

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Aplicación de enzimas en biocatálisis. Perspectivas de la utilización de nanoarreglos como biocatalizadores

Application of enzymes on biocatalysis. Perspectives of the use of nanoarrays as biocatalysts

Alberto del Monte-Martínez,^{1*} Bessy V. Cutiño-Avila,¹ Jorge O. González-Bacerio,¹ Darío González-Abradelo,² Viviana Figueroa Espí³ y Roberto Cao-Vázquez²

¹ Laboratorio de Tecnología Enzimática, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

² Laboratorio de Bioinorgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.

³ Laboratorio de Nanobiotecnología y Liberación de Biomoléculas, Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE), Universidad de La Habana, Cuba.

* Autores para correspondencia: adelmonte@fbio.uh.cu

Introducción

Muchas reacciones químicas pueden ocurrir espontáneamente y a una velocidad apreciable sin necesidad de catalizadores, mientras que otras deben ser catalizadas para que se produzcan a una velocidad elevada. Los catalizadores son moléculas que reducen la magnitud de la barrera energética que debe ser superada para que una sustancia pueda convertirse químicamente en otra (energía de activación). Termodinámicamente, la magnitud de esta barrera de energía se puede expresar convenientemente en términos de energía libre. En realidad, los catalizadores hacen transcurrir la reacción por un mecanismo distinto al de la reacción no catalizada, de manera que el nuevo complejo de transición, en presencia del catalizador, muestra una energía de activación menor que el complejo de transición de la reacción original. El catalizador no se consume o altera durante la reacción; en principio, puede utilizarse para convertir el sustrato en producto de manera indefinida. En la práctica, este comportamiento está limitado por la estabilidad del catalizador, es decir, su capacidad de retener su estructura activa a través del tiempo en las condiciones de reacción.

Las enzimas son catalizadores biológicos que han sido estudiados extensivamente por más de cien años y desempeñan un papel fundamental en la mayoría de los procesos bioquímicos. Estas moléculas han sido seleccionadas evolutivamente para realizar sus funciones en condiciones fisiológicas; sin embargo, es posible aprovechar sus propiedades como catalizadores de manera artificial. La aplicación de las enzimas en procesos industriales abarca una serie de aspectos y áreas, tales como la Química Verde, la Biotecnología Blanca y la Química Sustentable, así como la discusión sobre los recursos renovables y los recursos fósiles. Estas áreas pueden solaparse en mayor o menor medida y tienen en común que pueden contribuir a un desarrollo sustentable de la sociedad (Grunwald, 2009). La mayoría de los especialistas en este campo coinciden en definir la biocatálisis como la utilización de enzimas en

la catálisis de diferentes procesos –industriales o no– en condiciones artificiales (*in vitro*).

El desafío mayor en biocatálisis es transformar estos catalizadores biológicos en catalizadores capaces de trabajar en condiciones de reacción normalmente alejadas de las fisiológicas, como las de un proceso industrial. Las enzimas, como catalizadores de reacciones bioquímicas (biocatalizadores), actúan del mismo modo que cualquier catalizador –disminuyen la energía de activación–; pero, al mismo tiempo, muestran propiedades diferentes a las encontradas en los catalizadores químicos: 100 % de rendimiento, incrementos mucho mayores en la velocidad de reacción, versatilidad química, gran especificidad, posibilidad de regulación, labilidad estructural. Todas estas propiedades son consecuencias de su compleja estructura molecular (Illanes, 2008).

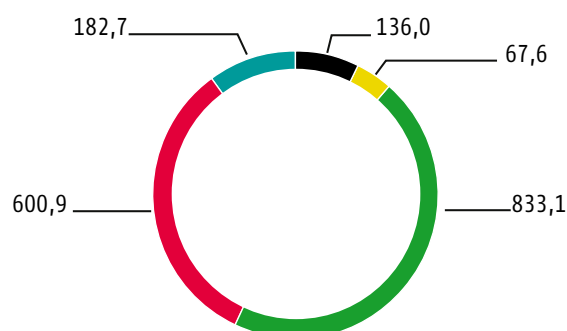
En este trabajo se presenta una revisión actualizada del tema de la biocatálisis: las clases de enzimas más utilizadas, los principales productos obtenidos, las ventajas y desventajas de los biocatalizadores en comparación con los catalizadores químicos, los mayores retos de la utilización industrial de esta tecnología, así como las herramientas disponibles en la actualidad para superarlos.

Ventas globales de enzimas

Las ventas globales de enzimas de uso industrial se estimaron, para el año 2002, en 1820,3 millones de dólares a un ritmo de crecimiento anual del 4 %. Las predicciones del empleo de enzimas a nivel industrial son muy alentadoras (BCC report C147-NA, 2002). Si se produce el incremento esperado habrá una gran penetración en el mercado de las aplicaciones ya existentes, nuevas aplicaciones y tecnologías novedosas basadas en la mejora de las características funcionales de las enzimas, lo cual las haría más atractivas para su empleo a nivel industrial (Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003).

Las aplicaciones en las industrias de alimentación humana y animal dominan las ventas industriales de enzimas a nivel mundial (figura 1). El mercado de alimentación animal ofrece el mejor escenario para el crecimiento; pero este mercado aún no ha sido penetrado extensamente por las ventas de enzimas en todas las áreas geográficas

por igual. En el sector de los detergentes, los catalizadores biológicos han ocupado el mercado casi por completo, especialmente en los detergentes para lavado. En este campo, los detergentes «lavavajillas» aún representan un tentativo escenario de crecimiento en cuestión de ventas. Debido a que la ingeniería genética ha permitido disponer de las proteasas alcalinas en cantidades mayores que las de cualquier otra enzima recombinante, el precio de estas moléculas ha disminuido. No obstante, la ingeniería genética también ha contribuido a mejorar las propiedades catalíticas de muchas enzimas, con el objetivo de elevar la eficiencia en su funcionamiento. En relación con la comercialización de otros limpiadores (como desinfectantes y blanqueadores), las ventas de enzimas representan un porcentaje escaso. Por tanto, este constituye un mercado casi virgen que ofrece nuevas oportunidades para la venta, si estas cuentan con las propiedades adecuadas (BCC Report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003).



LEYENDA:

- Alimentación (humana y animal)
- Detergentes y limpiadores
- Textiles, cueros y pieles
- Pulpa y papel
- Química

Figura 1. Ventas globales de enzimas (en millones de dólares) estimadas para 2002, clasificadas según el tipo de industria destinataria.

Fuente: adaptado de BCC Report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003.

En el sector textil, las ventas de enzimas para la degradación de materiales celulósicos dominan el mercado. La influencia de la moda, que encarece las ropas de apariencia «prelavada», posiblemente haga florecer el mercado para las enzimas proce-

sadoras de mezclillas. Por otra parte, se espera que la introducción de nuevas fibras celulósicas en el mercado eleve las ventas de las enzimas necesarias para procesarlas. Las ventas de enzimas para el cuero y las pieles se afectan por la tendencia negativa de la moda hacia estos materiales. Aun así, la comercialización de proteasas y lipasas (alcalinas) ha ido en aumento, pero debe competir con las ventas de enzimas tradicionales como la tripsina (BCC Report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003). En el tratamiento de la pulpa y el papel, las enzimas más empleadas son las xilanasas, específicamente en el preblanqueamiento. En este campo, las oxidasas han tenido un buen desempeño y han sido muy estudiadas, pero no en términos de incrementar su eficiencia; por ello se necesita un mayor esfuerzo de investigación en esta área antes de incrementar su comercialización.

La empresa manufacturera de productos químicos, que incluye la químico-farmacéutica, es el sector final a nivel de mercado para el empleo de enzimas industriales. El empleo de enzimas para elevar la producción de alcohol –no para la producción de bebidas– domina este mercado. El resto de las enzimas se emplea en reacciones de química fina, para la producción de fármacos y sus intermediarios. La mayoría de los avances de la tecnología enzimática actualmente ha tenido lugar en el contexto de reacciones en química fina. Estos avances, en su mayoría, corresponden al aspecto de la tecnología quiral, la cual aprovecha la estereoselectividad de algunas enzimas para la síntesis de un enantiómero específico. Si se analiza desde un punto de vista comercial, las enzimas que se utilizan en reacciones de química fina se usan en pequeñas cantidades, por lo que los volúmenes que se producen son pequeños y los valores de las ventas son bajos. En estos casos, el valor real de las enzimas no es el que aparentan, ya que los productos de las reacciones de química fina tienen un costo elevado, por lo que la inversión es muy rentable desde ese punto de vista (BCC Report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003).

Si se analizan las ventas de enzimas, desglosadas según las distintas clases, se comprueba

que las hidrolasas dominan las ventas de enzimas industriales de manera global (figura 2a). Las otras clases (isomerasas, oxidorreductasas, liasas y transferasas) se comercializan en menor cantidad. La clase isomerasa está representada prácticamente por una sola enzima –la glucosa isomerasa– y las ligasas están casi ausentes a nivel industrial. Dentro de las hidrolasas, las carbohidrasas dominan en las aplicaciones industriales y constituyen un elevado porcentaje de las ventas (figura 2b). En segundo lugar en importancia comercial se encuentran las proteasas; y luego, en menor medida, las lipasas, esteratasas, fosfatasas y amilasas (BCC report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003).

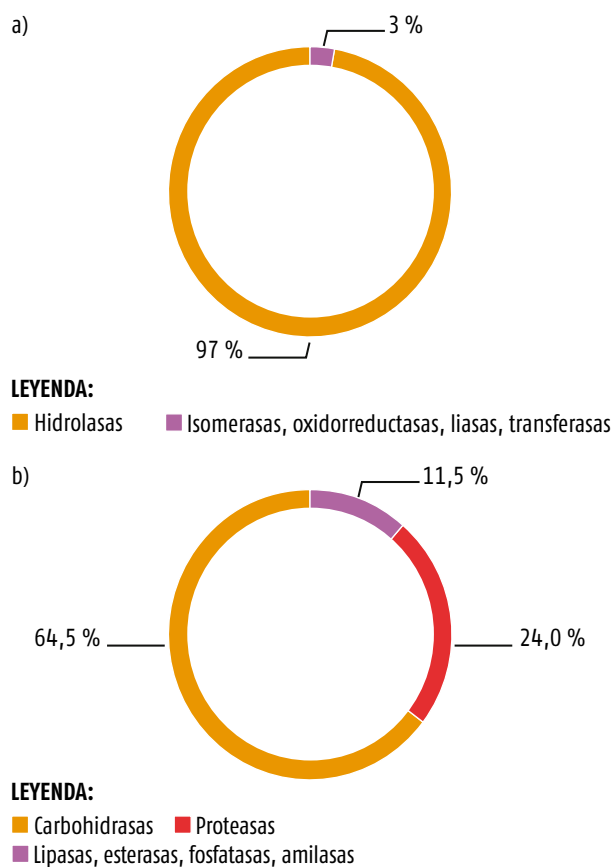


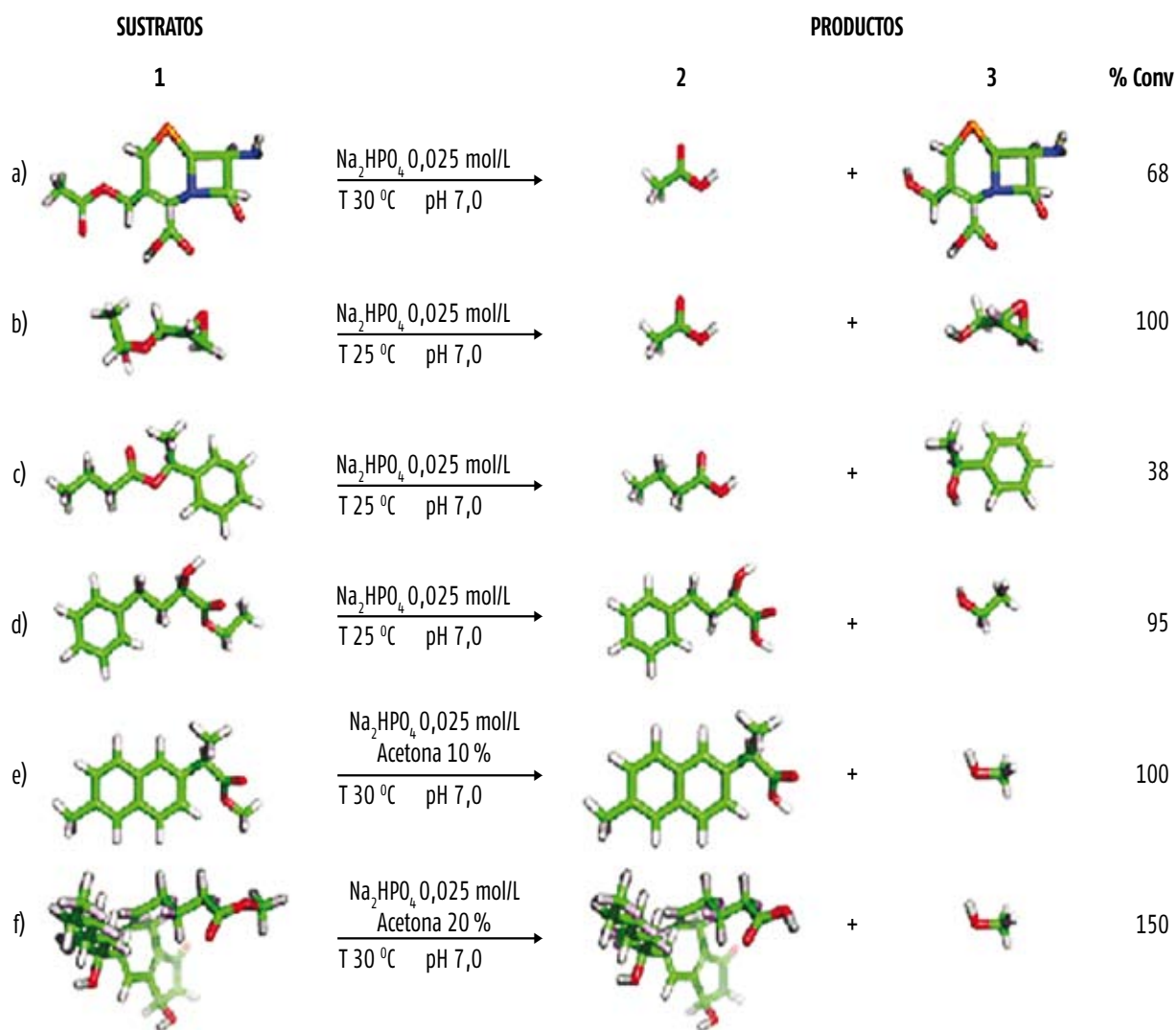
Figura 2. Ventas globales de enzimas (en porcentaje) para procesos químicos industriales, estimadas para 2002: a) clasificación de las ventas de enzimas según las distintas clases; b) clasificación de las ventas de las hidrolasas según las distintas subclases.

Fuente: adaptado de BCC Report C-147NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003.

Potencialidades e inconvenientes de la utilización de enzimas como catalizadores en procesos industriales

De las casi tres mil enzimas que han sido descritas, muchas están disponibles comercialmente –varias en forma inmovilizada (Mosier y Ladisch, 2011)–, lo que posibilita su reutilización en los procesos en

que se apliquen. Las enzimas son catalizadores muy deseables cuando la especificidad de la reacción se convierte en un problema de primer orden, como ocurre con los productos farmacéuticos y de química fina (figuras 3 y 4). Además, son capaces de catalizar muy eficazmente un espectro grande de reacciones, las cuales pueden ser de 10

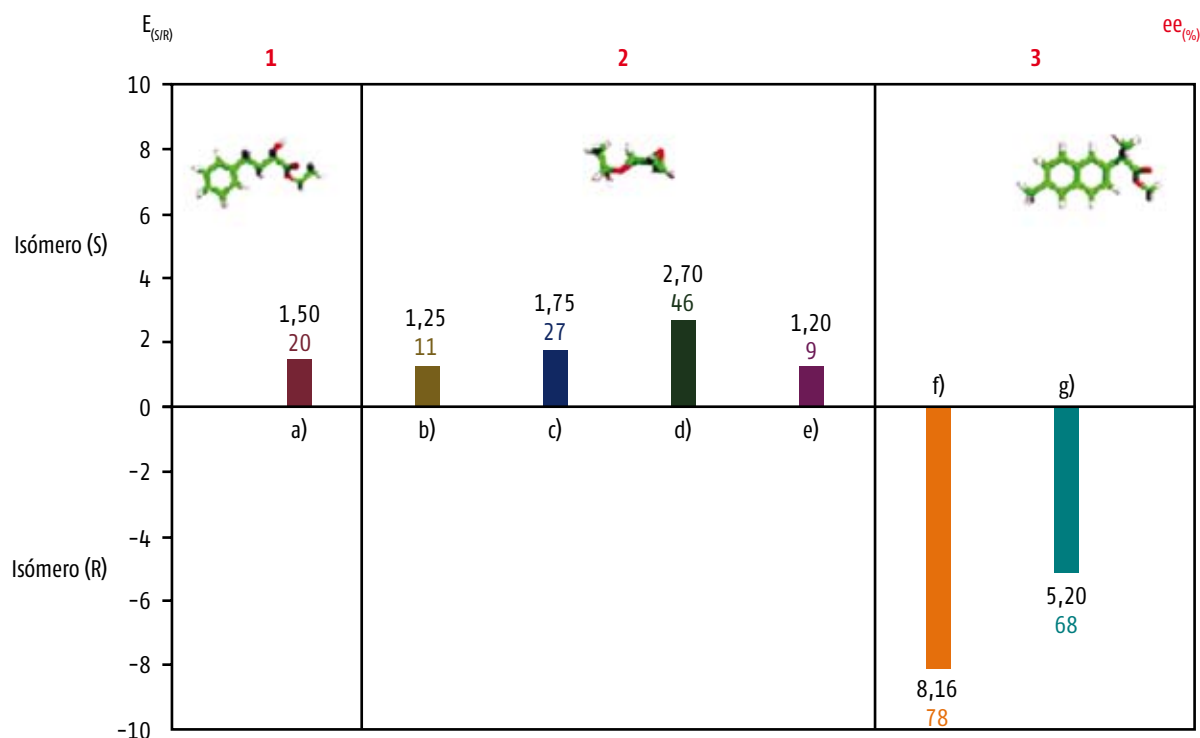


LEYENDA:

1: ésteres. 2: ácidos. 3: alcoholes. % Conv: porcentaje de conversión de sustrato en producto en 144 horas.

Figura 3. Reacciones de hidrólisis de ésteres de interés en las industrias química y químico-farmacéutica, utilizando un biocatalizador inmovilizado obtenido a partir de esterases interfaciales aisladas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* (286 U/g soporte): a) ácido 7-amino cefalosporánico «7-ACA»; b) 2-oxiranilmetil acetato (acetato de glicidol) «OMAc»; c) feniletil butirato «BPEt»; d) etil-2-hidroxi-4-fenil butanoato «HPBEt»; e) metil-6-metoxi- α -metil-2-naftalen-acetato (éster metílico del naproxeno) «Me-MMNAC»; f) metil-prostaglandina $F_2\alpha$ «Me-PGA2».

Fuente: Del Monte-Martínez, 2000.

**LEYENDA:**

Tiempo de reacción: 144 horas. 1: [S;R] etil-2-hidroxi-4-fenil butanoato «[S;R]HPBet». 2: [S;R] 2-oxiranilmetil acetato (acetato de glicidol) «[S;R]OMAc». 3: [S;R] metil-6-metoxi- α -metil-2-naftalen-acetato ([S;R] éster metílico del naproxeno) «[S;R]Me-MMNAC».

E(S/R): Tasa enantiomérica. ee(%): Porcentaje de exceso enantiomérico (valores en rojo).

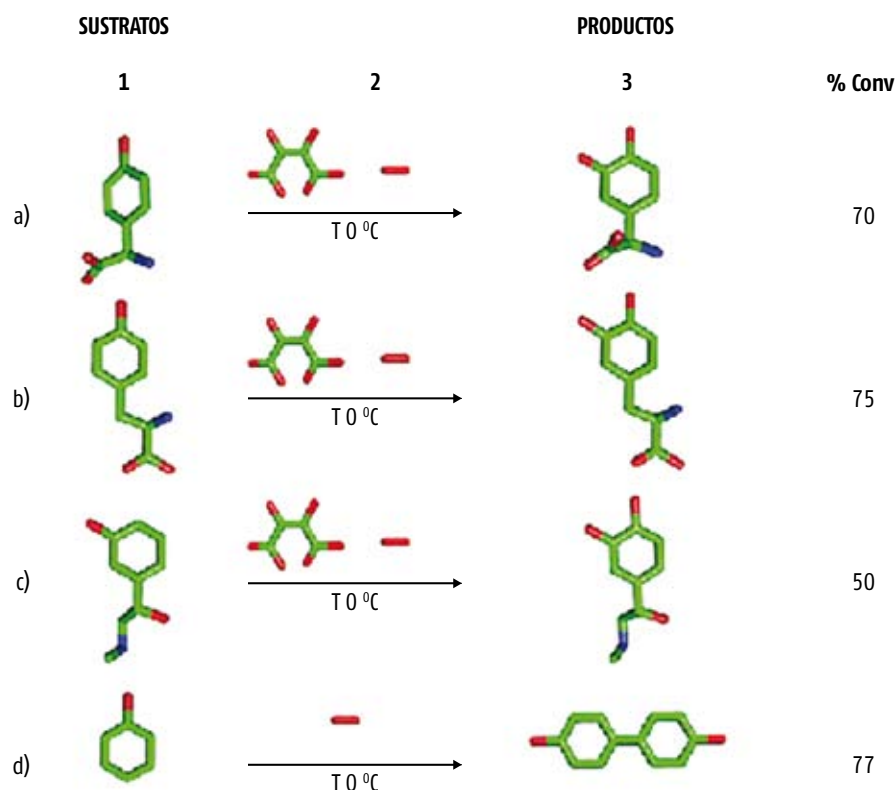
Figura 4. Resolución de mezclas racémicas de compuestos de interés en las industrias química y químico-farmacéutica, utilizando un biocatalizador inmovilizado obtenido a partir de esterasas interfaciales aisladas de la anémone marina *Stichodactyla helianthus* (286 U/g soporte). Condiciones de reacción: a) Na_2HPO_4 0,025 mol/L, pH 7, 25 °C; b) Na_2HPO_4 0,025 mol/L, pH 7, 25 °C; c) Na_2HPO_4 0,025 mol/L, pH 7, 4 °C; d) Na_2HPO_4 0,01 mol/L, pH 7, 4 °C; e) Na_2HPO_4 0,2 mol/L, pH 7; f) Na_2HPO_4 0,025 mol/L: acetronitrilo (9:1, v:v), pH 7, 30 °C; g) Na_2HPO_4 0,025 mol/L: metanol (9:1, v:v), pH 7, 30 °C.

Fuente: Del Monte-Martínez, 2000.

a 12 órdenes de magnitud más rápidas que con el empleo de catalizadores convencionales. Las enzimas son generalmente muy selectivas con respecto al tipo de reacción catalizada y al sustrato transformado; y pueden ser, incluso, específicas para elementos estereoestructurales del sustrato.

Como macromoléculas quirales, las enzimas son capaces de catalizar transformaciones asimétricas que pueden ser enantioméricas y enantiotopo-selectivas (figura 4). La actividad y la selectividad de las enzimas en explotación pueden modificarse por varios factores tales como la concentración de sustrato y producto, la temperatura, el pH, y a través de otras moléculas presentes en el sistema. Estos efectos pueden aprovecharse para dirigir los procesos hacia la obtención del producto deseado (Del Monte-Martínez, 2000).

Las enzimas constituyen una alternativa muy atractiva cuando los catalizadores deben ser activos bajo condiciones suaves (temperatura ambiente y pH casi neutro) debido a la inestabilidad del sustrato y/o del producto, o para evitar reacciones colaterales no deseadas, como ocurre en muchas reacciones de síntesis orgánica (figura 5). Esto es de primera importancia con productos que tienden a isomerizarse. Algunas enzimas tienen la capacidad de introducir grupos funcionales en posiciones que no son reactivas con los reactivos orgánicos más comunes. Esta alternativa es controlable desde el punto de vista experimental. Por ejemplo, las reacciones de hidroxilación selectiva de compuestos aromáticos, catalizadas por la peroxidasa de rábano picante, *Armoracia rusticana* (figura 5), deben realizarse a muy bajas temperaturas (0 °C)

**LEYENDA:**

1: sustratos aromáticos. 2: cofactores: -ácido dihidroxifumárico, -dioxígeno (O₂). 3: productos, % Conv: porcentaje de conversión de sustrato en producto.

Figura 5. Hidroxilaciones selectivas de compuestos aromáticos utilizando como biocatalizador la enzima peroxidasa aislada del rábano picante (*Armoracia rusticana*): a) D-3,4-dihidroxisfenilglicina; b) L-DOPA; c) L-epinefrina; d) difenol.

Fuente: Klibanov *et al.*, 1981; Schwartz y Hutchinson, 1981; Ballard *et al.*, 1983; Sinisterra, 1994.

para prevenir hidroxilaciones no enzimáticas provocadas por el ácido dihidroxifumárico y el oxígeno, ambos utilizados como cofactores. Las peroxidases se han utilizado también en la obtención de difenoles, a partir de la oxidación de fenoles en posición *orto*, y en la oxidación de aminoácidos y alcoholes que contienen un resto *p*-hidroxifenilo. A partir de precursores monohidroxilados o no hidroxilados, se han obtenido compuestos como L-DOPA –utilizado para el tratamiento del Parkinson–, D-3,4-dihidroxisfenilglicina y L-epinefrina (adrenalina), entre otros (Klibanov *et al.*, 1981; Schwartz y Hutchinson, 1981; Ballard *et al.*, 1983; Sinisterra, 1994).

Las enzimas como biocatalizadores resultan muy oportunas cuando las restricciones medioambientales y las regulaciones para la producción de

medicamentos, establecidas por los gobiernos, son severas. Esta es una situación generalizada en la actualidad, que otorga una ventaja distintiva a la biocatálisis sobre las tecnologías tradicionales. Sin embargo, los catalizadores enzimáticos son estructuras moleculares complejas, intrínsecamente lábiles y con un alto costo de obtención, lo cual constituye su principal desventaja respecto a los catalizadores químicos tradicionales (Bommarius y Broering, 2005). Por otro lado, la baja productividad volumétrica es a menudo un problema. Sin embargo, esto no debe asumirse como una gran desventaja, ya que en la actualidad algunos bioprocesos operan a concentraciones que igualan o normalmente exceden aquellas encontradas en los procesos químicos (industriales) convencionales. Un ejemplo notable es un proceso que ha sido

desarrollado por Novo-Nordisk para surfactantes basados en azúcares, con el uso de una lipasa como catalizador: un ácido graso de cadena larga es esterificado con un azúcar en ausencia de solvente y se logra casi el 100 % de formación del producto (Macrae y Hammond, 1985). Otros aspectos que pudieran considerarse como desventajas de los biocatalizadores son:

- a. Necesidad de cofactores.
- b. Incompatibilidad con solventes orgánicos, particularmente los polares.
- c. Carencia, a menudo, de propiedades buscadas por el ingeniero de procesos: fuerza mecánica y propiedades reológicas, ya que la aplicación de células enteras o la enzima inmovilizada conducen a sistemas heterogéneos.
- d. Posibilidad de inhibición.
- e. Problemas operacionales de separación de fases (Arroyo, 1998).

Estrategias actuales para la solución de los inconvenientes de la aplicación de enzimas como catalizadores en procesos industriales

La mayoría de las restricciones que presentan las enzimas como catalizadores en procesos industriales se han solucionado a través de la investigación y el desarrollo en diferentes áreas del conocimiento. De hecho, se han desarrollado varias estrategias de estabilización de enzimas para que funcionen adecuadamente en las condiciones de los procesos industriales en los que se desea aplicarlas (Illanes, 1999). Estas estrategias incluyen técnicas como:

- a. Modificación química de la estructura de la enzima (Roig y Kennedy, 1992; Ozturk *et al.*, 2002; Mislovičová *et al.*, 2006).
- b. Inmovilización de la enzima a soportes sólidos (Abián *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a).
- c. Cristalización de la enzima y entrecruzamiento de los cristales con agentes bifuncionales (Haring y Schreier, 1999; Roy y Abraham, 2006).
- d. Obtención de agregados y posterior entrecruzamiento con agentes bifuncionales (Cao

et al., 2003; Mateo *et al.*, 2004; Schoevaart *et al.*, 2004; Illanes *et al.*, 2006).

- e. Aplicación de técnicas modernas de diseño de proteínas para el aumento de la estabilidad y mejoramiento de las propiedades catalíticas (Chen, 2001; Declerck *et al.*, 2003; Sylvestre *et al.*, 2006; Leisola y Turunen, 2007).
- f. Mutagénesis de sitio específico para el aumento de la estabilidad y mejoramiento de las propiedades catalíticas (Bhosale *et al.*, 1996; Ogino *et al.*, 2001; Boller *et al.*, 2002; Van den Burg y Eijsink, 2002; Adamczak y Hari Krishna, 2004; Bardy *et al.*, 2005; Morley y Kazlauskas, 2005).
- g. Evolución dirigida por mutagénesis en «tándem», o barajado de ADN asistido por polimerasa y recombinación genética asistida por ligasas para el aumento de la estabilidad y mejoramiento de las propiedades catalíticas (Stemmer, 1994; Shibuya *et al.*, 2000; Arnold, 2001; Brakmann y Johnson, 2002; Alexeeva *et al.*, 2003; Chodorge *et al.*, 2005; Kaur y Sharma, 2006; Boersma *et al.*, 2007).

El tamizaje de enzimas intrínsecamente estables constituye una estrategia de mucha actualidad en biocatálisis. Los extremófilos, organismos capaces de vivir y crecer en condiciones medioambientales extremas, son una fuente prometedora para la obtención de enzimas muy estables (Adams y Kelly, 1998; Demirjian *et al.*, 2001; Davis, 2003; Van den Burg, 2003; Bommarius y Riebel, 2004; Gomes y Steiner, 2004), por lo que la investigación centrada en el aislamiento de enzimas de estos organismos es en la actualidad un área de mucha actividad dentro de la comunidad científica. Se han clonado genes de organismos extremófilos en hospederos convenientes para su expresión en sistemas biológicos, con mejores rendimientos en la producción (Halldórsdóttir *et al.*, 1998; Haki y Rakshit, 2003).

Clases de enzimas y su empleo en biocatálisis

Las enzimas se clasifican de acuerdo con la guía publicada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología

Molecular (IUBMB, 1984). Todas las enzimas informadas están comprendidas en seis clases, sobre la base del tipo de reacción química que catalizan. Según la Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB, cada enzima se identifica con cuatro dígitos. El primero asigna la clase; el segundo y el tercero asignan la subclase y la sub-subclase, respectivamente, de acuerdo con el tipo y la posición del enlace o grupo particular involucrado en la reacción; el cuarto dígito asigna el número de identificación de la enzima sobre la base de la reacción específica que ella cataliza. Las seis clases son:

1. Oxidorreductasas: presentan 23 subclases. Catalizan reacciones de oxidación-reducción sobre diferentes grupos funcionales, por ejemplo:
 - › HC-OH
 - › C=O
 - › HC-CH-
 - › HC-NH₂
 - › C-NH-
2. Transferasas: presentan 9 subclases. Catalizan la transferencia de grupos funcionales, por ejemplo:
 - › Grupos mono-carbonados
 - › Grupos aldehído o cetona
 - › Grupos acilo
 - › Grupos glicosilo
 - › Grupos alquilos o arilos
 - › Grupos nitrogenados
 - › Grupos con fósforo
 - › Grupos con azufre
3. Hidrolasas: presentan 13 subclases. Catalizan reacciones de hidrólisis, por ejemplo:
 - › Enlaces ésteres
 - › Enlaces glicosídicos
 - › Enlaces peptídicos
 - › Otros enlaces C-N
 - › Enlaces anhídrido de ácidos
4. Liasas: presentan 7 subclases. Catalizan reacciones de ruptura de enlaces covalentes por mecanismos distintos de la hidrólisis o la oxidación, por ejemplo:
 - › Enlaces C-C
 - › Enlaces C-O
 - › Enlaces C-N
5. Isomerasas: presentan 6 subclases. Catalizan reacciones de isomerización, por ejemplo:
 - › Racemizaciones y epimerizaciones
6. Ligasas: presentan 6 subclases. Catalizan reacciones de formación de enlaces covalentes, por ejemplo:
 - › C-O
 - › C-S
 - › C-N
 - › C-C

A continuación se presentan algunos ejemplos clásicos de enzimas utilizadas en biocatálisis, agrupadas según las clases mencionadas: oxidoreductasas (peroxidasas, catalasas, glucosa oxidasas y lacasas); transferasas (fructosil y glucosil transferasas) e hidrolasas (amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas, proteasas, pululanadas). Estas son las enzimas con mayor número de aplicaciones. En condiciones apropiadas pueden catalizar la reacción inversa y formar enlaces con eliminación de agua. Este tipo de reacción se considera que posee un promisorio potencial tecnológico. Por su parte, las liasas (pectato liasa, α -acetolactato descarboxilasa, nitrilo hidrolasa, aspartato amonio liasa, fumarato hidratasa, L-histidina amonio liasa) usualmente actúan en la formación de enlaces C-C mediante la reacción inversa a la que deben su nombre. Esto les confiere un atractivo potencial para aplicaciones tecnológicas. También están involucradas en otros procesos biocatalíticos como la producción de L-aspartato, fumarato y ácido uracánico. Estas enzimas se han utilizado con mucha frecuencia en la síntesis asimétrica de compuestos orgánicos ópticamente activos. Las isomerasas (glucosa isomerasa, actualmente D-xilosa aldosa-cetosa-isomerasa, mutasas) constituyen uno de los ejemplos paradigmáticos de la aplicación de enzimas en procesos tecnológicos. Se emplean en la producción de siropes ricos en fructosa (HFS) a partir de almidón de maíz. Por último, dentro de las ligasas el caso con aplicación más conocido es la 4 ADN ligasa, utilizada rutinariamente en técnicas de ingeniería genética. Generalmente, las enzimas de esta clase son consideradas complejas e inestables, por lo que se encuentran prácticamente ausentes en aplicaciones a escala industrial (Illanes, 2008).

Aunque es lógico que haya una relación directa entre el porcentaje de ventas y el empleo de enzimas, existen variaciones en dependencia del tipo de proceso biocatalítico donde se utilizan. En la figura 6 se muestra un esquema con los tipos de enzimas más utilizados en síntesis orgánica.

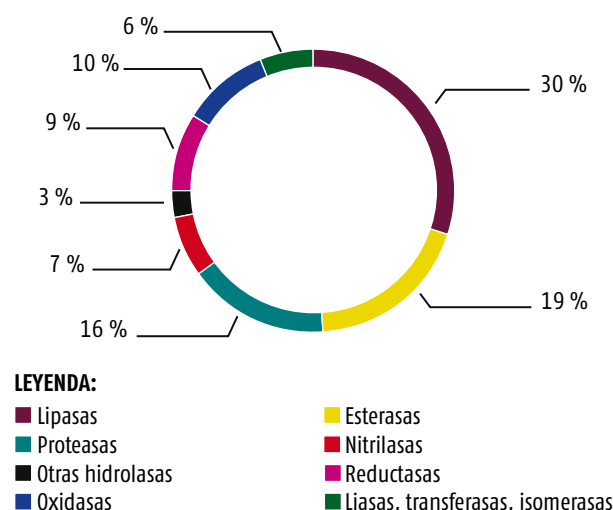


Figura 6. Tipos de enzimas más utilizadas en biocatálisis con énfasis en síntesis orgánica (porcentaje de utilización).

Producción industrial de compuestos a través del empleo de enzimas como biocatalizadores

La utilización de enzimas como biocatalizadores para la producción de compuestos a nivel industrial es muy alentadora (BCC Report C-147NA, 2002). La información presentada en la tabla 1 ilustra la importancia creciente de dicha utilización en procesos industriales. Para este estudio comparativo se seleccionaron desde los productos a granel más baratos hasta los más caros, como los que se obtienen mediante reacciones de química fina (vitaminas o antibióticos). Algunos de estos compuestos no pueden obtenerse por síntesis química tradicional. Por otra parte, las aplicaciones industriales de las enzimas en función del tipo de reacción que catalizan se muestran en la tabla 2.

Entre las compañías más importantes en la producción y venta de enzimas se encuentran: Novozymes (Dinamarca), DSM (Holanda), Genencor International (Finlandia, EE. UU.), Fluka (Suiza), Amano Pharmaceutical Co. (Japón), Sankyo Co. (Japón) y Sigma Chemical (EE. UU.).

Tabla 1. Producción mundial (en toneladas, año 2002) y precio (USD/kg) de varios compuestos que son el resultado de diferentes procesos enzimáticos.

PRODUCTO	PRODUCCIÓN MUNDIAL (T/AÑO)	MERCADO MUNDIAL PRECIO (USD/KG)
Bio-etanol	38 000 000	0,62
Ácido L-glutámico	1 500 000	2,32
Ácido cítrico	1 500 000	1,24
L-lisina	350 000	3,10
Ácido láctico	250 000	3,10
Vitamina C	80 000	12,40
Ácido glucónico	50 000	2,32
Antibióticos (productos a granel)	30 000	232,50
Antibióticos (especializados)	5 000	1 325,00
Xantanos	20 000	12,40
L-hidroxifenilalanina	10 000	15,50
Dextranos	200	124,00
Vitamina B ₁₂	3	38 750,00

Fuente: Soetaert y Vandamme, 2006; Grunwald, 2009.

Los procesos en los que intervienen estas proteínas deben ser congruentes con las características y propiedades de la enzima a emplear. Por ejemplo, debe tenerse en cuenta la tolerancia a elevadas temperaturas, la estabilidad frente al pH y a solventes orgánicos, entre otros factores.

Nanopartículas: presente y perspectivas para su aplicación en biocatálisis

A lo largo de este artículo dedicado a la biocatálisis, se ha informado acerca de la utilización de las enzimas en varios campos relacionados con la producción industrial de compuestos, así como otros procesos y áreas de actividad en los que estas intervienen como biocatalizadores. Es necesario aclarar que no existe necesariamente una vinculación directa entre estas aplicaciones y la escala o los procesos establecidos a nivel de industria (síntesis orgánica). Otro aspecto ya mencionado es la insolubilización o inmovilización de enzimas como procedimiento muy generalizado para enfrentar el reto de la estabilización de estas proteínas (Guisán *et al.*, 1993). En gran medida, la inmovilización se consigue mediante la unión de

Tabla 2. Aplicaciones de enzimas a gran escala en bioquímica industrial, organizadas de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan. (Se muestran los productos que sintetizan y la producción en toneladas en el año 2000.)

TIPO DE REACCIÓN	ENZIMA	PRODUCTO	PRODUCCIÓN (TONELADAS)
Hidrólisis	nitrilo hidrolasa	acrilamida	100 000
	penicilino amidasa	ácido 6-amino penicilánico	10 000
Resolución de compuestos quirales	hidantoinasa	4-hidroxi-D-fenilglicina	1 200
	enzimas de <i>Pseudomonas</i>	L-cisteína	500
	dehalogenasa	(S)-2-cloropropionato	2 000
Oxidación	D-sorbitol dehidrogenasa	L-sorbosa	80 000
Hidroxilación	niacin hidroxilasa	ácido 6-hidroxinicotínico	20
Reducción	β -cetorreductasa	(R)-carnitina	300
Síntesis de enlace C-C	piruvato descarboxilasa	(R)-fenilacetil carbinol	500
	tirosinfenol liasa	3,4-dihidroxi-fenil-alanina (L-DOPA)	300
Conversión de precursores quirales	fumarasa	L-malato	500
	aspartato amonio liasa	L-aspartato	300
Síntesis de péptidos	termolisina	α -aspartamo	10 000
Transferencia de glicosilos	ciclodextrina glucano transferasa (CGT-asa)	β -ciclodextrina	10 000

Fuente: Soetaert y Vandamme, 2006; Illanes, 2008; Grunwald, 2009.

la enzima a superficies sólidas, porosas o no, lo que permite la reutilización del biocatalizador y elimina otra de las restricciones para la aplicación de este tipo de moléculas en procesos químicos. En la inmovilización de proteínas sobre superficies sólidas, uno de los componentes esenciales es el material al cual se unirá la enzima. Las dimensiones de este pueden abarcar desde la micro hasta la nano-escala (Liu *et al.*, 2012), ya que las nanopartículas pueden actuar también como soportes para la inmovilización, de forma similar a las matrices utilizadas convencionalmente.

Se conocen los avances en química biomimética y su relación con las enzimas artificiales y la catálisis por diseño (Breslow, 1995). Debido al alto costo y los problemas de estabilidad presentados por las enzimas naturales, se han realizado grandes esfuerzos para sustituirlas por enzimas artificiales o miméticas (Breslow, 1995; Zen y Kumar, 2001; Wulff, 2002). En este sentido, se han logrado resultados exitosos en la obtención de materiales miméticos de citocromo P450 (Volz y Holzbecher, 1997; Aissaoui *et al.*, 1998; Schenning *et al.*, 1998), proteasas de tipo serino (Ghosh *et al.*, 1999), dioxigenasas (Funabiki *et al.*, 1998; Chen y Que, 1999), fosfodiesterasas (Molenveld *et al.*, 1999), ligasas (Han *et al.*, 2000), nucleasas

(Muche y Gobel, 1996), así como en el proceso de metanogénesis (Signor *et al.*, 2000). En el campo de los materiales miméticos, se han informado muchos resultados vinculados a la actividad peroxidasa, incluidos compuestos como hemina (Aissaoui *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Fruk y Niemeyer, 2005), hematina (Genfa y Dasgupta, 1992), hemoglobina (Wang *et al.*, 2002), ciclodextrina (Liu *et al.*, 1999), porfirinas (Ci *et al.*, 1993; Bonar-Law y Sanders, 1995), empleados todos para la detección de H_2O_2 y ácido ascórbico (Genfa y Dasgupta, 1992; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Debido al interés biotecnológico generado por las nanopartículas, dado por su importancia, los nanomateriales –especialmente los nanomateriales funcionales– han atraído la atención de los investigadores en los últimos años (Roucoux *et al.*, 2002; Burda *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007; Pérez, 2007; Wei y Wang, 2008). En virtud de su elevada relación superficie/volumen, los nanomateriales son muy atractivos para ser utilizados como catalizadores eficientes en catálisis homogénea o heterogénea, aplicaciones para las que han sido estudiados intensamente en la última década (Roucoux *et al.*, 2002; Burda *et al.*, 2005).

Los nanomateriales magnéticos, como la magnetita (Fe_3O_4), se han empleado asiduamente

en estudios de resonancia magnética, liberación de drogas, separaciones biológicas, e incluso en catálisis biológica. Estos nanomateriales magnéticos son química y biológicamente inertes *per se*, por lo que generalmente se funcionalizan con metales catalíticos, enzimas o anticuerpos con el objetivo de elevar su funcionalidad (Bergemann *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004; Brähler *et al.*, 2006).

Los sistemas miméticos de peroxidasas presentan iones Fe^{2+} o Fe^{3+} en sus centros de reacción. Es bien conocido el reactivo de Fenton, que consiste en una disolución de iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno y es ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales (Figueroa-Espí, 2010). En el caso de las nanopartículas de magnetita, no existen informes que expliquen el mecanismo catalítico de la actividad peroxidasa; sin embargo, se ha propuesto que los átomos de hierro de la superficie contribuyen a la actividad observada y que los iones Fe^{2+} desempeñan un papel importante en la catálisis (Gao *et al.*, 2007).

Este acercamiento a la relación existente entre las nanopartículas y la biocatálisis comienza, según nuestra apreciación, a partir de dos puntos de vista:

1. Considerar como biocatalizadores las nanopartículas con actividad catalítica intrínseca, como la presentada por varios materiales miméticos (figura 7).
2. Considerar como biocatalizadores las nanopartículas con enzimas inmovilizadas (figura 8). Es decir, estos biocatalizadores son nanomateriales sobre los que se inmovilizan proteínas –pudieran considerarse nanoarreglos– mediante un tratamiento de funcionalización –pudiera no ser necesario– similar al aplicado a los soportes utilizados tradicionalmente.

La aplicación de nanopartículas miméticas y nanoarreglos (nanopartículas magnéticas, de oro, de plata, nanotubos de carbono, entre otras) en catálisis y en procesos de reconocimiento se encuentra muy documentada en la literatura especializada (Kim *et al.*, 2006a; Figueroa-Espí, 2010). Por ejemplo, se

han utilizado nanopartículas magnéticas funcionalizadas para inmovilizar distintos ligandos, tales como un anticuerpo policlonal anti-*Escherichia coli* (Cheng *et al.*, 2009), una lipasa (Huang *et al.*, 2003), colesterol oxidasa (Kouassi *et al.*, 2005) y fosfatasa alcalina (Saiyed *et al.*, 2007). En todos los casos se obtuvieron altos porcentajes de inmovilización y alta tolerancia a variaciones de pH, temperatura y concentración de sustrato.

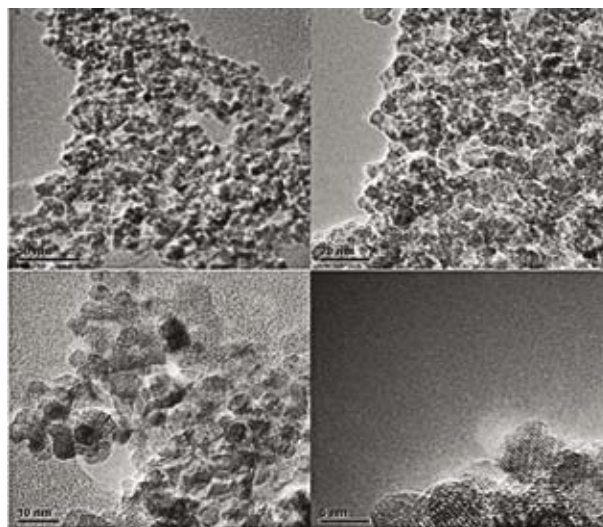
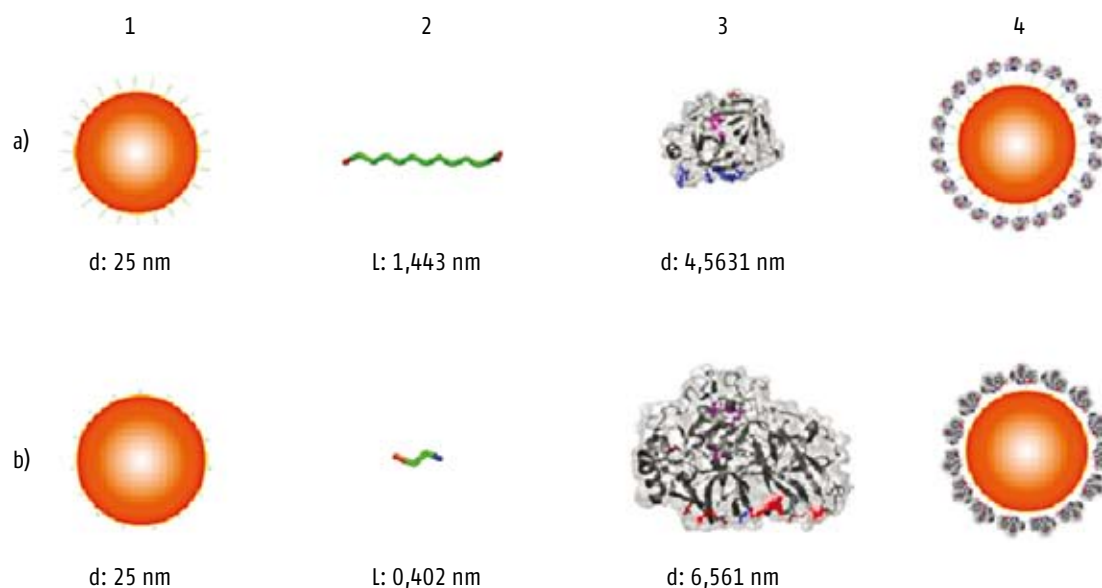


Figura 7. Nanopartículas magnéticas compuestas por ferrita de manganeso (MnFe_2O_4). Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se visualiza la forma esférica de las nanopartículas con un diámetro en el intervalo entre 5 y 15 nm. Este tamaño es indicador de excelentes capacidades catalíticas, ya que existe una relación inversa entre el tamaño de la nanopartícula y su actividad catalítica.

Las tecnologías de celdas de biocombustibles basadas en enzimas inmovilizadas (citocromo c, lacasas, glucosa oxidasas, peroxidasas, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa), que utilizan como combustible la glucosa, reciben en la actualidad una atención particular y se hacen cada día más competitivas en aplicaciones prácticas (Kim *et al.*, 2006b; Wan, 2011). Las dos limitaciones principales encontradas hasta el momento están relacionadas con el corto tiempo de vida media y la baja densidad, propiciados por los problemas de estabilidad de las enzimas, la velocidad de transferencia de electrones y la carga enzimática permitida en los biocatalizadores.

**LEYENDA:**

1: nanopartícula funcionalizada. 2: grupo funcional. 3: enzima utilizada como ligando. ■ grupos amino reactivos de residuos con accesibilidad al solvente. ■ grupos carboxilo reactivos de residuos con accesibilidad al solvente. ■ sitio activo de la enzima.

4: biocatalizador inmovilizado «nanoarreglo». d: diámetro. L: longitud.

Figura 8. Inmovilización de enzimas sobre nanopartículas de oro funcionalizadas: a) grupo funcional: ácido mercaptoundecanoico, enzima: tripsina de páncreas bovino (*Bos taurus*); b) grupo funcional: cisteamina, enzima: lacasa (*Trametes maxima*).

Los recientes progresos en nanobiocatálisis abren posibilidades de mejoramiento en estos aspectos. Muchos materiales nanoestructurados, como los soportes mesoporosos, las nanopartículas, las nanofibras y los nanotubos, han demostrado su eficiencia en la inmovilización de enzimas. Estos materiales presentan una alta conductividad, facilidades cinéticas para la reacción y un área superficial elevada, lo que posibilita el aumento de la carga de enzima en el biocatalizador; ello a su vez permite resolver el problema relacionado con la densidad en la construcción de celdas de biocombustibles. Además, los esfuerzos realizados para incrementar la retención de la actividad funcional y la estabilidad de las enzimas inmovilizadas, con el uso de nanoestructuras, han permitido un apreciable progreso en la biocatálisis nanoestructurada, ya que han posibilitado superar el mayor obstáculo en el desarrollo de mejores celdas de biocombustibles (Kim *et al.*, 2006b). Este es un ejemplo claro de cómo pueden combinarse las nanociencias y la ingeniería para solucionar las dificultades relacionadas con las propiedades dependientes del tamaño y los fenómenos que se

presentan a escala nanométrica. Esta alianza ha permitido a los científicos desarrollar nuevos procedimientos para lograr tecnologías de procesos químicos eficientes y sustentables (Wan, 2011).

Si retomamos la definición de biocatálisis más aceptada por los especialistas en esta área (utilización de enzimas como catalizadores de procesos en condiciones artificiales), entonces es discutible la inclusión de las nanopartículas catalíticamente competentes y miméticas dentro de los biocatalizadores. Sin embargo, consideramos acertado incluir los nanoarreglos, basados en la inmovilización de enzimas sobre la superficie de nanopartículas, en el campo de la biocatálisis. Estos biocatalizadores presentan un potencial aún no explotado al máximo en procesos biocatalíticos.

Conclusiones

Las enzimas constituyen catalizadores biológicos con propiedades muy atractivas para múltiples aplicaciones, como la biocatálisis, la cual consiste en el aprovechamiento de la función catalítica de estas proteínas para producir una transformación química deseada en condiciones artificiales. La

amplia demanda de representantes de todas las clases de estas moléculas para procesos industriales se refleja en las ventas anuales, superiores a los mil millones de dólares en todo el mundo. Asimismo, el extraordinario beneficio social que se deriva del uso de las enzimas queda evidenciado por la producción anual de decenas de millones de toneladas de compuestos químicos obtenidos a partir de la utilización de biocatalizadores. El principal reto en biocatálisis consiste en manipular las propiedades de la molécula enzimática para lograr que desempeñe su función catalítica de manera óptima, en condiciones alejadas de las que prevalecen en su entorno fisiológico. Entre las múltiples metodologías dirigidas a superar una de las principales limitaciones del uso de las enzimas en procesos industriales –la estabilidad del biocatalizador– se encuentra la inmovilización de enzimas en soportes sólidos. En este sentido, los nanoarreglos de enzimas inmovilizadas en la superficie de nanopartículas constituyen un grupo de biocatalizadores inmovilizados de última generación, con propiedades biocatalíticas superiores a las de los derivados inmovilizados convencionales.

Agradecimientos

Agradecemos al ICP-CSIC (Madrid, España), al CONACYT (México) y a la Universidad de La Habana (Cuba) por el financiamiento de proyectos que han cubierto parte de esta investigación. Igualmente, expresamos agradecimiento al ICP-CSIC y al CQF-MINSAP (La Habana, Cuba) por el suministro de muchos de los compuestos modelos presentados en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- ABIÁN, O.; C. MATEO, G. FERNÁNDEZ-LORENTE, J. PALOMO *et al.* (2001): «Stabilization of Immobilized Enzymes against Water Soluble Organic Cosolvents and Generation of Hyper-hydrophilic Microenvironments Surrounding Enzyme Molecules», *Biocatalysis Biotransformation*, vol. 19, pp. 489-504.
- ADAMCZAK, M. y S. HARI KRISHNA (2004): «Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis», *Food Technology and Biotechnology*, vol. 42, n.º 4, pp. 251-264.
- ADAMS, M. y R. KELLY (1998): «Finding and Using Hyperthermophilic Enzymes», *TIBTECH Innovations*, vol. 16, pp. 329-332.
- AISSAOUI, H.; R. BACHMANN, A. SCHWEIGER y W.D. WOGGON (1998): «On the Origin of the Low-spin Character of Cytochrome P450cam in the Resting State - Investigations of Enzyme Models with Pulse EPR and ENDOR spectroscopy», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 37, pp. 2998-3002.
- ALEXEEVA, M.; R. CARR y N.J. TURNER (2003): «Directed Evolution of Enzymes: New Biocatalysts for Asymmetric Synthesis», *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 1, pp. 4133-4137.
- ARNOLD, F.H. (2001): «Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design», *Nature*, vol. 409, pp. 253-257.
- ARROYO, M. (1998): «Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones», *Ars Pharmaceutica*, vol. 39, n.º 2, pp. 23-39.
- BALLARD, D.G.H.; A. COURIS, I.M. SHIRLEY y S.C. TAYLOR (1983): «A Biotech Route to Polyphenylene», *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 954-955.
- BARDY, S.L.; S.Y. NG, D.S. CARNEGIE y K.F. JARRELL (2005): «Site-directed Mutagenesis Analysis of Amino Acids Critical for Activity of the Type I Signal Peptidase of the Archaeon *Methanococcus voltae*», *Journal of Bacteriology*, vol. 187, n.º 3, pp. 1188-1191.
- BCC REPORT C-147NA (2002): *Enzymes for Industrial Applications*, Business Communications Co., Norwalk, EE. UU.
- BERGEMANN, C.; D. MÜLLER-SCHULTE, J. OSTER, L.Á. BRASSARD *et al.* (1999): «Magnetic Ion-exchange Nano- and Microparticles for Medical, Biochemical and Molecular Biological Applications», *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 194, n.ºs 1-3, pp. 45-52.
- BHOSALE, S.H.; M.B. RAO y V.V. DESHPANDE (1996): «Industrial Aspects of Glucose Isomerase», *Microbiological Reviews*, vol. 60, pp. 280-300.
- BIOTECHNOLOGY CENTER OF EXCELLENCE CORPORATION (2003): *Estudio de mercado*, <<http://www.caf.com>> y <<http://www.eclac.cl/dmaah/proyectos/caf/index.htm>> [23/11/ 2012].
- BOERSMA, Y.L.; M.J. DROGE y W.J. QUAX (2007): «Selection Strategies for Improved Biocatalysts», *FEBS Journal*, vol. 274, n.º 9, pp. 2181-2195.

- BOLLER, T.; C. MEIER y S. MENZLER (2002): «Eupergit Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis», *Organic Process Research & Development*, vol. 6, n.º 4, pp. 509-519.
- BOMMARIUS, A.S. y J.M. BROERING (2005): «Established and Novel Tools to Investigate Biocatalyst Stability», *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 23, n.ºs 3 y 4, pp. 125-139.
- BOMMARIUS, A.S. y B.R. RIEBEL (2004): *Biocatalysis: fundamentals and applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- BONAR-LAW, R.P. y J.K.M. SANDERS (1995): «Polyol Recognition by a Steroid-capped Porphyrin; Enhancement and Modulation of Misfit Binding by Water or Methanol», *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, pp. 259-271.
- BRÄHLER, M.; R. GEORGIEVA, N. BUSKE, A. MÜLLER et al. (2006): «Magnetite-loaded Carrier Erythrocytes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging», *Nano Letters*, vol. 6, n.º 11, pp. 2505-2509.
- BRAKMANN, S. y K. JOHNSON (eds.) (2002): *Molecular Evolution of Proteins: Or How to Improve Enzymes for Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim.
- BRESLOW, R. (1995): «Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design», *Accounts of Chemical Research*, vol. 28, pp. 146-153.
- BURDA, C.; X.B. CHEN, R. NARAYANAN y M.A. EL-SAYED (2005): «Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes», *Chemical Reviews*, vol. 105, n.º 4, pp. 1025-1102.
- CAO, L.; L. VAN LANGEN y R. SHELDON (2003): «Immobilised Enzymes: Carrier-bound or Carrier-free?», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, pp. 1-8.
- CHEN, K. y L. QUE (1999): «Cis-dihydroxylation of Olefins by a Non-heme Iron Catalyst: a Functional Model for the Rieske Dioxygenases», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, pp. 2227-2229.
- CHEN, R. (2001): «Enzyme Engineering: Rational Design versus Directed Evolution», *TIBTECH Innovations*, vol. 19, n.º 1, pp. 13-14.
- CHENG, Y.; Y. LIU, J. HUANG, K. LI et al. (2009): «Combining Biofunctional Magnetic Nanoparticles and ATP Bioluminescence for Rapid Detection of *Escherichia coli*», *Talanta*, vol. 7, pp. 1332-1336.
- CHODORGE, M.; L. FOURAGE, C. ULLMANN, V. DUVIVIER et al. (2005): «Rational Strategies for Directed Evolution of Biocatalysts - Application to *Candida antarctica* lipase B (CALB)», *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 347, pp. 1022-1026.
- CI, Y.X.; Y.G. ZHENG, J.K. TIE y W.B. CHANG (1993): «Chemiluminescence Investigation of the Interaction of Metalloporphyrins with Nucleic Acids», *Analytica Chimica Acta*, vol. 282, n.º 3, pp. 695-701.
- DAVIS, B. (2003): «Chemical Modification of Biocatalysts», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, pp. 379-386.
- DECLERCK, N.; M. MACHIUS, P. JOYET, G. WIEGAND et al. (2003): «Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and Modulation of its Stability over a 50 °C Temperature Range», *Protein Engineering Design and Selection*, vol. 16, n.º 4, pp. 287-293.
- DEL MONTE-MARTÍNEZ, A. (2000): «Obtención de un nuevo material para ser utilizado como biocatalizador inmovilizado en Química Fina a partir de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*», tesis de maestría en Bioquímica de las Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, <<http://www.fbio.uh.cu/intranet.fbio.uh.cu/bibliotecavirtual>> [23/11/2012].
- DEMIRJIAN, D.C.; F. MORIS-VARAS y C.S. CASSIDY (2001): «Enzymes from Extremophiles», *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, n.º 2, pp. 144-151.
- FIGUEROA-ESPÍ, V. (2010): «Actividad catalítica y conjugación de nanopartículas de ferrita de manganeso con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la Sticholisina II», tesis de maestría en Bioquímica, Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales-Facultad de Biología, Universidad de La Habana, <<http://www.fbio.uh.cu/intranet.fbio.uh.cu/bibliotecavirtual>> [23/11/2012].
- FRUK, L. y C.M. NIEMEYER (2005): «Covalent Heme-DNA Adducts for Generating a Novel Class of Artificial Heme Enzymes», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, pp. 2603-2606.
- FUNABIKI, T.; T. YAMAZAKI, A. FUKUI, T. TANAKA et al. (1998): «Oxygenative Cleavage of Chlorocatechols with Molecular Oxygen Catalyzed by Non-Heme Iron(III) Complexes and its Relevance to Chlorocatechol Dioxygenases», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 37, pp. 513-515.
- GAO, L.; J. ZHUANG, L. NIE, J. ZHANG et al. (2007): «Intrinsic Peroxidase-like Activity of Ferromagnetic Nanoparticles», *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 577-583.
- GENFA, Z. y P.K. DASGUPTA (1992): «Hematin as a Peroxidase Substitute in Hydrogen Peroxide Determinations», *Analytical Chemistry*, vol. 64, pp. 517-522.

- GHOSH, M.; J.L. CONROY y C.T. SETO (1999): «Hydrolysis of Amides Catalyzed by 4-Heterocyclohexanones: Small Molecule Mimics of Serine Proteases», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, pp. 514-516.
- GOMES, J. y W. STEINER (2004): «The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes», *Food Technology and Biotechnology*, vol. 42, n.º 4, pp. 223-235.
- GRUNWALD, P. (2009): *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications*, Imperial College Press, London.
- GUISÁN, J.M.; R. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, V. RODRÍGUEZ, A. BASTIDA et al. (1993): «Enzyme Stabilization by Multipoint Covalent Attachment to Activated Pre-existing Supports», en W.J.J. van der Tweel, A. Harder y R.M. Buitelaar (eds.), *Stability Stabilization of Enzymes*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 53-58.
- HAKI, G.D. y S.K. RAKSHIT (2003): «Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review», *Bioresource Technology*, vol. 89, n.º 1, pp. 17-34.
- HALLDÓRSDÓTTIR, S.; E. THÓRÓLFSÓTTIR, R. SPILLIAERT, M. JOHANSSON et al. (1998): «Cloning, Sequencing and Overexpression of a *Rhodothermus marinus* Gene Encoding a Thermostable Cellulase of Glycosylhydrolase Family 12», *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, pp. 277-284.
- HAN, M.J.; K.S. YOO, J.Y. CHANG y T.K. HA (2000): «5-(beta-Cyclodextrinylamino)-5-Deoxy-alpha-D-Riboses as Models for Nuclease, Ligase, Phosphatase, and Phosphorylase», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, pp. 347-349.
- HARING, D. y P. SCHREIER (1999): «Cross-linked Enzyme Crystals», *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 3, pp. 35-38.
- HUANG, S.; M. LIAO y D. CHEN (2003): «Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles», *Biotechnology Progress*, vol. 19, pp. 1095-1100.
- ILLANES, A. (1999): «Stability of Biocatalysts», *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 2, pp. 1-9.
- ILLANES, A. (2008): *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer, Amsterdam.
- ILLANES, A.; L. WILSON, E. CABALLERO, R. FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al. (2006): «Crosslinked Penicillin Acylase Aggregates for Synthesis of β -lactam Antibiotics in Organic Medium», *Applied Biochemistry in Biotechnology*, vol. 133, pp. 189-202.
- IUBMB (1984): *Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular*, <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>> [23/11/2012].
- KAUR, J. y R. SHARMA (2006): «Directed Evolution: an Approach to Engineer Enzymes», *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 26, pp. 165-199.
- KIM, J.; H. JIA y P. WANG (2006b): «Challenges in Biocatalysis for Enzyme-based Biofuel Cells», *Biotechnology Advances*, vol. 24, pp. 296-308.
- KIM, J.; J.W. GRATE y P. WANG (2006a): «Nanostructures for Enzyme Stabilization», *Chemical Engineering Science*, vol. 61, n.º 3, pp. 1017-1026.
- KLIBANOV, A.M.; Z. BERMAN y B.N. ALBERTI (1981): «Preparative Hydroxylation of Aromatic Compounds Catalysed by Peroxidase», *Journal of the American Chemical Society*, vol. 103, pp. 6263-6264.
- KOUASSI, G.K., J. IRUDAYARAJ y G. MCCARTY (2005): «Examination of Cholesterol Oxidase Attachment to Magnetic Nanoparticles», *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 3, pp. 1-7.
- LEISOLA, M. y O. TURUNEN (2007): «Protein Engineering: Opportunities and Challenges», *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 75, n.º 6, pp. 1225-1232.
- LIU, W.; L. WANG y R. JIANG (2012): «Specific Enzyme Immobilization Approaches and Their Application with Nanomaterial», *Topics in Catalysis*, vol. 55, pp. 1146-1156.
- LIU, Z.H.; R.X. CAI, L.Y. MAO, H.P. HUANG et al. (1999): «Highly Sensitive Spectrofluorimetric Determination of Hydrogen Peroxide with β -cyclodextrin-hemin as Catalyst», *Analyst*, vol. 124, pp. 173-176.
- MACRAE, A.R. y R.C. HAMMOND (1985): «Present and Future Applications of Lipases», *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 3, pp. 193-217.
- MATEO, C.; O. ABIÁN, M. BERNEDO, E. CUENCA et al. (2005): «Some Special Features of Glyoxyl Supports to Immobilize Proteins», *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 37, pp. 456-462.
- MATEO, C.; J.M. PALOMO, L.M. VAN LANGEN, F. VAN RANTWIJK et al. (2004): «A New, Mild Cross-linking Methodology to Prepare Cross-linked Enzyme Aggregates», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 86, pp. 273-276.

- MISLOVIČOVÁ, D.; J. MASÁROVÁ, M. BUČO y P. GEMEINER (2006): «Stability of Penicillin G Acylase Modified with Various Polysaccharides», *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, pp. 579-585.
- MOLENVELD, P.; J.F.L. ENGBERSEN y D.N. REINHOUDT (1999): «Specific RNA Dinucleotide Cleavage by a Synthetic Calix», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, pp. 3189-3192.
- MORLEY, K.L. y R.J. KAZLAUSKAS (2005): «Improving Enzyme Properties: When are Closer Mutations Better?», *TIBTECH Innovations*, vol. 23, n.º 5, pp. 231-237.
- MOSIER, N.S. y M.R. LADISCH (2011): *Modern Biotechnology. Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*, John Wiley & Sons, New York.
- MUCHE, M.S. y M.W. GOBEL (1996): «Bis(guanidinium) Alcohols as Models of Staphylococcal Nuclease: Substrate Binding through Ion Pair Complexes and Fast Phosphoryl Transfer Reactions», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 35, pp. 2126-2129.
- OGINO, H.; T. UCHIHO, J. YOKOO, R. KOBAYASHI et al. (2001): «Role of Intermolecular Disulfide Bonds of the Organic Solvent Stable PST-01 Protease in its Organic Solvent Stability», *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, pp. 942-947.
- OZTURK, D.C.; D. KAZAN y A. ERARSLAN (2002): «Stabilization and Functional Properties of *Escherichia coli* Penicillin G acylase by Covalent Conjugation of Anionic Polysaccharide Carboxymethyl Cellulose», *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 18, pp. 881-888.
- PÉREZ, J.M. (2007): «Iron Oxide Nanoparticles», *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 535-536.
- ROIG, M. y J. KENNEDY (1992): «Perspectives of Chemical Modification of Enzymes», *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 12, pp. 391-412.
- ROUCOUX, A.; J. SCHULZ y H. PATIN (2002): «Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts?», *Chemical Reviews*, vol. 102, n.º 10, pp. 3757-3778.
- ROY, J.J. y T.E. ABRAHAM (2006): «Preparation and Characterization of Cross-linked Enzyme Crystals of Laccase», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 38, pp. 31-36.
- SAIYED, Z.M.; R. SHARMA, R. GODAWAT, S.D. TELANG et al. (2007): «Activity and Stability of Alkaline Phosphatase (ALP) Immobilized onto Magnetic Nanoparticles (Fe₃O₄)», *Journal of Biotechnology*, vol. 131, pp. 240-244.
- SCHENNING, A.; J.H.L. SPELBERG, D.H.V. HUBERT, M.C. FEITERS et al. (1998): «A Supramolecular Cytochrome P450 Mimic», *Chemistry - A European Journal*, vol. 4, pp. 871-880.
- SCHOEVAART, R.; M.W. WOLBERS, M. GOLUBOVIC, M. OTTENS et al. (2004): «Preparation, Optimization, and Structures of Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEA)», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 87, pp. 754-762.
- SCHWARTZ, R.D. y D.B. HUTCHINSON (1981): «Microbial and Enzymatic Production of 4,4'-Dihydroxybiphenyl Via Phenol Coupling», *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 3, pp. 361-363.
- SHIBUYA, H.; S. KANEKO y K. HAYASHI (2000): «Enhancement of the Thermostability and Hydrolytic Activity of Xylanase by Random Gene Shuffling», *Biochemical Journal*, vol. 349, pp. 651-656.
- SIGNOR, L.; C. KNUPPE, R. HUG, B. SCHWEIZER et al. (2000): «Methane Formation by Reaction of a Methyl Thioether with a Photo-excited Nickel Thiolate: A Process Mimicking Methanogenesis in Archaea», *Chemistry - A European Journal*, vol. 6, pp. 3508-3516.
- SINISTERRA, J.V. (1994): «Preparación de sustancias homoquirales por métodos biotecnológicos: una nueva tecnología en la síntesis de fármacos quirales», *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 60, pp. 645-673.
- SOETAERT, W. y E. VANDAMME (2006): «The Impact of Industrial Biotechnology», *Biotechnology Journal*, vol. 1, pp. 756-769.
- STEMMER, W.P. (1994): «Rapid Evolution of a Protein *in vitro* by DNA Shuffling», *Nature*, vol. 370, pp. 389-391.
- SYLVESTRE, J.; H. CHAUTARD, F. CEDRONE y M. DELCOURT (2006): «Directed Evolution of Biocatalysts», *Organic Process Research & Development*, vol. 10, n.º 3, pp. 562-571.
- VAN DEN BURG, B. (2003): «Extremophiles as a Source for Novel Enzymes», *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, pp. 213-218.
- VAN DEN BURG, B. y V.G.H. EIJNSINK (2002): «Selection of Mutations for Increased Protein Stability», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, pp. 333-337.

- VOLZ, H. y M. HOLZBECHER (1997): «A Bridged Porphyrinato(thiolato)iron(III) Complex as a Model of the Active Center of the Cytochrome P-450 Isozyme», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 36, pp. 1442-1445.
- WAN, P. (2011): *Nanoscale Biocatalysis: Methods and Protocols*, Human Press, New York.
- WANG, Q.L.; Z.H. LIU, R.X. CAI y G.X. LU (2002): «Highly Sensitive Determination of Hydrogen Peroxide with Hemoglobin as Catalyst», *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 30, pp. 928-931.
- WANG, Q.L., Z.H. LIU, L.Y. MAO y R.X. CAI (2000): «Highly Sensitive Fluorescent Enhance Assay for Ascorbic Acid», *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 28, pp. 1229-1232.
- WEI, H. y E. WANG (2008): «Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection», *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 2250-2254.
- WULFF, G. (2002): «Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers», *Chemical Reviews*, vol. 102, pp. 1-27.
- YANG, H.H.; S.Q. ZHANG, X.L. CHEN, Z.X. ZHUANG et al. (2004): «Magnetite-containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations», *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 1316-1321.
- ZEN, J.M. y A.S. KUMAR (2001): «A Mimicking Enzyme Analogue for Chemical Sensors», *Accounts of Chemical Research*, vol. 34, pp. 772-780.
- ZHU, Q.Z.; F.H. LIU, J.G. XU, W.J. SU et al. (1998): «Fluorescence Immunoassay of α -1-fetoprotein with Hemin as a Mimetic Enzyme Labelling Reagent. Fresenius», *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 362, pp. 537-540.

