



RECIENTES AVANCES Y APLICACIONES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA INMOVILIZADA POR UNIÓN COVALENTE

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2019/2020

Alumna: Belén Cacho Salán

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

Universidad de Valladolid

Índice

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
3.	Justificación	3
4.	Objetivos	3
5.	Material y métodos	3
6.	Resultados y discusión	4
6.1.	Aspectos generales de la enzima glucosa oxidasa	4
6.2.	Aplicaciones de la enzima glucosa oxidasa en la industria alimentaria	6
6.3.	Visión general de los sistemas de inmovilización de enzimas	8
6.4.	Avances en la inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa	14
7.	Conclusiones	22
8.	Referencias bibliográficas	23
9.	Anexo I	28

1. Resumen

Las enzimas son catalizadores biológicos que desempeñan un papel primordial en distintos procesos bioquímicos de la industria alimentaria. Una de las enzimas más utilizadas en este ámbito es la glucosa oxidasa debido, en parte, a sus propiedades oxidantes al convertir la glucosa en ácido glucónico, consumiendo oxígeno y produciendo peróxido de hidrógeno. La inmovilización de la glucosa oxidasa se ha empleado como estrategia para mejorar su actividad y estabilidad y permitiendo también su reutilización, por lo que permite que los procesos industriales sean más rentables. Uno de los métodos de inmovilización más destacados es la inmovilización por unión covalente gracias, principalmente, a que la unión de la enzima con el soporte es muy estable. En este trabajo se hace una revisión bibliográfica de los avances recientes en la inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa. Los avances de este método, tanto en los en materiales de soporte como en los distintos procedimientos de inmovilización, realizados en los últimos años están siendo satisfactorios, permitiendo aplicar la glucosa oxidasa en distintos procesos como envasado activo o producción industrial de ácido glucónico mediante inmovilización covalente.

Palabras clave: glucosa oxidasa, inmovilización, unión covalente, aplicaciones, industria alimentaria.

Abstract

The enzymes are biological catalysts that it plays a main role in different biochemical processes in the food industry. One of the most widely used enzymes in this field is glucose oxidase due, in part, to its oxidizing properties by converting glucose to gluconic acid producing hydrogen peroxide. The immobilization of glucose oxidase has been used as a strategy to improve its activity and stability and also allow its reuse, thus allowing industrial processes to be more profitable. One of the most prominent immobilization methods is immobilization by covalent bonding, mainly because the binding of the enzyme with the support is very stable. In this work, a bibliographic review of recent advances in the covalent immobilization of the enzyme glucose oxidase is made. The advances of this method, both in support materials and in the different procedures carried, out in recent years are being satisfactory, allowing the application of glucose oxidase in different processes such as active packaging or industrial production of gluconic acid through covalent immobilization.

Keywords: glucose oxidase, immobilization, covalent bond, applications, food industry.

2. Introducción

En los últimos años se ha observado un gran aumento en el uso de enzimas en diversas industrias, como la farmacéutica, la biotecnológica, la química y, sobre todo, en la industria alimentaria. La importancia de las enzimas en la industria alimentaria proviene de las ganancias que se obtienen de su uso, mejorando los procesos de fabricación y la calidad de los alimentos, por lo que su venta se ha incrementado de manera constante en los últimos años (del Moral y col., 2015).

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que tienen la capacidad de acelerar y facilitar reacciones químicas (Sánchez-Ramírez y col., 2014). Las enzimas, también llamadas catalizadores biológicos, controlan la mayoría de los procesos bioquímicos en los organismos y, normalmente, la concentración de enzima necesaria es muy pequeña (Enderle y col., 2012). Algunas cuestiones que han limitado la utilización de enzimas en diversos procesos son las condiciones de trabajo bajo las cuales las enzimas son estables y el gran coste del proceso por el alto precio de las enzimas.

Gracias a los procesos de inmovilización de enzimas, los problemas mencionados anteriormente se pueden solucionar en gran medida, ya que, por ejemplo, la inmovilización permite la reutilización de la enzima, entre otras ventajas (Cabral y col., 2018). Uno de los procesos de inmovilización de enzimas que existe actualmente es la inmovilización por unión covalente, un método que en los últimos años está recibiendo bastante atención por parte de los investigadores por sus múltiples ventajas, entre las cuales destacan su sencillez, la gran estabilidad de la enzima inmovilizada y que no hay pérdida de la enzima después del proceso de inmovilización.

Por otro lado, la enzima glucosa oxidasa está recibiendo también bastante atención debido a sus diversas aplicaciones en las distintas industrias, entre ellas la industria alimentaria. La reacción catalizada por la glucosa oxidasa transforma la glucosa en ácido glucónico eliminando oxígeno y generando peróxido de hidrógeno, una propiedad interesante en el campo de la conservación de alimentos, ya que la enzima tiene efecto oxidante y el peróxido de hidrógeno actúa como un agente antibacteriano y antifúngico (Wong y col., 2008).

Las aplicaciones de la glucosa oxidasa se encuentran en la industria de la panificación, mejorando las propiedades sensoriales de los productos (Kouassi-Koffi y col., 2018), actuando como conservante o antioxidante por su capacidad de eliminar oxígeno, utilizándose también en la industria láctea como agente antibacteriano (Wong y col., 2008), en la producción de vino con bajo contenido en alcohol porque en su reacción se elimina la glucosa que de otro modo se convertiría en alcohol (Valencia y

col., 2017) y en la producción de huevo en polvo para evitar el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard (Zia y col., 2013).

3. Justificación

Como se ha comentado anteriormente, la utilización de la enzima glucosa oxidasa en el campo de la industria alimentaria se encuentra en pleno auge desde hace unos años debido a sus múltiples propiedades, beneficios y aplicaciones. Los procesos de inmovilización de enzimas, entre los cuales se encuentra la inmovilización por unión covalente, permiten una mejora en la actividad y estabilidad de la enzima y, también, reducir los costes al permitirse su reutilización.

Por lo tanto, es necesario conocer los últimos avances en la inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa para poder seguir optimizando este proceso de inmovilización y permitir la utilización de esta enzima inmovilizada de manera óptima y eficaz en diversos ámbitos de la industria alimentaria.

4. Objetivos

El principal objetivo de esta revisión consiste en estudiar la inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa recopilando toda la información actual existente sobre este método. Para hacer este estudio, en primer lugar, se revisará información sobre la enzima glucosa oxidasa y los distintos métodos de inmovilización enzimáticos que existen, revisando posteriormente los últimos avances en la inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa. Por otro lado, también se estudiarán las aplicaciones de esta enzima inmovilizada covalentemente en la industria alimentaria.

5. Material y métodos

En este estudio se ha realizado una búsqueda masiva de documentos y artículos científicos en relación con los avances sobre la enzima glucosa oxidasa, sus distintos mecanismos de inmovilización, centrándonos en la inmovilización covalente y sus posibles aplicaciones en la industria, destacando la industria alimentaria. Para la recopilación de datos se utilizaron las siguientes bases de datos: Web of Science (WOS), Scopus, ScienceDirect y, por último, Google Scholar, considerando que estas bases de datos cubren los campos necesarios para realizar dicha revisión. La

búsqueda se basó en las siguientes palabras claves: glucosa oxidasa, inmovilización, unión covalente, aplicaciones, industria alimentaria.

También se encontraron documentos a partir de las referencias de otros artículos y/o revisiones bibliográficas. Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta fueron que los artículos estuvieran en inglés o bien en español. En cuanto al rango de fecha de la publicación, para la búsqueda de la información general sobre la glucosa oxidasa y sus distintas aplicaciones en la industria alimentaria, así como los distintos tipos de inmovilización de enzimas que existen no se ha hecho ninguna restricción temporal. Por otro lado, para la búsqueda de los avances en la inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa y sus aplicaciones inmovilizada covalentemente en la industria alimentaria nos hemos centrado en los últimos 10 años. Se ha excluido aquellos trabajos encaminados al desarrollo de biosensores y células de biofuel con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada covalentemente que por la amplia información que se ha encontrado pueden ser objeto de revisiones específicas. En cuanto al proceso de selección de los artículos, se revisaron todos los resúmenes y conclusiones, y, en algunos casos, los artículos completos con el fin de poder decidir si la información que había en ellos estaba relacionada con el objetivo de nuestro trabajo. Finalmente, si el tema tratado en el documento era de interés, el documento ha sido transcrito para adecuarlo a la redacción del presente documento.

6. Resultados y discusión

En este apartado de la revisión se describe toda la información que se ha encontrado una vez procesada y ordenada. En primer lugar, se describen las características generales de la enzima glucosa oxidasa. En segundo lugar, se describen las distintas aplicaciones de la glucosa oxidasa en la industria alimentaria. En tercer lugar, se realiza una revisión de los distintos sistemas de inmovilización de enzimas que existen, destacando sus ventajas y desventajas. Por último, se describen los últimos avances en soportes y procedimientos que existen en los procesos de inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa, así como las distintas aplicaciones en la industria alimentaria de esta enzima inmovilizada covalentemente.

6.1. Aspectos generales de la enzima glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa fue descubierta a finales de la década de 1920 en extractos del hongo *Aspergillus niger*. Esta enzima presenta un grupo prostético: FAD (flavín-

adenina-dinucleótido) y posee dos dominios, por lo que es una enzima oligomérica (Valenzuela y col., 2007). La glucosa oxidasa pertenece a la familia de las oxidorreductasas (β -D-glucosa: oxígeno-1-oxidorreductasa; EC 1.1.2.3.4) la cual cataliza la reacción de oxidación de la β -D-glucosa a ácido glucónico, utilizando oxígeno molecular como un aceptor de electrones con producción simultánea de agua oxigenada (Figura 1). Se ha observado que la glucosa oxidasa es altamente específica con el anómero β de D-glucosa, no ocurriendo lo mismo con el anómero α el cual no parece ser un sustrato adecuado (Bankar y col., 2009). La glucosa oxidasa es un enzima que tiene efecto oxidante debido a la liberación de peróxido de hidrógeno en su reacción catalítica.

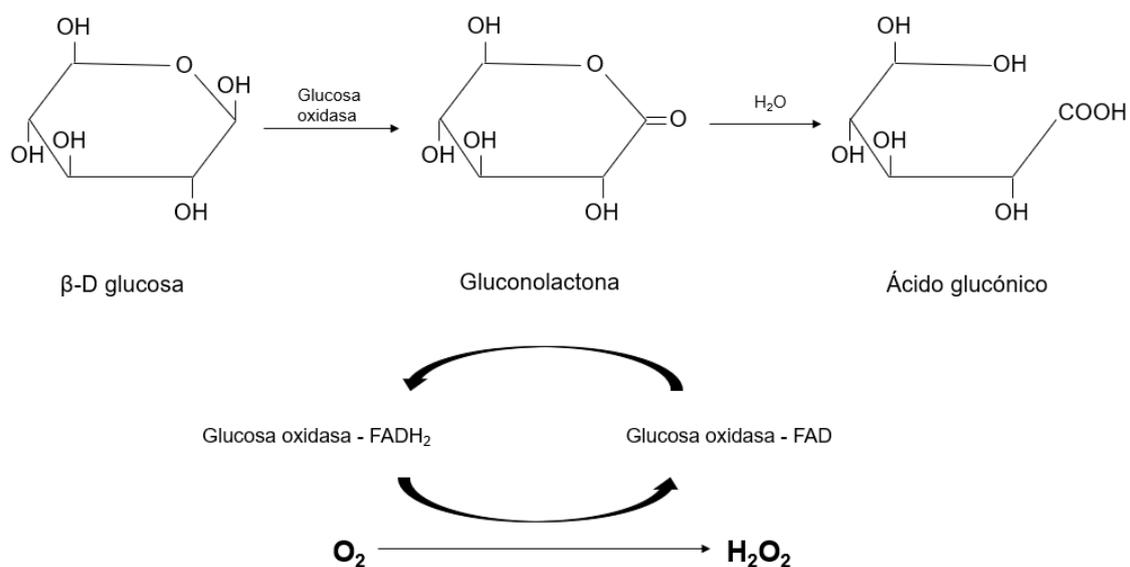


Figura 1. Representación esquemática de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa (Bankar y col., 2009).

Esta enzima es soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol, cloroformo y éter. El pH óptimo para su activación es de 5,5, pudiendo presentar actividad entre pH de 4,0 a 7,0 y su temperatura óptima oscila entre 30°C y 40°C (Singh y col., 2013).

La glucosa oxidasa puede obtenerse de una gran variedad de fuentes distintas, incluyendo plantas, animales, hongos, insectos, bacterias, algas rojas y frutas cítricas (Dubey y col., 2017). La función principal de la glucosa oxidasa es de defensa contra bacterias y hongos patógenos en los organismos en los que se encuentra gracias a la propiedad de mantener una producción permanente de peróxido de hidrógeno, lo que permite un estrés oxidativo y, por lo tanto, que no exista crecimiento de patógenos (Wong y col., 2008).

La glucosa oxidasa es una enzima ampliamente utilizada y muy importante, ya que, por ejemplo, es necesaria para evaluar los niveles de glucosa en sangre, una tarea analítica que formó parte del 40% del total de todas las pruebas de sangre realizadas en un año (Steiner y col., 2011). Por otro lado, la glucosa oxidasa se selecciona con frecuencia como enzima modelo para investigar nuevos métodos de inmovilización (Nery y col., 2016).

6.2. Aplicaciones de la enzima glucosa oxidasa en la industria alimentaria

Hoy en día, la glucosa oxidasa se considera una enzima segura y está disponible comercialmente para su uso como aditivo en la industria alimentaria en formato líquido o en polvo gracias a sus propiedades antioxidantes, estabilizantes y conservantes (Wong y col., 2008). A continuación, se detallan las distintas aplicaciones que puede tener la enzima glucosa oxidasa en la industria alimentaria:

- Elaboración de pan

La aplicación de enzimas como aditivo en la industria de panificación es una opción muy interesante para mejorar el rendimiento de la masa de trigo dado que se consideran coadyuvantes alimenticios naturales no tóxicos. La glucosa oxidasa es la alternativa enzimática más adecuada frente a los agentes oxidantes químicos para mejorar la masa de pan (Wang y col., 2011). Se ha observado que al añadir determinadas concentraciones de glucosa oxidasa en la masa de trigo se obtiene una mejora en la calidad del pan y un fortalecimiento en la masa de trigo. La cantidad de enzima añadida debe ser la adecuada porque se observaron efectos adversos al agregar niveles más altos de enzima (Bonet y col., 2006). Otras investigaciones también han observado un efecto positivo por la adición de glucosa oxidasa en masas de harina de trigo, observando masas con un mayor volumen y mejoras en el grano de la miga (Vemulapalli y col., 1998). El mecanismo por el cual la glucosa oxidasa produce estas mejoras es que el peróxido de hidrógeno producido en la reacción provoca la oxidación de las unidades de sulfhidrilo libres de la proteína del gluten, lo que da enlaces disulfuro y la gelificación de los pentosanos, provocando un cambio en las propiedades reológicas de la masa.

- Antioxidante / conservante

Como se ha mencionado anteriormente, la reacción general catalizada por la glucosa oxidasa implica el consumo de glucosa y oxígeno para producir ácido glucónico y agua

oxigenada. Esta reacción consume oxígeno, lo cual es una propiedad interesante ya que la presencia de oxígeno es un problema en muchos productos alimenticios como productos con alto contenido en grasa (mayonesa, por ejemplo), donde la oxidación de los lípidos puede ocasionar un sabor rancio. De la misma forma, en bebidas como el vino o la cerveza, la ausencia de oxígeno evita reacciones de oxidación. En alimentos enlatados, embotellados o envasados, el oxígeno promueve el crecimiento microbiano, por lo que es adecuado promover un ambiente anaeróbico. (Wong y col., 2008).

Por otro lado, el ácido glucónico producido en la reacción enzimática se considera seguro para el consumo humano y la OMS no ha establecido un límite en su ingesta diaria aceptable. A esto se le suma una mayor demanda por parte de los consumidores de productos que no contengan antioxidantes químicos, por lo que la enzima glucosa oxidasa presenta un gran potencial en el campo de la conservación de alimentos.

La enzima glucosa oxidasa también puede servir como conservante utilizándola sobre los materiales de envase de productos lácteos y de panificación para prevenir el crecimiento de levaduras y bacterias aeróbicas eliminando el oxígeno (Suppakul y col., 2003).

- **Producción de huevo en polvo**

Un efecto indeseado en ciertos productos alimentarios es el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard. Se produce por la reacción del grupo amino de la proteína con los azúcares reductores, dando como resultado un sabor no deseado y un pardeamiento indeseable en el huevo en polvo deshidratado. Para evitar este pardeamiento, la glucosa oxidasa se utiliza de manera eficaz para eliminar la glucosa y el oxígeno residuales de los alimentos y de esta manera, prolongar su vida útil (Zia y col., 2013). Este pardeamiento también está presente en productos como la patata, por lo que la aplicación de la glucosa oxidasa puede proporcionar buenos resultados para reducir el pardeamiento no deseado de la misma manera (Low y col., 1989).

- **Producción de vino con bajo contenido alcohólico**

Actualmente existe una creciente demanda por parte de los consumidores de vinos que contengan niveles más bajos de alcohol y también de conservantes químicos. La glucosa oxidasa juega un papel importante en la producción de este tipo de vinos porque se utiliza para reducir el contenido alcohólico al eliminar parte de la glucosa del mosto que, de otro modo, se convertiría en etanol a través de procesos fermentativos anaeróbicos (Dubey y col., 2017). Por otra parte, en las regiones climáticas más

cálidas, los niveles de azúcar en la uva son más altos que en regiones climáticas más frías, y, por lo tanto, los vinos poseen niveles de alcohol más altos (Malherbe y col., 2003). Este punto podría ser interesante por el hecho de que nuestro planeta está sufriendo un cambio climático que provocará un aumento de las temperaturas y, por lo tanto, los vinos tendrán un grado alcohólico superior. Se ha demostrado que la utilización de la glucosa oxidasa puede reducir hasta el 87% de la glucosa libre de la uva en ácido glucónico (Bankar y col., 2009).

- **En la industria láctea**

Como se ha mencionado anteriormente, una de las aplicaciones más importantes de la glucosa oxidasa se encuentra en la conservación de alimentos. El sistema lactoperoxidasa es un agente bacteriostático que se encuentra en algunas secreciones como la leche o la saliva de mamíferos. Este sistema consta de tres componentes: la enzima lactoperoxidasa, el tiocianato (SCN⁻) y el peróxido de hidrógeno. La catálisis por la lactoperoxidasa genera intermedios activos que son seguros y poseen propiedades antimicrobianas. Este sistema cuando se utiliza junto con la glucosa oxidasa es un agente antimicrobiano muy útil ya que la presencia de esta enzima y su sustrato, que es la glucosa, permiten que el peróxido de hidrógeno que requiere el sistema lactoperoxidasa se genere y reponga continuamente (Wong y col., 2008). Dicho sistema es efectivo en la leche cruda previniendo su deterioro en el transporte y almacenamiento y aumentando la vida útil del producto. Este sistema también se puede utilizar en la producción de queso porque el ácido glucónico producido se utiliza para la acidificación directa del queso.

6.3. Visión general de los sistemas de inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas, a pesar de ser un proceso que se conoce desde hace más de 100 años, sigue siendo una herramienta biotecnológica en continuo estudio para mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas. Las enzimas inmovilizadas son definidas como enzimas físicamente localizadas o confinadas en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas de forma repetida (Arroyo, 1998). La inmovilización combina la actividad elevada y específica de las enzimas con la estabilidad química y mecánica del soporte. Esto consiste en mantener la enzima unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos (Fajardo-Ochoa y col., 2011).

Las técnicas de inmovilización que se emplean deben cumplir algunas características fundamentales que son las siguientes (Papamichael y col., 2020):

- Simplicidad.
- Bajo coste de la matriz de inmovilización y del proceso.
- Estabilidad, durabilidad, reutilización y fácil recuperación de la enzima inmovilizada.
- Mantenimiento de la actividad selectiva de la enzima.

En muchas ocasiones, las aplicaciones de las enzimas inmovilizadas son más eficaces que sus formas libres, dado que evitan el coste de añadir nuevas enzimas y no reutilizarlas y la existencia de problemas de estabilidad por efectos del pH y la temperatura (Cao, 2005).

Por lo tanto, las ventajas más significativas de los procesos de inmovilización de las enzimas son las siguientes (Dwevedi, 2016):

- Manejo más sencillo de la enzima.
- Capacidad de reutilizar la enzima (útil especialmente para enzimas costosas).
- Mayor estabilidad en condiciones físicas y químicas extremas.
- El proceso completo es más viable desde el punto de vista económico.
- Las enzimas inmovilizadas se adaptan a todo tipo de procesos industriales.

Del modo contrario, los principales inconvenientes que se pueden presentar con la inmovilización enzimática son los siguientes (Sánchez-Ramírez y col., 2014):

- Alteración de la conformación de la enzima.
- Pérdida total o parcial de la actividad enzimática.
- Presencia de fracciones de enzimas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte, lo que modifica su actividad enzimática y estabilidad.
- Los procesos de inmovilización son costosos.

Hoy en día existen distintos métodos para la inmovilización enzimática. Es importante que se escoja el método de inmovilización más adecuado para cada enzima, para asegurarnos que después de la inmovilización, la efectividad de la enzima sigue persistiendo (Fajardo-Ochoa y col., 2011). A continuación, se detallan los distintos métodos de inmovilización de enzimas que existen, mostrándose en la Figura 2 un esquema de los mismos.

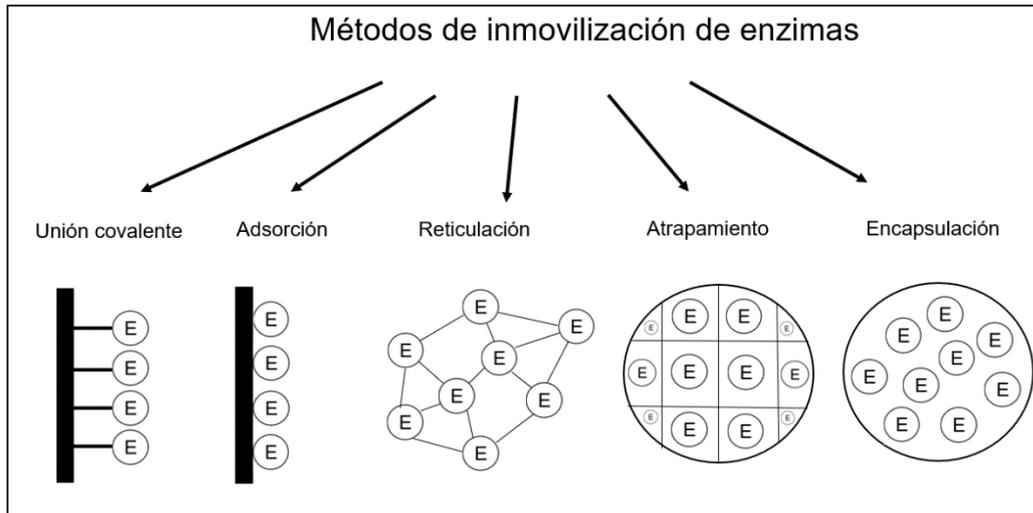


Figura 2. Representación esquemática de los distintos métodos de inmovilización de enzimas, donde E representa una molécula de enzima libre. Adaptado de Sirisha y col. (2016).

Inmovilización por unión covalente

La inmovilización enzimática por unión covalente es uno de los métodos donde se encuentran los desarrollos recientes más interesantes (Papamichael y col., 2020) y que más se utiliza actualmente (Nguyen y col., 2017).

Este método consiste en la formación de complejos estables enzima-matriz de inmovilización a través de enlaces covalentes. Generalmente, el procedimiento de unión de la enzima al soporte sólido tiene dos etapas: una primera etapa de activación de la superficie para proporcionar grupos reactivos con los aminoácidos de la enzima, y una segunda etapa de acoplamiento covalente de la enzima al soporte activado. Para reducir los problemas de accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima inmovilizada se pueden emplear moléculas que se comportan como brazos alargadores entre la superficie y la enzima (Nguyen y col., 2017). Si los aminoácidos del centro activo de la enzima participan en la unión covalente con el soporte se puede producir una desactivación total o parcial de la enzima. Para evitar este problema, el proceso de inmovilización se puede llevar a cabo en presencia de un sustrato o un inhibidor de la enzima. De esta forma se ocupa el centro activo de la enzima durante la inmovilización por estas moléculas (Sulaiman y col., 2014).

Las enzimas contienen hasta 20 aminoácidos diferentes, pero no todos se encuentran expuestos al exterior de las proteínas. Los principales grupos expuestos son la lisina, a través de su grupo ϵ -amino, la tirosina e histidina, los grupos cisteína y, en menor

medida, también la metionina, triptófano, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico (Sheldon y col., 2013). Estos aminoácidos son los que mayoritariamente participarán en el proceso de inmovilización covalente con el soporte.

Este método ampliamente utilizado en la industria alimentaria presenta las siguientes ventajas (Fajardo-Ochoa y col., 2011):

- La manipulación de las enzimas es sencilla.
- La carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización.
- Los enlaces formados entre las enzimas y el soporte son muy estables.
- No existe liberación de enzimas en la solución.
- La enzima posee una mayor estabilidad frente a la desactivación por el efecto de la temperatura, de disolventes orgánicos o efectos de pH.

En cambio, este tipo de inmovilización también presenta ciertos inconvenientes que es necesario conocer (Elnashar, 2010; Sánchez-Ramírez y col., 2014):

- Puede existir pérdida de la actividad enzimática.
- Los buenos soportes suelen ser bastantes caros, por lo que el proceso puede tener un alto coste.
- Se requiere la protección del centro activo para evitar una posible alteración.

Inmovilización por adsorción

La adsorción enzimática es uno de los métodos más sencillos para inmovilizar. Los mecanismos de adsorción se basan en enlaces débiles, como las fuerzas de Van der Waal, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Sassolas y col., 2012), y en función del tipo de enlace la inmovilización por adsorción se puede clasificar en tres categorías: adsorción física, enlace electrostático y adsorción hidrofóbica (Nguyen y col., 2017).

La enzima se disuelve en una solución y el soporte sólido se pone en contacto con la solución de enzima durante un tiempo determinado en unas condiciones adecuadas que permitan la inmovilización de la enzima. Las moléculas de enzima que no se absorben se eliminan de la superficie lavando con una solución tampón (Nguyen y col., 2017). Es un sistema de inmovilización que permite que las moléculas de enzima adsorbidas se encuentren protegidas de la agregación, proteólisis e interacciones hidrofóbicas (Spahn y col., 2008).

Los investigadores han utilizado soportes ecológicos como las fibras de coco, las cuales tienen buena capacidad de retención de agua y alta propiedad de intercambio catiónico; celulosa microcristalina con capacidad de unión reversible; caolín con alta capacidad de retención de enzimas; y materiales micro/mesoporosos, ofreciendo una gran área de superficie ideal para las reacciones enzimáticas (Datta y col., 2013).

La inmovilización por adsorción presenta múltiples ventajas ya que nos encontramos ante un proceso simple y económico dado que no es un proceso que necesite de reactivos. Por otra parte, este tipo de inmovilización no es destructivo para la actividad enzimática porque no implica ninguna funcionalización del soporte (Nguyen y col., 2017). De modo contrario, la inmovilización por adsorción también presenta inconvenientes ya que las enzimas se unen de forma débil al soporte mediante una unión física débil, de modo que los cambios de temperatura, pH o fuerza iónica pueden provocar procesos de desorción/lixiviación de la enzima (Mohamad y col., 2015). Otro inconveniente es que sólo se puede controlar la reacción en periodos cortos de tiempo (Romero y col., 2014).

Inmovilización por reticulado o entrecruzamiento

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de diversas enzimas, las cuales se pueden unir entre ellas, sin soporte, a través del entrecruzamiento. Este método de inmovilización sin soporte consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima. Como reactivos bifuncionales se utilizan dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio y aminas activadas con carbodiimida (Arroyo, 1998), aunque el reactivo más ampliamente utilizado es el glutaraldehído (Nguyen y col., 2017).

Los procedimientos de inmovilización por reticulado se pueden distinguir en dos tipos: mediante agregados enzimáticos reticulados (CLEA) o por medio de cristales de enzimas reticulados (CLEC). En el caso del procedimiento utilizando CLEA, las enzimas inmovilizadas también funcionan en soluciones acuosas y son estables en condiciones con concentraciones elevadas de sales metálicas, solventes orgánicos polares y apolares. Las enzimas inmovilizadas en el caso de la utilización de CLEC, generalmente poseen mejoras significativas en las propiedades mecánicas, dando como resultado una mayor estabilidad y eficiencia que las enzimas no tratadas (Nguyen y col., 2017; Papamichael y col., 2020).

La inmovilización por entrecruzamiento es un método muy simple basado en la fuerte unión química de biomoléculas enzimáticas, por lo que la posible fuga de enzimas es mínima. Otra ventaja destacada es la posibilidad de utilizar agentes estabilizantes adecuados para ajustar el microambiente de la enzima y, de este modo, aumentar la estabilidad (Nguyen y col., 2017). Este método también posee inconvenientes, siendo susceptible a cambios leves de temperatura y pH en las condiciones de operación (Fajardo-Ochoa y col., 2011). Otro inconveniente es que el uso de glutaraldehído podría dar como resultado graves modificaciones enzimáticas conduciendo a cambios conformacionales enzimáticos y, por consiguiente, pérdida de su actividad. Para solventar este problema, se pueden agregar proteínas inertes como gelatina o albúmina de suero bovino durante la inmovilización para minimizar la modificación de las enzimas (Nguyen y col., 2017).

Inmovilización por atrapamiento

Este método de inmovilización implica la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa formada generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo alginato, acrilamida, colágeno, etc. (Arroyo, 1998). Este sistema permite el intercambio del sustrato y los productos, pero retiene la enzima, por lo que la difusión de la enzima está limitada (Çil y col., 2007). Sin embargo, solo se puede utilizar en un número limitado de enzimas (Dwevedi, 2016), siendo un método poco eficaz para enzimas que emplean sustratos de elevado peso molecular, ya que los microporos del soporte dificultan la entrada del sustrato al centro activo de la enzima.

El procedimiento de inmovilización por atrapamiento consiste en dos pasos (Nguyen y col., 2017): una primera etapa en la que se produce la mezcla de enzima en una solución de monómero, y una segunda etapa en la cual se produce la polimerización de la solución del monómero elegido mediante una reacción química o condiciones experimentales cambiantes. Uno de los polímeros más empleado es el alginato de calcio, con el cuál se consigue un atrapamiento eficiente y se evita la pérdida de la enzima (Romero y col., 2014).

La ventaja más destacable de este método es su eficiencia a la hora de inmovilizar la enzima. Por otra parte, podemos también destacar que la enzima no sufre ningún tipo de alteración estructural ya que el método de unión es físico y no químico (Matosevic y col., 2011). Otra ventaja adicional es la capacidad de optimizar las condiciones de la inmovilización, gestionando el microambiente de la enzima inmovilizada y teniendo

cierto control sobre su valor de pH óptimo y otros parámetros (Nguyen y col., 2017). Sin embargo, este método también tiene varias desventajas. Es posible que en este método exista fuga de enzimas, solamente se pueden utilizar sustratos o productos de pequeño tamaño y es necesario un equilibrio entre las propiedades mecánicas de la matriz y su efecto sobre la actividad enzimática (Dwevedi, 2016).

Inmovilización por encapsulación o microencapsulación

Es un método similar al atrapamiento, pero en esta técnica las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso controlado de moléculas de sustrato y producto hacia el interior, pero no de enzima al exterior (Arroyo, 1998). Estas membranas pueden ser permanentes o no permanentes (Kuiper y col., 2008). Este método proporciona una gran superficie entre la membrana semipermeable y la enzima (Nisha y col., 2012). Gracias a este método es posible combinar enzimas y encapsularlas en una misma membrana, provocando una combinación en las funciones de las enzimas y/o liberando de manera ordenada las diferentes enzimas presentes en las distintas etapas de las reacciones.

Una ventaja de este método es que permite una alta actividad de la enzima inmovilizada y proporciona gran resistencia a cambios de temperatura y pH (Wang y col., 2004). Otra de las ventajas es que es posible aumentar el nivel de protección de las enzimas creando capas protectoras de distintos materiales como emulsificantes y espesantes (Fajardo-Ochoa y col., 2011). El principal inconveniente de este método es que puede haber liberación de enzimas al medio, contaminándolo e impidiendo la reutilización de la enzima (Volodkin y col., 2004). Otro inconveniente de esta técnica es la inactivación de la enzima durante el proceso de encapsulación (Nisha y col., 2012).

6.4. Avances en la inmovilización por unión covalente de la enzima glucosa oxidasa

En los últimos años se han producido avances significativos en la inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa porque dicha enzima está recibiendo mucha atención por parte de los investigadores por sus amplias aplicaciones. También hay que señalar que la glucosa oxidasa se selecciona con frecuencia como enzima modelo para investigar nuevos métodos de inmovilización covalente (Nery y col., 2016).

En este apartado analizaremos las técnicas de inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa realizadas en los últimos diez años. Los avances en la inmovilización covalente de la glucosa oxidasa se han discutido atendiendo al tipo de soporte empleado en el proceso de inmovilización. Estos estudios se muestran en la Tabla 1 (Anexo I), donde se puede observar el soporte, el agente activador del soporte y las ventajas e inconvenientes de cada procedimiento.

6.4.1. Nanopartículas magnéticas

Recientes investigaciones han mostrado que las nanopartículas magnéticas son una alternativa interesante a las matrices orgánicas y minerales empleadas para la inmovilización de enzimas. Las nanopartículas magnéticas son partículas con tamaños de hasta 100 nm que presentan en su composición un componente magnético (Afjeh y col., 2020). Se han empleado óxidos de Fe, como la magnetita (Fe_3O_4), magemita ($\gamma-Fe_2O_3$) (Afjeh y col., 2020) y la ferrita de níquel ($NiFe_2O_4$) (Atacan y col., 2019), y sales de Co, como el $CoCl_2$, como componentes magnéticos (Lee y col., 2012a).

La inmovilización en este tipo de soporte tiene como ventaja que las enzimas inmovilizadas pueden separarse fácilmente mediante un campo magnético externo, dando como resultado una mejor reutilización de la enzima y, por lo tanto, reduciendo el coste total (Bilal y col., 2018).

Además, también se ha observado que la inmovilización covalente de la glucosa oxidasa en estas nanopartículas magnéticas mejoran su estabilidad. La unión covalente de la enzima en la superficie de nanopartículas magnéticas de óxido de Fe recubiertas con sílice y tratadas con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (Figura 3) mejoran la estabilidad de la enzima frente al pH y la temperatura. Se ha demostrado que la enzima inmovilizada adquiere una disposición conformacional y estructural adecuada para mejorar su actividad y estabilidad ante rangos más amplios de pH y temperatura. Además, el proceso de inmovilización tuvo apenas efecto sobre el sustrato y la difusión del producto (Abbasi y col., 2016).

Similares resultados se han encontrado en un reciente estudio donde la glucosa oxidasa fue inmovilizada covalentemente en nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel ($NiFe_2O_4$) modificadas con taninos. La enzima inmovilizada mostró una mejor actividad y estabilidad frente a rangos más amplios de temperatura y pH que la enzima libre (Atacan y col., 2019).

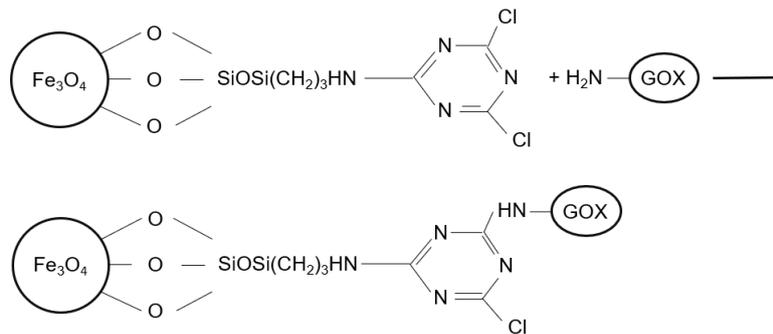


Figura 3. Unión covalente de glucosa oxidasa en nanopartículas magnéticas de óxido de Fe modificado. Adaptado de Abbasi y col. (2016).

6.4.2. Nanopartículas de sílice / partículas mesoporosas

En esta última década se ha observado un gran interés por las nanopartículas de sílice mesoporoso como soporte para la inmovilización de enzimas, ya que estos materiales inorgánicos presentan alta resistencia, se puede controlar su morfología y porosidad, son biocompatibles y es fácil introducir en su superficie grupos funcionales reactivos con los aminoácidos de las enzimas. Estos materiales tienen una estructura ordenada con canales con un tamaño de mesoporo (2-50 nm) y separados por paredes de sílice (SiO_2), lo que les confiere una gran superficie por volumen para la inmovilización de enzimas (Popat y col., 2011).

Se ha estudiado distintos activadores de la superficie de estas estructuras de sílice con el objeto de proporcionar puntos de anclaje covalente para la enzima glucosa oxidasa.

Se han incluido grupos epoxi reactivos en la superficie de nanopartículas de sílice empleando 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (Figura 4A) (Jung y col., 2010) y metacrilato de glicidilo (Figura 5) (Ji y col., 2013). La unión soporte-enzima tiene lugar a través de la reacción entre el grupo amino de la glucosa oxidasa y el grupo epoxi del soporte. También se han incorporado grupos amino reactivos a la superficie de estos materiales empleando el 3-aminopropiltrimetoxisilano (Figura 4B) (Jung y col., 2010). En este caso se empleó glutaraldehído como agente entrecruzante entre los grupos amino del soporte y de la enzima. Otros estudios también han demostrado la eficacia del glutaraldehído como agente entrecruzante entre el soporte de sílice activado y la enzima, mejorando la actividad y la estabilidad térmica de la glucosa oxidasa e incrementándose su reutilización y capacidad de almacenamiento (Huang y col., 2010; Huang y col., 2011; Wu y col., 2012; Golikova y col., 2017; Pitzalis y col., 2017).

Figura 4A.

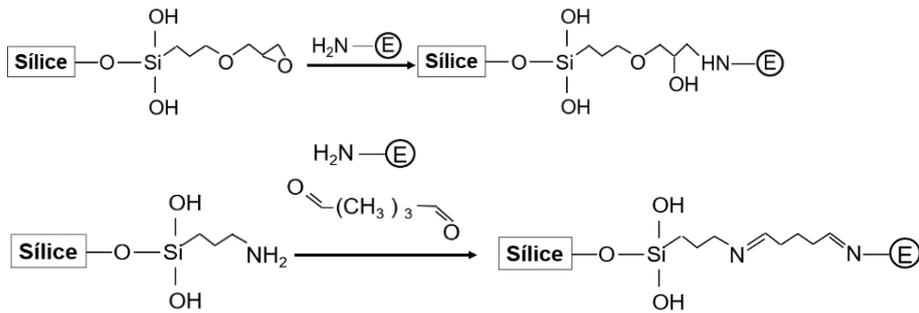


Figura 4. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en nanopartículas de sílice: (A) la sílice modificada con epoxi reacciona con el extremo N-terminal de la enzima; (B) la sílice modificada con aminopropilo reacciona con el glutaraldehído y el extremo N de la enzima. Adaptado de Jung y col. (2010).

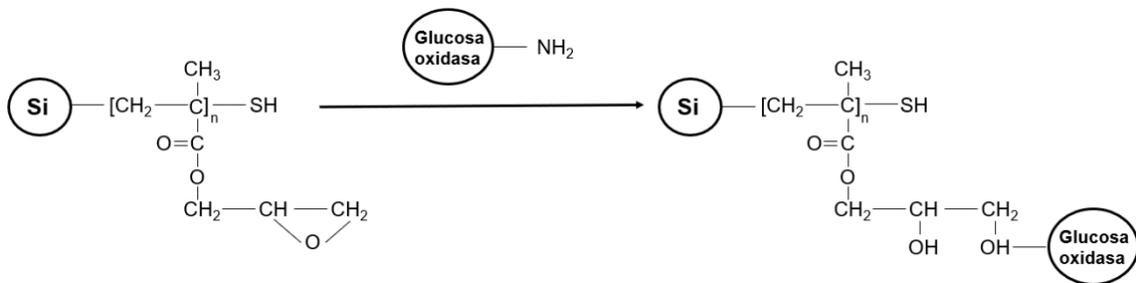


Figura 5. Esquema que muestra la reacción que se da entre las nanopartículas de sílice modificadas con metacrilato de glicidilo y la enzima glucosa oxidasa (Ji y col., 2013).

Otros reactivos, como el N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, empleado solo (Lee y col., 2012a; Lee y col., 2012b) o en combinación con la N-hidroxisuccinimida (Balistreri y col., 2016), se han estudiado para mejorar la unión de la enzima glucosa oxidasa sobre la superficie de soportes de sílice. La unión covalente soporte-enzima tiene lugar con la formación de un enlace amida entre el grupo amino del soporte y los residuos carboxílicos de la enzima. Estos agentes químicos mejoraron la actividad catalítica de la enzima inmovilizada, además de su estabilidad térmica y su reutilización.

Para la encapsulación de nanopartículas de sílice se ha empleado quitosano para inmovilizar la glucosa oxidasa, permitiendo la reutilización repetida de la enzima (Lee y col., 2012b) (Figura 6), mostrando la glucosa oxidasa una mayor estabilidad y una ligera pérdida de su actividad (Madhu y col., 2019).

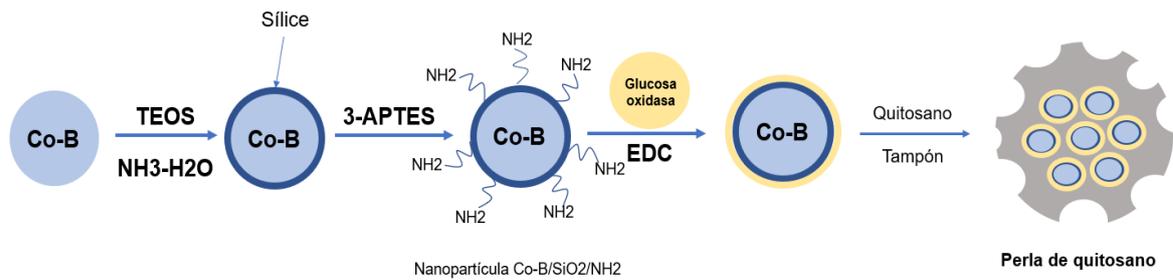


Figura 6. Inmovilización de glucosa oxidasa en nanopartículas de Co-B/SiO₂ formando perlas de quitosano. TEOS: ortosilicato de tetrametilo; 3-APTÉS: 3-aminopropiltriétoxissilano; EDC: N-(3 dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida. Adaptado de Lee y col. (2012b).

6.4.3. Óxidos de grafeno

El óxido de grafeno es una especie de nanomaterial de carbono bidimensional que se caracteriza por tener una gran superficie específica y poseer muchos grupos funcionales que contienen oxígeno que se pueden activar, lo que lo convierte en un material potencial para actuar como soporte en la inmovilización de enzimas (Zhao y col., 2014).

Se ha utilizado un soporte selectivo formado por óxido de grafeno y concanavalina A para la inmovilización de la glucosa oxidasa. De este modo, los grupos amino de la concanavalina A se unieron covalentemente a los grupos carboxilo de la enzima. La glucosa oxidasa inmovilizada poseía un rango más amplio de estabilidad frente al pH y la temperatura, un plazo más largo de estabilidad en almacenamiento y una mayor resistencia frente a agentes desnaturalizantes (Zhou y col., 2012). En otro estudio, se emplearon los grupos carboxilo e hidroxilo de la superficie del óxido de grafeno para la coinmovilización de glucosa oxidasa y celulasa con el objetivo de convertir en un único paso la carboximetilcelulosa en ácido glucónico. Previamente a la inmovilización enzimática, los grupos carboxilos se activaron previamente con N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida y los grupos hidroxilo con 2,4,6-triclorotriazina (Zhang y col., 2019).

6.4.4. Polímeros derivados del ácido acrílico y maleico

Se han empleado diversos polímeros del ácido acrílico y sus derivados (acrilato de metilo, acrilato de polietilenglicol y acrilato de *tert*-butilo), los cuales contienen grupos carboxilo, que facilitan la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa. Estos soportes proporcionaron a la enzima una mayor actividad y una mejora en su estabilidad térmica (Xu y col., 2017).

El uso de nanofibras de poliacrilonitrilo como soporte de inmovilización mejoró la actividad catalítica de la glucosa oxidasa tras un almacenamiento prolongado y posibilitó su reutilización (Manuel y col., 2015). También se ha observado un incremento en la estabilidad térmica de la glucosa oxidasa inmovilizada covalentemente en un copolímero de ácido acrílico y polietilenglicol, mejorando su estabilidad al almacenamiento, si bien, se observó una disminución de su actividad (Luo y col., 2012).

Recientemente, se empleó como soporte de inmovilización esferas de metacrilato de poliglicidilo, utilizando diversos agentes activadores, como el N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, la N-hidroxisuccinimida y el glutaraldehído. La glucosa oxidasa inmovilizada mostró un rango más amplio de temperatura y pH óptimos, una mayor actividad catalítica y una mayor estabilidad al almacenamiento (Liao y col., 2019).

Por otro lado, se ha estudiado un copolímero del ácido maléico como soporte para la inmovilización de la glucosa oxidasa. Previamente se reactivó térmicamente el soporte para transformar sus grupos dicarboxílicos en grupos reactivos anhídrido del ácido maléico. Posteriormente, se formó un enlace amida por reacción de los grupos amino de la enzima con los grupos anhídrido del soporte. Tras el procedimiento de inmovilización, la glucosa oxidasa mostró una mayor actividad y estabilidad térmica (Samoilova y col., 2014).

6.4.5. Quitosano y dextrano

El quitosano es un material de origen natural económico. Contiene grupos amino en su estructura polimérica, lo cual lo ha convertido en un portador biológico con alta capacidad para inmovilizar enzimas (Ghadi y col., 2015). Diversas investigaciones han utilizado este material, ya sea en forma de microesferas, empleando glutaraldehído como agente entrecruzante, mostrando la glucosa oxidasa inmovilizada una mejor actividad enzimática (Zhou y col., 2012) o en forma de nanopartículas magnéticas también utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante. En este caso, la glucosa oxidasa tuvo una pequeña pérdida de actividad, aunque mostró una mayor resistencia a rangos amplios de pH (Afjeh y col., 2020).

El dextrano es un polisacárido que contiene principalmente enlaces α -1,6 y también α -1,2, α -1,3 y α -1,4 entre unidades de glucosa. Se utilizó este polímero como soporte en la inmovilización covalente de la glucosa oxidasa, observándose una alta actividad enzimática a altos valores de pH y temperatura (Altikatoglu y col., 2010). La activación del soporte se realizó por oxidación de sus grupos hidroxilo con peryodato de sodio

para rendir grupos aldehído reactivos con los grupos amino de la enzima mediante la formación de una base de Schiff (Figura 7).

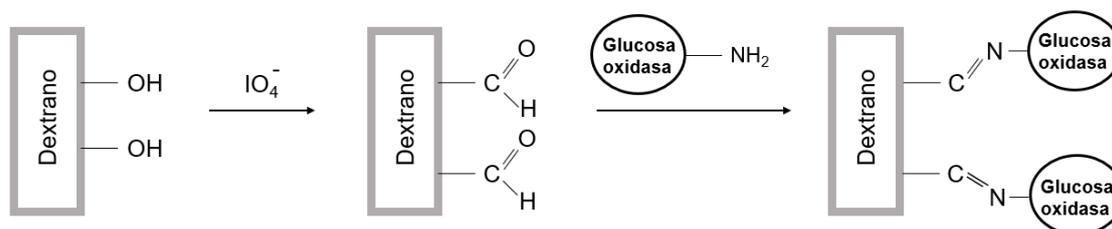


Figura 7. Representación esquemática de la activación del soporte con peryodato de sodio y unión covalente de la enzima. Elaboración propia.

6.4.6. Polímeros derivados del polietilenglicol

En un estudio reciente se ha sintetizado un soporte a base de un polímero derivado del polietilenglicol para inmovilizar covalentemente a la glucosa oxidasa. Tal y como se observó para el dextrano, se activó el soporte con peryodato de sodio para obtener grupos aldehído reactivos que pudiera reaccionar con los grupos amino de la enzima. Los resultados mostraron una mayor vida útil de la glucosa oxidasa, así como una mejora en la estabilidad térmica, pero se observó también una pérdida de la actividad enzimática (Vardar y col., 2018).

6.4.7. Marcos cristalinos organometálicos

Los marcos cristalinos organometálicos son materiales que pueden ser útiles como soporte debido a diversas características como son su alta superficie específica, su tamaño de poros uniformes y su gran potencial para incorporar una gran variedad de funcionalidades químicas (O’Keeffe y col., 2011). Se han empleado marcos cristalinos organometálicos derivados del ácido tereftálico para la unión covalente de la glucosa oxidasa a su superficie. Para ello, se modificaron los residuos amino del soporte con glutaraldehído para proporcionar grupos carboxílicos reactivos con los grupos amino de la enzima. Se observó que la glucosa oxidasa inmovilizada tenía una alta capacidad de reutilización, manteniéndose la estructura del soporte y su actividad enzimática (Tudisco y col., 2016).

6.4.8. Aplicaciones de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada por unión covalente

A pesar de que existen diversas aplicaciones de la enzima glucosa oxidasa en la industria alimentaria, muchas de estas aplicaciones se realizan con la enzima en forma libre, no con un procedimiento de inmovilización por unión covalente. No obstante, en

los últimos años se han realizado algunas investigaciones aplicando esta enzima inmovilizada mediante enlaces covalentes para diversos usos en la industria alimentaria.

Por un lado, el uso de materiales de envasado con enzimas inmovilizadas covalentemente puede ser una manera prometedora de diseñar envases activos aplicables en la industria alimentaria. Los enlaces covalentes aseguran que las enzimas no migren al alimento, por lo que pueden ofrecer la ventaja reglamentaria de no ser consideradas un aditivo alimentario. En este sentido, se ha inmovilizado la glucosa oxidasa en películas de polímeros derivados del ácido metacrílico y de poliamida. La activación de la superficie de las películas se realizó, previo tratamiento con ácido clorhídrico, con glutaraldehído e isocianuro de ciclohexilo, para permitir una unión covalente entre la película activada y los grupos carboxilos y/o amino de la enzima. Estas biopelículas inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* CNCTC 6859, *Pseudomonas fluorescens* CNCTC 5793, *Lactobacillus helveticus* CH-1, *Listeria ivanovii* CCM 5884 y *Listeria innocua* CCM 4030 (Hanusova y col., 2013).

Por otro lado, la tendencia en el consumo de lácteos funcionales, entre los cuales destaca el yogur por contener bacterias probióticas, está en aumento por sus múltiples beneficios para la salud. Sin embargo, la presencia de oxígeno es incompatible con las bacterias probióticas, ya que muchas de ellas son anaeróbicas. Por sus características, la glucosa oxidasa es una enzima que se puede utilizar para reducir el efecto nocivo del oxígeno en este tipo de productos. Un estudio reciente inmovilizó covalentemente la glucosa oxidasa en nanopartículas recubiertas de quitosano y se aplicaron en yogur probiótico para beber. Se utilizó glutaraldehído como agente entrecruzante entre el soporte y la enzima. Los resultados mostraron que las muestras de yogur con la enzima inmovilizada contenían mayor concentración de bacterias probióticas, como *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*, que con el uso de la enzima libre. También se observó que la adición de glucosa oxidasa no tuvo efectos negativos en el sabor, demostrándose ser un método seguro, natural y económicamente viable para la conservación de las bacterias probióticas del yogur (Afjeh y col., 2019).

Por último, como se ha mencionado anteriormente, en la reacción química de la glucosa oxidasa se produce ácido glucónico, el cual es un compuesto que en la industria alimentaria se emplea como acidulante, gasificante, estabilizador del color, antioxidante y agente quelante en pan, piensos, bebidas, etc. (Wong y col., 2008). La producción de ácido glucónico basada en enzimas como la glucosa oxidasa se

considera un método viable para reducir los costes de su producción. Recientemente, se ha propuesto un método enzimático para la producción de ácido glucónico a partir de carboximetilcelulosa en un solo paso a través de la coinmovilización de las enzimas glucosa oxidasa y celulasas en la superficie de un soporte de óxido de grafeno. La activación del soporte se realizó con la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y la N-hidroxisuccinimida. Este método proporciona una estrategia más económica para la producción de ácido glucónico a nivel industrial (Zhang y col., 2019).

7. Conclusiones y futuras tendencias

La inmovilización de la glucosa oxidasa permite hacer un uso de esta enzima en la industria de una manera más eficiente y económica. Actualmente, se están realizando numerosas investigaciones en cuanto a materiales de inmovilización y distintos procedimientos para optimizar este método de inmovilización covalente con la enzima glucosa oxidasa. Estos estudios muestran las ventajas de la inmovilización covalente de la enzima glucosa oxidasa, ya que incrementa su actividad y estabilidad y permite su reutilización. Sin embargo, hasta la fecha son pocos los estudios que han abordado el uso de la enzima inmovilizada covalentemente en la industria alimentaria, centrándose su aplicación en la producción de ácido glucónico y como agente antimicrobiano. En base a los resultados discutidos en esta memoria, sería muy interesante valorar la inmovilización covalente de la glucosa oxidasa como estrategia para mejorar su aplicación en otras aplicaciones industriales.

8. Referencias bibliográficas

- Abbasi, M., Amiri, R., Bordbar, A. K., Ranjbakhsh, E. & Khosropour, A. R. (2016). Improvement of the stability and activity of immobilized glucose oxidase on modified iron oxide magnetic nanoparticles. *Applied Surface Science*, 364, 752-757.
- Afjeh, M. E. A., Pourahmad, R., Akbari-adergani, B. & Azin, M. (2019). Use of glucose oxidase immobilized on magnetic chitosan nanoparticles in probiotic drinking yogurt. *Food Science of Animal Resources*, 39(1), 73-83.
- Afjeh, M. E. A., Pourahmad, R., Akbari-adergani, B. & Azin, M. (2020). Characteristics of glucose oxidase immobilized on magnetic chitosan nanoparticles. *Food Science and Technology*, 40(1), 68-75.
- Altikatoglu, M., Basaran, Y., Arioz, C., Ogan, A. & Kuzu, H. (2010). Glucose oxidase-dextran conjugates with enhanced stabilities against temperature and pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), 2187-2197.
- Arroyo, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- Atacan, K., Güy, N., Çakar, S. & Özacar, M. (2019). Efficiency of glucose oxidase immobilized on tannin modified NiFe₂O₄ nanoparticles on decolorization of dye in the Fenton and photo-biocatalytic processes. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, 382.
- Balistreri, N., Gaboriau, D., Jolival, C. & Launay, F. (2016). Covalent immobilization of glucose oxidase on mesocellular silica foams: Characterization and stability towards temperature and organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 26-33.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, S. R. & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*. 27(4), 489-501.
- Bilal, M., Zhao, Y., Rasheed, T. & Iqbal, H. M. N. (2018). Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(B), 2530-2544.
- Bonet, A., Rosell, C. M., Caballero, P. A, Gómez, M., Pérez-Munuera, I. & Lluch, M. A. (2006). Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99(2), 408-415.
- Cabral, H. A., Dorantes, J. J., Calva, G., Lucho, C. A. & Beltrán Hernández, R. I. (2018). Inmovilización de enzimas. *Boletín Científico del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería*, 5(10), 7-8.
- Cao, L. (2005). Carrier-bound Immobilized Enzymes. En: *Principles, Applications and Design*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Çil, M., Büyükbayram, A. E., Kiralp, S., Toppare, L. & Yagci, Y. (2007). Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 49-55.
- Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3, 1-9.
- del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. P. & García-Gómez, M. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87-102.

- Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R. & Bajpai, V. K. (2017). Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): Current updates. *Frontiers in Microbiology*, 8(1032), 1-22.
- Dwevedi, A. (2016). Basics of enzyme immobilization. En: *Enzyme Immobilization. Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. Dwevedi, A. (Ed.). 21-44. Springer
- Elnashar, M. M. M.(2010). Immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1, 61-77.
- Enderle, J., & Bronzino, J. (2012). *Introduction to biomedical engineering*. Bronzino, J. (Ed.). Elsevier.
- Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., Villavelázquez, C. & Escalante-Minakata, P. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 42-56.
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Rosahn, F. T. & Alavije, R. S. (2015). Fabrication and characterization of core-shell magnetic chitosan nanoparticles as a novel carrier for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase. *Journal of Oleo Science*, 64(4), 423-430.
- Golikova, E. P., Lakina, N. V., Grebennikova, O. V., Matveeva, V. G. & Sulman, E. M. (2017). A study of biocatalysts based on glucose oxidase. *Faraday Discussions*, 202, 303-314.
- Hanusova, K., Vapenka, L., Dobias, J. & Miskova, L. (2013). Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme. *Central European Journal of Chemistry*, 11(7), 1066-1078.
- Huang, J., Wang, H., Li, D., Zhao, W., Ding, L. & Han, Y. (2011). A new immobilized glucose oxidase using SiO₂ nanoparticles as carrier. *Materials Science and Engineering: C*, 31(7), 1374-1378.
- Huang, J., Zhao, R., Wang, H., Zhao, W. & Ding, L. (2010). Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles. *Biotechnology Letters*, 32(6), 817-821.
- Ji, J., Xia, K., Liu, T. & Li, L. (2013). Covalent immobilization of glucose oxidase on well-defined polymer-silicon wafer hybrids via surface-initiated raft-mediated process. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(3), 1872-1875.
- Jung, D., Streb, C. & Hartmann, M. (2010). Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous molecular sieve SBA-15. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 762-778.
- Kouassi-Koffi, J. D., Sturza, A., Paucean, A., Man, S., Muresan, A. E., Petrut, G., Muresan, V. & Muste, S. (2018). Effect of glucose oxidase addition on the textural characteristics of wheat-maize dough and bread. *Food Science and Technology*, 39(1), 1-7.
- Kuiper, S. M., Nallani, M., Vriezema, D. M., Cornelissen, J. J. L. M., van Hest, J. C. M., Nolte, R. J. M. & Rowan, A. E. (2008). Enzymes containing porous polymersomes as nanoreaction vessels for cascade reactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(23), 4315-4318.
- Lee, H. U., Park, C. & Kim, S. W. (2012a). Immobilization of glucose oxidase onto cobalt based on silica core/shell nanoparticles as carrier. *Process Biochemistry*, 47(8), 1282-1286.
- Lee, H. U., Song, Y. S., Suh, Y. J., Park, C. & Kim, S. W. (2012b). Synthesis and characterization of glucose oxidase-core/shell magnetic nanoparticle complexes into chitosan bead. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 31-36.

- Liao, L., Meng, Y., Wang, R., Jia, B. & Li, P. (2019). Coupling and regulation of porous carriers using plasma and amination to improve the catalytic performance of glucose oxidase and catalase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(426), 1-11.
- Low, N., Jiang, Z., Ooraikul, B., Dokhani, S. & Palcic, M. M. (1989). Reduction of glucose content in potatoes with glucose oxidase. *Journal of Food Science*, 54(1), 118-121.
- Luo, X., Liu, J., Liu, G., Wang, R., Liu, Z. & Li, A. (2012). Manipulation of the bioactivity of glucose oxidase via raft-controlled surface modification. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(14), 2786-2793.
- Madhu, A. & Chakraborty, J. (2019). Bio-bleaching of cotton with H₂O₂ generated from native and immobilized glucose oxidase. *AATCC Journal of Research*, 6(2), 7-17.
- Malherbe, D. F., du Toit, M., Cordero, R. R., van Rensburg, P. & Pretorius, I. S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 502-511.
- Manuel, J., Kim, M., Dharela, R., Chauhan, G. S., Fapyane, D., Lee, S. J., Chang, I. S., Kang, S. H., Kim, S. W. & Ahn, J. H. (2015). Functionalized polyacrylonitrile nanofibrous membranes for covalent immobilization of glucose oxidase. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(1), 143-149.
- Matosevic, S., Szita, N. & Baganz, F. (2011). Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(3), 325-334.
- Mohamad, N. R., Marzuqui, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-210.
- Nery, E. W. & Kubota, L. T. (2016). Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices - A glucose oxidase study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 551-559.
- Nguyen, H. H. & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163.
- Nisha, S., Arun, K. S. & Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzymes. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3), 148-155.
- O'Keeffe, M. & Yaghi, O. M. (2011). Deconstructing the crystal structures of Metal-Organic Frameworks and related materials into their underlying nets. *Chemical Reviews*, 112(2), 675-702.
- Papamichael, E. & Stergiou, P. Y. (2020). Enzyme immobilization: strategies and bioprocessing applications. En: *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Sudhir, P., Singh, S. P., Pandey, A., Rani, R., Larroche, Ch. & Li, Z. (Eds.). 217-241. Elsevier.
- Pitzalis, F., Monduzzi, M. & Salis, A. (2017). A bienzymatic biocatalyst constituted by glucose oxidase and horseradish peroxidase immobilized on ordered mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 241, 145-154.
- Popat, A., Hartono, S. B., Stahr, F., Liu, J., Qiao, S. Z. & Lu, G. Q. (2011). Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*, 3(7), 2801-2818.
- Romero, L., Mejía, C. M., Sánchez, A., Balagurusamy, N. & Luévanos, M. P. (2014). Application of immobilized enzymes. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 1-9.

- Samoilova, N., Krayukhina, M. A., Klimova, T. P., Babuskhina, T. A., Vyshivannaya, O. V., Blagodatskikh, I. V. & Yamskov, I. A. (2014). Oxidation of glucose to gluconic acid using a colloidal catalyst containing gold nanoparticles and glucose oxidase. *Russian Chemical Bulletin*, 63(4), 1009-1016.
- Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. & Segura-Ceniceros, E. P. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3), 504-512.
- Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.
- Sheldon, R. A. & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Singh, J. & Verma, N. (2013). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: production, characterization and immobilization for glucose oxidation. *Advances in Applied Science Research*, 4(3), 250-257.
- Sirisha, V., Jain, A. & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material and applications of immobilized enzymes. En: *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part II - Marine Organisms Producing Enzymes. Advances in Food and Nutrition Research*. Kim, S., Toldrá, F. (Eds.). 179-211. Elsevier.
- Spahn, C. & Minteer, S. D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, 2(3), 195-200.
- Steiner, M. S., Duerkop, A. & Wolfbeis, O. S. (2011). Optical methods for sensing glucose. *Chemical Society Reviews*, 40(9), 4805-4839.
- Sulaiman, S., Mokhtar, M. N., Naim, M. N., Baharuddin, A. S. & Sulaiman, A. (2014). A review: potential usage of cellulose nanofibers (CNF) for enzyme immobilization via covalent interactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1817-1842.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408-420.
- Tudisco, C., Zolubas, G., Seoane, B., Zafarani, H. R., Kazemzad, M., Gascon, J., Hagedoorn, P. L. & Rassaei, L. (2016). Covalent immobilization of glucose oxidase on amino MOFs via post-synthetic modification. *RSC Advances*, 6(109), 108051-108055.
- Valencia, P., Espinoza, K., Ramirez, C., Franco, W. & Urtubia, A. (2017). Technical feasibility of glucose oxidase as a prefermentation treatment for lowering the alcoholic degree of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(3), 386-389.
- Valenzuela, H. L. D. & Ortíz, R. L. R. (2007). Glucose oxidase stability in amorphous systems formed by saccharose, maltose and trehalose disaccharides. *Química Nova*, 30(7), 1633-1637.
- Vardar, G., Altikatoglu, M., Basaran, Y. & Isildak, I. (2018). Synthesis of glucose oxidase - PEG aldehyde conjugates and improvement of enzymatic stability. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(4), 788-794.
- Vemulapalli, V., Miller, K. A. & Hosney, R. C. (1998). Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chemistry*, 75(4), 439-442.
- Volodkin, D. V., Larionova, N. I. & Sukhorukov, G. B. (2004). Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating. *Biomacromolecules*, 5(5), 1962-1972.
- Wang, X., Zhu, K. X. & Zhou, H. M. (2011). Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3042-3054.

- Wang, Y. & Caruso, F. (2004). Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres. *Chemical Communications*, 13, 1528-1529.
- Wong, C. M., Wong, K. H. & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, functions, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938.
- Wu, Q., He, J., Zhang, J. & Ou, J. (2012). Immobilization of glucose oxidase on ordered macroporous silicas functionalized with amino groups. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(2), 283-287.
- Xu, G., Xu, Y., Li, A., Chen, T. & Liu, J. (2017). Enzymatic bioactivity investigation of glucose oxidase modified with hydrophilic or hydrophobic polymers via *in situ* RAFT polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(8), 1289-1293.
- Zhang, H., Hua, S. F. & Zhang, L. (2019). Co-immobilization of cellulase and glucose oxidase on graphene oxide by covalent bonds: a biocatalytic system for one-pot conversion of gluconic acid from carboxymethyl cellulose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(4), 1116-1125.
- Zhao, F., Li, H., Jiang, Y., Wang, X. & Mu, X. (2014). Co-immobilization of multi-enzyme on control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch. *Green Chemistry*, 16(5), 2558-2565.
- Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., Zhao, X., Ma, L. & Zhou, Q. (2012). Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 28-31.
- Zhou, T., Zhu, X., Su, J., Yao, D. & Liu, D. (2012). Covalent immobilization of glucose oxidase within organic media. *Chinese Journal of Biotechnology*, 28(4), 476-487.
- Zia, M. A., Riaz, A., Rasul, S. & Abbas, R. Z. (2013). Evaluation of antimicrobial activity of glucosa oxidase from *Aspergillus niger* EBL-A and *Penicillium notatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(6), 956-961.

9. Anexo I

Tabla 1. Resumen de los distintos soportes de inmovilización por unión covalente para la enzima glucosa oxidasa.

	Soporte	Modificador de soporte / Agente activador	Características	Referencia
Partículas magnéticas	Partículas magnéticas de óxido de Fe	2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT)	Mejora de la estabilidad ante cambios de pH y temperatura	(Abbasi y col., 2016)
	Nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel	Taninos	Mejora en la actividad y estabilidad en rangos más amplios de pH y temperatura	(Atacan y col., 2019)
Nanopartículas de sílice / partículas mesoporosas	Sílice/SiO ₂	Glutaraldehído	Alta actividad y estabilidad Exclusión de la adición de catalasa	(Golikova y col., 2017)
	Espumas de sílice mesocelular con grandes áreas superficiales	N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida (EDC) N-hidroxisuccinimida (NHS)	Mayor actividad catalítica Mayor estabilidad térmica Ligera desnaturalización de la glucosa oxidasa	(Balistreri y col., 2016)
	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	Glutaraldehído 3-aminopropiltri-etoxisilano	Mayor estabilidad térmica, capacidad de operación y mayor tiempo de almacenamiento	(Huang y col., 2010)
	Nanopartículas de sílice	Glutaraldehído	Mejor rendimiento catalítico y mayor estabilidad	(Huang y col., 2011)
	Nanopartículas de Co-B/SiO ₂	EDC	Mayor actividad catalítica Mantenimiento de la actividad tras varias reutilizaciones	(Lee y col., 2012a)
	Nanopartículas de Co-B/SiO ₂ en perlas de quitosano	EDC	Mejor estabilidad durante la operación y almacenamiento Baja actividad	(Lee y col., 2012b)
	Silicio	Metacrilato de glicidilo	Mejora de la estabilidad en almacenamiento	(Ji y col., 2013)
	Sílice mesoporosa SBA-15	Glutaraldehído	Fácil manejo de la enzima inmovilizada y reutilización repetidas veces Pérdida de actividad	(Pitzalis y col., 2017)

	Soporte	Modificador de soporte / Agente activador	Características	Referencia	
	Material macroporoso ordenado tridimensionalmente	Glutaraldehído	Alta actividad catalítica y estabilidad térmica	(Wu y col., 2012)	
	Tamiz molecular SBA-15 mesoporoso con ortosilicato de tetraailo	3-aminopropiltrimetoxisilano (ATS) 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GTS) Glutaraldehído-ATS	Almacenamiento más largo sin pérdida de actividad Esta unión hace que la glucosa oxidasa sea menos propensa a la lixiviación	(Jung y col., 2010)	
Óxidos de grafeno	Óxido de grafeno	EDC NHS TCT	Buena actividad y estabilidad de la glucosa oxidasa	(Zhang y col., 2019)	
	Óxido de grafeno	Concanavalina A	Rango de estabilidad de pH más amplio Mayor tiempo de almacenamiento Mayor resistencia a agentes desnaturalizantes	(Zhou y col., 2012)	
Polímeros derivados de ácido acrílico y maleico	Esferas de metacrilato de poliglicidilo	EDC NHS Glutaraldehído	Rango más amplio de temperatura y pH óptimos Mayor actividad catalítica Mayor estabilidad en el almacenamiento	(Liao y col., 2019)	
	Ácido acrílico Acrilato de metilo Acrilato de poli(etilenglicol) Acrilato de <i>terc</i> -butilo		Mayor actividad catalítica Mejora de la estabilidad térmica	(Xu y col., 2017)	
	Nanofibras de poliacrilonitrilo		Retención de actividad eficiente tras almacenamiento prolongado Reutilización enzimática simple	(Manuel y col., 2015)	
	Metacrilato de glicidilo/sílice	Metacrilato de glicidilo		Mejora de la estabilidad en almacenamiento	(Ji y col., 2013)
	Copolímero de ácido acrílico y polietilenglicol			Aumento de la estabilidad térmica Aumento de la estabilidad en almacenamiento Disminución de la bioactividad	(Luo y col., 2012)

	Soporte	Modificador de soporte / Agente activador	Características	Referencia
	Copolímero de ácido maleico		Mayor estabilidad térmica Mayor actividad catalítica	(Samoilova y col., 2014)
Quitosan	Nanopartículas magnéticas de quitosano	Glutaraldehído	Mayor resistencia a rangos amplios de pH Pequeña pérdida de actividad catalítica	(Afjeh y col., 2020)
	Quitosano		Utilización repetidas veces de la glucosa oxidasa inmovilizada	(Madhu y col., 2019)
	Microesferas de quitosano	Glutaraldehído	Mejor actividad enzimática	(Zhou y col., 2012)
Dextranos	Dextrano	Peryodato de sodio	Se mantiene la actividad enzimática a altos rangos de pH y temperatura	(Altikatoglu y col., 2010)
Polímeros derivados de polietilenglicol	Polímero derivado de polietilenglicol	Peryodato de sodio	Mayor estabilidad térmica Mayor vida útil de la enzima Reducción de la actividad enzimática	(Vardar y col., 2018)
Marcos cristalinos organometálicos	Marco cristalino organometálico derivado del ácido tereftálico	Glutaraldehído	Alta capacidad de reutilización enzimática Retención de la actividad catalítica	(Tudisco y col., 2016)