9	48.5 ± 2.9	47.5 ± 3.0
<b>500</b>	193 ± 19.4	99.7	38.7 ± 3.9	38.6 ± 3.9

**Tabla 11.2.** Caracterización de la inmovilización de GalOx sobre DS-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar.

Act ofrecida ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Act observada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Rendimiento inmovilización %	Factor de eficacia %	Act recuperada %
<b>5</b>	3.17 ± 0.39	93.0	68.2 ± 6.1	63.4 ± 3.2
<b>10</b>	7.17 ± 0.54	94.8	75.6 ± 5.4	71.7 ± 4.0
<b>25</b>	17.1 ± 1.0	84.8	80.8 ± 5.5	68.5 ± 5.2
<b>50</b>	28.4 ± 3.2	79.4	71.4 ± 7.1	56.7 ± 3.1
<b>100</b>	32.6 ± 2.1	47.5	68.6 ± 4.9	32.6 ± 2.7
<b>200</b>	36.9 ± 3.5	31.2	59.1 ± 5.3	18.5 ± 1.1
<b>348</b>	46.9 ± 2.8	27.4	49.2 ± 3.0	13.5 ± 0.74

**Tabla 11.3.** Caracterización de la inmovilización de lacasa sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de acetato sódico a pH 5. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado, y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>Act observada</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>Rendimiento inmovilización</b> %	<b>Factor de eficacia</b> %	<b>Act recuperada</b> %
<b>3.15</b>	1.86 ± 0.13	100.0	59.0 ± 4.2	59.0 ± 4.2
<b>6.25</b>	3.36 ± 0.08	99.5	54.0 ± 1.4	53.7 ± 1.4
<b>12.5</b>	6.58 ± 0.17	99.3	53.0 ± 1.4	52.6 ± 1.4
<b>18.8</b>	8.73 ± 0.52	98.8	47.0 ± 2.8	46.4 ± 2.8
<b>25</b>	10.18 ± 0.00	99.3	41.0 ± 0	40.7 ± 0
<b>50</b>	19.13 ± 0.00	98.1	39.0 ± 0	38.3 ± 0
<b>200</b>	49.78 ± 4.10	86.3	25.5 ± 2.1	22.0 ± 1.8

**Tabla 11.4.** Caracterización de la inmovilización de tirosinasa sobre PEI-Ag. Todos los experimentos se realizaron a 30°C en 100 mM de fosfato sódico a pH 7. Las medidas de actividad observadas se realizaron por duplicado (excepto las dos últimas), y el valor mostrado es la media de estos experimentos junto con su error estándar.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>Act observada</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>Rendimiento inmovilización</b> %	<b>Factor de eficacia</b> %	<b>Act recuperada</b> %
<b>13.9</b>	10.14 ± 0.00	100	73.0 ± 2.6	73.0 ± 2.6
<b>27.8</b>	18.83 ± 1.55	100	67.7 ± 3.4	67.7 ± 3.4
<b>55.6</b>	33.69 ± 4.25	94.2	64.3 ± 3.2	60.6 ± 3.0
<b>83.4</b>	47.23 ± 7.4	90.2	62.8 ± 4.1	56.6 ± 3.7
<b>111</b>	51.85 ± 0.86	90.6	51.5 ± 3.6	46.7
<b>222</b>	59.78 ± 1.73	72.8	37.0 ± 4.8	26.9

**Tabla 11.5.** Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la GOX inmovilizada en PEI-Ag.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>500</b>
<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	20.4 ± 0.3	11.5 ± 0.1	9.71 ± 0.19	5.58 ± 0.10	7.74 ± 0.15
<b>Act<sub>max</sub> (L·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>)</b>	0.741 ± 0.007	0.611 ± 0.003	0.678 ± 0.005	0.422 ± 0.004	0.513 ± 0.006
<b>Factor de eficacia</b>	0.824 ± 0.025	0.633 ± 0.031	0.606 ± 0.024	0.368 ± 0.030	0.501 ± 0.027
<b>m<sub>cat</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>	16.67	9.10	6.54	3.85	1.96
<b>SRC</b>	5.72·10 <sup>-3</sup>	2.92·10 <sup>-3</sup>	2.96·10 <sup>-3</sup>	5.18·10 <sup>-3</sup>	4.36·10 <sup>-3</sup>
<b>RMSE</b>	6.29·10 <sup>-3</sup>	5.69·10 <sup>-3</sup>	7.17·10 <sup>-3</sup>	8.48·10 <sup>-3</sup>	9.60·10 <sup>-3</sup>
<b>F Fischer</b>	38790	23994	12579	9019	4791
<b>AIC</b>	-1788	-1731	-886	-925	-761

**Tabla 11.6.** Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la GalOx inmovilizada en DS-Ag.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	51.1 ± 0.9	40.1 ± 0.6	38.9 ± 0.66	24.68 ± 0.89
<b>Act<sub>max</sub> (L·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>)</b>	1.28·10 <sup>-2</sup> ± 1.41·10 <sup>-4</sup>	6.32·10 <sup>-3</sup> ± 5.94·10 <sup>-5</sup>	5.90·10 <sup>-3</sup> ± 5.94·10 <sup>-5</sup>	4.71·10 <sup>-3</sup> ± 8.84·10 <sup>-5</sup>
<b>Factor de eficacia</b>	0.829 ± 0.022	0.758 ± 0.017	0.702 ± 0.037	0.555 ± 0.012
<b>m<sub>cat</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>	39.4	22.0	13.6	5.45
<b>SRC</b>	3.18·10 <sup>-3</sup>	3.96·10 <sup>-3</sup>	4.65·10 <sup>-3</sup>	2.19·10 <sup>-3</sup>
<b>RMSE</b>	7.33·10 <sup>-3</sup>	7.28·10 <sup>-3</sup>	8.27·10 <sup>-3</sup>	1.74·10 <sup>-3</sup>
<b>F Fischer</b>	12721	15913	12551	2901
<b>AIC</b>	-1087	-1283	-1235	-1116

**Tabla 11.7.** Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la lacasa inmovilizada en PEI-Ag.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>
<b>K<sub>O2</sub> (mM)</b>	0.465 ± 0.085	0.729 ± 0.13	0.830 ± 0.15	0.896 ± 0.17
<b>K<sub>S</sub> (mM)</b>	1.94 ± 0.29	3.0 ± 0.47	3.0 ± 0.49	3.69 ± 0.64
<b>Act<sub>max</sub> (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	0.330 ± 0.022	0.634 ± 0.031	0.721 ± 0.044	0.966 ± 0.061
<b>Factor de eficacia</b>	0.431 ± 0.015	0.363 ± 0.011	0.308 ± 0.09	0.240 ± 0.05
<b>m<sub>cat</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>	13.0	8.80	5.66	4.40
<b>SRC</b>	7.61·10 <sup>-3</sup>	7.08·10 <sup>-3</sup>	3.32·10 <sup>-3</sup>	4.21·10 <sup>-3</sup>
<b>RMSE</b>	9.81·10 <sup>-3</sup>	1.06·10 <sup>-3</sup>	8.45·10 <sup>-3</sup>	8.28·10 <sup>-3</sup>
<b>F Fischer</b>	103527	28687	50928	45241
<b>AIC</b>	-1799	-1650	-1319	-1391

**Tabla 11.8.** Parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos a partir del análisis integral de múltiple respuesta para la tirosinasa inmovilizada en PEI-Ag.

<b>Act ofrecida</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>10</b>	<b>33</b>	<b>60</b>
<b>K<sub>O2</sub> (mM)</b>	0.0321 ± 0.002	0.065 ± 0.003	0.029 ± 0.001
<b>K<sub>S</sub> (mM)</b>	0.601 ± 0.012	1.26 ± 0.025	0.23 ± 0.003
<b>Factor de eficacia</b>	0.309 ± 0.023	0.274 ± 0.018	0.347 ± 0.015
<b>m<sub>cat</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>	23.2	7.90	4.76
<b>Act<sub>max</sub> (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	1.58 ± 0.05	2.48 ± 0.08	1.35 ± 0.03
<b>SRC</b>	1.30·10 <sup>-2</sup>	6.24·10 <sup>-3</sup>	3.03·10 <sup>-3</sup>
<b>RMSE</b>	1.29·10 <sup>-2</sup>	7.13·10 <sup>-3</sup>	6.90·10 <sup>-3</sup>
<b>F Fischer</b>	30531	61830	51500
<b>AIC</b>	-2634	-3067	-2057

**Tabla 11.9.** Tiempos de vida media del indicador luminiscente Ru(bpds)<sub>2</sub> en disolución (con NaPi 50 mM pH 7) en disolución con PEI (50% vol) e inmovilizado en PEI-Ag, en distintas condiciones de saturación con oxígeno.

Concentración (mg·ml <sup>-1</sup> ) = 0.07							
En disolución	[O <sub>2</sub> ]%	τ <sub>1</sub> (ns)	(τ <sub>M0</sub> /τ <sub>M</sub> )-1				
	0%	514	0.00				
	21%	416	0.24				
	100%	249	1.06				
Concentración (mg·ml <sup>-1</sup> ) = 0.035							
En disolución + PEI (50% vol)	[O <sub>2</sub> ]%	τ <sub>1</sub> (ns)	τ <sub>2</sub> (ns)	%τ <sub>1</sub>	%τ <sub>2</sub>	τ <sub>M</sub>	(τ <sub>M0</sub> /τ <sub>M</sub> )-1
	0%	114	253	11%	89%	222	0.00
	21%	87	209	6%	94%	193	0.15
	100%	82	175	10%	90%	157	0.41
Carga (mg·g <sup>-1</sup> ) = 5							
Sobre PEI-Ag	[O <sub>2</sub> ]%	τ <sub>1</sub> (ns)	τ <sub>2</sub> (ns)	%τ <sub>1</sub>	%τ <sub>2</sub>	τ <sub>M</sub>	(τ <sub>M0</sub> /τ <sub>M</sub> )-1
	0%	158	330	21%	79%	268	0.00
	21%	131	299	14%	86%	251	0.06
	100%	119	238	21%	79%	197	0.36

**Tabla 11.10.** Tiempos de vida media del indicador luminiscente Ru(pbbs)<sub>3</sub> en disolución (con NaPi 50 mM pH 7) e inmovilizado en PEI-Ag, en distintas condiciones de saturación con oxígeno.

Concentración (mg·ml <sup>-1</sup> ) = 0.1							
En disolución	[O <sub>2</sub> ]%	τ <sub>1</sub> (ns)	(τ <sub>M0</sub> /τ <sub>M</sub> )-1				
	0%	1945	0.00				
	21%	785	1.48				
	100%	234	7.30				
Carga (mg·g <sup>-1</sup> ) = 5							
Sobre PEI-Ag	[O <sub>2</sub> ]%	τ <sub>1</sub> (ns)	τ <sub>2</sub> (ns)	%τ <sub>1</sub>	%τ <sub>2</sub>	τ <sub>M</sub>	(τ <sub>M0</sub> /τ <sub>M</sub> )-1
	0%	532	4400	1%	99%	4021	0.00
	21%	645.3	3781	2%	98%	3381	0.19
	100%	789.5	2432	11%	89%	1977	1.03

**Tabla 11.11.** Condiciones de medida del equipo TCSPC empleadas en los ensayos.

Condiciones de medida	
KHz	80
λ <sub>emisión</sub> (nm)	635
Rango tiempo (μs)	10
Canales	1024
Cuentas de pico	5000
Δλ	1.2-2

**Tabla 11.12.** Velocidad de reacción analizada a distintos tiempos en la oxidación de galactosa en biorreactor aireado referente a la **Figura 6.11**.

<b>Actividad observada (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}</math>)</b>			
<b>Inicial<sup>[a]</sup></b>	<b>Inicial<sup>[b]</sup></b>	<b>A las 2.5 h<sup>[c]</sup></b>	<b>Final<sup>[d]</sup></b>
<b>10.73</b>	1.36	1.60	0.804

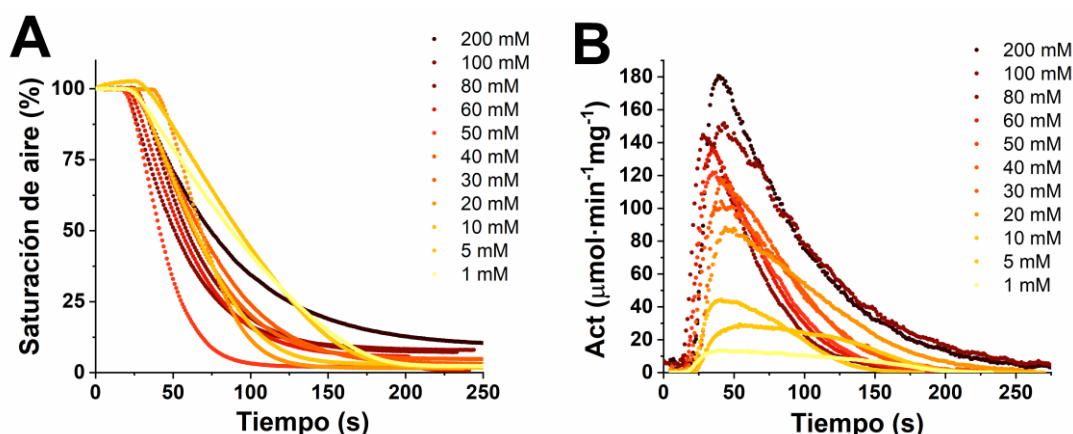
[a] Velocidad inicial de consumo de galactosa.

[b] Velocidad inicial de consumo de oxígeno suprimiendo OTR.

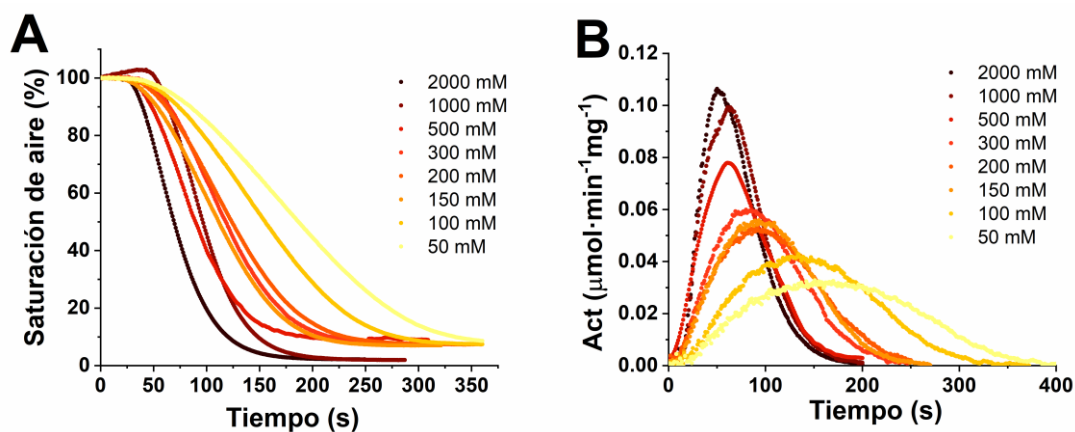
[c] Velocidad de consumo de oxígeno a las 2.5 h suprimiendo OTR.

[d] Velocidad final de consumo de oxígeno suprimiendo OTR.

11.4. FIGURAS

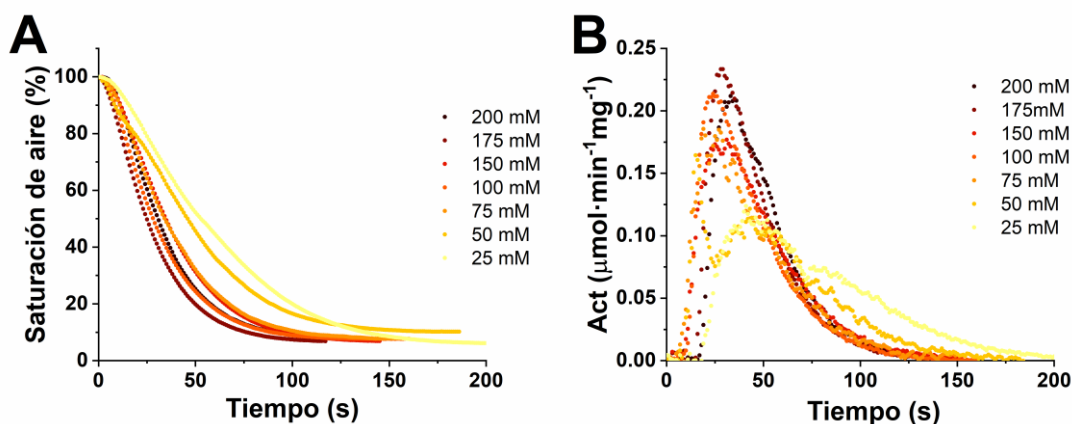


**Figura 11.1.** Conjunto representativo de cursos temporales de oxígeno a distintas  $[glucosa]_0$  para GOX. *Panel A:* Curso temporal de saturación en aire; *Panel B:* Curso temporal de velocidad de reacción específica (actividad enzimática). Los datos de B se obtienen mediante diferenciación por incrementos finitos de los datos del panel A. La concentración de enzima,  $[E]$ , se ajustó para tener un número adecuado de puntos de datos ( $E$  se incrementó en actividades bajas y  $E$  se redujo en actividades altas;  $[E]=0.0015-0.003 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).  $[O_2] = 0.215 \text{ mM}$  en condiciones de saturación en aire al 100 %, 25 °C y 50 mM de tampón fosfato pH 7.

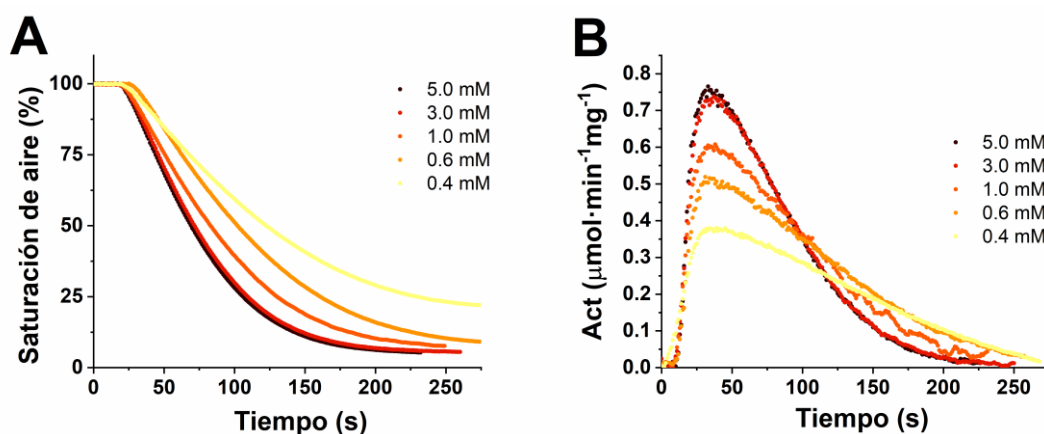


**Figura 11.2.** Conjunto representativo de cursos temporales de oxígeno a distintas  $[galactosa]_0$  para GalOx con HRP como activador. *Panel A:* Curso temporal de saturación en aire; *Panel B:* Curso temporal de velocidad de reacción específica (actividad enzimática). Los datos de B se obtienen mediante diferenciación por incrementos finitos de los datos del panel A. La concentración de enzima,  $[E]$ , se ajustó para tener un número adecuado de puntos de datos ( $E$  se incrementó en actividades bajas y  $E$  se redujo en

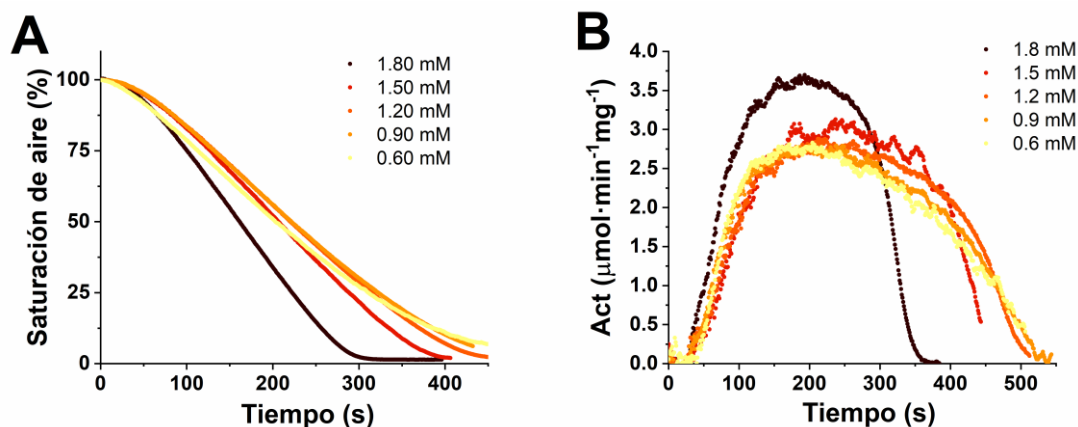
actividades altas;  $[E]=5-10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $[O_2] = 0.215 \text{ mM}$  en condiciones de saturación de aire al 100 %, 25 °C y 50 mM de tampón fosfato pH 7.



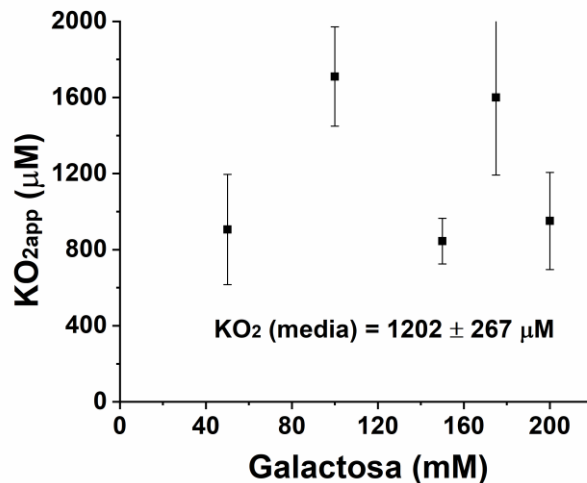
**Figura 11.3.** Conjunto representativo de cursos temporales de oxígeno a distintas  $[\text{galactosa}]_0$  para GalOx con  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  como activador. *Panel A:* Curso temporal de saturación en aire; *Panel B:* Curso temporal de velocidad de reacción específica (actividad enzimática). Los datos de B se obtienen mediante diferenciación por incrementos finitos de los datos del panel A. La concentración de enzima,  $[E]$ , se ajustó para tener un número adecuado de puntos de datos ( $E$  se incrementó en actividades bajas y  $E$  se redujo en actividades altas;  $[E]=0.50-0.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $[O_2] = 0.215 \text{ mM}$  en condiciones de saturación de aire al 100 %, 25 °C y 50 mM de tampón fosfato pH 7.



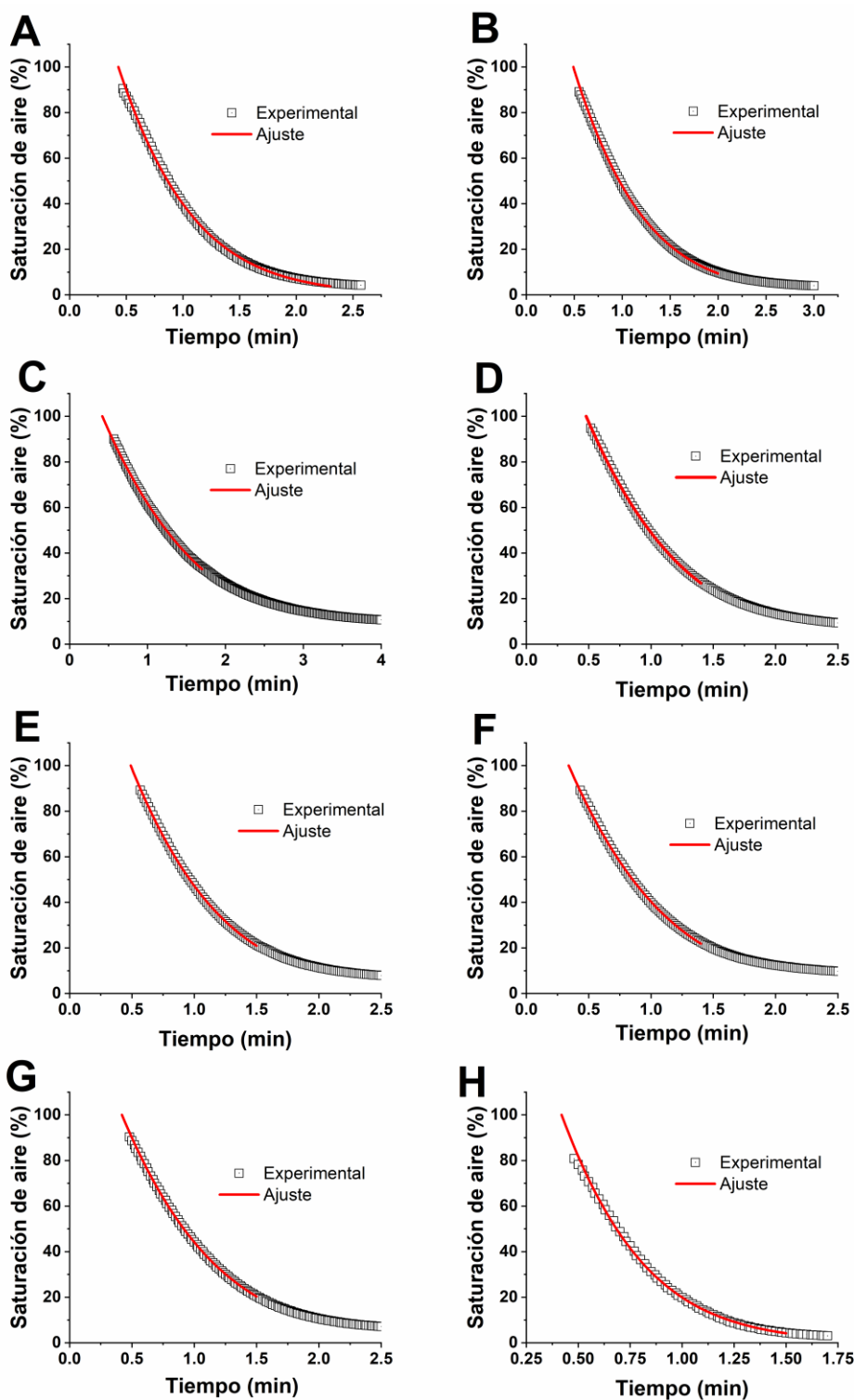
**Figura 11.4.** Conjunto representativo de cursos temporales de oxígeno a distintas  $[\text{catecol}]_0$  para lacasa. *Panel A:* Curso temporal de saturación en aire; *Panel B:* Curso temporal de velocidad de reacción específica (actividad enzimática). Los datos de B se obtienen mediante diferenciación por incrementos finitos de los datos del panel A.  $[E]=0.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .  $[O_2] = 0.215 \text{ mM}$  en condiciones de saturación de aire al 100 %, 25 °C y 50 mM de tampón acetato pH 5.



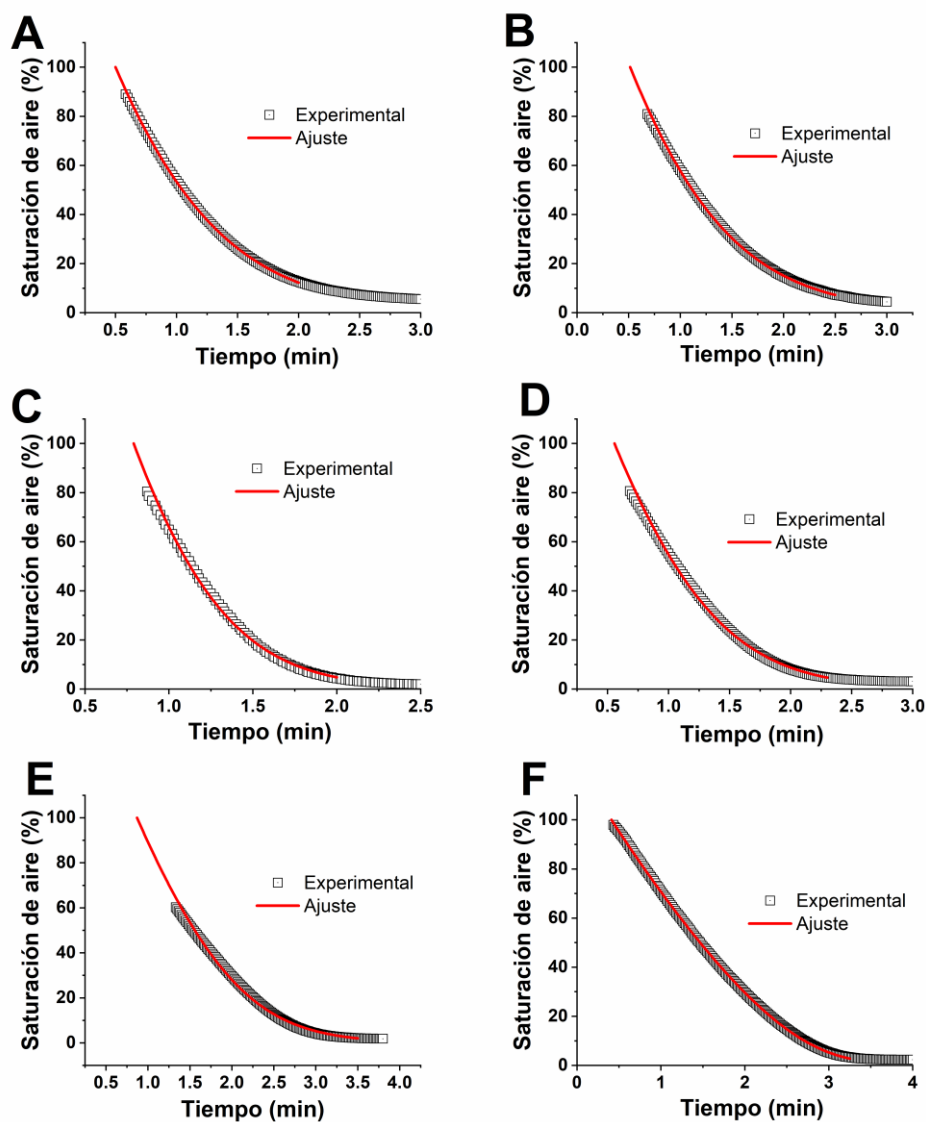
**Figura 11.5.** Conjunto representativo de cursos temporales de oxígeno a distintas  $[tirosina]_0$  para tirosinasa. *Panel A:* Curso temporal de saturación en aire; *Panel B:* Curso temporal de velocidad de reacción específica (actividad enzimática). Los datos de B se obtienen mediante diferenciación por incrementos finitos de los datos del panel A. La concentración de enzima,  $[E]$ , se ajustó para tener un número adecuado de puntos de datos ( $E$  se incrementó en actividades bajas y  $E$  se redujo en actividades altas;  $[E]=0.10-0.16$   $mg \cdot mL^{-1}$ ).  $[O_2] = 0.215$   $mM$  en condiciones de saturación de aire al 100 %, 25 °C y 50  $mM$  de tampón fosfato pH 7.



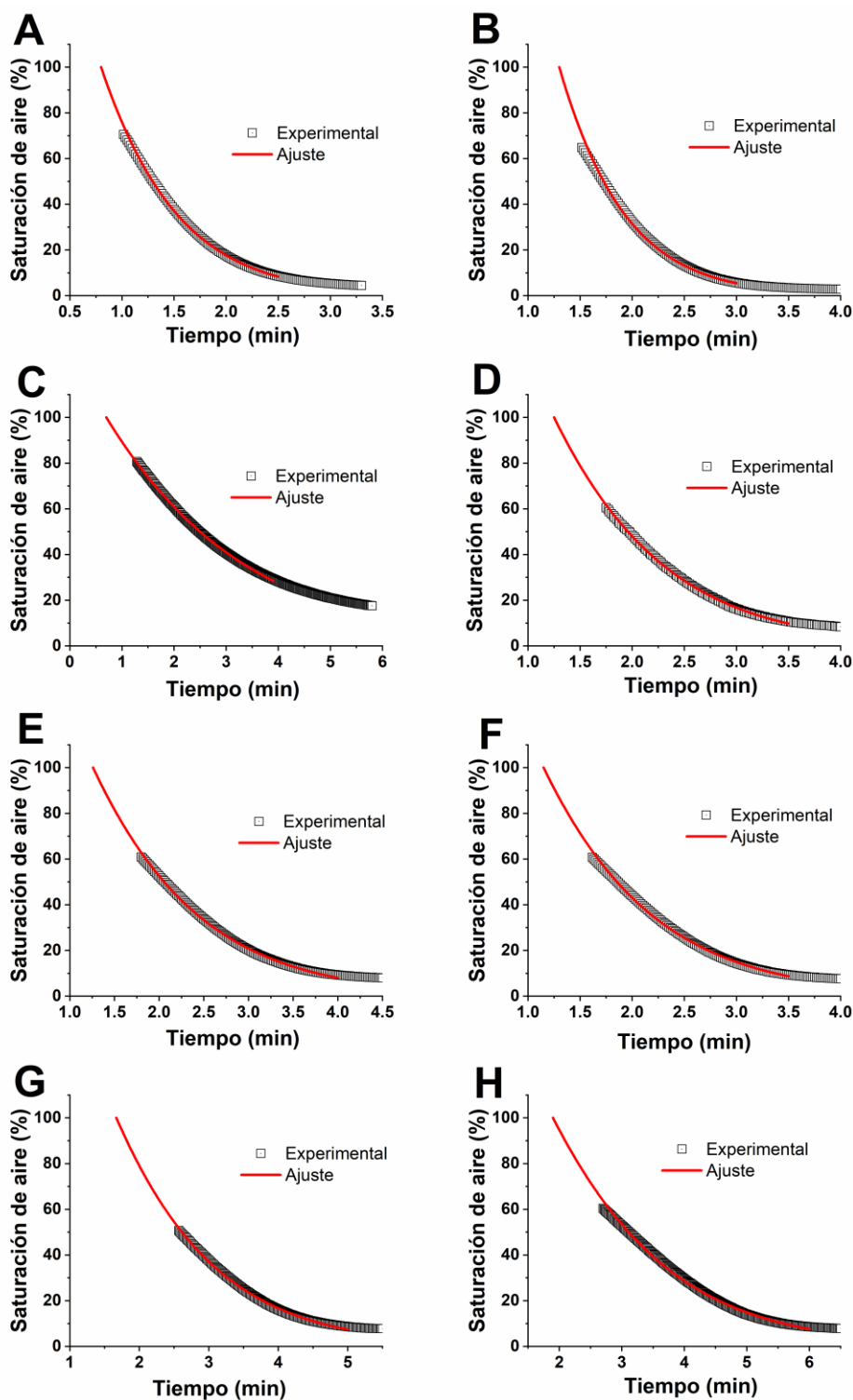
**Figura 11.6.** Gráfico del análisis diferencial respecto al  $O_2$  para GalOx con  $K_3Fe(CN)_6$  como activador, constante cinética aparente para el oxígeno ( $K_{O_2app}$ ) variando la concentración de galactosa.  $E=1.6$   $mg \cdot mL^{-1}$ .



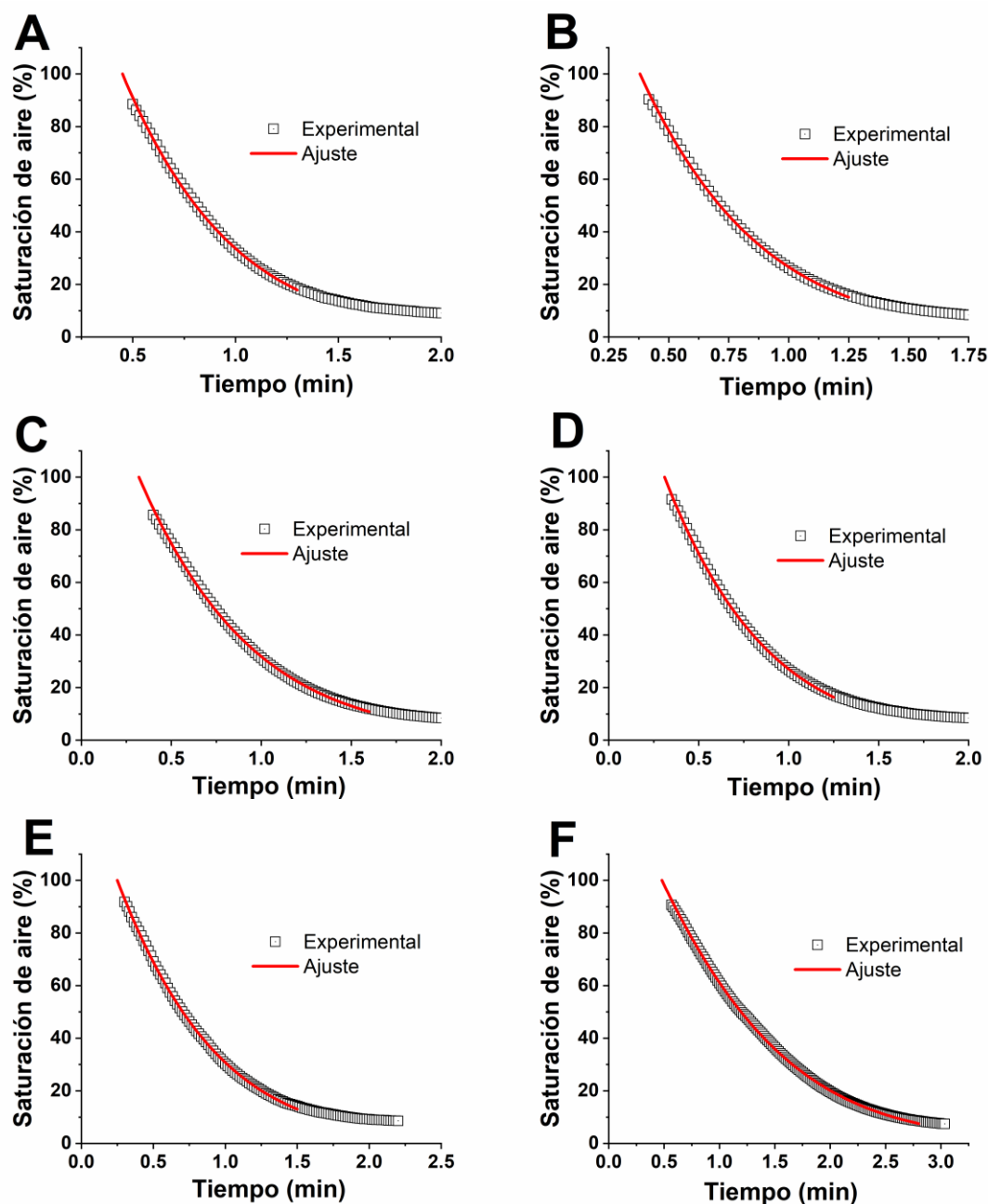
**Figura 11.7.** Análisis integral de simple respuesta con BM para GOX con glucosa 2000-50 mM. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 2000 mM; *Panel B:* 400 mM; *Panel C:* 200 mM; *Panel D:* 100 mM; *Panel E:* 90 mM; *Panel F:* 80 mM; *Panel G:* 60 mM; *Panel H:* 50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



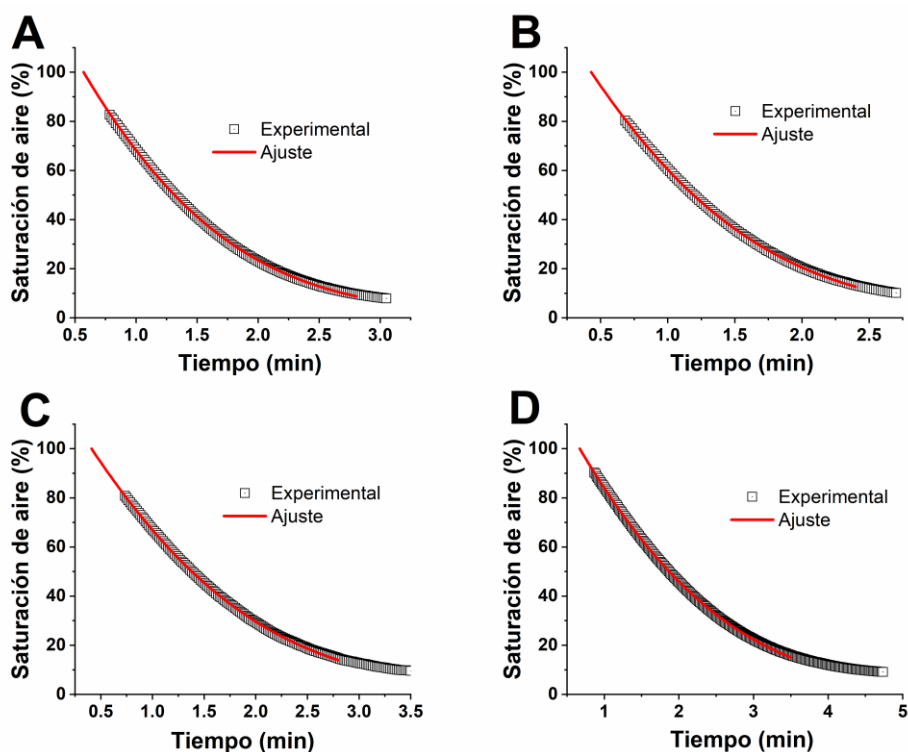
**Figura 11.8.** Análisis integral de simple respuesta con BM para GOX con glucosa 40-1 mM. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 40 mM; *Panel B:* 30 mM; *Panel C:* 20 mM; *Panel D:* 10 mM; *Panel E:* 5 mM; *Panel F:* 1 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



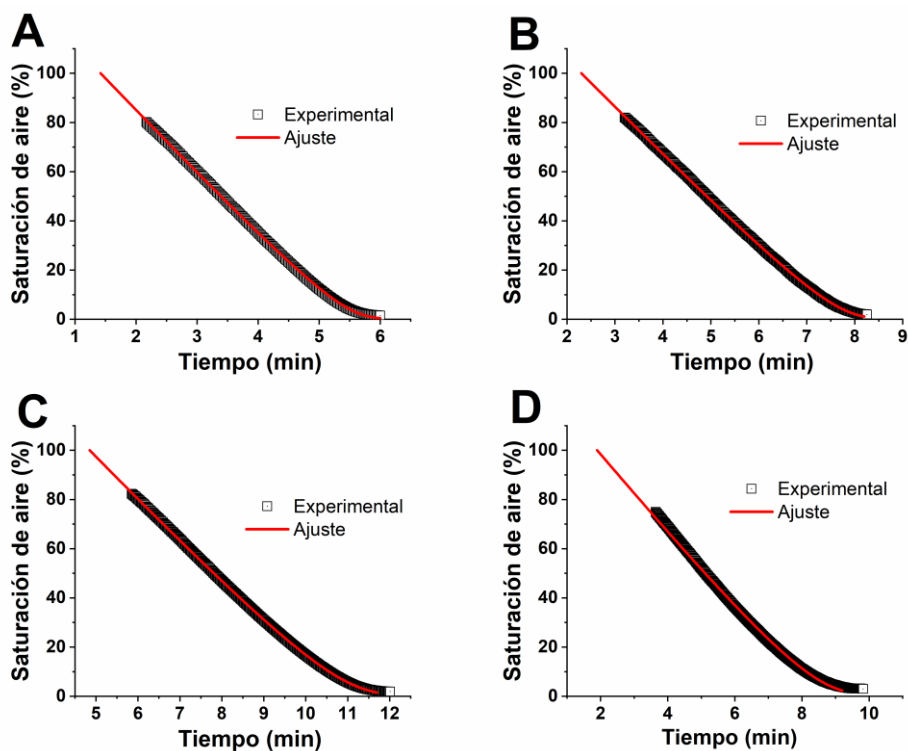
**Figura 11.9.** Análisis integral de simple respuesta con BM para GalOx con HRP como activador y con galactosa 2000-50 mM. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 2000 mM; *Panel B:* 1000 mM; *Panel C:* 500 mM; *Panel D:* 300 mM; *Panel E:* 200 mM; *Panel F:* 150 mM; *Panel G:* 100 mM; *Panel H:* 50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



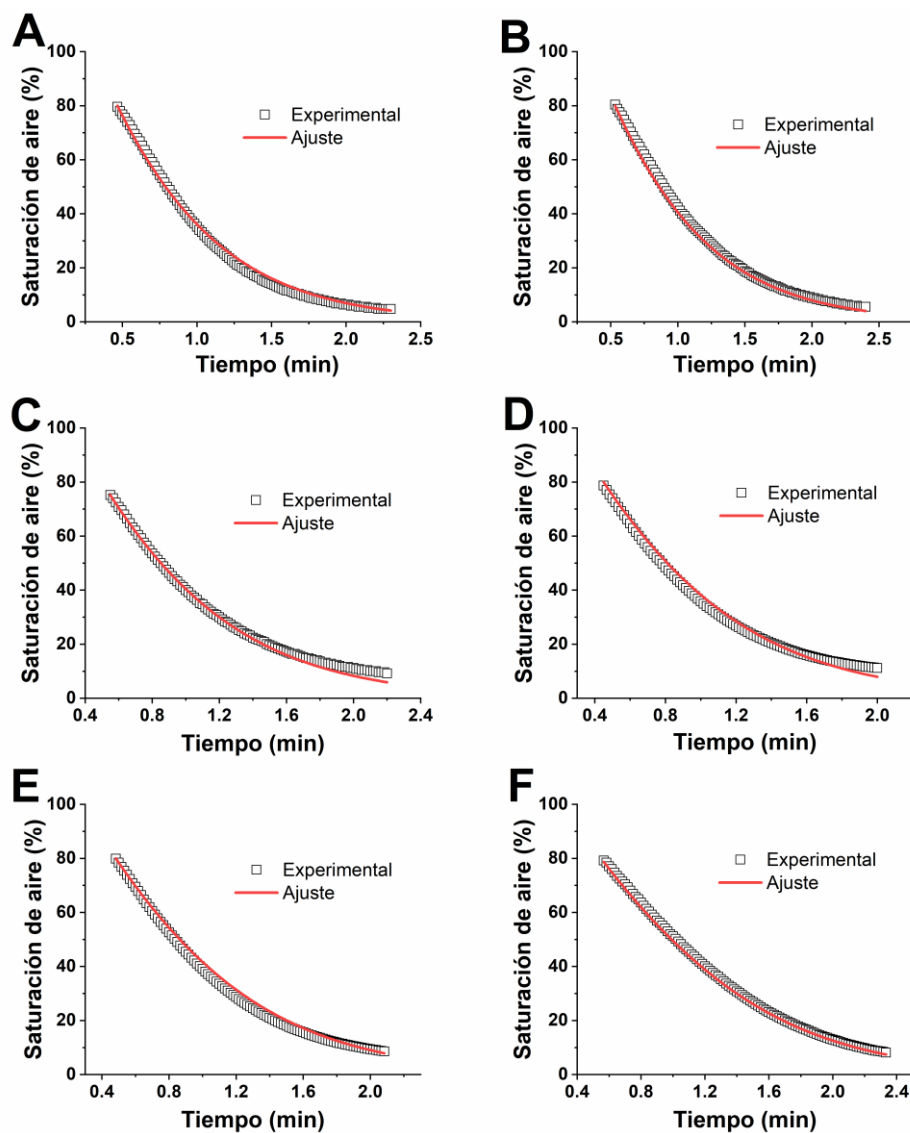
**Figura 11.10.** Análisis integral de simple respuesta con BM para GalOx con  $K_3Fe(CN)_6$  como activador y con galactosa 2000-25 mM. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 200 mM; *Panel B:* 175 mM; *Panel C:* 150 mM; *Panel D:* 100 mM; *Panel E:* 75 mM; *Panel F:* 25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



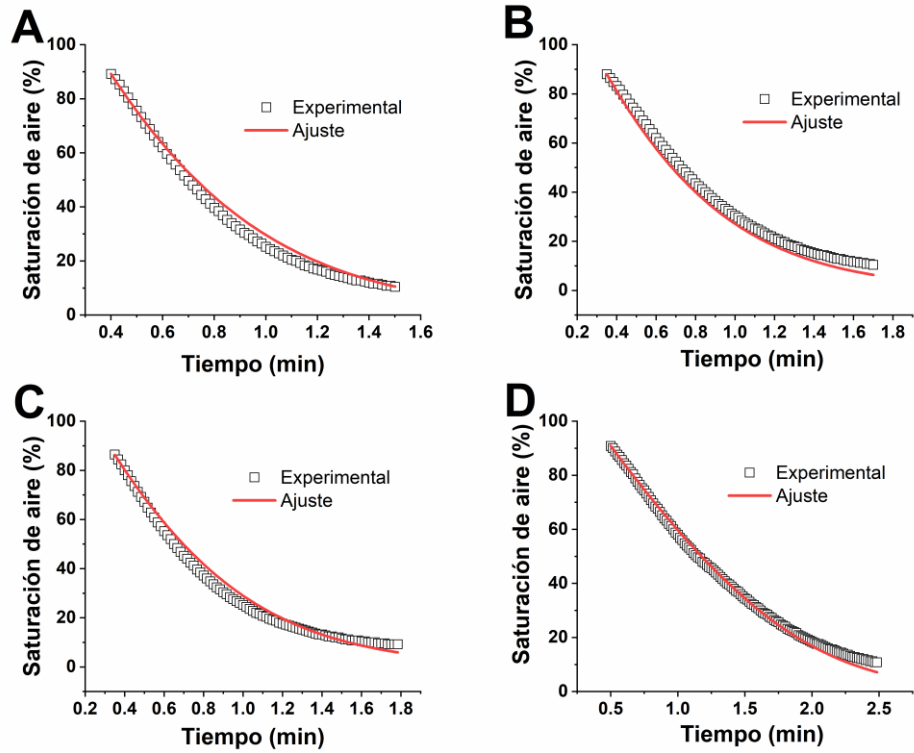
**Figura 11.11.** Análisis integral de simple respuesta con BM para lacasa con catecol 5.0-0.6 mM. Cada panel corresponde a distintas [catecol]. *Panel A:* 5.0 mM; *Panel B:* 3.0 mM; *Panel C:* 1.0 mM; *Panel D:* 0.6 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



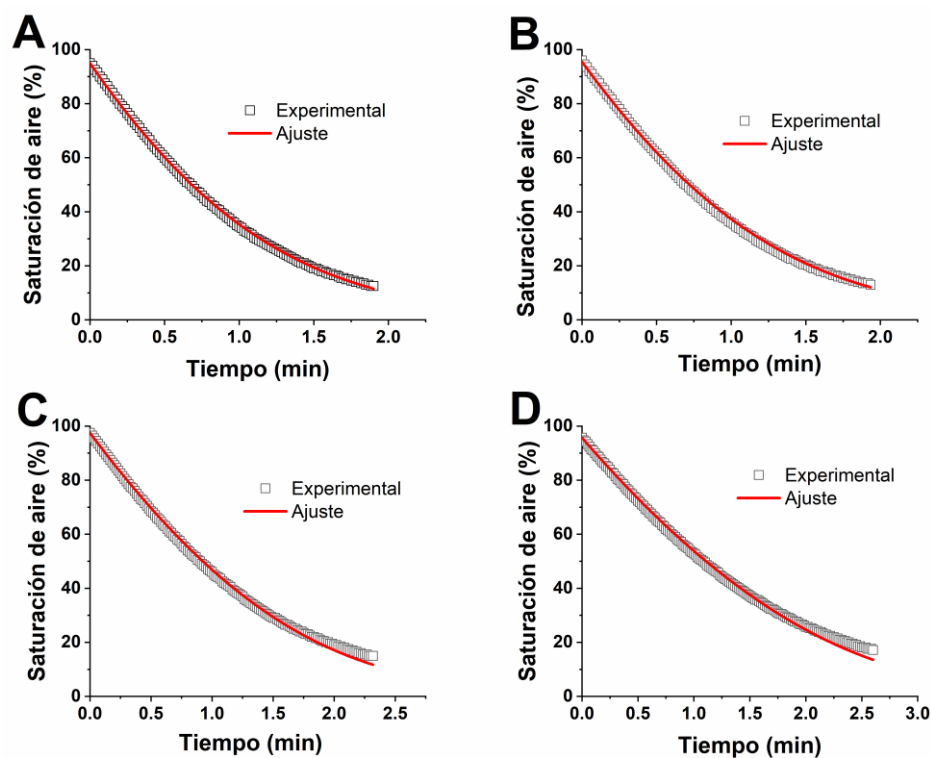
**Figura 11.12.** Análisis integral de simple respuesta con BM para tirosinasa con tirosina 1.8-0.9 mM. Cada panel corresponde a distintas [tirosina]. *Panel A:* 1.8 mM; *Panel B:* 1.5 mM; *Panel C:* 1.2 mM; *Panel D:* 0.9 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



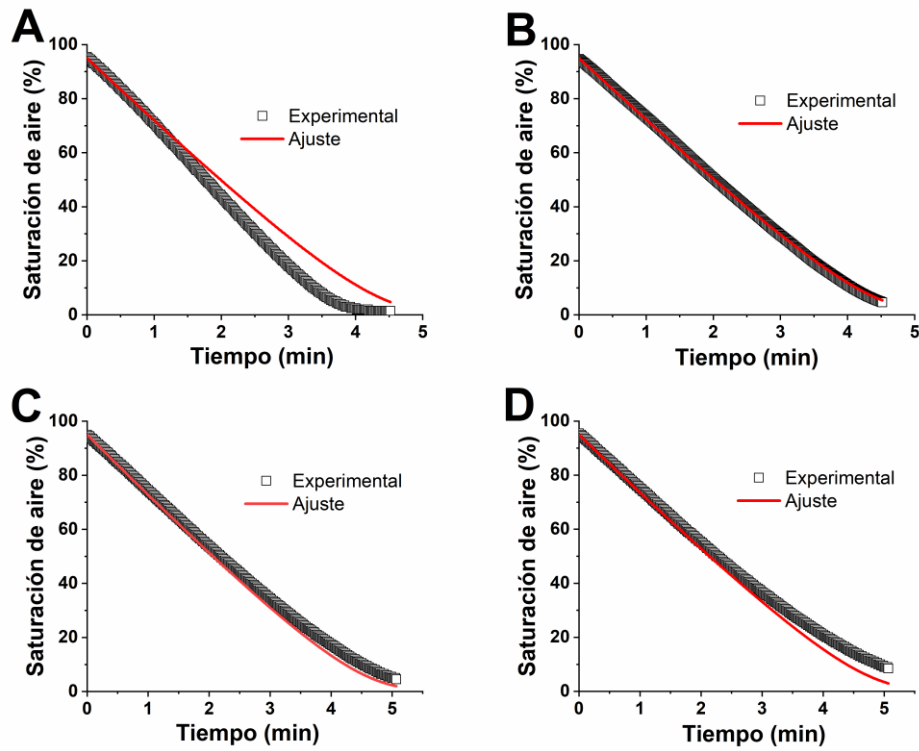
**Figura 11.13.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX con glucosa 2000-25 mM. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 2000 mM; *Panel B:* 400 mM; *Panel C:* 100 mM; *Panel D:* 75 mM; *Panel E:* 50 mM; *Panel F:* 25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



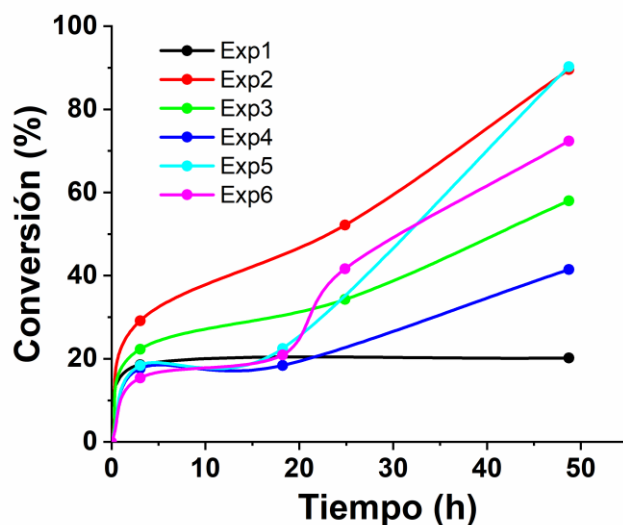
**Figura 11.14.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GalOx con  $K_3Fe(CN)_6$  como activador y con galactosa 175-25 mM. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 175 mM; *Panel B:* 150 mM; *Panel C:* 100 mM; *Panel D:* 25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.15.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para lacasa con catecol 5.0-0.6 mM. Cada panel corresponde a distintas [catecol]. *Panel A:* 5.0 mM; *Panel B:* 3.0 mM; *Panel C:* 1.0 mM; *Panel D:* 0.6 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.16.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para tirosinasa con tirosina 1.8-0.9 mM. Cada panel corresponde a distintas [tirosina]. *Panel A:* 1.8 mM; *Panel B:* 1.5 mM; *Panel C:* 1.2 mM; *Panel D:* 0.9 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.17.** Experimentos de conversión de galactosa frente a tiempo para GalOx en reactores no instrumentados de 50 mL de volumen con aireación superficial. Condiciones de cada experimento: *Exp1*:  $4.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HRP, sin catalasa. *Exp2*:  $4.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HRP,  $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa. *Exp3*:  $4.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HRP,  $0.84 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa. *Exp4*:  $4.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , sin catalasa. *Exp5*:  $4.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa. *Exp6*:  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de enzima,  $0.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $0.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de catalasa.

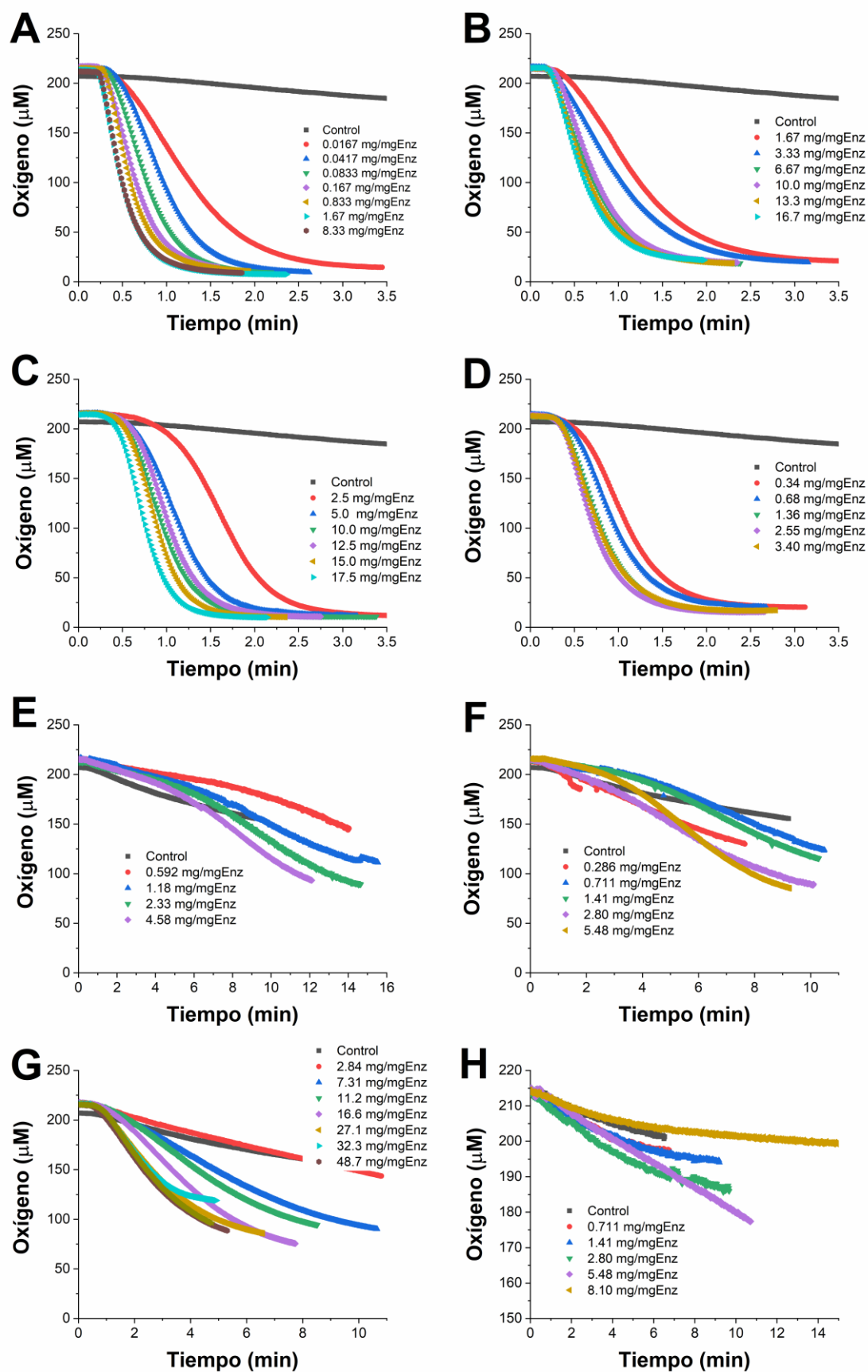
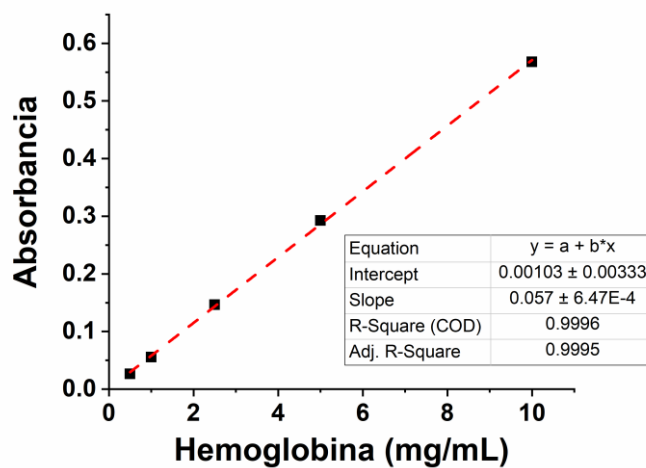
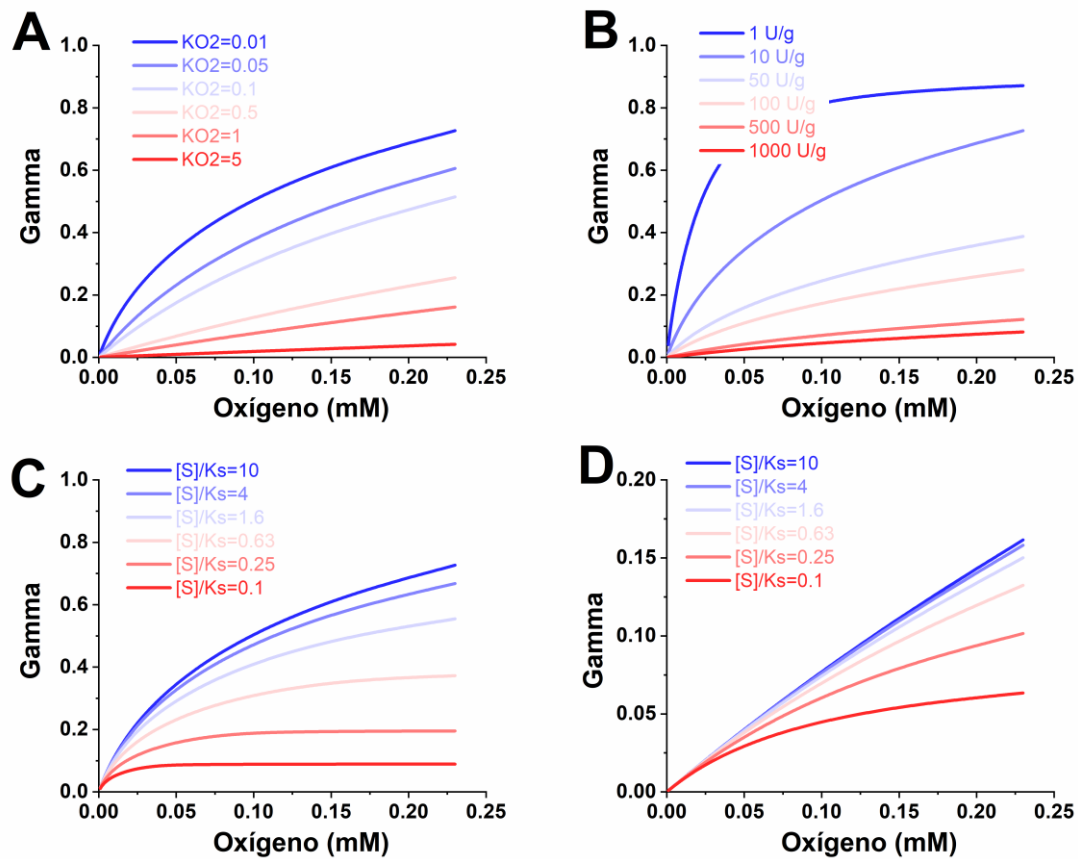


Figura 11.18. Perfiles de consumo de oxígeno de GalOx con diferentes activadores. Las reacciones se llevaron a cabo en viales de tanque agitado de 7 mL, con un volumen de

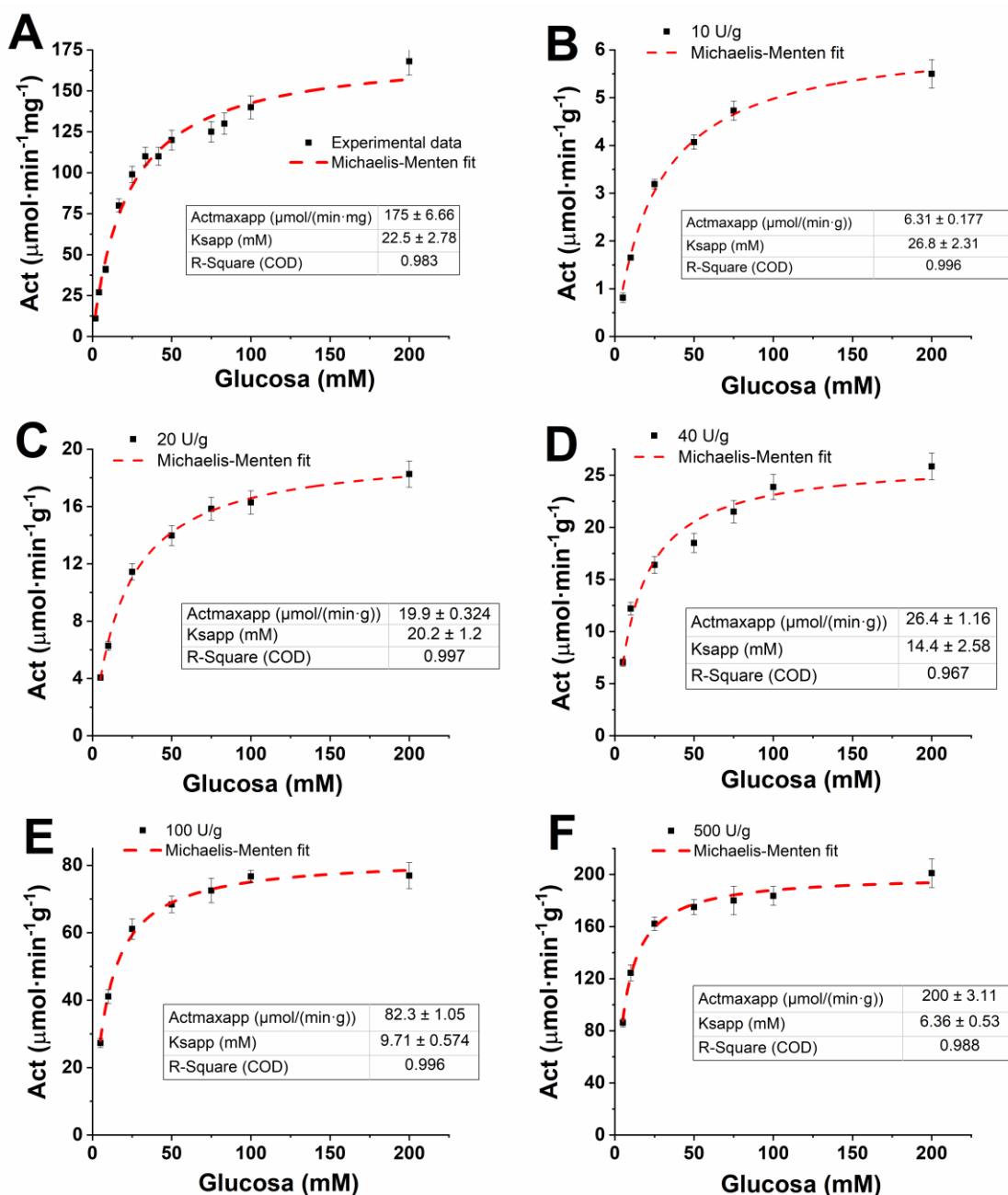
reacción variable de 5.1-5.6 mL. Condiciones de reacción: 250 mM de galactosa, 30°C de temperatura, agitación magnética de 250 rpm. *Panel A*:  $K_3Fe(CN)_6$ ; *Panel B*: HRP; *Panel C*: Hemoglobina; *Panel D*: Mioglobina; *Panel E*: Hemina; *Panel F*: Hematina; *Panel G*: Azul de Prusia (PB); *Panel H*: Porfina de Mn.



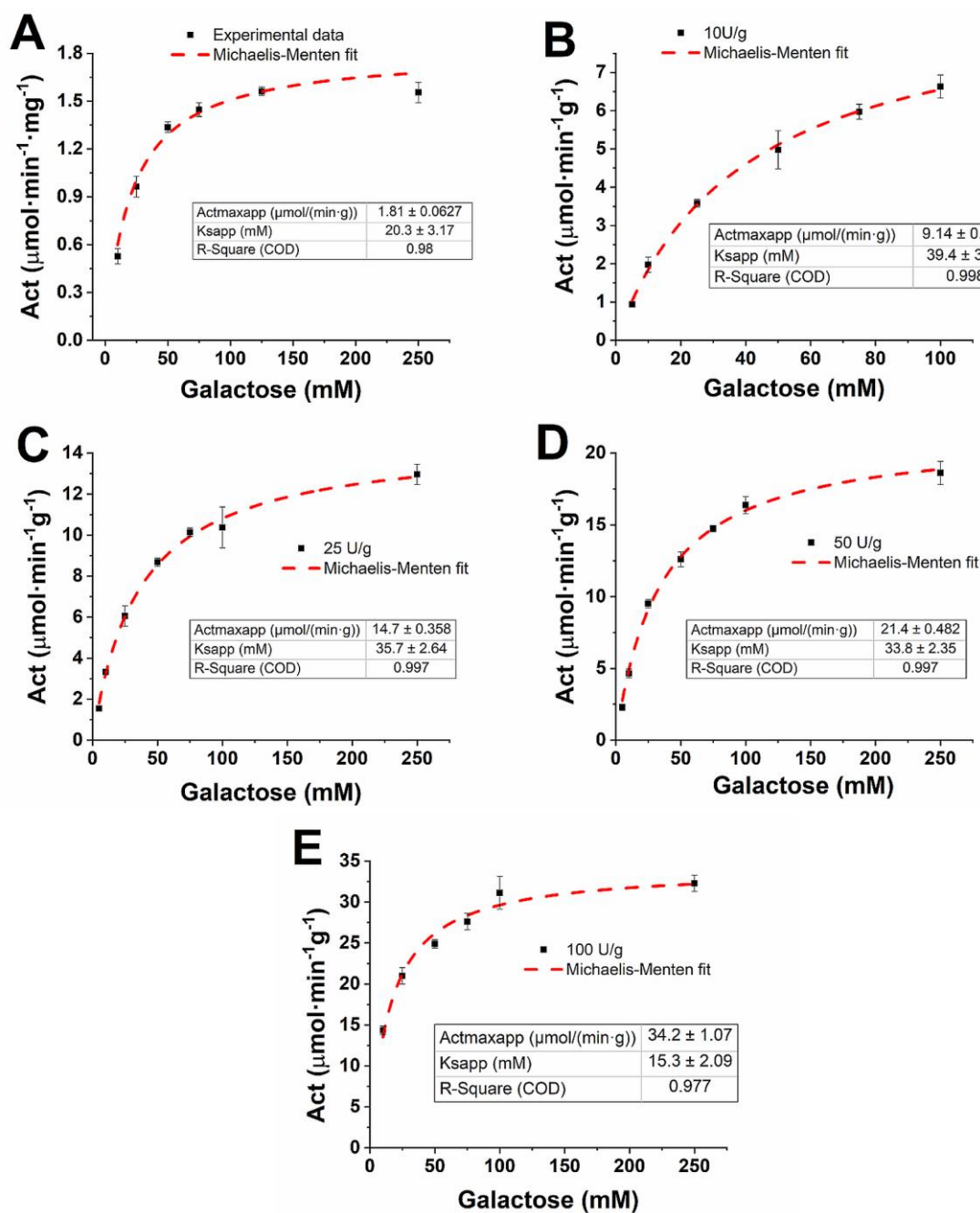
**Figura 11.19.** Recta de calibrado para la hemoglobina analizada en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.



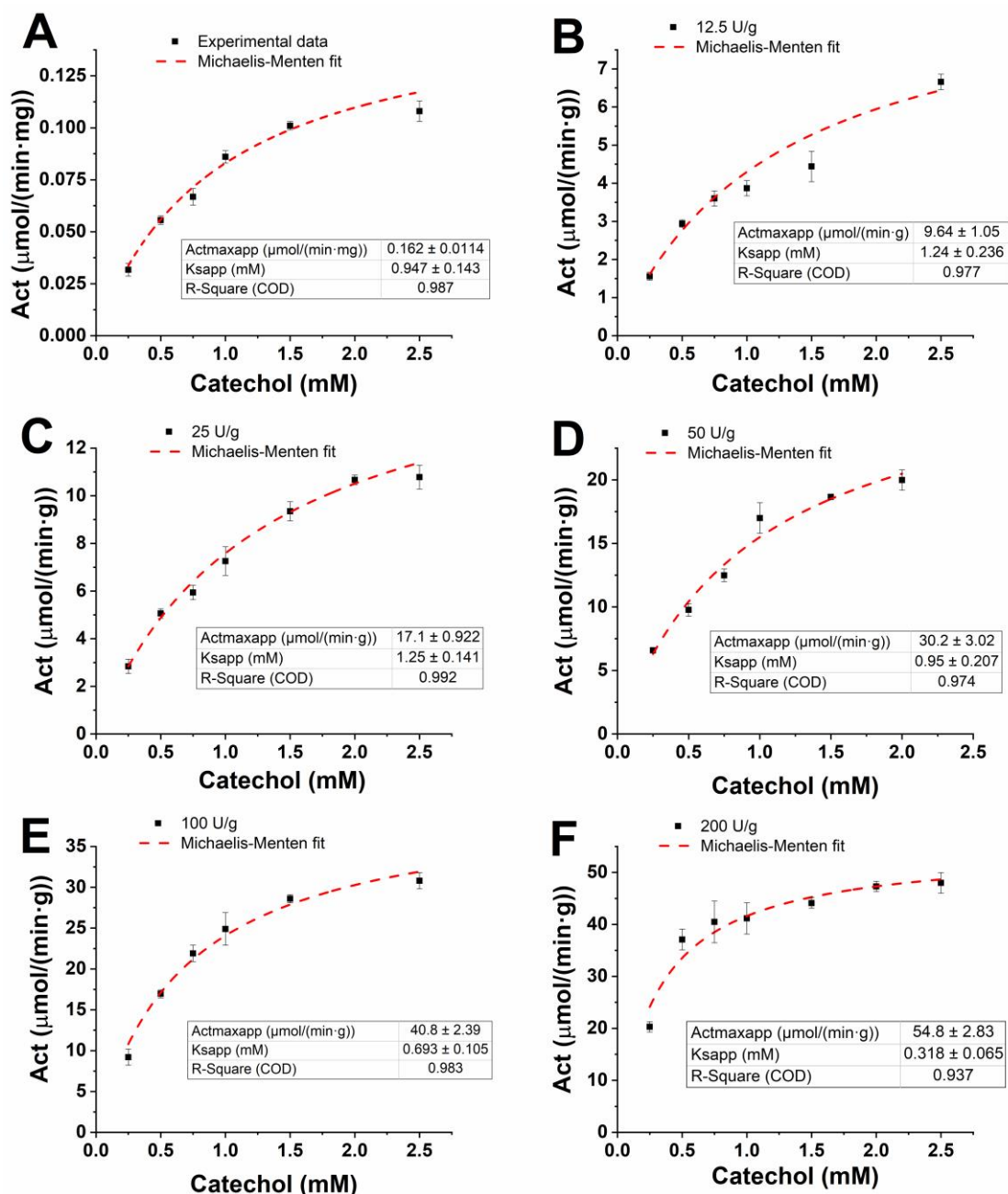
**Figura 11.20.** Relación entre la actividad observable y la actividad máxima (gamma), frente a la concentración de oxígeno (mM) a distintas condiciones. *Panel A:* Variando  $K_{O_2}$  (mM),  $Act_{maxImm}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $[S]/K_S=10$ ; *Panel B:* Variando  $Act_{maxImm}$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $K_{O_2}=0.01$  mM,  $[S]/K_S=10$ ; *Panel C:* Variando  $[S]/K_S$ ,  $K_{O_2}=0.01$ ,  $Act_{maxImm}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:* Variando  $[S]/K_S$ ,  $K_{O_2}=1.0$ ,  $Act_{maxImm}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Condiciones de la simulación:  $[O_2]_{inicial}=0.23$  mM,  $Act_{max}=100 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{enzyme}}^{-1}$ ,  $m_{cat}=0.1$  mg soporte/mL reactor,  $\text{radio de partícula}=75 \mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .



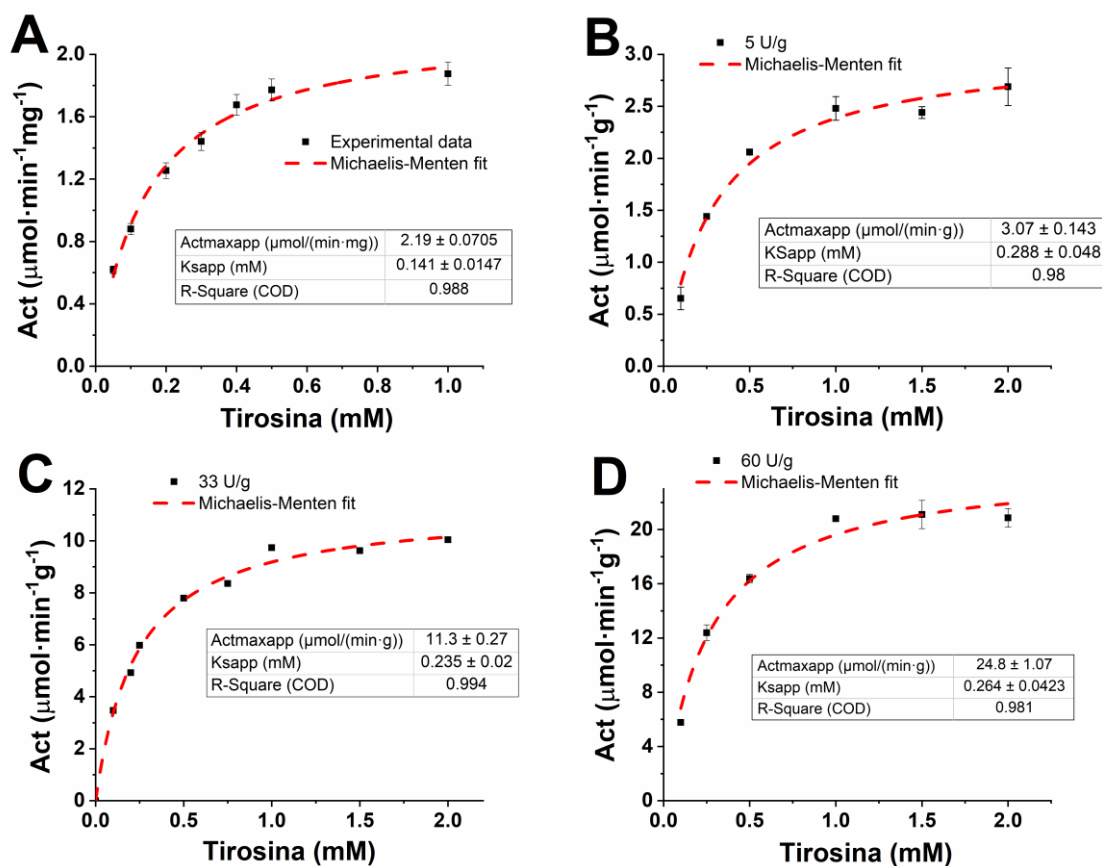
**Figura 11.21.** Análisis diferencial de la actividad de GOX inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) variando la concentración de glucosa (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* enzima libre; *Panel B:*  $6.7 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:*  $25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:*  $40 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel E:*  $100 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel F:*  $500 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



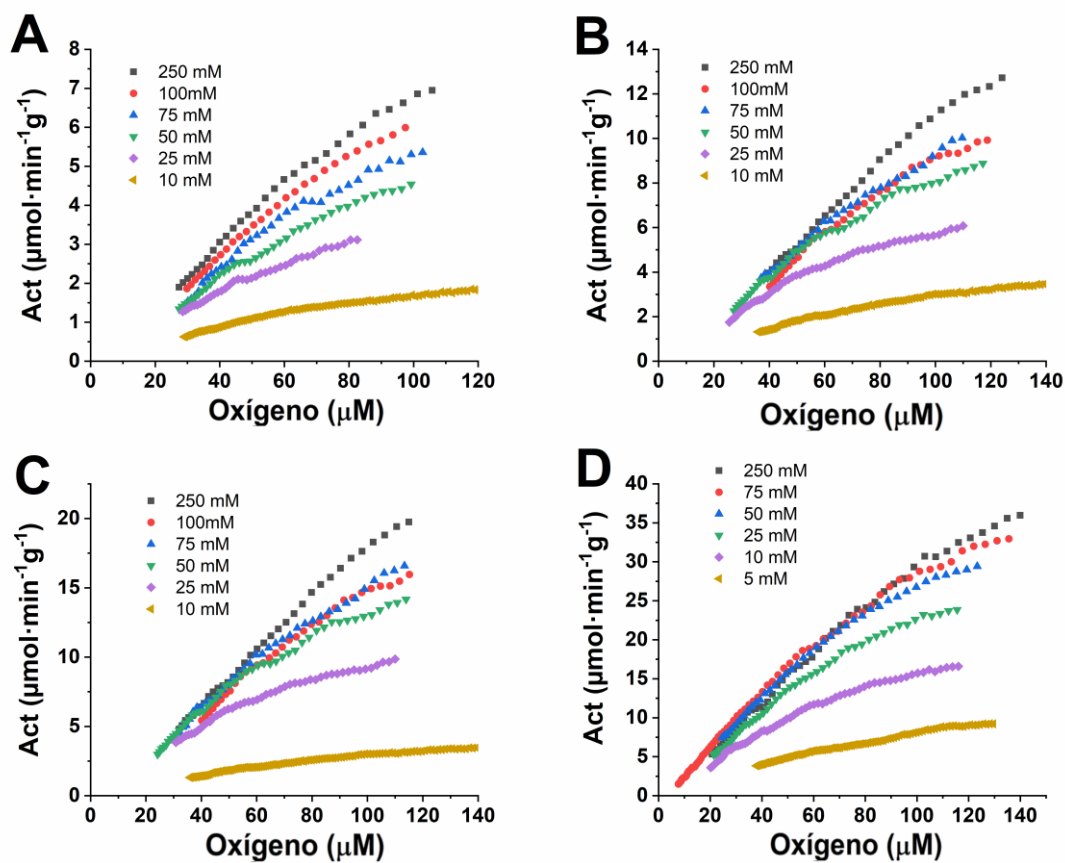
**Figura 11.22.** Análisis diferencial de la actividad de GalOx inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) variando la concentración de galactosa (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* enzima libre; *Panel B:* 10  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:* 25  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:* 50  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel E:* 100  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



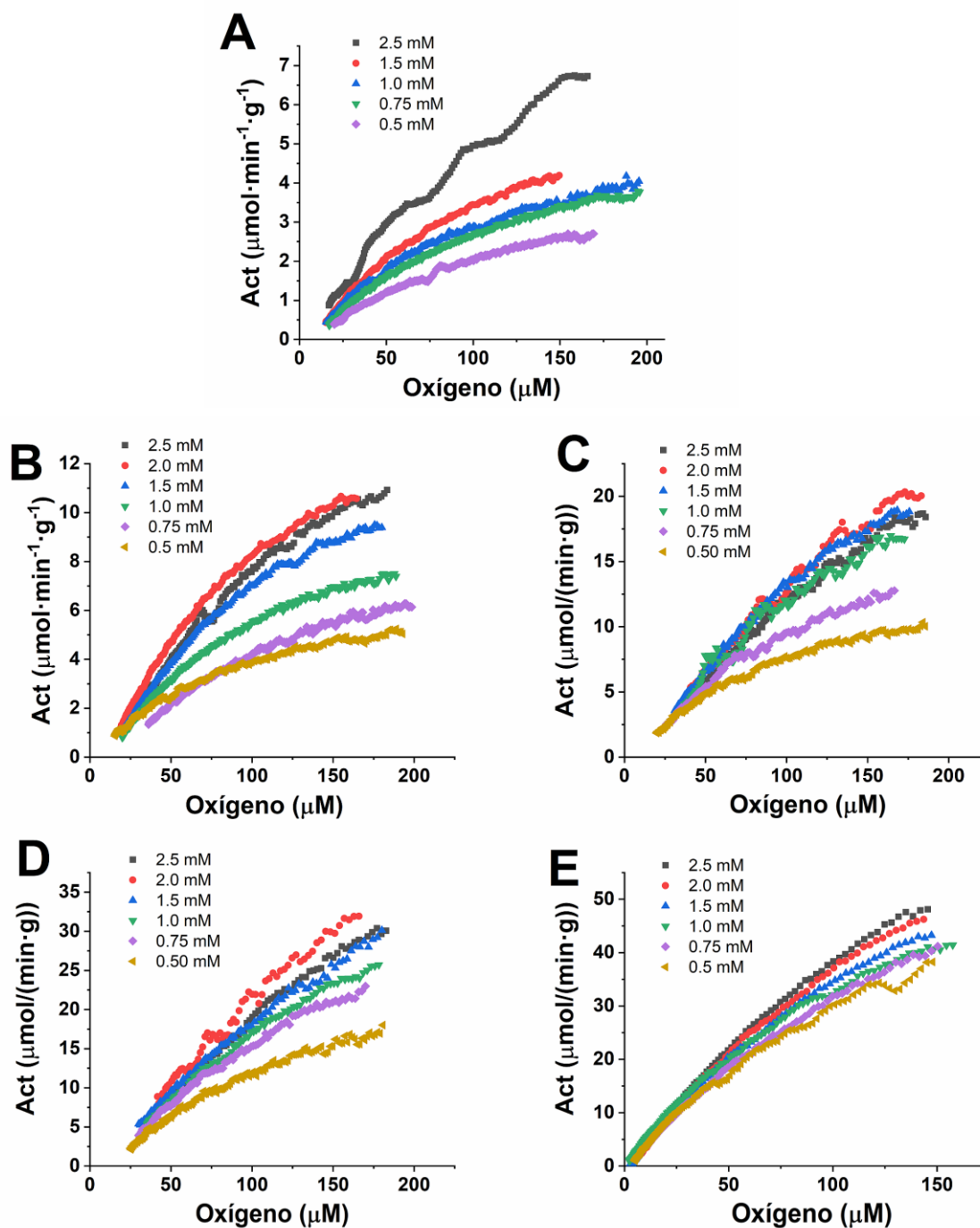
**Figura 11.23.** Análisis diferencial de la actividad de lacasa inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) variando la concentración de catecol (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* enzima libre; *Panel B:*  $12.5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:*  $25\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:*  $50\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel E:*  $100\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel F:*  $200\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



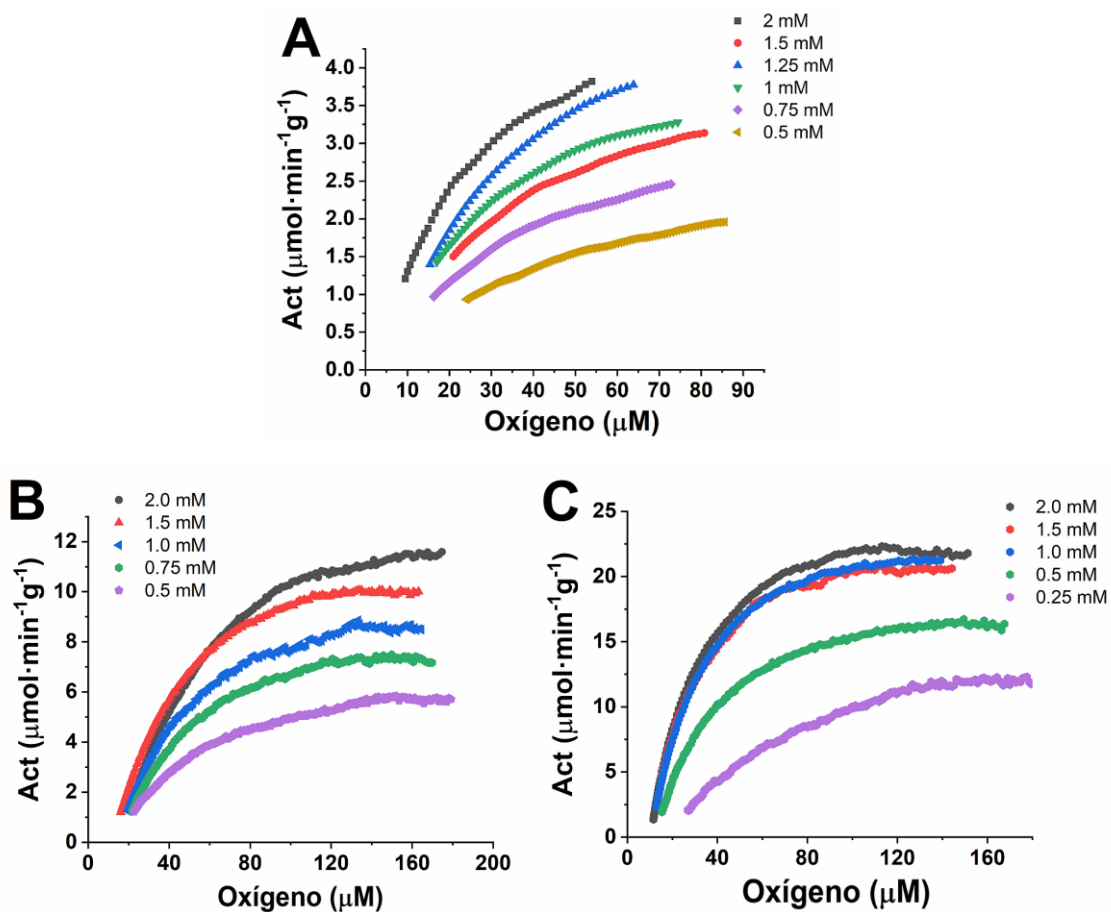
**Figura 11.24.** Análisis diferencial de la actividad de tirosinasa inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) variando la concentración de tirosina (mM) a distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* enzima libre; *Panel B:*  $5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:*  $33\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ , *Panel D:*  $60\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



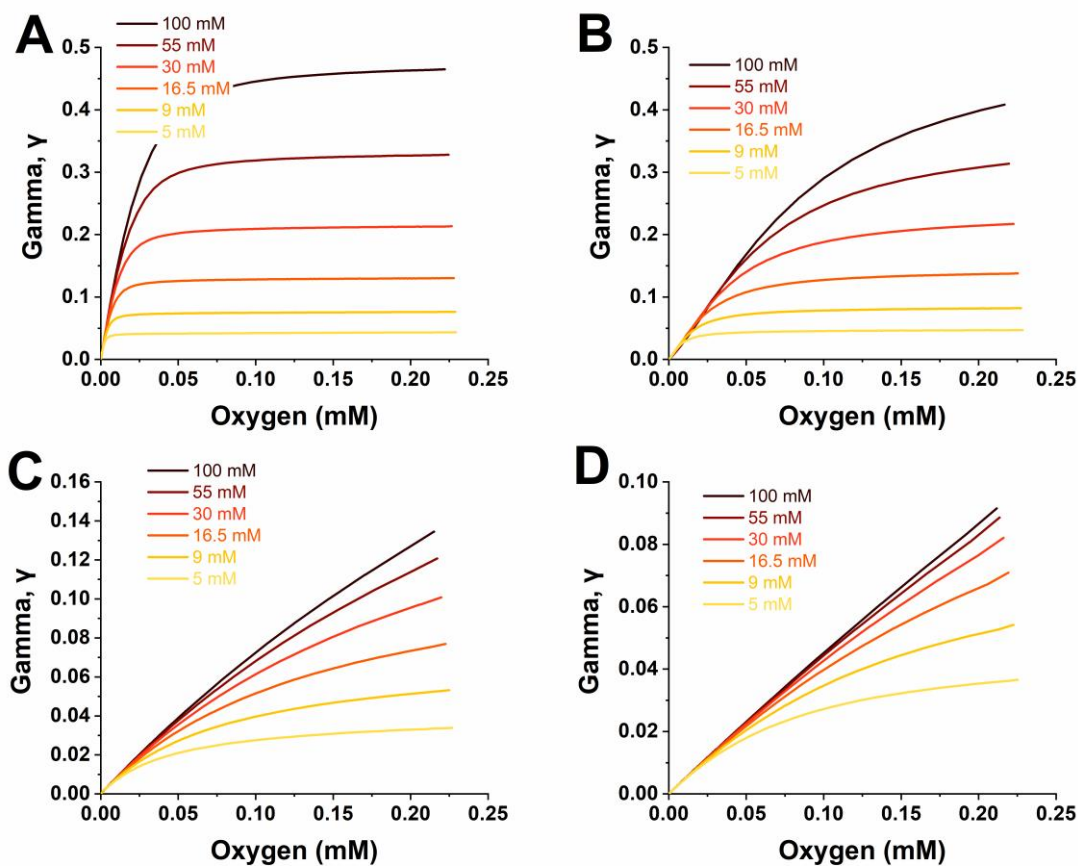
**Figura 11.25.** Análisis diferencial de la actividad de GalOx inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la concentración de oxígeno (mM) a varias [galactosa] y distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* 10 U·g<sup>-1</sup>; *Panel B:* 25 U·g<sup>-1</sup>; *Panel C:* 50 U·g<sup>-1</sup>, *Panel D:* 100 U·g<sup>-1</sup>.



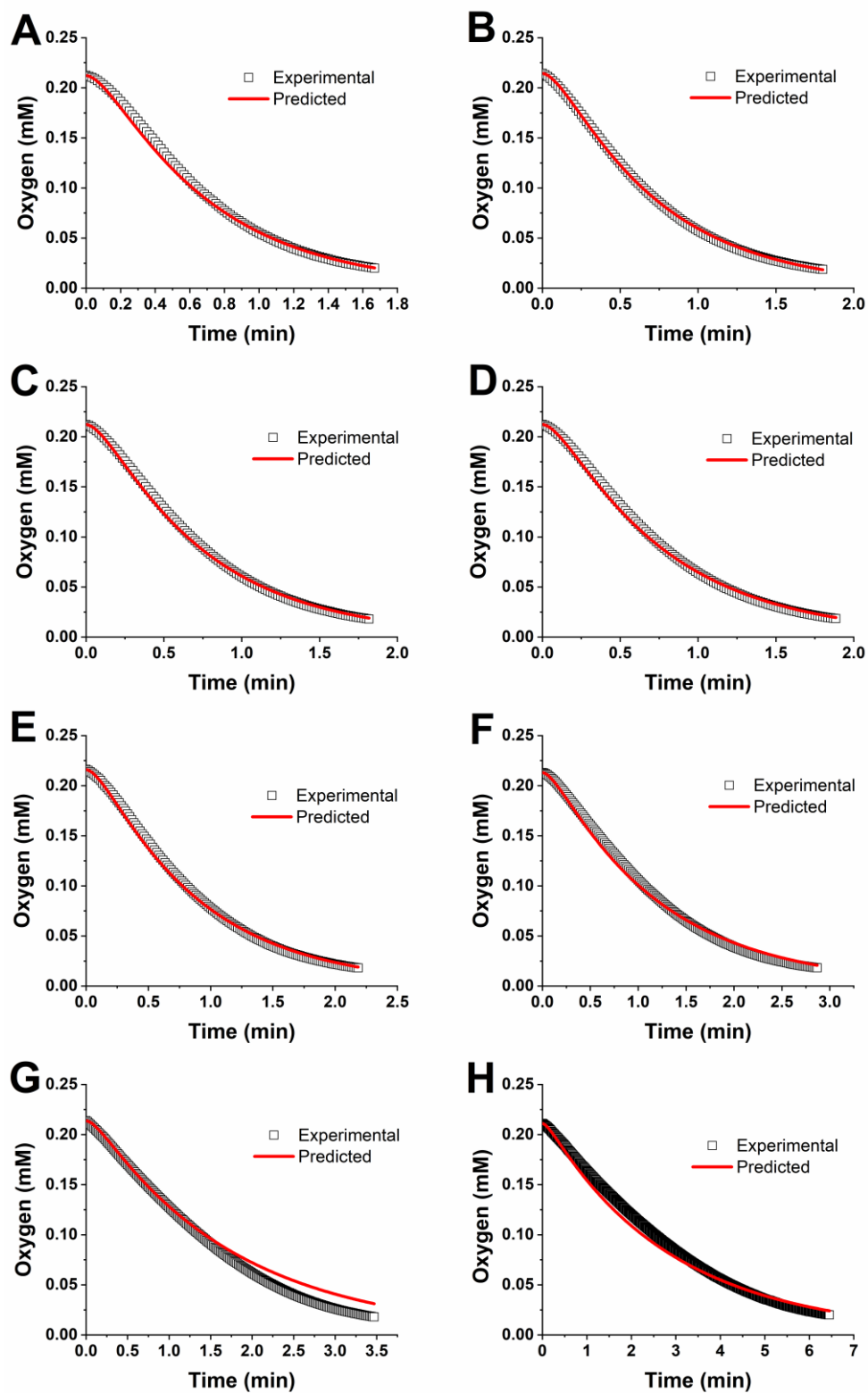
**Figura 11.26.** Análisis diferencial de la actividad de lacasa inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la concentración de oxígeno (mM) a varias [catecol] y distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:*  $12.5\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel B:*  $25\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:*  $50\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:*  $100\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel E:*  $200\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



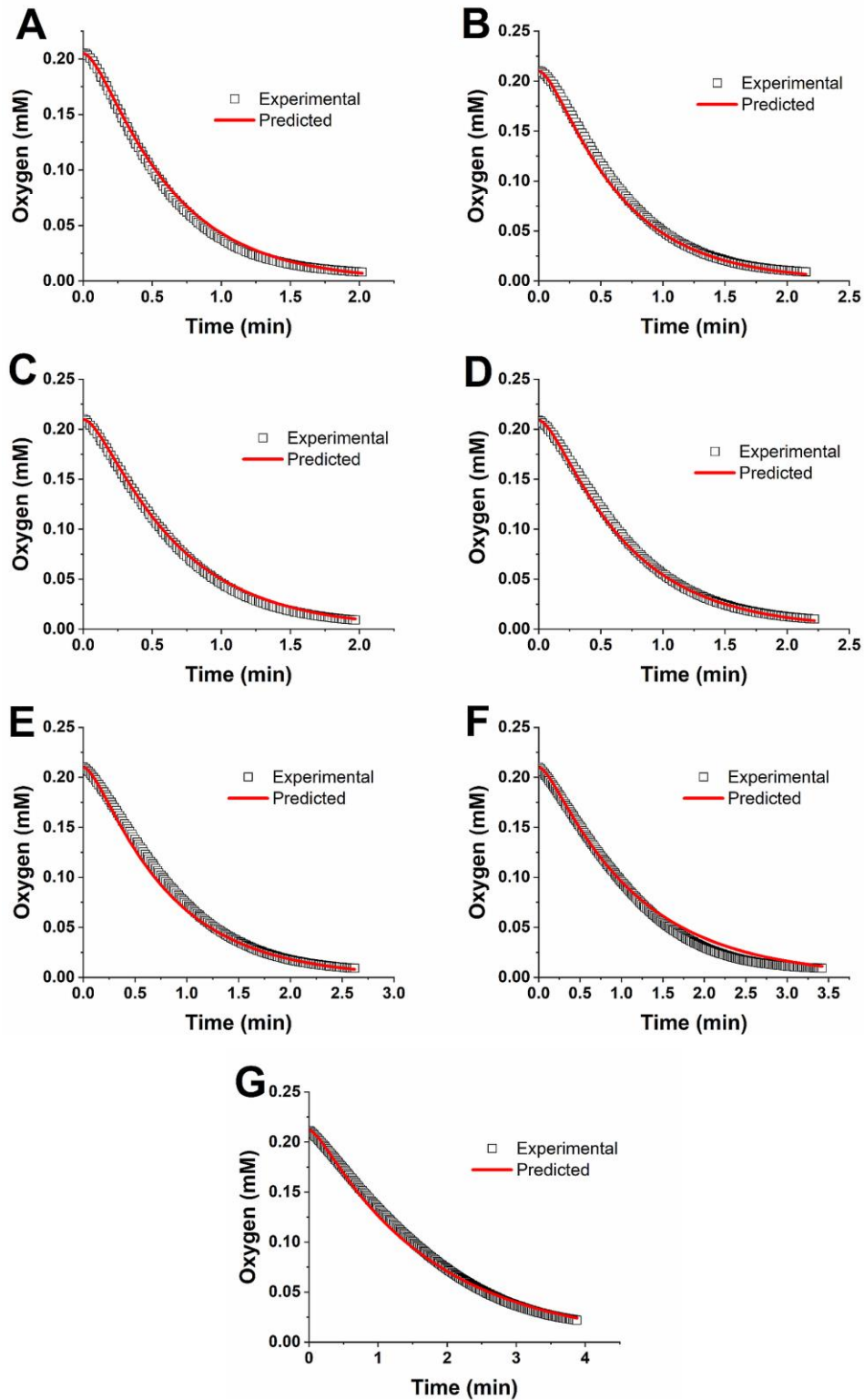
**Figura 11.27.** Análisis diferencial de la actividad de tirosinasa inmovilizada ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la concentración de oxígeno (mM) a varias [tirosina] y distintas actividades ofrecidas en cada panel. *Panel A:* 10  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel B:* 33  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:* 60  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ .



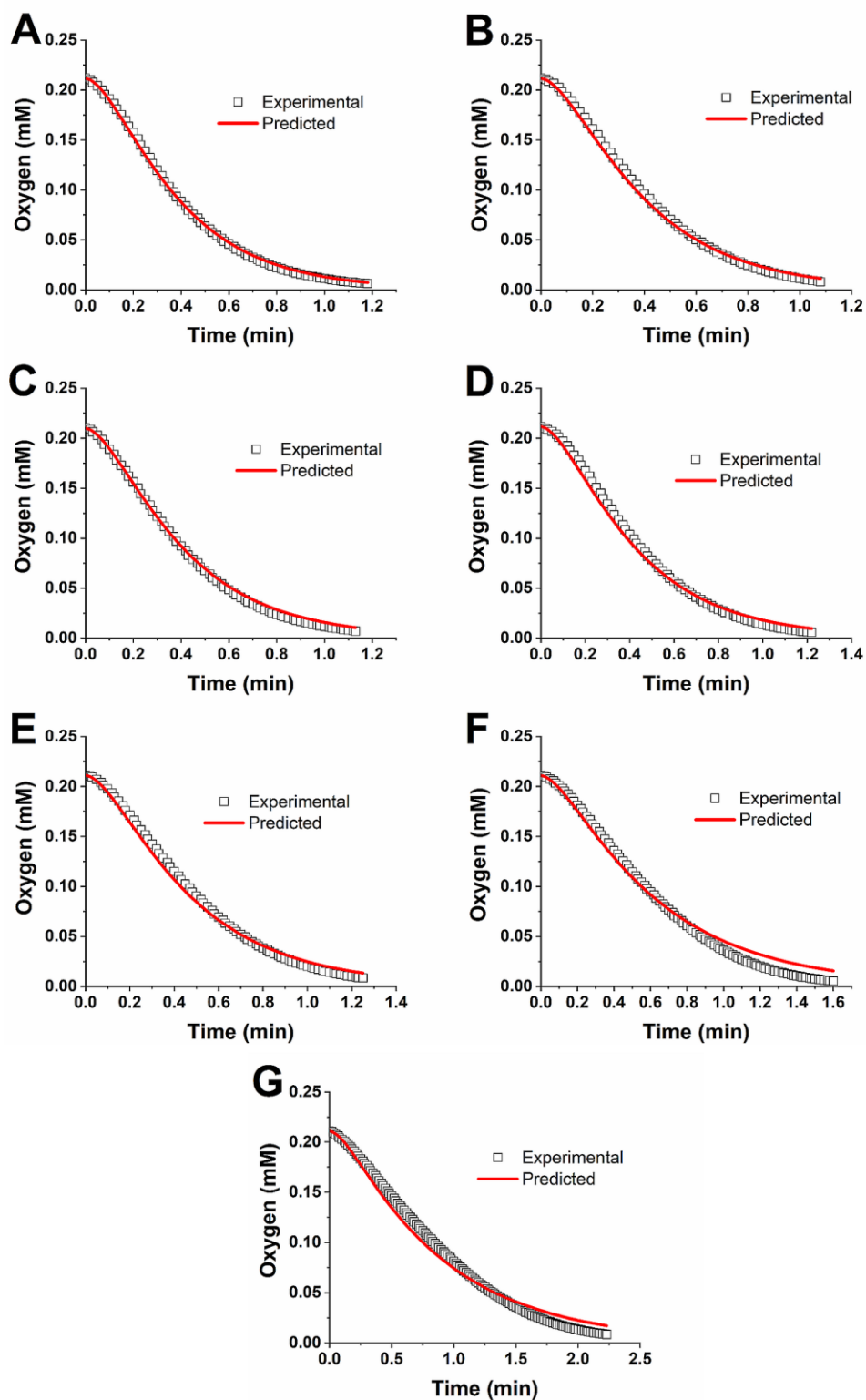
**Figura 11.28.** Relación entre la actividad observable y la actividad máxima ( $\gamma$ ), frente a concentración de oxígeno (mM) a distintas  $[S]_0$ . *Panel A:*  $K_{O_2}=0.01$  mM,  $Act_{maxImm}=1$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel B:*  $K_{O_2}=0.01$  mM,  $Act_{maxImm}=20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel C:*  $K_{O_2}=1.0$  mM,  $Act_{maxImm}=1$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ; *Panel D:*  $K_{O_2}=1.0$  mM,  $Act_{maxImm}=5$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Condiciones de la simulación:  $[O_2]_{inicial}=0.23$  mM,  $Act_{max}=100$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{enzyme}}^{-1}$ ,  $K_S=100$  mM,  $\text{radio de partícula}=75$   $\mu\text{m}$ ,  $Deff_{O_2}=300$   $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .



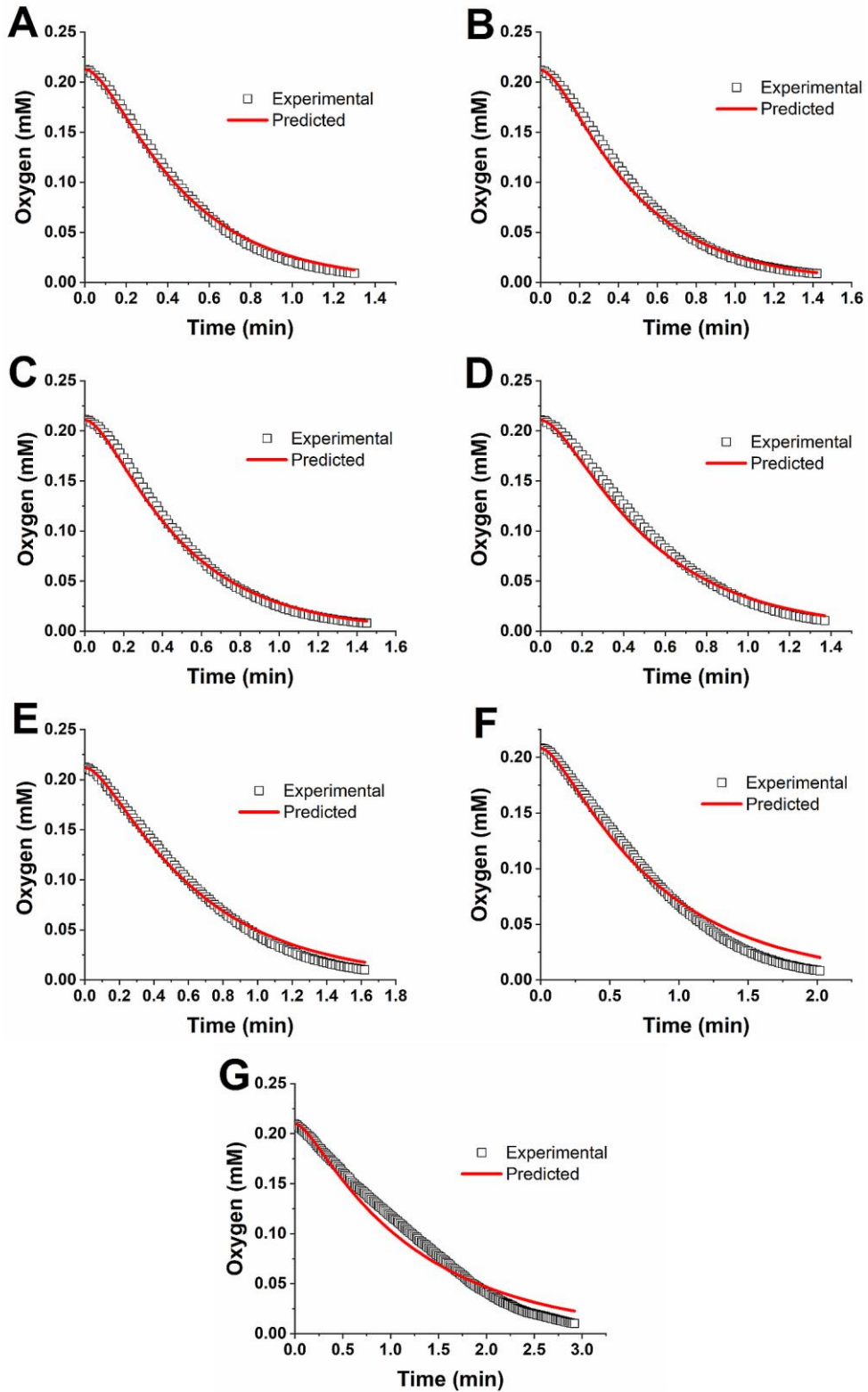
**Figura 11.29.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX inmovilizada con 20 U·g<sup>-1</sup> de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 200 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM; *Panel G:* 5 mM; *Panel H:* 2.5 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.30.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX inmovilizada con  $40 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas  $[\text{glucosa}]$ . *Panel A:* 200 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM; *Panel G:* 5 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.31.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX inmovilizada con 100 U·g<sup>-1</sup> de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 200 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM; *Panel G:* 5 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



**Figura 11.32.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX inmovilizada con 200 U·g<sup>-1</sup> de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. *Panel A:* 100 mM; *Panel B:* 75 mM; *Panel C:* 50 mM; *Panel D:* 25 mM; *Panel E:* 10 mM; *Panel F:* 5 mM; *Panel G:* 5 mM.

F: 5 mM; Panel G: 2.5 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).

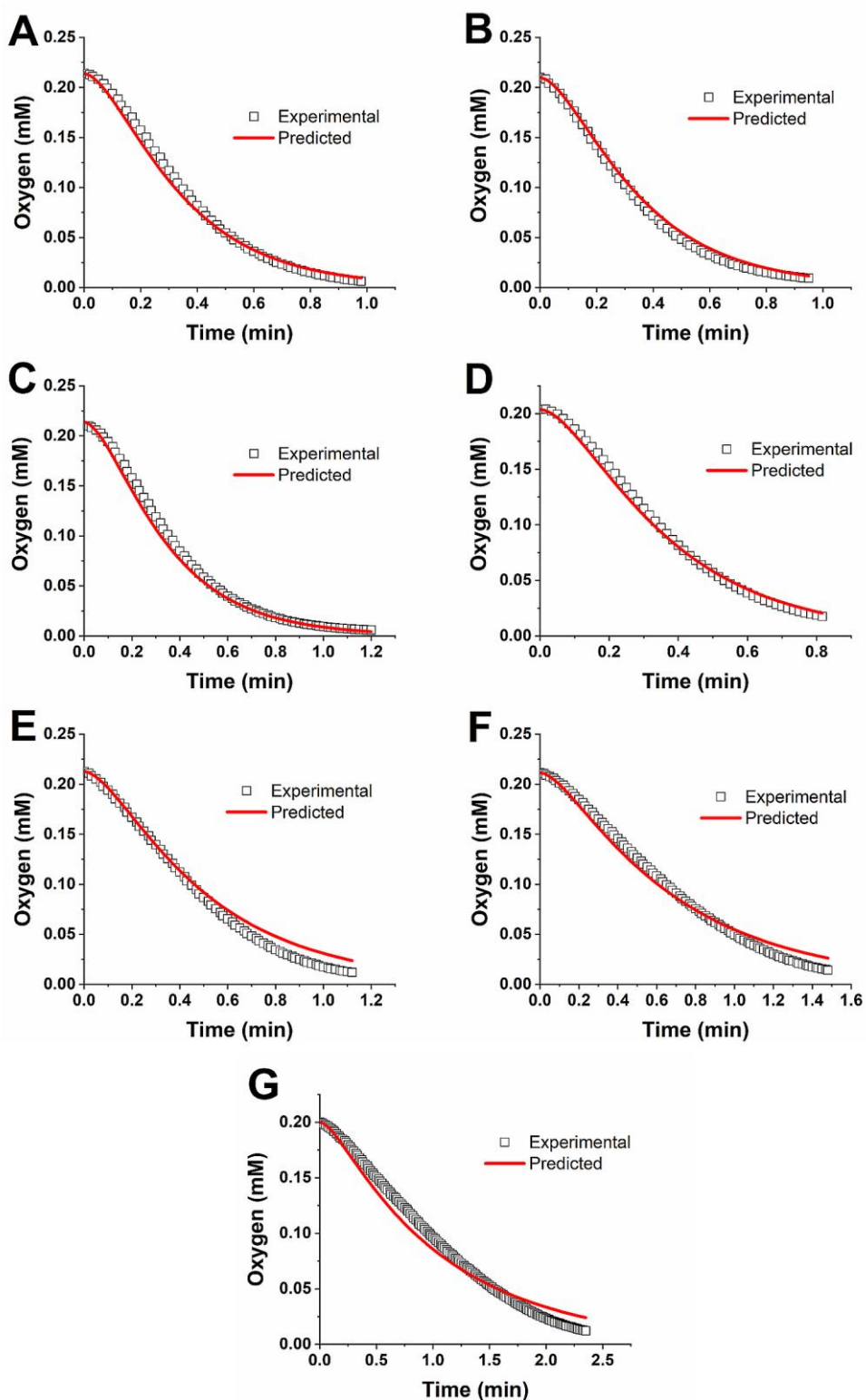
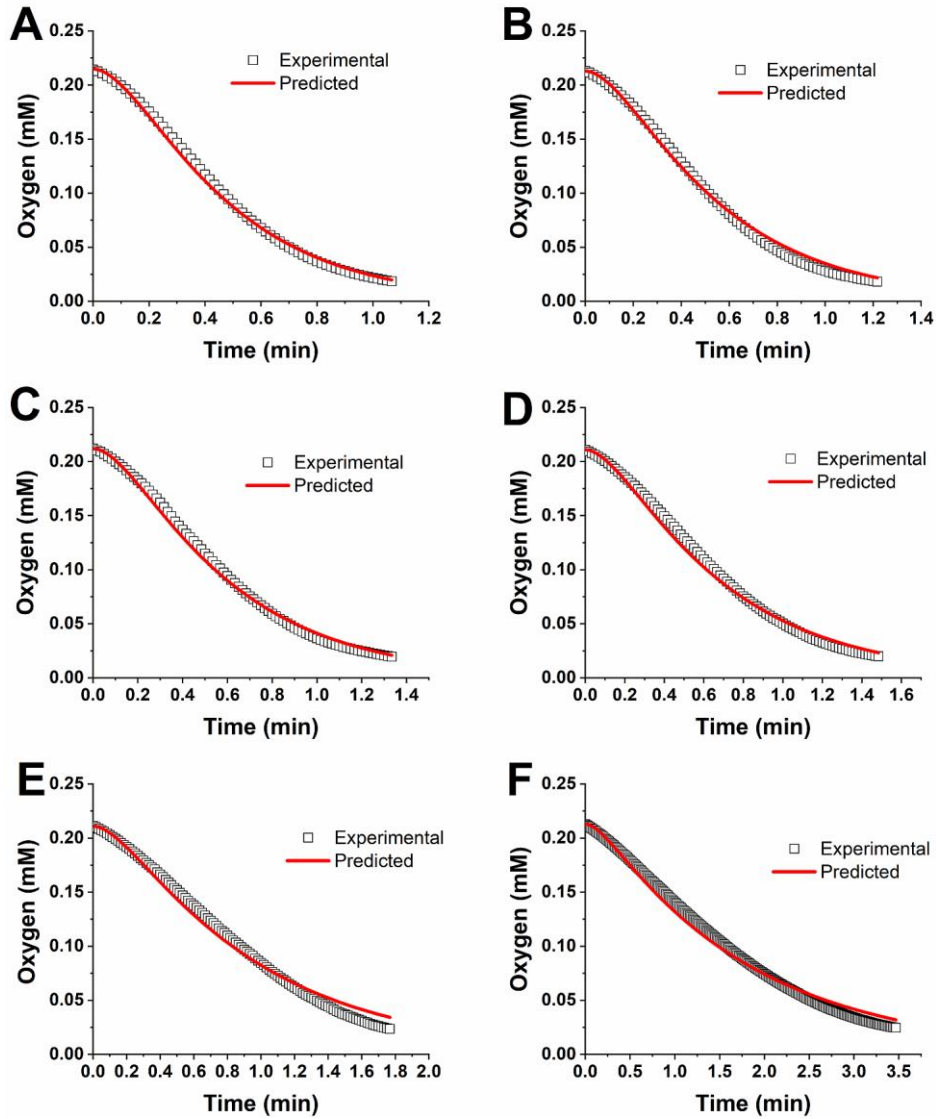
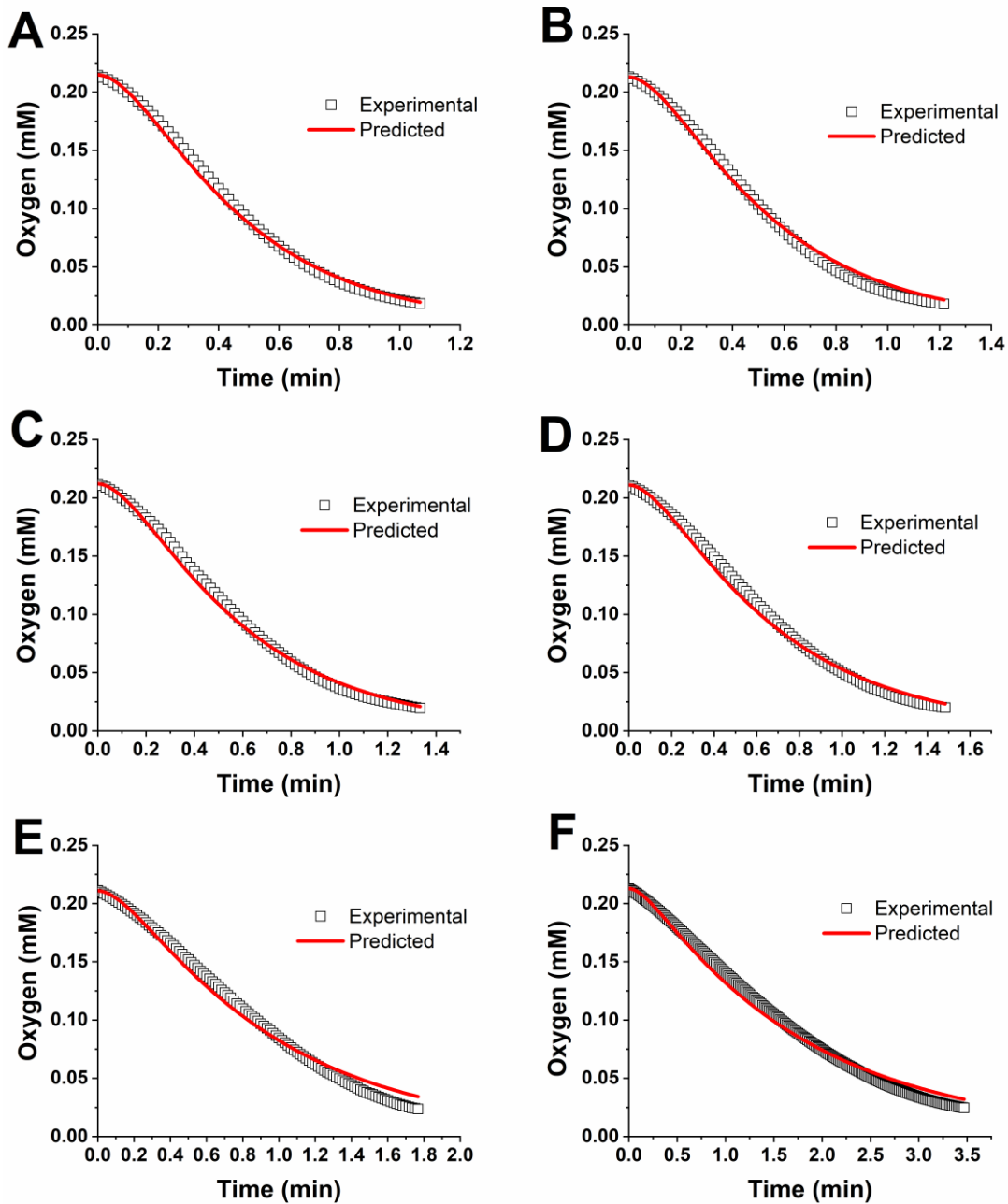


Figura 11.33. Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GOX inmovilizada con  $500 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [glucosa]. Panel

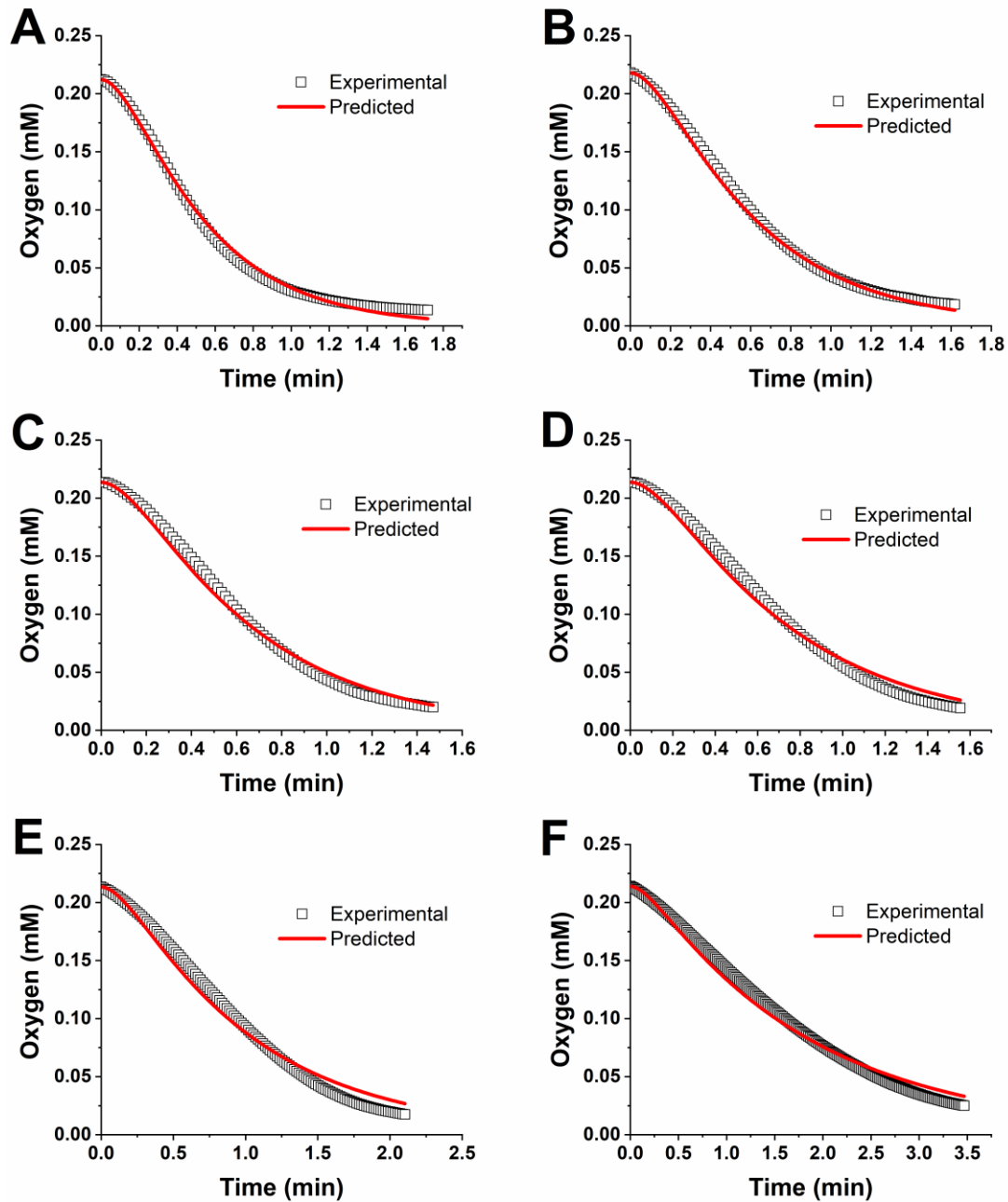
A: 200 mM; Panel B: 100 mM; Panel C: 75 mM; Panel D: 50 mM; Panel E: 25 mM; Panel F: 10 mM; Panel G: 5 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



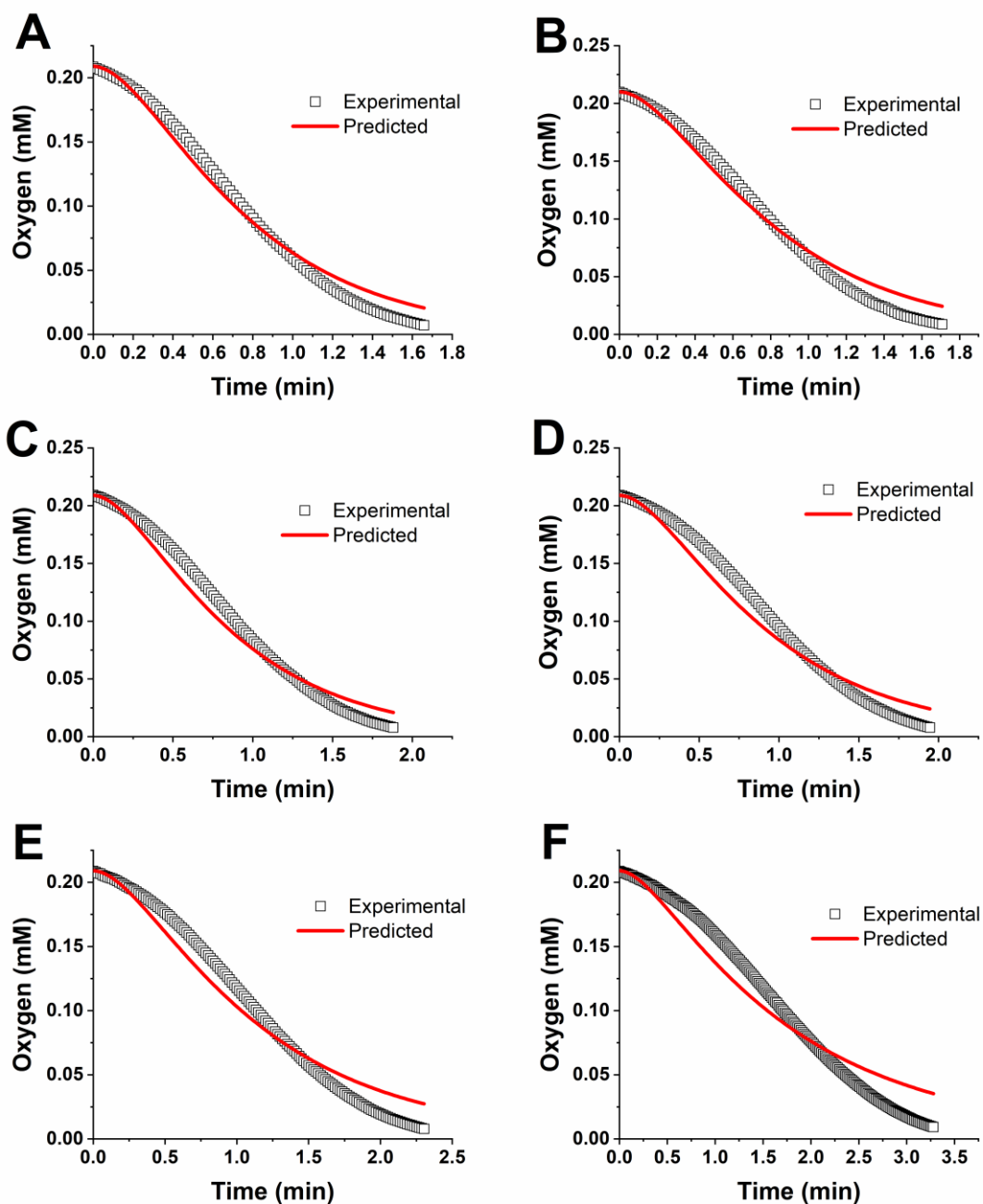
**Figura 11.34.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GalOx inmovilizada con  $10 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. Panel A: 250 mM; Panel B: 100 mM; Panel C: 75 mM; Panel D: 50 mM; Panel E: 25 mM; Panel F: 10 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



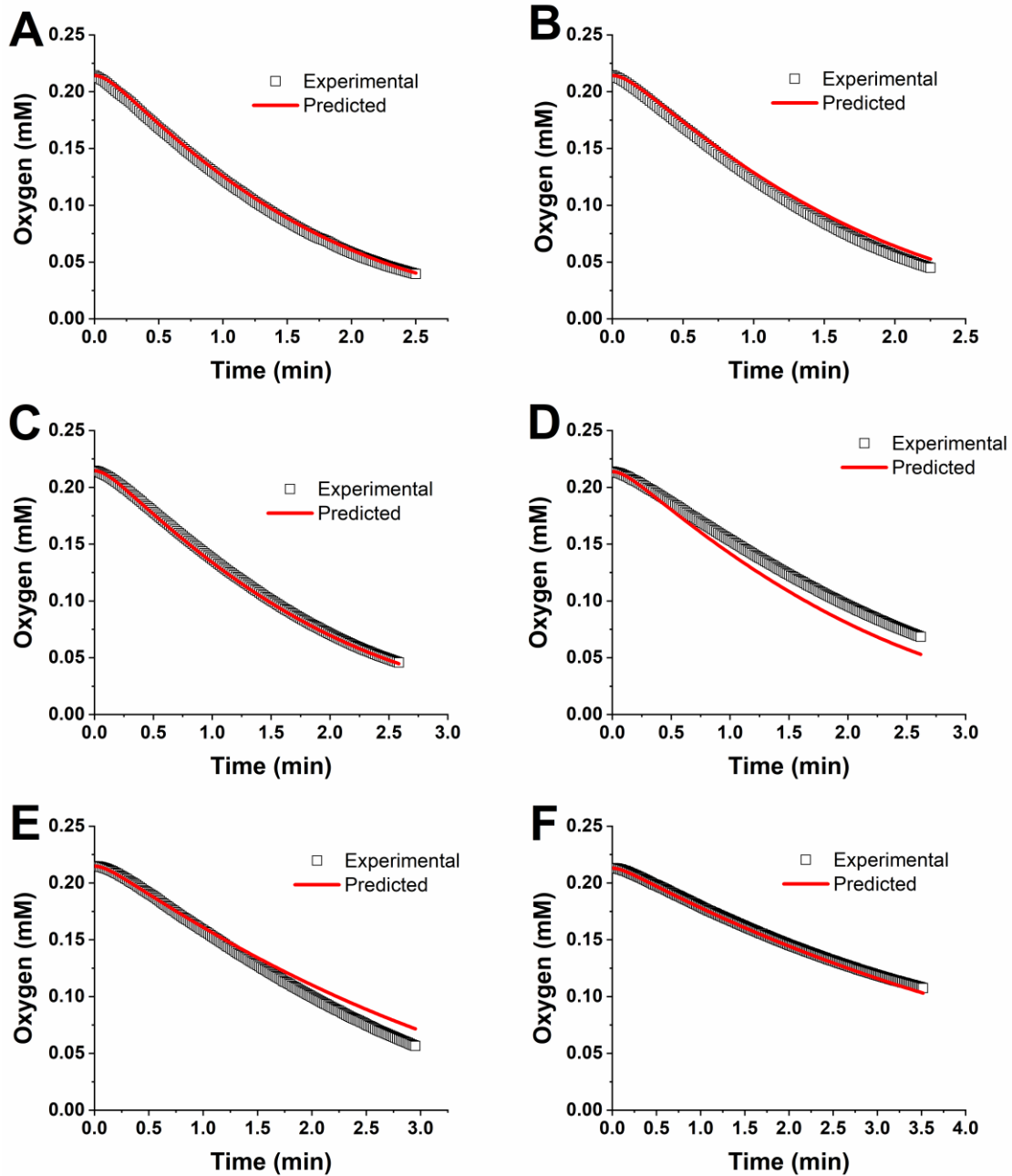
**Figura 11.35.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GalOx inmovilizada con  $25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 250 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



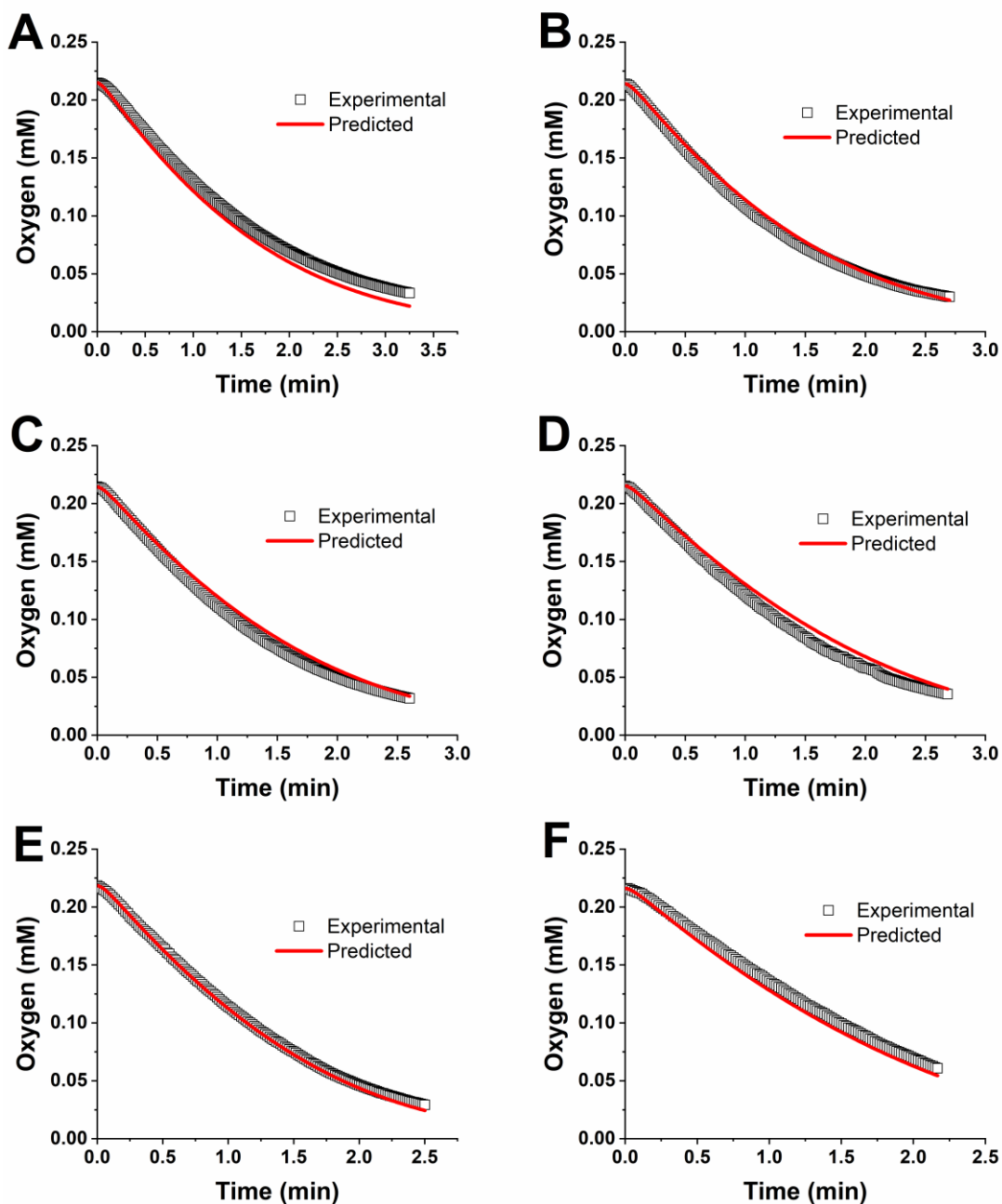
**Figura 11.36.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GalOx inmovilizada con  $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 250 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



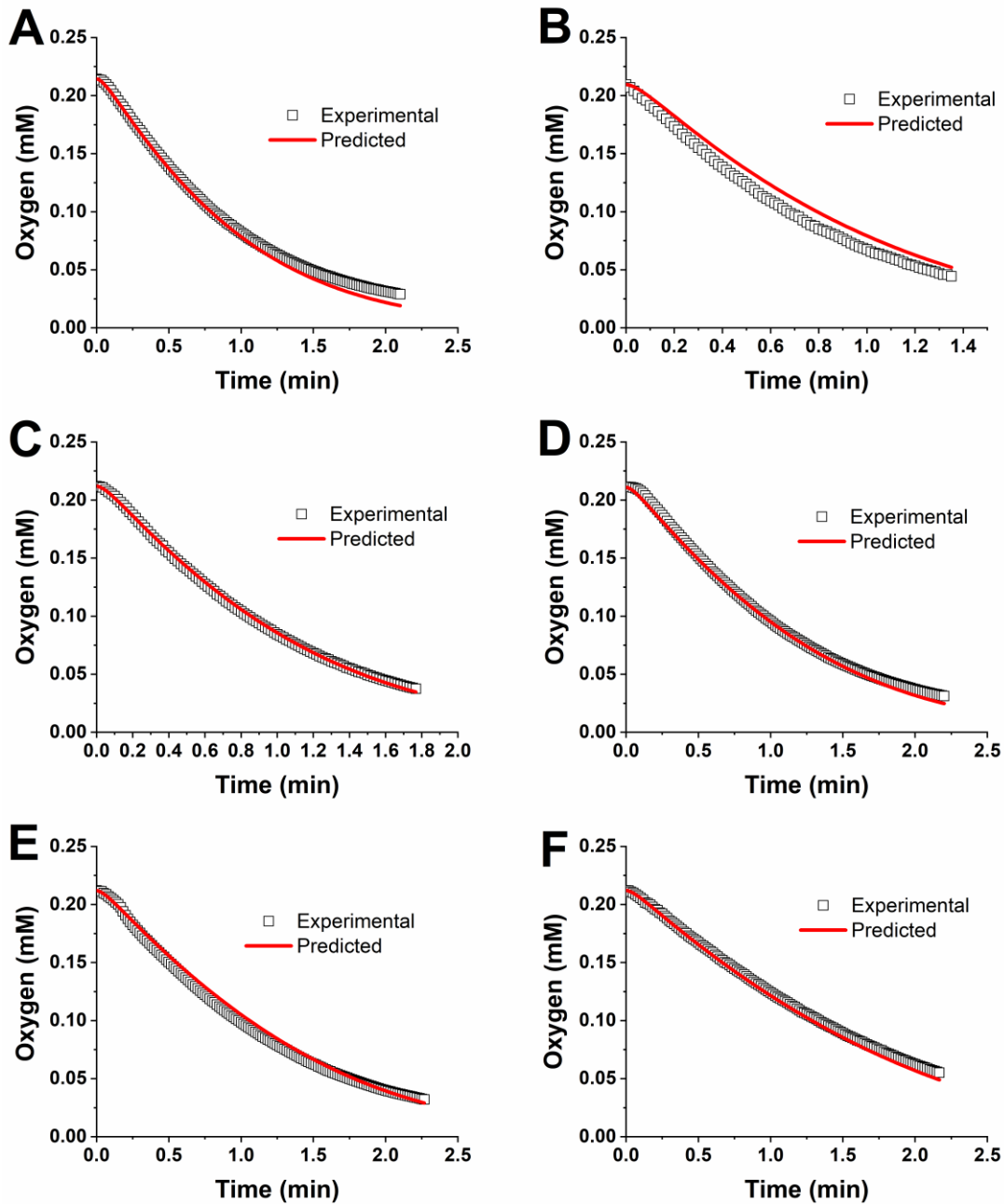
**Figura 11.37.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para GalOx inmovilizada con  $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [galactosa]. *Panel A:* 250 mM; *Panel B:* 100 mM; *Panel C:* 75 mM; *Panel D:* 50 mM; *Panel E:* 25 mM; *Panel F:* 10 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



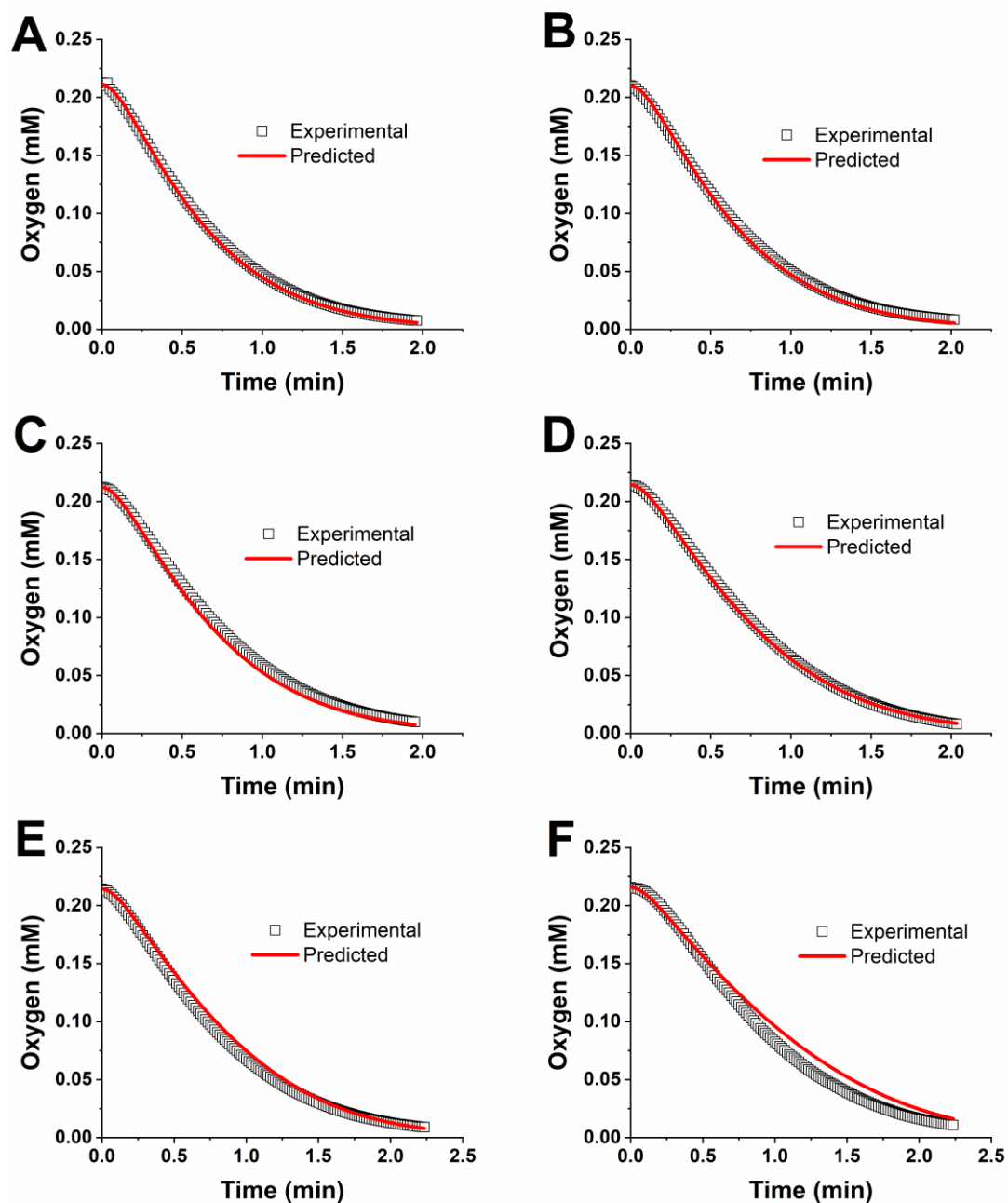
**Figura 11.38.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para lacasa inmovilizada con  $25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas  $[\text{catecol}]$ . *Panel A:* 2.5 mM; *Panel B:* 2.0 mM; *Panel C:* 1.5 mM; *Panel D:* 1.0 mM; *Panel E:* 0.75 mM; *Panel F:* 0.50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



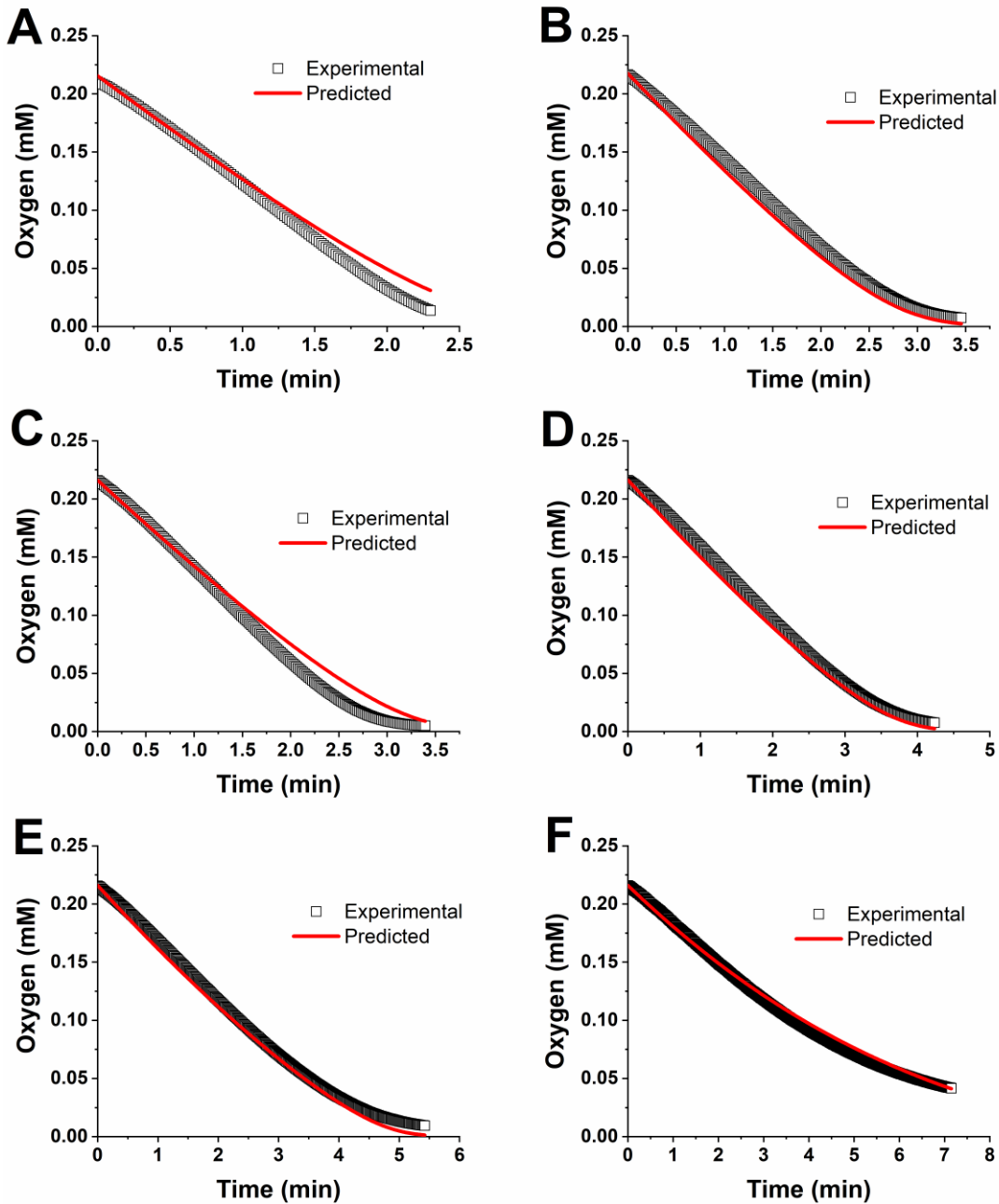
**Figura 11.39.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para lacasa inmovilizada con  $50 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas  $[\text{catecol}]$ . *Panel A:* 2.5 mM; *Panel B:* 2.0 mM; *Panel C:* 1.5 mM; *Panel D:* 1.0 mM; *Panel E:* 0.75 mM; *Panel F:* 0.50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



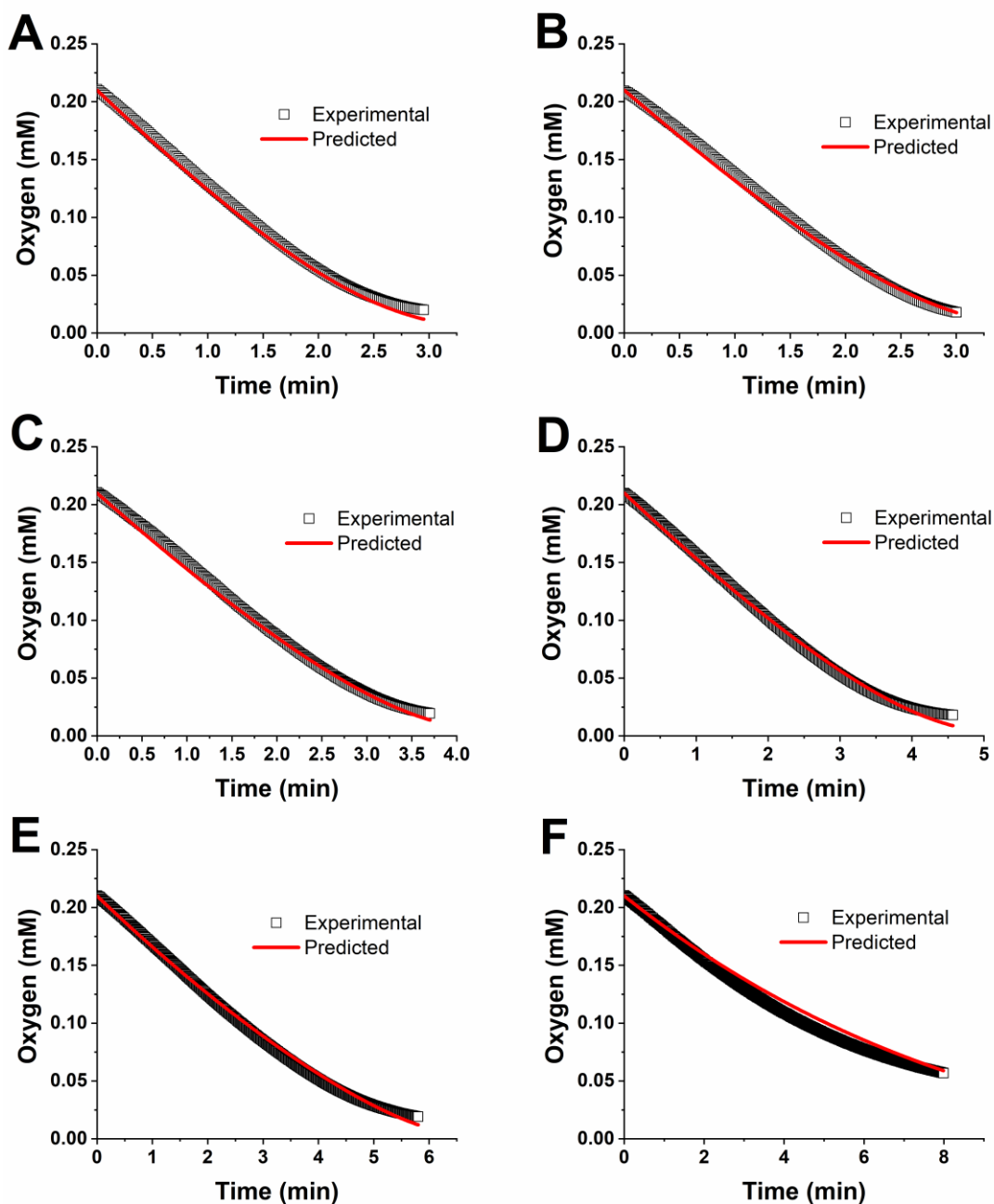
**Figura 11.40.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para lacasa inmovilizada con  $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas  $[\text{catecol}]$ . *Panel A:* 2.5 mM; *Panel B:* 2.0 mM; *Panel C:* 1.5 mM; *Panel D:* 1.0 mM; *Panel E:* 0.75 mM; *Panel F:* 0.50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



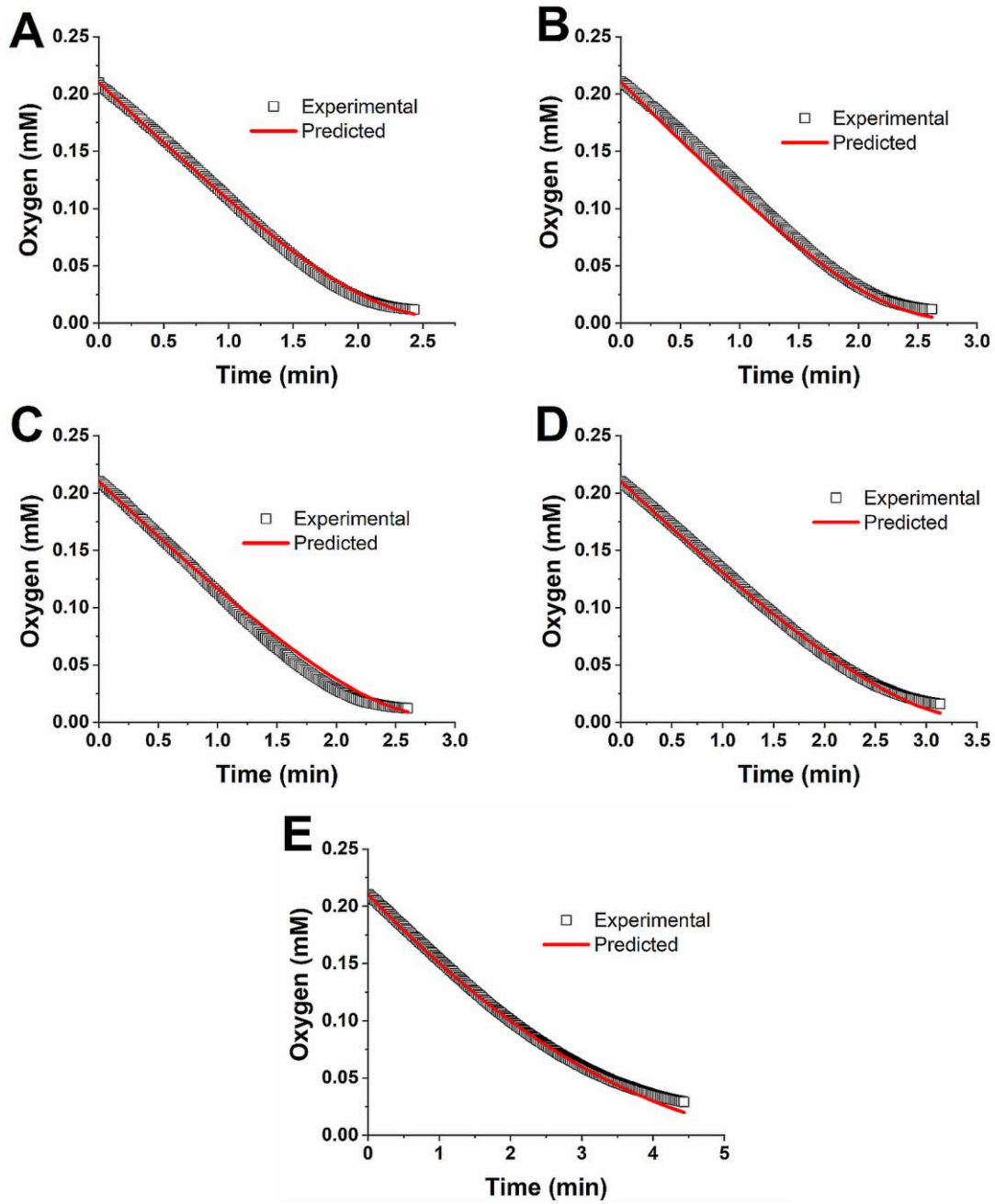
**Figura 11.41.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para lacasa inmovilizada con  $200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas  $[\text{catecol}]$ . *Panel A:* 2.5 mM; *Panel B:* 2.0 mM; *Panel C:* 1.5 mM; *Panel D:* 1.0 mM; *Panel E:* 0.75 mM; *Panel F:* 0.50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



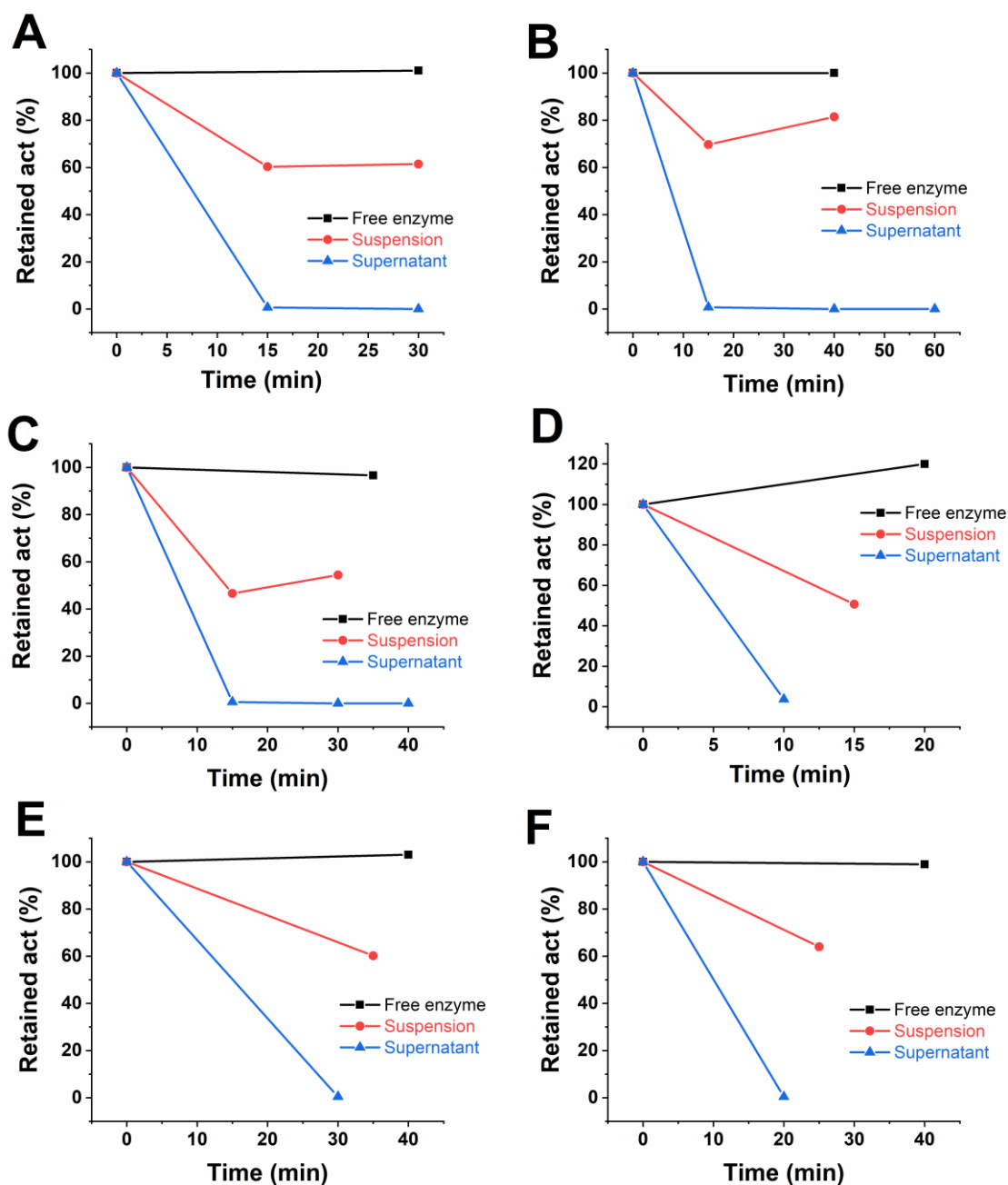
**Figura 11.42.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para tirosinasa inmovilizada con  $10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [tirosina]. *Panel A:* 2.0 mM; *Panel B:* 1.5 mM; *Panel C:* 1.0 mM; *Panel D:* 0.75 mM; *Panel E:* 0.50 mM; *Panel F:* 0.25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



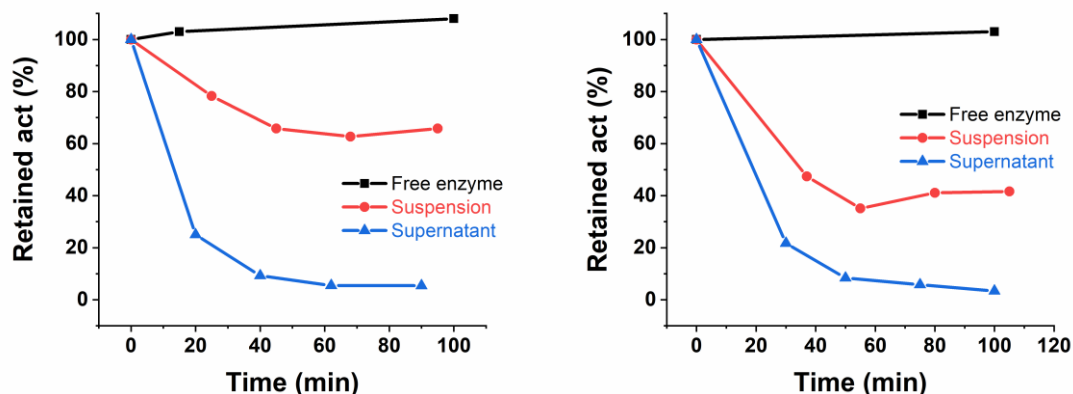
**Figura 11.43.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para tirosinasa inmovilizada con  $33 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [tirosina]. *Panel A:* 2.0 mM; *Panel B:* 1.5 mM; *Panel C:* 1.0 mM; *Panel D:* 0.75 mM; *Panel E:* 0.50 mM; *Panel F:* 0.25 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



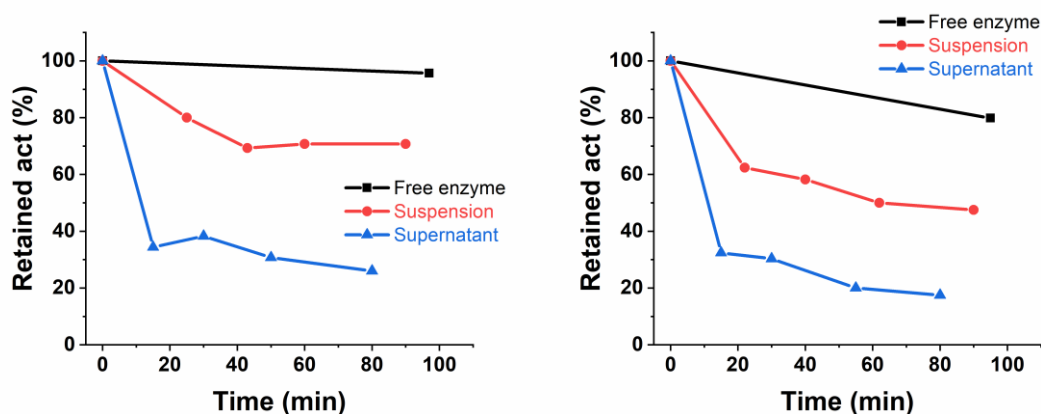
**Figura 11.44.** Análisis integral de múltiple respuesta con Aspen para tirosinasa inmovilizada con  $60 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida. Cada panel corresponde a distintas [tirosina]. *Panel A:* 2.0 mM; *Panel B:* 1.5 mM; *Panel C:* 1.0 mM; *Panel D:* 0.75 mM; *Panel E:* 0.50 mM. Datos experimentales (puntos cuadrados), datos simulados (línea roja).



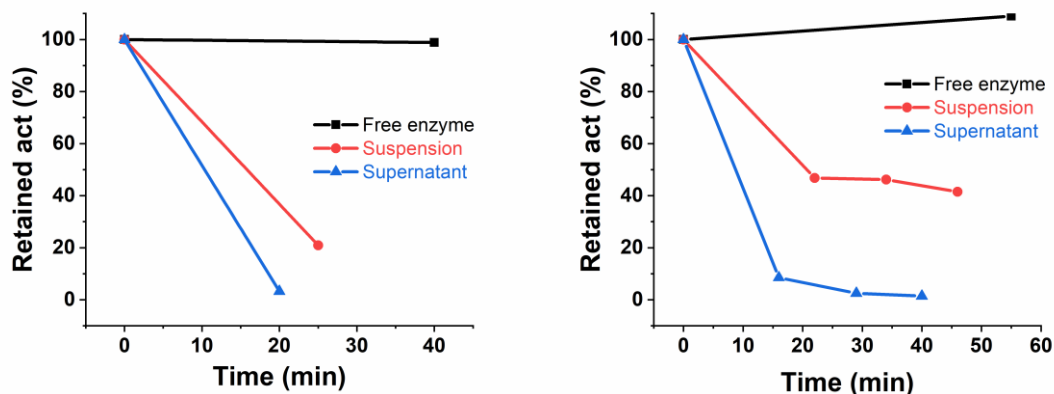
**Figura 11.45.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre Gly-Ag. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) a tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo. La actividad recuperada en suspensión disminuye aún más después de la etapa de reducción. Cada panel muestra una actividad ofrecida diferente ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). *Panel A:* 44.3; *Panel B:* 40.2; *Panel C:* 38.6; *Panel D:* 43.4; *Panel E:* 49.5; *Panel F:* 60.0.



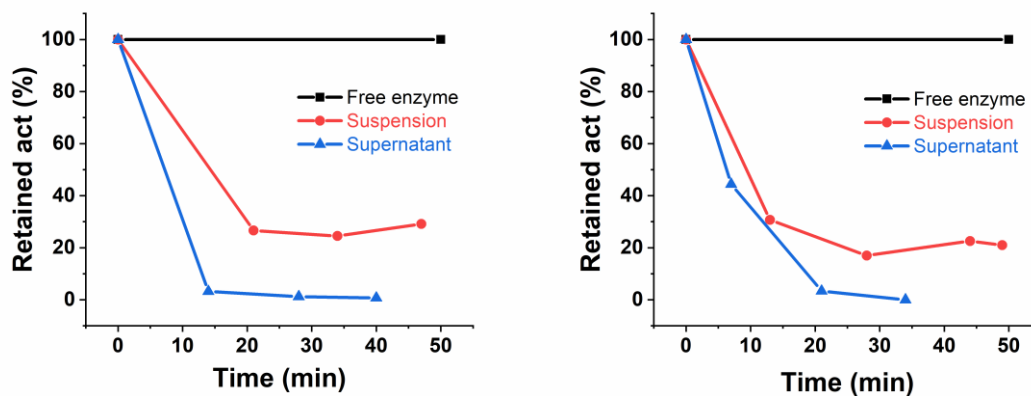
**Figura 11.46.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre VS-Ag. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) a tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo. La actividad recuperada en suspensión disminuye aún más después de la etapa de reducción. Cada panel muestra una actividad ofrecida diferente ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). *Panel A:* 66.4; *Panel B:* 54.0.



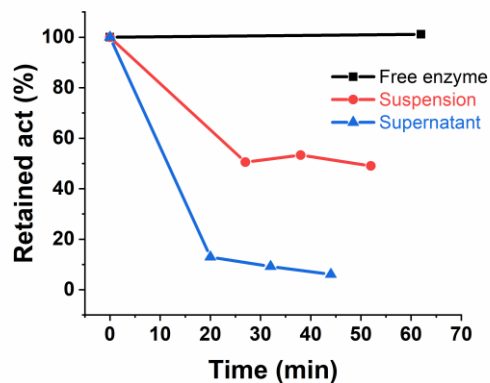
**Figura 11.47.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre DS-Ag. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) a tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo. La actividad recuperada en suspensión disminuye aún más después de la etapa de reducción. Cada panel muestra una actividad ofrecida diferente ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). *Panel A:* 76.5; *Panel B:* 40.0.



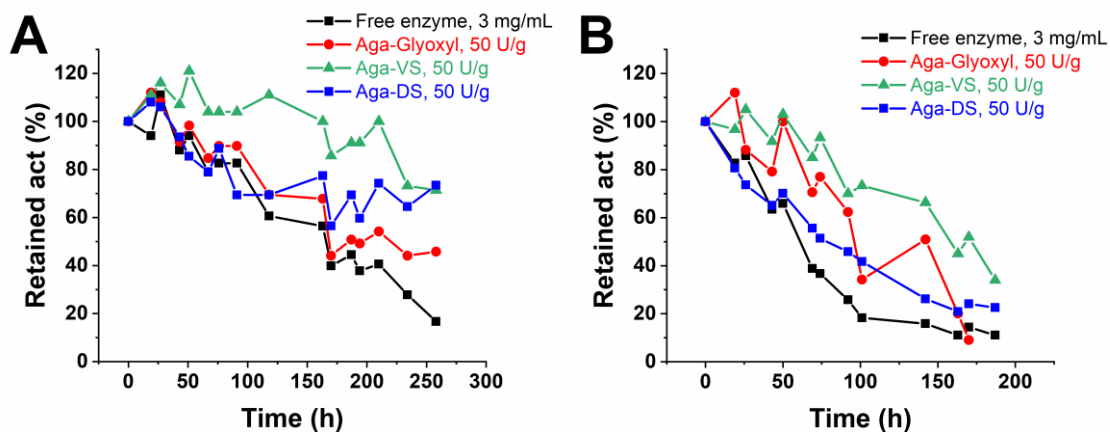
**Figura 11.48.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre aldehído-Purolita. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) a tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo. La actividad recuperada en suspensión disminuye aún más después de la etapa de reducción. Cada panel muestra una actividad ofrecida diferente ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). *Panel A:* 44.3; *Panel B:* 53.4.



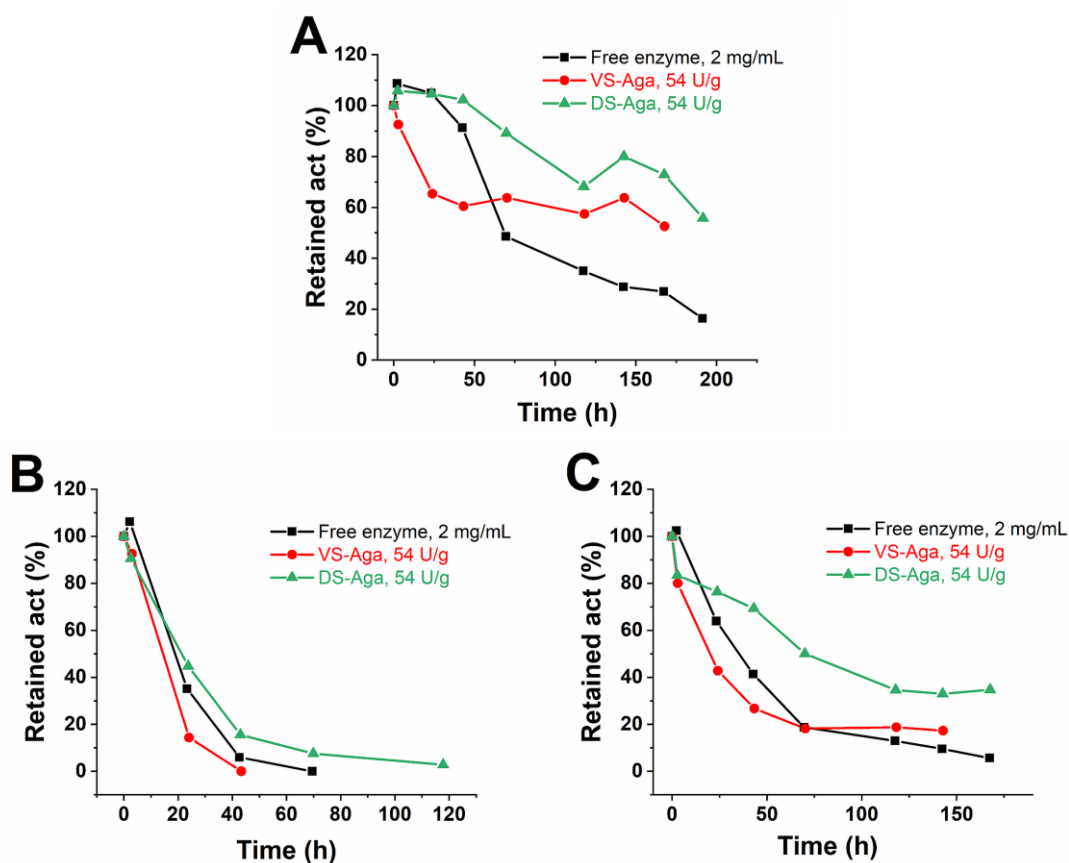
**Figura 11.49.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre VS-Purolita. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) a tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo. La actividad recuperada en suspensión disminuye aún más después de la etapa de reducción. Ambos paneles muestran la misma actividad ofrecida,  $64 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ . *Panel A:* Purolita funcionalizada con vinilsulfona directamente sobre grupos epóxido; *Panel B:* Purolita funcionalizada con vinilsulfona sobre grupos hidroxilo, tras hidrolizar los grupos epóxido.



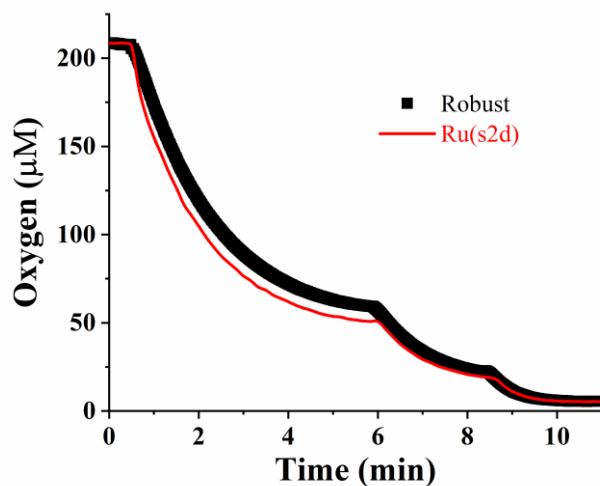
**Figura 11.50.** Seguimiento de la inmovilización de la GalOx sobre DS-Purolita. Se toma como referencia la actividad enzimática (libre e inmovilizada) en el tiempo 0, y se mide la actividad tanto del sobrenadante como de la suspensión a lo largo del tiempo.  $67 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  de actividad ofrecida.



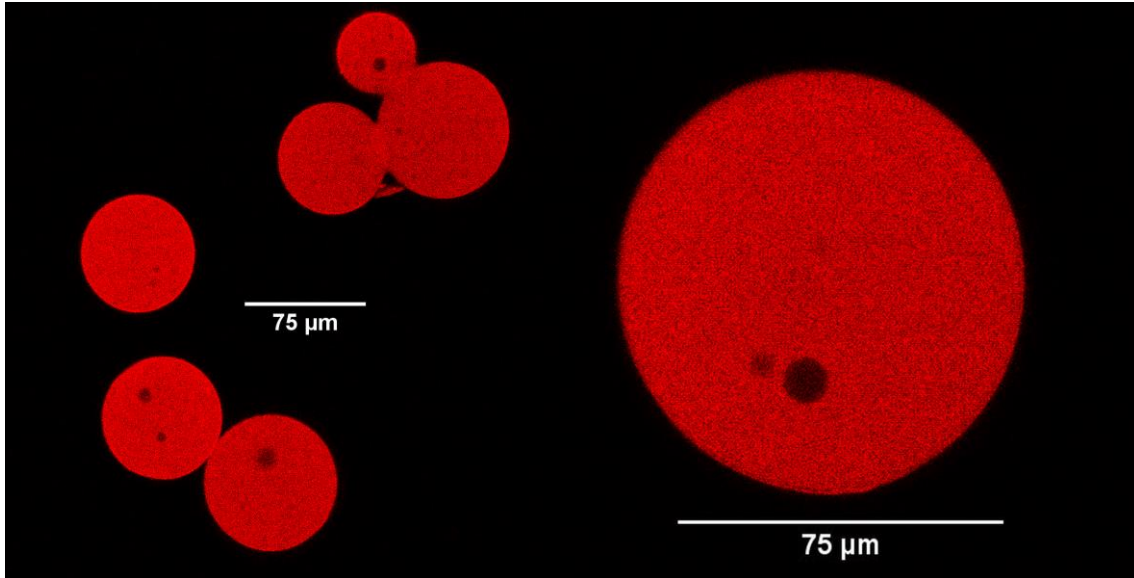
**Figura 11.51.** Estabilidad de la GalOx soluble e inmovilizada. La actividad retenida se refiere al porcentaje de actividad medido con respecto al tiempo 0 h, que corresponde al 100% de actividad retenida. *Panel A:* A temperatura ambiente; *Panel B:* en condiciones de inactivación térmica (40 °C).



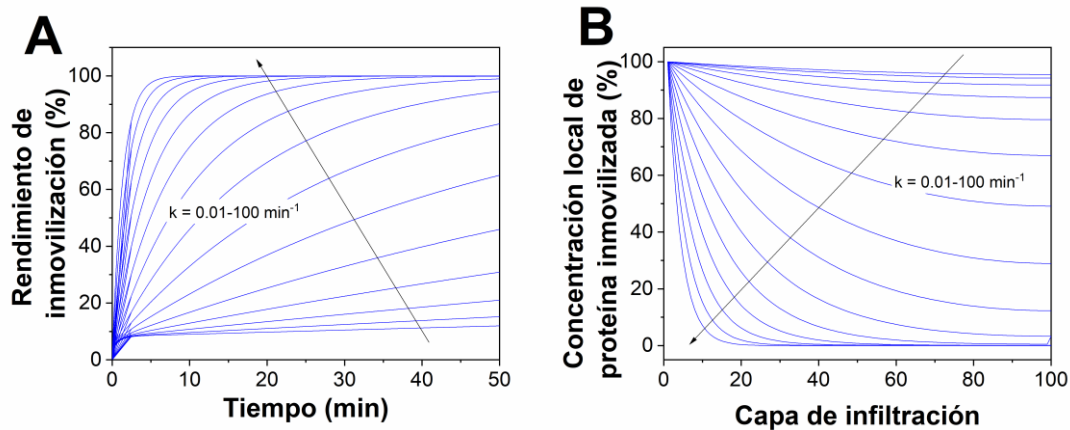
**Figura 11.52.** Estabilidad de la GalOx soluble e inmovilizada en condiciones de reposo y variando los medios de incubación. *Panel A:* NaPi 10 mM; *Panel B:* 50% (v/v) EtOH 96% en NaPi 10 mM; *Panel C:* 50% (v/v) acetona en NaPi 10 mM.



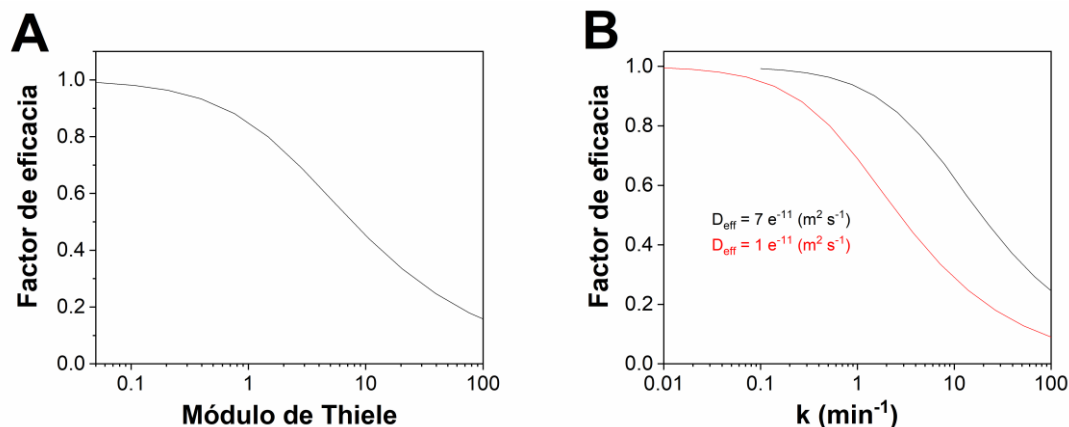
**Figura 11.53.** Cursos de consumo de oxígeno del sensor comercial de Pyroscience y el indicador luminiscente  $\text{Ru}(\text{pbbs})_3$  en fase líquida comprobar el solapamiento de la medida. Desoxigenación de un medio de galactosa con GalOx soluble.



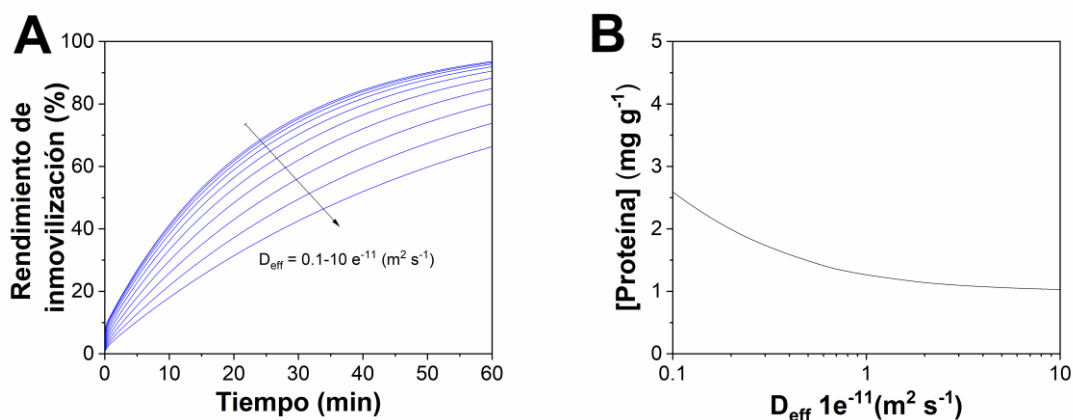
**Figura 11.54.** Imagen de varias partículas de PEI-Ag inmovilizadas con  $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$   $[\text{Ru}(\text{pbbs})_3]$  observadas mediante microscopía de fluorescencia.



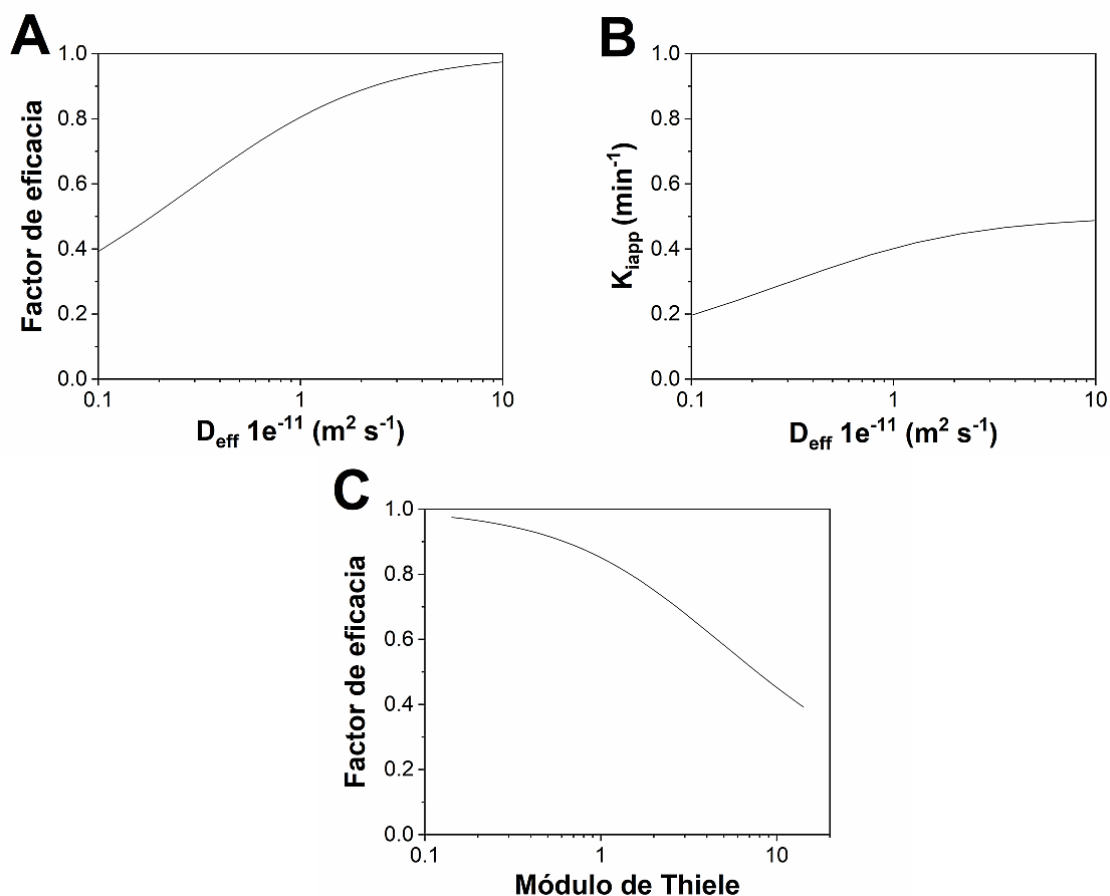
**Figura 11.55.** Simulación de cursos de inmovilización a diferentes constantes cinéticas intrínsecas.  $D_{\text{eff}}=7e^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . *Panel A:* Curso temporal del rendimiento de inmovilización. *Panel B:* Perfil de la concentración de proteína inmovilizada en la partícula.



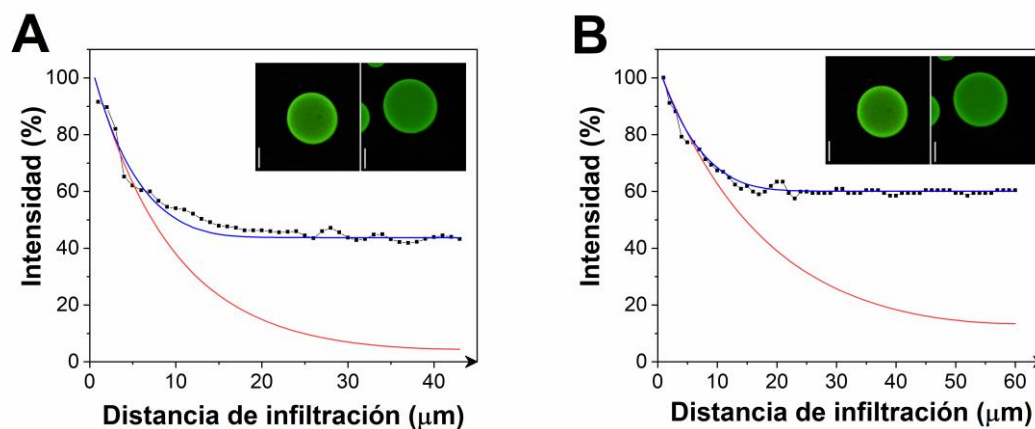
**Figura 11.56.** Simulación de la eficacia de la inmovilización a diferentes velocidades del proceso. *Panel A:* Variación del módulo de Thiele a  $D_{\text{eff}}=7\text{e}^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . *Panel B:* Variación de la constante cinética de la velocidad de inmovilización.



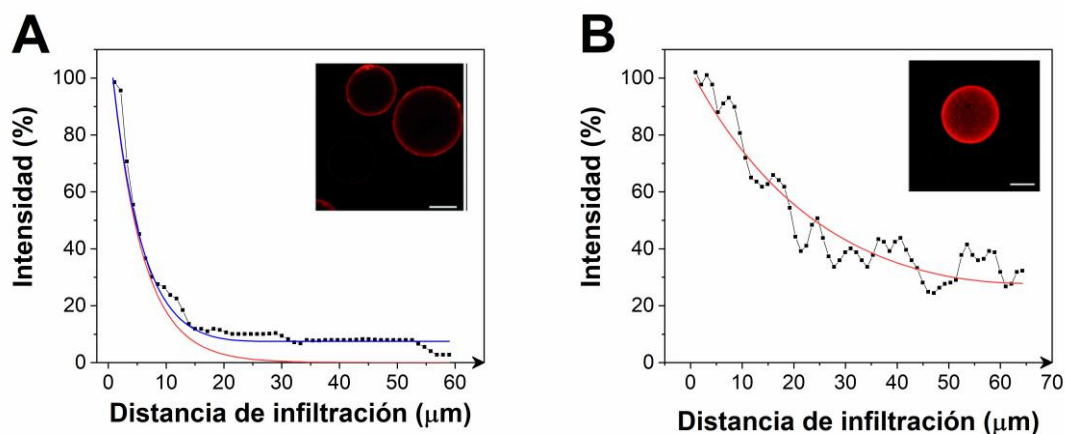
**Figura 11.57.** Influencia de la difusividad efectiva en el proceso de inmovilización. *Panel A:* Simulación de los cursos de inmovilización a diferentes difusividades efectivas de la proteína. *Panel B:* Concentración final en la capa externa de la partícula una vez completada la inmovilización.



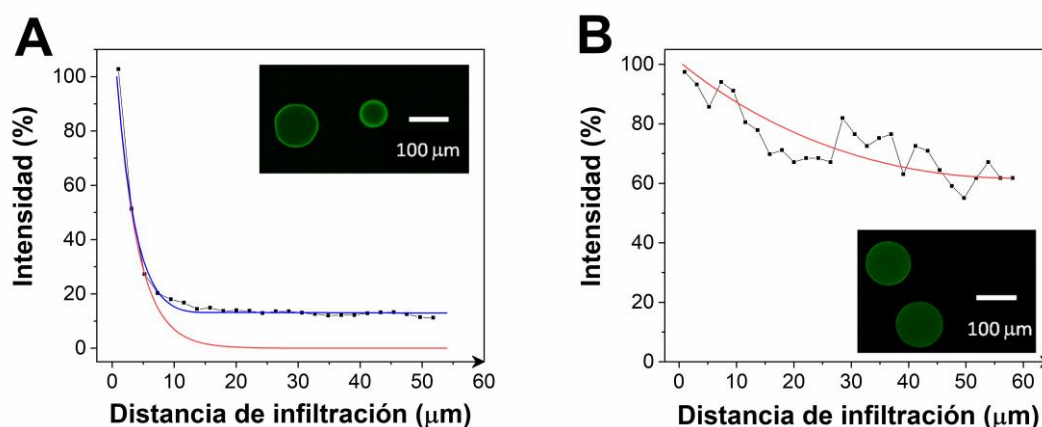
**Figura 11.58.** Influencia de la difusividad efectiva en el proceso de transferencia de materia. *Panel A:* Eficacia de la inmovilización en función de la difusividad efectiva de la proteína,  $k=0.5 \text{ min}^{-1}$ . A medida que aumentan las limitaciones difusionales, la tasa de inmovilización aparente tiende al máximo alcanzable. *Panel B:* Constante de inmovilización aparente en función de la difusividad efectiva de la proteína. *Panel C:* Eficacia de la inmovilización en función del módulo de Thiele, cuando se varía  $D_{\text{eff}}$ .  $k=0.5 \text{ min}^{-1}$ . Cuando el proceso está controlado por la velocidad de difusión, la eficacia de inmovilización disminuye.



**Figura 11.59.** Perfil de concentración de la proteína TtADH en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. Los paneles A y B muestran el perfil de concentración en dos partículas diferentes (43 y 60  $\mu\text{m}$  respectivamente) sin utilizar imidazol y en glioxil-agarosa. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación normal con línea roja continua y la simulación considerando la migración de proteína con línea azul continua.

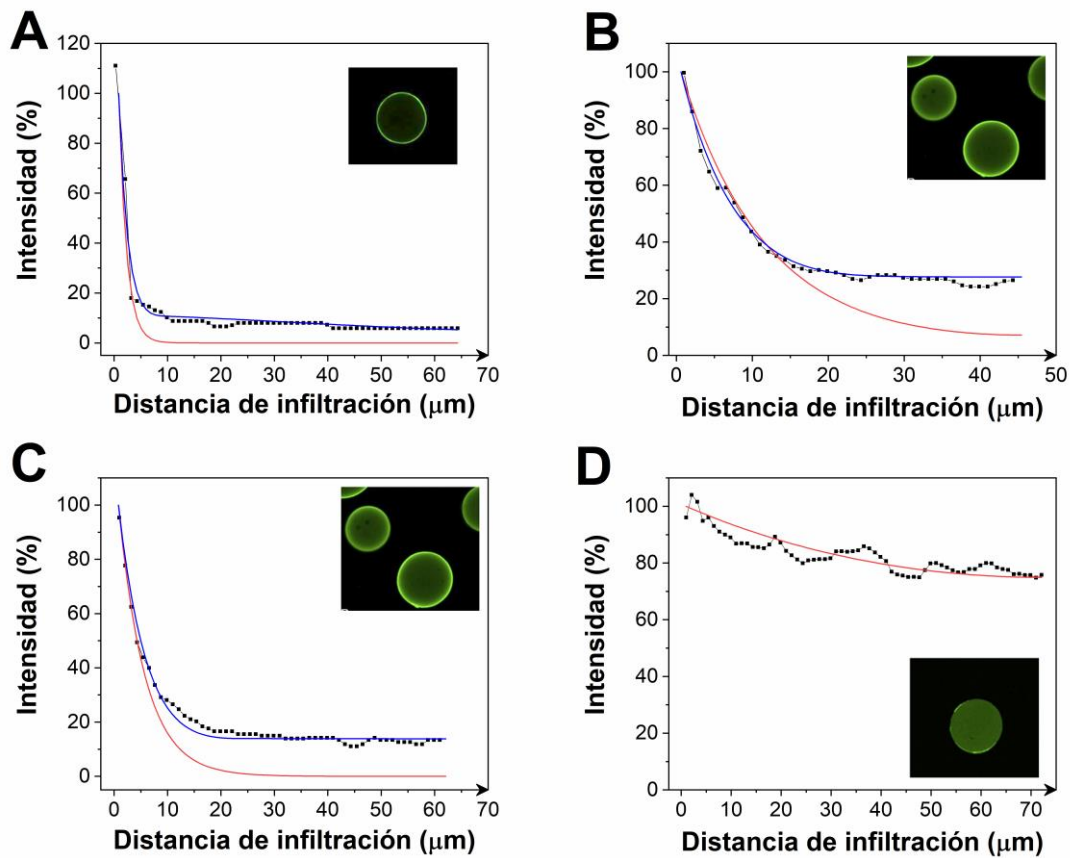


**Figura 11.60.** Perfil de concentración de la proteína His-GluDH en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. Enlaces de coordinación His-Ni. *Panel A:* Inmovilización sin imidazol, 59  $\mu\text{m}$  de radio; *Panel B:* 200 mM de imidazol, 64  $\mu\text{m}$  de radio. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación normal con línea roja continua y la simulación considerando la migración de proteína con línea azul continua.

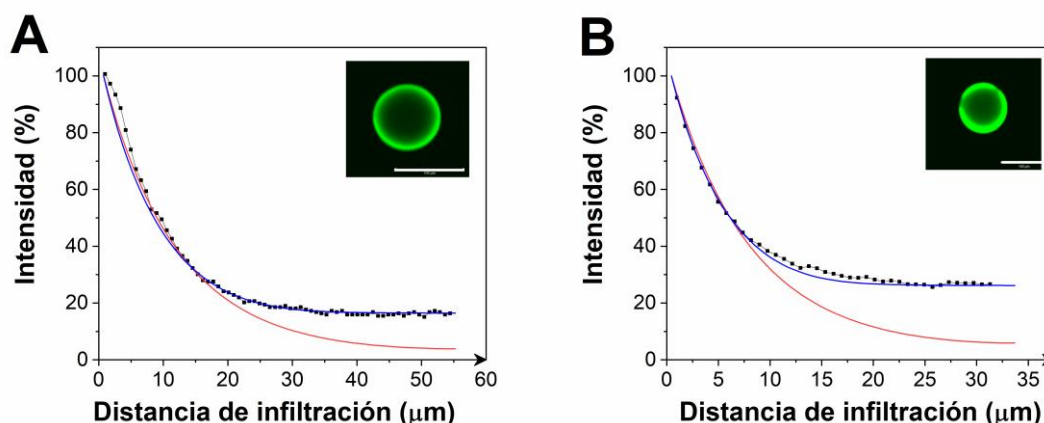


**Figura 11.61.** Perfil de concentración de la proteína Fab en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. Enlaces de coordinación His-Cu. *Panel A:* Inmovilización sin imidazol, 54  $\mu\text{m}$  de radio; *Panel B:* 10 mM de imidazol, 58  $\mu\text{m}$  de radio. Los datos experimentales se muestran con

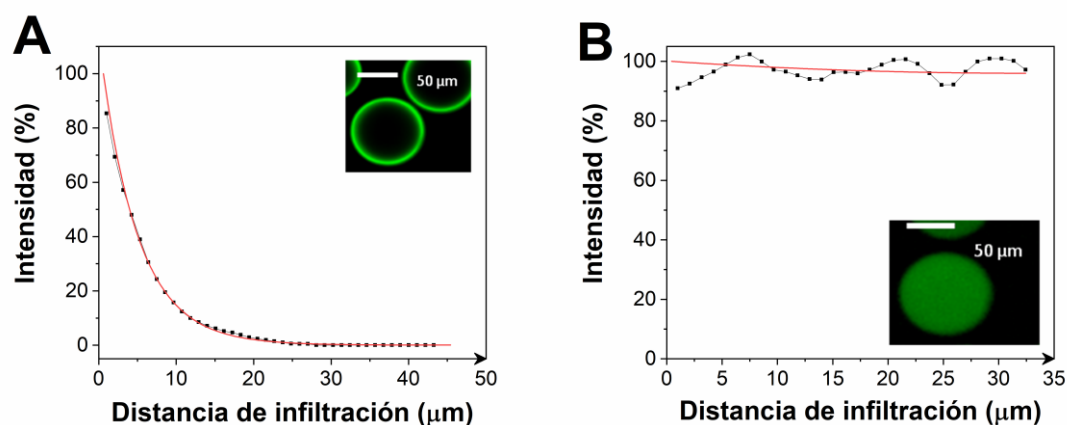
cuadrados negros unidos, la simulación normal con línea roja continua y la simulación considerando la migración de proteína con línea azul continua.



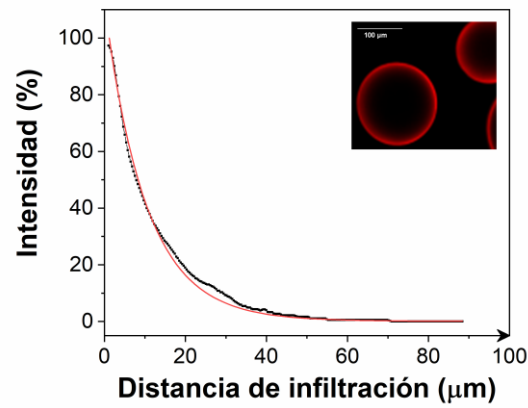
**Figura 11.62.** Perfil de concentración de la proteína IgG en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. *Panel A:* Inmovilización sin imidazol, 65  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Cu; *Panel B:* Inmovilización sin imidazol, 45  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Zn; *Panel C:* Inmovilización sin imidazol, 62  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Zn; *Panel D:* 50 mM de imidazol, 72  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Cu. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación normal con línea roja continua y la simulación considerando la migración de proteína con línea azul continua.



**Figura 11.63.** Perfil de concentración de la proteína EGFP en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. Los paneles A y B muestran el perfil de concentración en dos partículas diferentes (55 y 34  $\mu\text{m}$  respectivamente) sin utilizar imidazol y en glioxil-agarosa. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos, la simulación normal con línea roja continua y la simulación considerando la migración de proteína con línea azul continua.



**Figura 11.64.** Perfil de concentración de la proteína NOX en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. *Panel A:* Inmovilización sin imidazol, 45  $\mu\text{m}$  de radio y en glioxil-agarosa; *Panel B:* 10 mM de hidroxilamina, 32  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Cu. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos y la simulación con línea roja continua.



**Figura 11.65.** Perfil de concentración de la proteína transaminasa en la partícula. También se adjunta una imagen de la proteína inmovilizada con microscopía de fluorescencia. Inmovilización sin imidazol, 88  $\mu\text{m}$  de radio y enlaces de coordinación His-Cu. Los datos experimentales se muestran con cuadrados negros unidos y la simulación con línea roja continua.