



Programa de la asignatura:

Ingeniería de biorreactores I

U1

Biorreactores. Conceptos y herramientas básicas



DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Biorreactores. Conceptos y herramientas básicos



Biorreactor de pie / piloto.

Tomado de. <http://www.directindustry.es/prod/inoxpa/product-66392->



Índice

Presentación.....	4
Competencia específica a desarrollar	4
Propósitos de la unidad.....	5
1.1 Introducción	7
1.1.1 Biorreactores: generalidades.....	8
1.1.2 Microorganismos y células en la industria	12
1.1.3 Enzimas y sistemas celulares como catalizadores	16
1.2 Teoría de la Catálisis Enzimática	19
1.2.1 Biotransformación y biocatálisis.....	20
1.2.2 Cinética de los procesos microbiológicos	23
1.2.3 Cinética enzimática.....	26
1.2.4. Mecanismo de reacción enzimática	32
1.3 Factores que influyen la actividad enzimática	34
1.3.1 Especificidad.....	36
1.3.2 Desnaturalización.....	40
1.3.3 pH.....	42
1.3.4 Temperatura.....	43
1.3.5 Inhibición	44
1.3.6 Inmovilización de enzimas.....	50
1.4 Modelos matemáticos para el diseño de biorreactores	53
Actividades.....	55
Autorreflexiones	56
Cierre de unidad.....	56
Para saber más.....	57
Fuentes de consulta	59



Presentación

En esta primera unidad revisaremos los conceptos más importantes de la ingeniería en biorreactores, qué es un **biorreactor o fermentador**, cuál es su función y sus principales características.

Identificarás los componentes biológicos y estructurales de algunos de los tipos de biorreactores y analizarás el papel de la cinética enzimática en los procesos de biotransformación y de biocatálisis. Revisarás y estudiarás los factores que afectan la actividad de las enzimas y como lo hacen.

Reconocerás los modelos matemáticos de crecimiento que proporcionarán las bases para analizar el comportamiento del crecimiento microbiano y posteriormente aplicar este conocimiento a los procesos que se llevan a cabo en los biorreactores.

Competencia específica a desarrollar



Analizar la cinética enzimática, para distinguir la actividad de las enzimas en la biocatálisis y biotransformaciones, mediante la revisión de modelos matemáticos utilizados en el diseño de biorreactores.



Propósitos de la unidad



1

Identificar los elementos que componen un biorreactor.

2

Identificar las características de la Teoría de la Catálisis Enzimática.

3

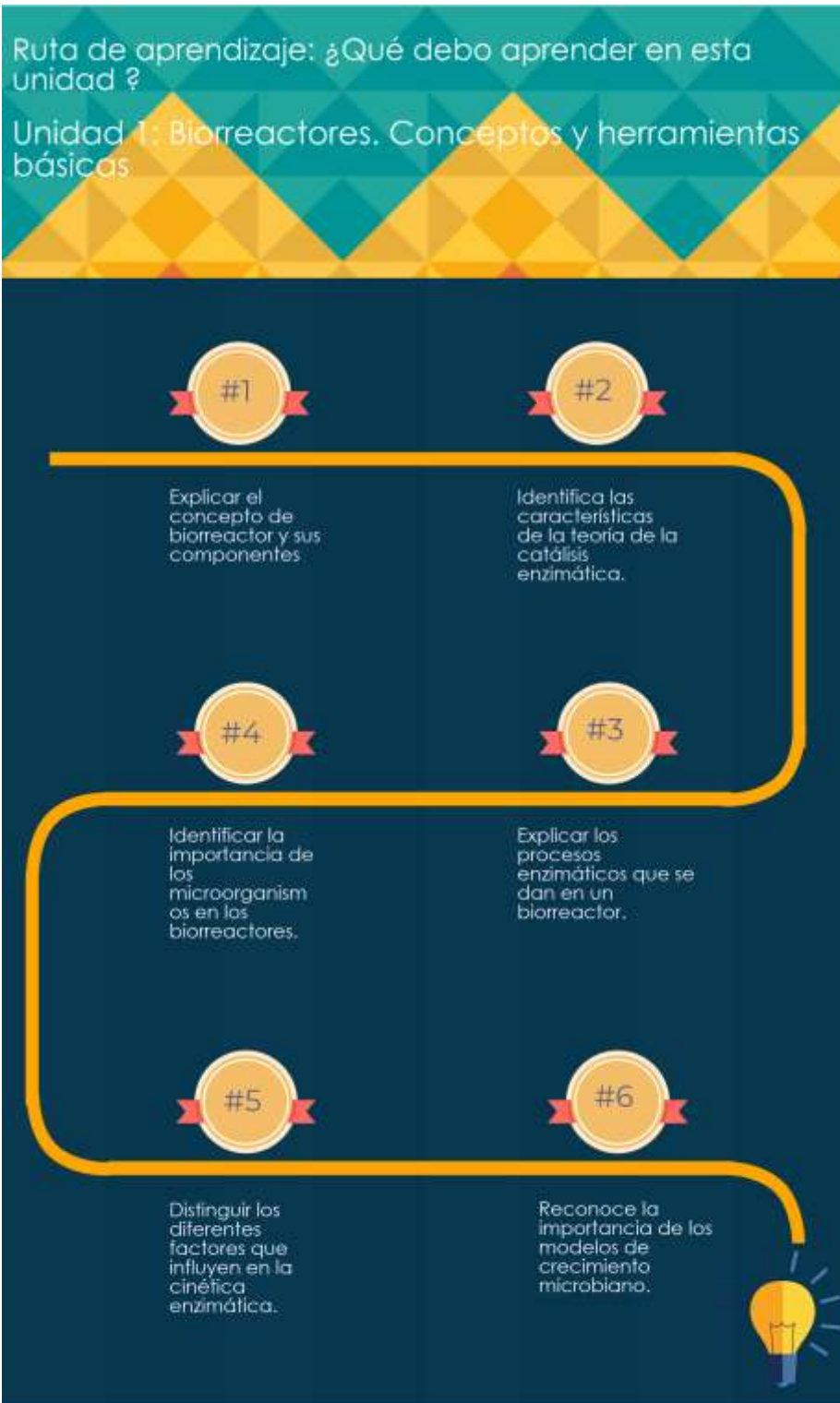
Explicar los procesos enzimáticos que se dan en un biorreactor.

4

Distinguir las aplicaciones de las ecuaciones de diseño en biorreactores.

5

Identificar los factores que influyen en la cinética enzimática.





1.1 Introducción

En la actualidad las transformaciones biológicas de la materia o **biotransformación** junto con sus bioprocesos son de gran interés y se han convertido en indispensables para la elaboración de varios productos industriales de los ramos alimenticio, farmacéutico, energético, etc. Estos bioprocesos se llevan a cabo en equipamientos específicos denominados **biorreactores** o **fermentadores**. Más adelante se explicarán con detenimiento qué son estos equipamientos.

Biotransformación

Serie de eventos fisiológicos de un organismo (unicelular o pluricelular) para modificar las sustancias tanto endógenas como exógenas y transformarlas en metabolitos que puedan ser reabsorbidos y excretados. (OSMAN, 2015).

Enlaces

Debes tomar en cuenta los conocimientos que has adquirido en las asignaturas *Bioquímica*, *Balances de materia y energía*, así como en la de *Fenómenos de transporte*. Ahora podrás aplicar y relacionar lo aprendido a los procesos que se llevan a cabo dentro de un biorreactor. Asimismo, esta asignatura te proporcionará las bases teóricas para las siguientes asignaturas como son *Ingeniería de Biorreactores II* e *Ingeniería de Bioprocesos I y II*.

A continuación, analizarás con mayor profundidad lo que es un biorreactor y conocerás cuáles son las características principales que posee.



1.1.1 Biorreactores: generalidades

El diseño y análisis de un biorreactor depende del conocimiento de la cinética de las reacciones biológicas y de los balances de materia y energía. En la práctica, este proceso se hace muy complejo debido a la naturaleza de la catálisis biológica y del caldo de fermentación, los cuales pueden variar con el tiempo y presentar patrones cinéticos y de flujo muy complejos. Además, debemos considerar que los procesos de transferencias de masa y calor añaden complejidad al problema.

Biorreactor o fermentador

Un biorreactor o fermentador es el centro de todo proceso biotecnológico. Su función principal es proveer un ambiente controlado para alcanzar el máximo de crecimiento microbiano y/o para la formación óptima de productos. Además, el fermentador tiene como objetivo garantizar una condición estéril que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés (Galindo *et al.*, 2008).

Los biorreactores o fermentadores pueden variar ampliamente en el tamaño, las dimensiones de este dependerán del proceso y operación que se lleve a cabo en él, así que encontramos aquellos que pueden ir de 0.1-10 l que son los que se utilizan comúnmente en los laboratorios, estos permiten un mayor control del bioproceso en un espacio reducido (Figura 1), por ejemplo, los que se emplean en el cultivo de microalgas para la producción de biodiesel. También encontramos fermentadores industriales con una capacidad de hasta 400,000 l en los cuales el objetivo es obtener la mayor cantidad de un producto determinado, resultado de un bioproceso (Figura 1), por ejemplo, los utilizados en la industria cervecera.



Figura 1. Fermentador: Laboratorio e Industrial.

Tomado de: <https://www.sartorius.es/es/productos/laboratorio/biorreactores-fermentadores>/<http://www4.ujaen.es/~ecastro/proyecto/equipos.html>

En la figura 2 se observa un ejemplo donde se representan las diferentes etapas de un bioproceso, en este caso el de producción de anticuerpos por medio de un fermentador.

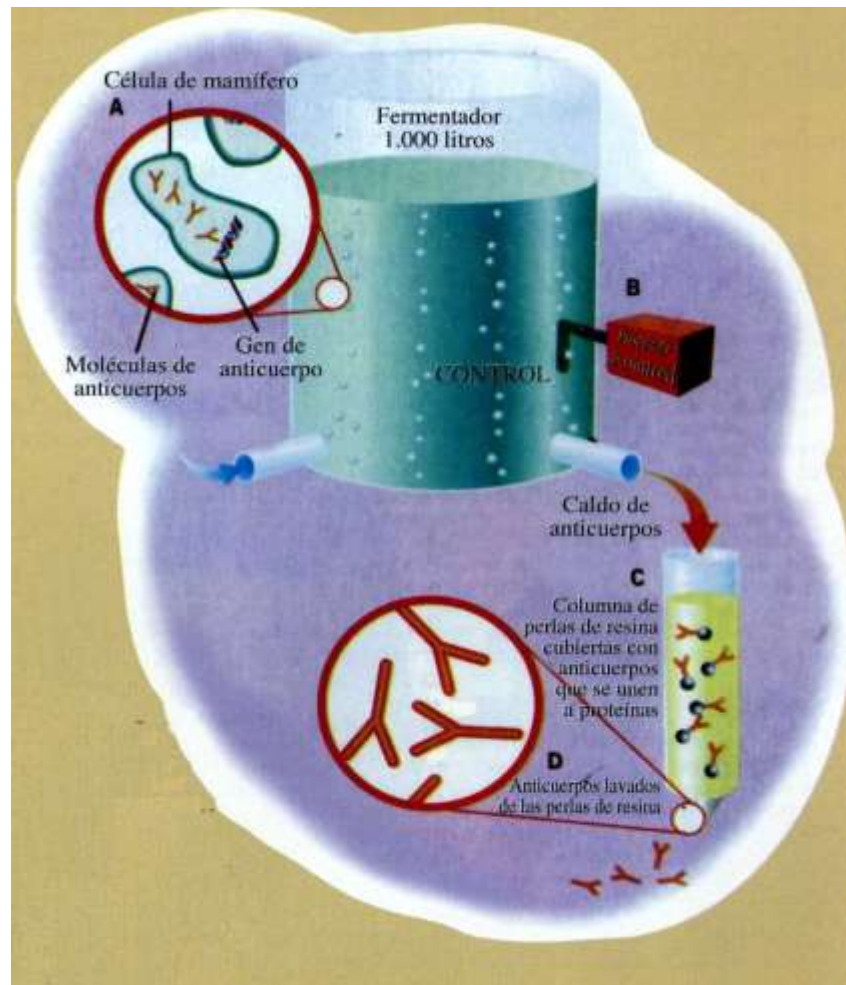


Figura 2. Biorreactor o fermentador. Esquema de un fermentador utilizado para la producción masiva de anticuerpos monoclonales humanizados.

Tomado de: *Creces Educación*. www.creces.cl

Un ingeniero en biotecnología debe ser capaz de seleccionar, diseñar y optimizar un biorreactor, por lo que es necesario identificar su estructura, así como reconocer que este es el recipiente en donde se promueve el crecimiento del microorganismo para la síntesis de diversos productos biotecnológicos, así como identificar los componentes físicos de los biorreactores o fermentadores (Figura 3).

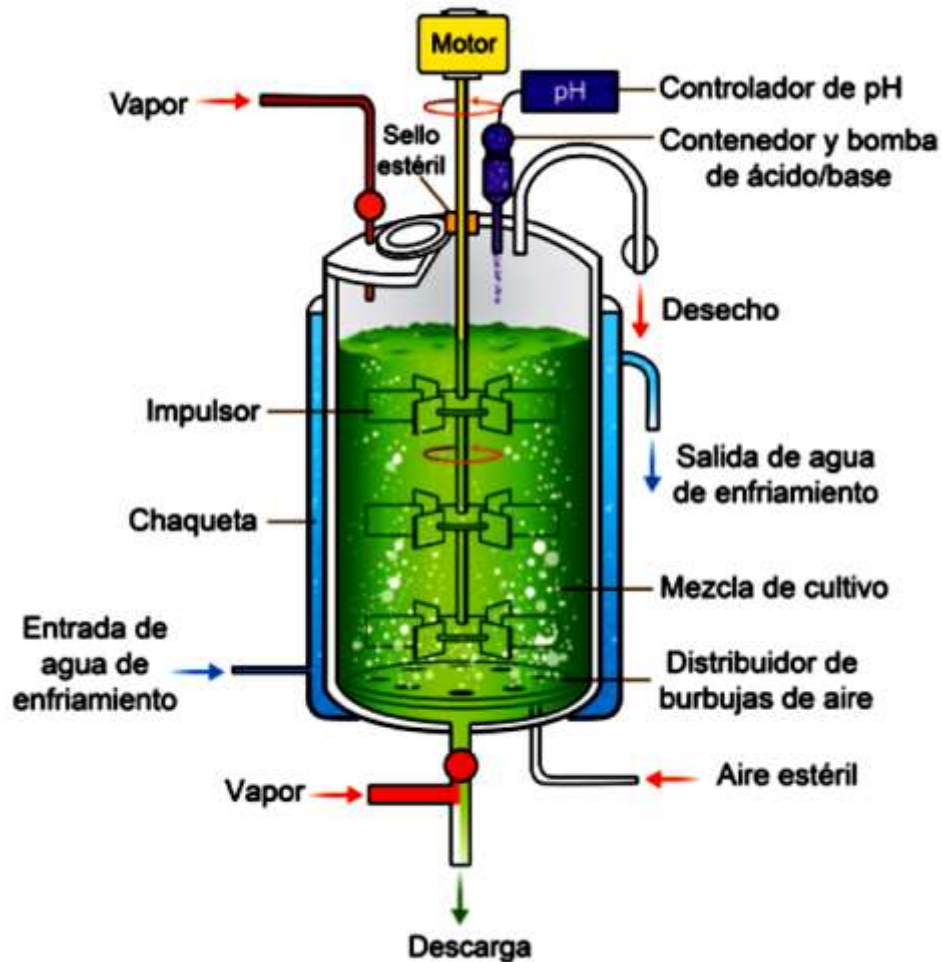


Figura 3. Principales componentes de un biorreactor o fermentador.
Tomado de: Lázaro, 2013.

Cabe aclarar que no todos los fermentadores tienen los mismos componentes o la misma estructura, la cual estará definida de acuerdo al tipo de bioproceso que se llevará a cabo.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo (Ruiz-Leza *et al.*, 2007):



Criterios para el diseño de un biorreactor

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días y así evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un medio adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- El consumo de energía debe ser el mínimo.
- Debe poseer entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad que satisfaga el consumo del mismo por parte del microorganismo.
- El diseño del fermentador debe permitir mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y esterilizado.

Además de los elementos físicos que componen un biorreactor, es necesario considerar el componente biológico de estos: **los microorganismos**.

1.1.2 Microorganismos y células en la industria

Cotidianamente consumimos alimentos y bebidas como el pan, el queso, el vino, la cerveza, etc. que son el resultado de la utilización de biorreactores y de la actividad de **microorganismos**.



Microorganismo

La palabra microorganismo proviene del griego, formada por “*mikro*” que significa pequeño, más la raíz “*organon*” que quiere decir órgano, herramienta o instrumento, y el sufijo “ismo” que significa actividad o sistema.

Lo entendemos como cualquier organismo vivo que no sea visible a simple vista, formas unicelulares. La ciencia que estudia estos fenómenos microscópicos es la microbiología. Entre estos microorganismos están las bacterias, los virus, los mohos y las levaduras (UPNA, 2016).

La correcta selección de los microorganismos es esencial en la producción industrial para alcanzar la mayor eficiencia de un biorreactor y obtener el máximo del producto de interés. A pesar de que la productividad del proceso, está relacionada con la optimización de los parámetros de operación del equipo, **la célula** es la entidad donde se desarrolla toda la actividad de manufactura. La producción en un biorreactor depende de la población de microorganismos empleada en el proceso, el ambiente donde las células se cultivan debe proporcionar lo necesario para que ellas rindan los resultados esperados.

La selección de un microorganismo para un proceso, en primer lugar, está sujeta a que este satisfaga las condiciones mínimas de producción. En la tabla 1 se enuncian varias especies de microorganismos utilizadas en distintos campos industriales y los subproductos generados.



Tabla 1. Microorganismos y áreas de aplicación (Saura, 2003)

Áreas de aplicación	Especies	Ejemplos de productos obtenidos
Salud	<i>Bordetella pertusis</i> , <i>Clostridium tetani</i> y <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Vacuna triple
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina
	<i>Streptomyces</i> sp.	Estreptomycin
	<i>Escherichia coli</i> recombinante	Insulina, interferón
Alimentos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pan
	<i>Streptococcus lactis</i>	Yogurt
	<i>Saccharomyces</i> spp.	Cerveza, vino, sidra
	<i>Acetobacter</i>	Vinagre
	<i>Bacillus</i> spp.	Saborizantes
	<i>Streptococcus</i> spp.	Quesos
Productos industriales	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Butanol, acetona
	<i>Bacillus</i>	Enzimas industriales
	<i>Aspergillus</i>	Amilasa, proteasas, celulasas, pectinasas
	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico y glucónico

La amplia utilización de los microorganismos son la base de industrias muy importantes en varios campos, donde uno de las especies más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) también denominada “levadura”, la cual es un hongo unicelular (Figura 4). En ámbito alimentario la importancia de *S. cerevisiae* se debe a la capacidad de dicho organismo de esponjar el pan y por otra parte por el producto final que se



obtiene de la fermentación alcohólica (la cerveza y el vino). El esponjar el pan y la fermentación alcohólica ocurren debido a la metabolización de los azúcares de la masa o el mosto (esencialmente glucosa, fructosa, sacarosa o maltosa) para generar **dióxido de carbono** y **alcohol etílico o etanol**. El primero es un gas que provoca que la masa del pan suba y forma las burbujas del cava, mientras que el segundo es el origen de las bebidas alcohólicas. La fermentación proporciona energía a la levadura independientemente de la presencia o no de oxígeno siendo una reacción endógena de oxidación-reducción (redox), durante la cual la mitad de la molécula de azúcar hace de donadora de electrones a la otra mitad.

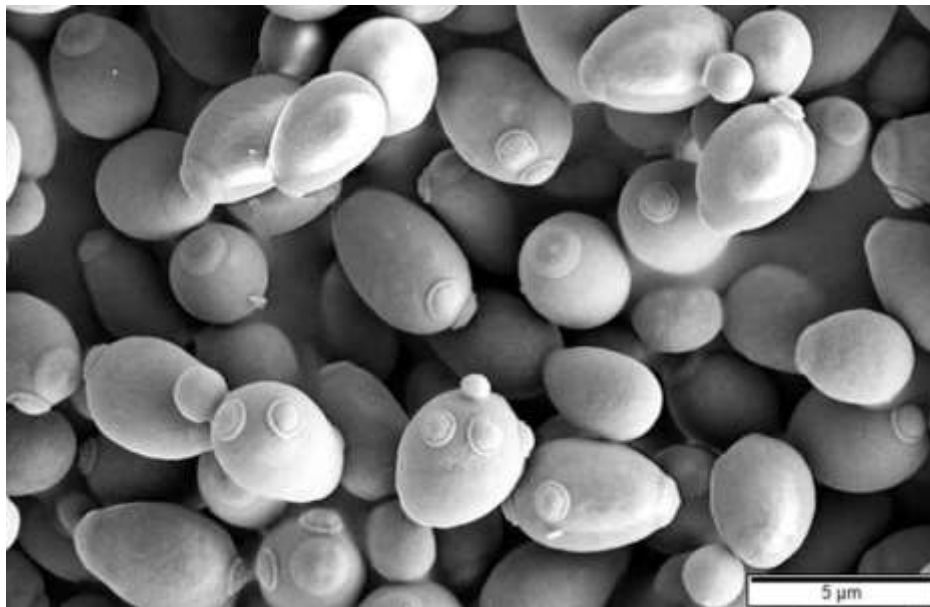


Figura 4. Micrografía electrónica de *Saccharomyces cerevisiae*. Especie utilizada en diferentes campos industriales. Tomado de: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg

Un requisito esencial para seleccionar el microorganismo es que generen un alto rendimiento del producto. No obstante, esta condición no garantiza el buen desempeño del biorreactor y, menos aún, una alta productividad del proceso. Para esto es necesario tomar en cuenta otras propiedades de los microorganismos, en relación con el caldo de cultivo. Entre ellas están la variedad de **sustratos** que puede consumir, las condiciones de temperatura y pH a las cuales puede operar, los requerimientos de oxígeno, la tolerancia al producto y sustrato; así como la producción de co-productos, entre otras.



Sustrato

La sustancia sobre la cual actúa una enzima se llama sustrato. Los sustratos son específicos para cada enzima, por ejemplo: La sacarosa es el sustrato de la sacarasa que actúa rompiéndola en sus componentes (Enzimas, 2016).

Además de la correcta elección del microorganismo de acuerdo al bioproceso que se va a desarrollar, también es importante reconocer las enzimas que pueden modificar la velocidad de reacción en la conversión de sustrato a producto.

1.1.3 Enzimas y sistemas celulares como catalizadores

Enlaces

Debes tomar en cuenta que el siguiente tema se complementa con los revisados en la asignatura de bioquímica donde revisaste definiciones sobre las proteínas y su actividad catalítica, ahora en esta nueva asignatura podrás aplicar estos conocimientos para la resolución de problemas cotidianos a los que te enfrentarás como ingeniero.

La célula, además de ser considerada la unidad fundamental de la vida, es vista como un sistema complejo que cuenta con una gran cantidad de sustancias capaces de sintetizar productos que le son necesarios o beneficiosos por encima de aquellos poco aprovechables o que ponen en riesgo sus funciones vitales y, por ende, la perpetuación de la vida. La modificación en la velocidad de síntesis de productos de la célula depende de la velocidad de las reacciones químicas.



Es importante considerar que la velocidad de una reacción química aumenta o disminuye agregando una sustancia llamada **catalizador**. En el caso particular de las reacciones químicas orgánicas, como son las de célula; estos catalizadores biológicos son las enzimas, las cuales hacen posibles los procesos de degradación de algunas sustancias complejas, su transformación de una en otra o la producción de nuevos compuestos.

Enzima

La palabra enzima deriva de la frase griega “*en zyme*”, que significa “en el fermento”. Las enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula (UNAD, 2016).

En la actualidad las enzimas se han convertido en elementos muy importantes en los procesos industriales, por ejemplo: el detergente en polvo contiene enzimas llamadas lipasas, utilizadas para remover selectivamente las manchas de manteca, aceite y lápiz labial de nuestra ropa, o bien, proteasas que remueven las manchas de sangre y huevo. Otra enzima de amplia aplicación industrial es la **lactasa**, la cual se emplea para la producción de leche deslactosada o las **dextrinas** que en presencia de una **amiloglucosidasa** y la **β -amilasa** se convierten en jarabes que son utilizados para la producción de bebidas, confitería, fermentaciones, helados, alimentos infantiles, etc. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de enzimas y su utilización en la industria.



Tabla 2. Enzima y su aplicación en la industria (Quirasco & López-Munguía Canales, 2006)

Enzima	Fuente	Aplicación industrial	Industria
Invertasa	Levadura	Relleno de caramelos	Confitería
Glucosa oxidasa	Hongos	Eliminación de glucosa y oxígeno	Alimentaria
		Papel para prueba de diabetes	Farmacéutica
Glucosa isomerasa	Bacterias	Jarabe de cereales rico en glucosa	Bebidas refrescantes
Pectinasa	Hongos	Prensado, clarificación del vino	Zumos de frutas
Renina	Hongos	Coagulación de leche	Quesera
Celulasa	Bacterias	Suavizante y abrillantador de tejidos, detergente	Lavandería
Lipasa	Hongos	Degradar la grasa	Lechería, lavandería
Lactasa	Hongos	Degradar la lactosa, glucosa y galactosa	Lechería y alimentos
ADN polimerasa	Bacterias, Archea	Replicación de ADN por PCR	Investigación biológica y forense

El mecanismo de funcionamiento de una enzima es muy complejo, pero puede simplificarse con el **modelo llave-cerradura** (Figura 3).



Figura 3. Representación del proceso de degradación de una sustancia (sustrato) por una enzima.

Tomado de: https://isqch.files.wordpress.com/2012/11/complejo_enzima-sustrato_llave-cerradura.jpeg

Como catalizadores, en un bioproceso las enzimas son requeridas en cantidades muy pequeñas ya que se recuperan al final de cada reacción para recomenzar un nuevo ciclo sin modificar su estado inicial y así funcionar indefinidamente.

1.2 Teoría de la Catálisis Enzimática

Como hemos visto la característica sobresaliente de las enzimas es que se fijan específicamente a sus sustratos, pudiendo ser muy grandes las energías de fijación implicadas. Estas energías pueden utilizarse para modificar el sustrato hacia los productos, los teóricos han explorado las diferentes formas en las que la energía de fijación de la enzima y sustrato puede ser utilizada para disminuir la energía de activación de los pasos químicos. Así, la alta selectividad con la que las enzimas participan en diferentes procesos de transformación química y las condiciones de reacción en las que se operan dichos procesos industriales, traen en consecuencia un ahorro energético y económico.



Teoría de la Catálisis Enzimática

Esta implica el análisis de cómo participan las enzimas dentro de una reacción química y cuál es su influencia sobre la velocidad de la misma. Asimismo, incluye las herramientas que te permitirán calcular la afinidad que tiene un biocatalizador por un sustrato y la velocidad máxima que puede llegar a adquirir (Fersht, 1980).

En los siguientes apartados se proporcionarán los elementos que permitirán comprender mejor cómo se dan los procesos que se implican en la Teoría de la Catálisis Enzimática.

1.2.1 Biotransformación y biocatálisis

Para poder entender la teoría catálisis enzimática, debemos revisar dos conceptos importantes que ayudarán a comprender los cambios y productos derivados de la acción de las enzimas: **biotransformación** y **biocatálisis**.



Biocatálisis y biotransformación

La palabra biocatálisis proviene de dos términos: "*bio*" que significa vida y "*catálisis*" que significa acelerar. Dentro de cada ser vivo se realizan un sin número de reacciones químicas, las cuales se efectúan de manera simultánea y a temperaturas moderadas.

El término biocatálisis se refiere a la utilización de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas. Mientras que el término biotransformación hace referencia a las transformaciones metabólicas que en el organismo sufren la mayoría de los agentes xenobióticos, asimismo esta transformación es catalizada, por enzimas (Cardellá-Rosales, 2007).

Ambos procesos se llevan a cabo dentro de los biorreactores.

Para desarrollar procesos biocatalíticos a gran escala se suelen seguir las etapas a continuación citadas:



Fases de un proceso biocatalítico



Es importante considerar que la naturaleza proteica de los biocatalizadores o enzimas permite que las moléculas se degraden fácilmente, recuerda que en contraposición hay catalizadores químicos que al estar constituidos por metales pesados son difíciles de destruir. Sin duda, las ventajas de los biocatalizadores no solo se limitan al aspecto



ambiental, sino también al desarrollo de diversas áreas industriales como la farmacéutica, la alimentaria, la de cosméticos, entre otras.

1.2.2 Cinética de los procesos microbiológicos

Continuando con lo anterior ahora revisarás los elementos que conforman la cinética. Comenzarás con el mecanismo por el que ocurre una reacción química ordinaria donde una o más sustancias se transforman dando lugar a la formación de nuevos productos. Asimismo, revisarás de forma más detallada cómo actúan las enzimas sobre la velocidad de las reacciones y la formación de los productos.

Cinética química

Es el área de la química que estudia la velocidad o rapidez con la que ocurre una reacción, la cual:

- Predice la velocidad que tendrá una reacción en unas condiciones determinadas de presión, temperatura, concentración, catalizador, etc.
- Determina y comprende el mecanismo en el que tiene lugar una reacción (Levenspiel, 2004).

La energía para que se lleve cabo una reacción química es proporcionada a través del incremento de la temperatura; sin embargo, existen transformaciones que se deben experimentar a temperatura ambiente. Para favorecer estos procesos, se emplean biocatalizadores, que como ya se revisó, su función es modificar la velocidad de producción, mediante la disminución de la energía activación, utilizando menos calor al llevar a cabo la reacción (Figura 4).



Figura 4. Reacción química catalizada. Tomado de:
<http://coleccion.educ.ar/coleccion/CD21/ce/materialesymetodos.html>.

Estos biocatalizadores actúan sobre el sustrato (Figura 5). Al unirse a él, a través del sitio activo (parte funcional de la enzima), se forma un complejo (complejo enzima-sustrato) que posteriormente da lugar al producto de interés, tal como se muestra en la siguiente figura:

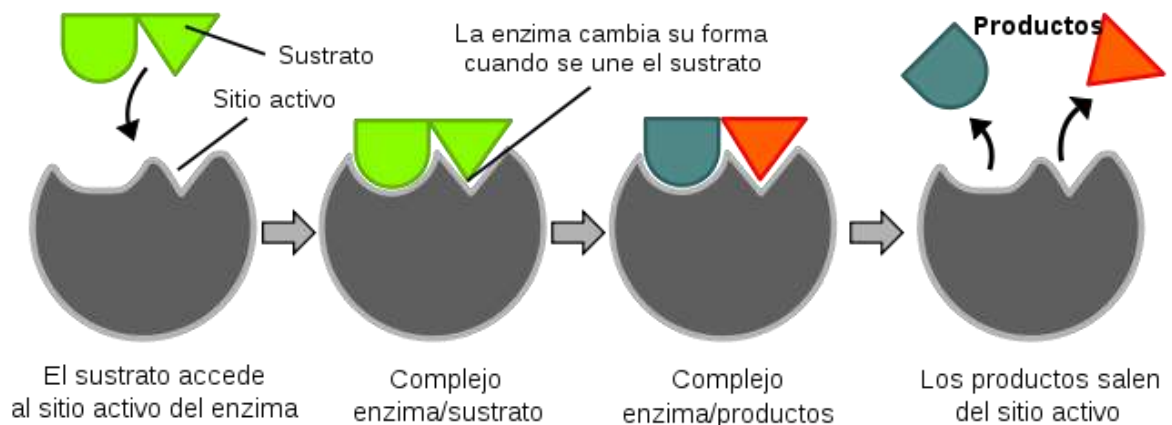


Figura 5. Formación de complejo enzima-sustrato. Tomado de:
https://es.wikipedia.org/wiki/Enzima#/media/File:Induced_fit_diagram_es.svg



En muchos casos las enzimas están integradas por una parte de naturaleza proteínica y otra que no lo es; la primera se conoce como **apoenzima** y la segunda como **cofactor** (Figura 5).

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteína (tal como la observada en la figura 5), mientras que otras necesitan, además, uno o más componentes no proteicos llamados **cofactores**.

Cofactor, coenzima y grupo prostético

El cofactor puede ser un ion metálico, la coenzima es una molécula orgánica, algunas enzimas necesitan de ambos para catalizar una reacción bioquímica. En un grupo prostético, el cofactor está unido fuertemente a la enzima (Quirasco & López-Munguía Canales, 2006).

El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de apoenzima (Figura 6).

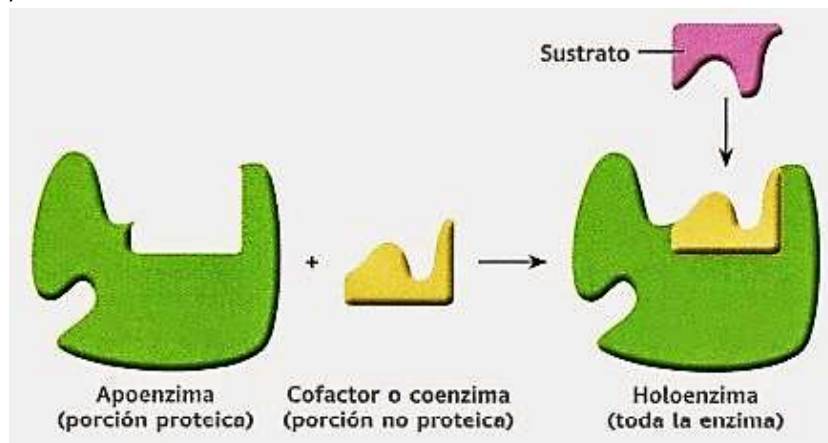


Figura 6. Holoenzima-apoenzima. Tomado de:
<http://apuntesbiotecnologiageneral.blogspot.mx/2014/05/enzimas.html>

Hasta el momento se revisaron los elementos de la cinética que se puede llevar a cabo con la utilización de catalizadores biológicos y no biológicos



(cofactores) y su relación con la energía de activación. Esto nos ayudará a entender la cinética que se lleva a cabo dentro de los biorreactores.

1.2.3 Cinética enzimática

Hoy en día no se dispone de una teoría sencilla que explique la **catálisis enzimática**. No obstante, existen numerosas ideas soportadas por los hechos experimentales que indican la existencia del **complejo enzima-sustrato** formado por la unión del sustrato al centro activo de la enzima. Mientras está enlazado a la enzima, el sustrato se transforma en producto, momento en el cual se libera la enzima.

Ahora revisaremos un tema elemental que nos permitirá cuantificar la velocidad de reacción en la actividad enzimática, que generalmente se expresa como cambios de concentración por unidad de tiempo, es decir, la cinética enzimática.

Cinética enzimática

Es una parte de la bioquímica encargada de estudiar las velocidades de reacción que son catalizadas por enzimas (Quirasco & López-Munguía Canales, 2006).

La importancia del estudio de la cinética enzimática no solamente radica en el hecho de que las enzimas actúan en el proceso metabólico de los microorganismos, sino que, gracias a su posible inmovilización, puede emplearse cada vez más en reacciones específicas de aplicación industrial.

Existen cuatro características que diferencian a las reacciones enzimáticas con respecto a las reacciones químicas catalizadas:

a) La enzima es altamente específica y cataliza solamente una o pocas reacciones químicas. Los catalizadores sólidos no suelen ser específicos y pueden intervenir en reacciones diferentes que tengan el mismo grupo funcional. Dada la gran variedad de enzimas descubiertas actualmente (unas 3300), se pueden llevar a cabo un gran número de reacciones químicas empleando enzimas específicas como catalizadores.



b) La velocidad de una reacción catalizada por una enzima es mucho mayor que la realizada por los productos no biológicos. Solo es necesaria la presencia de una pequeña cantidad de enzimas para acelerar suficientemente la reacción.

c) Las condiciones de reacción (temperatura, presión, pH, etc.) de las reacciones enzimáticas son suaves. A bajas temperaturas la actividad de las enzimas es más elevada que la de los catalizadores sólidos. A temperaturas altas los catalizadores ordinarios suelen ir aumentando su actividad, mientras que las de las enzimas disminuyen pudiendo perderla totalmente a partir de cierta temperatura.

d) Las enzimas son moléculas sensibles e inestables que requieren cuidado en su uso. Estas pierden fácilmente su actividad catalítica al cambiar su conformación estructural (Desnaturalización en el transcurso de algunas reacciones, Izquierdo *et al.*, 2004).

Para que comprendamos cómo se efectúan las reacciones químicas mediante biocatalizadores es necesario que identifiquemos que estas se producen mediante dos etapas, donde:

En la **Etapla 1** la enzima se une, a través del sitio activo, al sustrato, formando el complejo enzima-sustrato (Figura 7).

Mientras que en la **Etapla 2** el complejo enzima-sustrato da lugar a la generación del producto, liberando la enzima para volver a iniciar la etapa 1 (Figura 7).

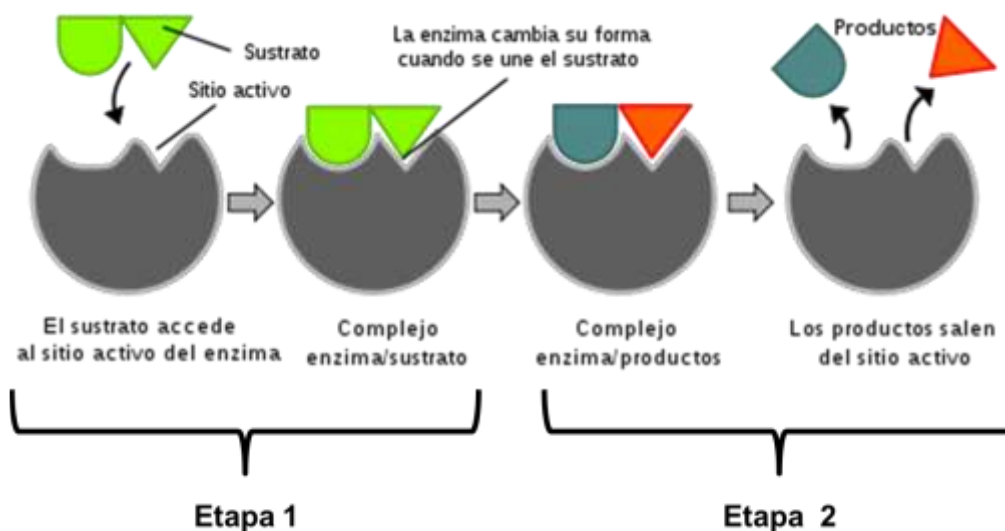


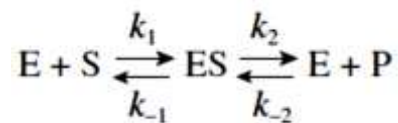
Figura 7. Etapas de una reacción biocatalizada.

Modificado de:

https://es.wikipedia.org/wiki/Enzima#/media/File:Induced_fit_diagram_es.svg



El comportamiento característico de la reacción de la mayoría de las enzimas puede describirse mediante la **ecuación de Michaelis-Menten**, la cual muestra la relación entre la **velocidad inicial** y la **concentración de sustrato**. Este modelo considera que cuando el reactivo o sustrato (**S**) está en contacto con la enzima (**E**), rápidamente se combinan para formar un complejo enzima-sustrato (**ES**). Posteriormente, de este complejo se liberan tanto el producto como la enzima, dejándola disponible para combinarse con una nueva molécula de sustrato. Lo anterior se representa en la siguiente ecuación general para una reacción en la que participa un solo sustrato:



En donde:

S = sustrato

E = enzima

ES = complejo enzima sustrato o complejo de Michaelis-Menten

k_1, k_2, k_{-1}, k_{-2} = Constantes de velocidad de la reacción (constantes cinéticas)

A continuación, revisarás el proceso que sucede en una reacción enzimática, analizando cada una de las fases.

En la **etapa 1** puede distinguirse que se forma el complejo enzima-sustrato; sin embargo, cierta parte del complejo se disocia para restablecer la enzima libre y el sustrato; en cambio, en la **etapa 2**, el complejo enzima-sustrato se disocia para generar la enzima libre y el producto; de tal forma, que las velocidades con sus respectivas constantes cinéticas, para cada uno de los procesos individuales, se pueden expresar como:

$v_1 = k_1 [E] [S]$
sustrato.

Etapa 1: Formación del complejo enzima-sustrato.

$v_2 = k_2 [ES]$
sustrato.

Etapa 1: Disociación del complejo enzima-sustrato.

$v_3 = k_3 [ES]$
sustrato.

Etapa 2: Disociación del complejo enzima-sustrato.

Donde:



k_1, k_2, k_3 = Constantes microscópicas de velocidad/constantes cinéticas individuales

$[E]$ = Concentración de enzima libre

$[S]$ = Concentración de sustrato

$[ES]$ = Concentración del complejo enzima-sustrato

Se puede distinguir entre enzima libre (**E**) y enzima unido al sustrato **[ES]**, de forma que la concentración total de enzima **[ET]**, (que es constante a lo largo de la reacción) es:

$$[ET] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [ET] - [ES]$, resulta que: $v_1 = k_1 [S] [ET] - k_1 [S] [ES]$

Este modelo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante a lo largo de la reacción. Por tanto, la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (v_1) es igual a la de su disociación ($v_2 + v_3$):

$$v_1 = v_2 + v_3$$

Además, como **[ES]** es constante, la velocidad de formación de los productos es constante:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante}$$

Como $v_1 = v_2 + v_3$, podemos decir que:

$$k_1 [S] [ET] - k_1 [S] [ES] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

Multiplicando por $\frac{1}{k_1}$:

$$(k_1 [ET][S] - k_1 [ES][S] = k_2 [ES] + k_3 [ES]) \left(\frac{1}{k_1} \right)$$

$$[ET][S] - [ES][S] = \frac{k_2}{k_1} [ES] + \frac{k_3}{k_1} [ES]$$

Despejando la **[ES]**:

$$[ES][S] + \frac{k_2}{k_1} [ES] + \frac{k_3}{k_1} [ES] = [ET][S]$$

$$[ES] \left([S] + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_1} \right) = [ET][S]$$



$$[ES] \left([S] + \frac{k_2 + k_3}{k_1} \right) = [ET][S]$$

$$[ES] = \frac{[ET][S]}{[S] + \frac{k_2 + k_3}{k_1}}$$

$$[ES] = \frac{[ET][S]}{K_M + [S]}$$

Siendo que $K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ o constante de Michaelis-Menten

Constante de Michaelis-Menten

En 1913, el bioquímico alemán L. Michaelis y la médica canadiense M.L. Menten formularon una ecuación matemática que relaciona la velocidad de reacción y la $[S]$. En dicha ecuación aparece el término k_m , denominado “**constante de Michaelis-Menten**”.

La K_M es una característica constante de cada enzima: se interpreta como un **indicador** de la **afinidad entre un enzima y su sustrato** y equivale a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción (Colegio marista de Granada, 2016).

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es:

$$[ES] = \frac{[ET][S]}{K_M + [S]}$$

$$v = v_3 = k_3[ES] = \frac{k_3[ET][S]}{K_M + [S]}$$

Si introducimos el parámetro $V_{m\acute{a}x}$ en la ecuación general de la velocidad, (la fórmula recuadrada anteriormente), obtenemos la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:



$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Donde:

V_0 = es la velocidad inicial de la reacción

$V_{m\acute{a}x}$ = es la velocidad máxima

K_M = es la constante de Michaelis-Menten = $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

$[S]$ = es la concentración del sustrato

Después de revisar la información anterior podemos concluir que la constante de Michaelis-Menten (K_M) es característica de una enzima y particular para un sustrato. La constante K_M es numéricamente igual a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$ ($K_M = \frac{V_{m\acute{a}x}}{2}$). Este parámetro, K_M no varía con la concentración de enzima (Figura 8).

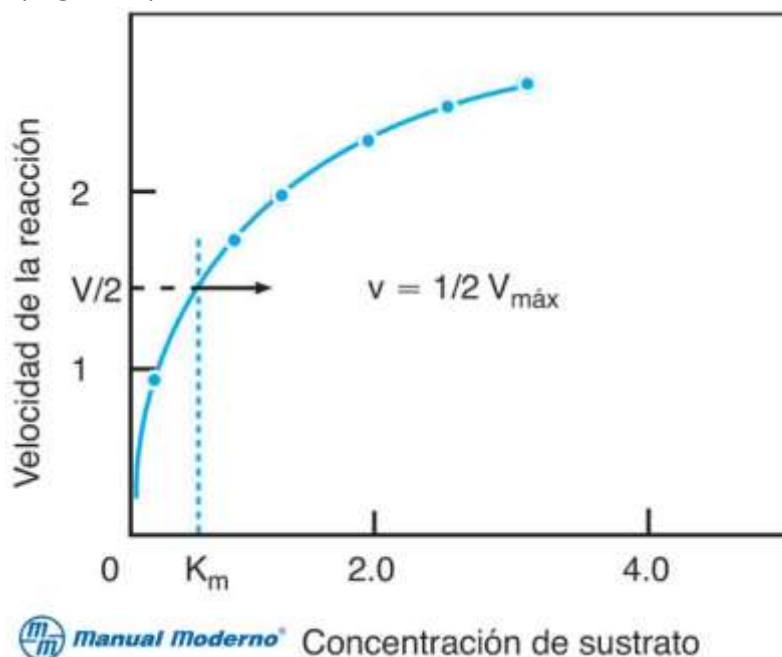


Figura 8. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten. Tomado de: http://www.manualmoderno.com/apoyos_electronicos/9786074482911/galeria_entrada.php?cap=10&imagen_inicial=5



Interpretación de K_M

Significado de una K_M pequeña: un valor numérico pequeño de K_M refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato porque a una baja concentración del mismo, la enzima ha desarrollado ya la mitad de la velocidad máxima.

Significado de una K_M grande: el valor numérico grande de K_M refleja una baja afinidad de la enzima por su sustrato porque a una concentración elevada del mismo, la enzima desarrolla la mitad de la velocidad máxima.

Relación de la velocidad con la concentración de enzima: la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima a cualquier concentración de sustrato. Por ejemplo, si la concentración de enzima es disminuida a la mitad, la velocidad inicial de la reacción (V_0) es reducida también a la mitad de la original (Gil Garzón *et al.*, 2012).

Se revisaron los conceptos de cinética enzimática, sus etapas, así como la ecuación de Michaelis-Menten y la determinación de las constantes cinéticas derivadas de dicha ecuación. Esto ayudará a comprender cómo es que funciona el interior del biorreactor y a determinar cuál será la mejor opción al elegir la enzima con respecto al sustrato a utilizar y el producto deseado.

1.2.4. Mecanismo de reacción enzimática

Además de la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 8) que muestra la relación entre la velocidad de la reacción y la concentración de sustrato para una reacción catalizada por una enzima, debes considerar que existe otra forma de determinar las constantes cinéticas a través de la representación de **Lineweaver-Burk** (Figura 9), en la que se gráfica el inverso de la velocidad inicial contra el inverso de la concentración de sustrato (gráfica doble recíproca).



El valor de $V_{m\acute{a}x}$ se puede determinar a partir del valor máximo obtenido de la curva; mientras que la K_M corresponde a la concentración de sustrato en la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 8).

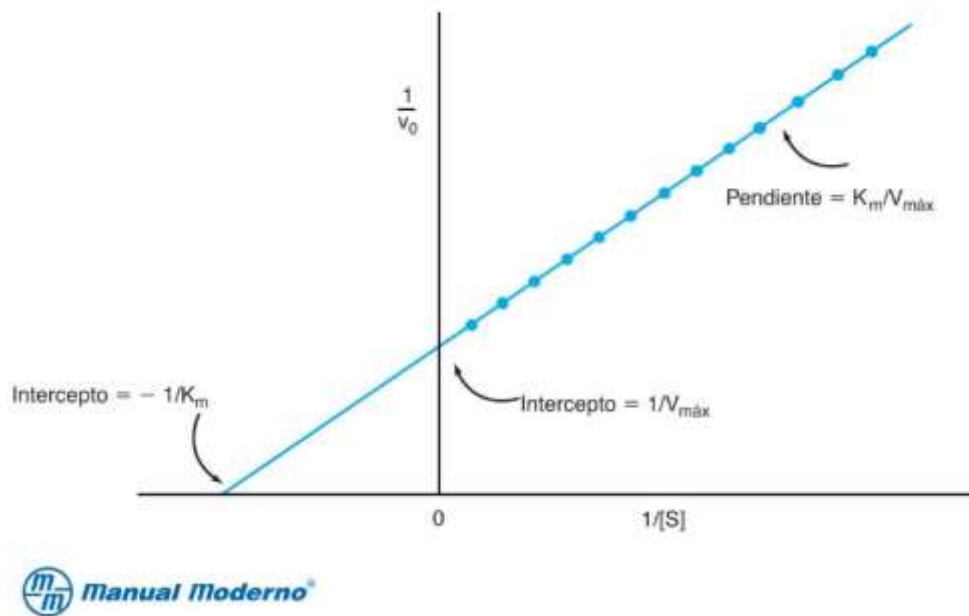


Figura 9. Gráfico de Lineaweaver-Burk. Tomado de:
http://www.manualmoderno.com/apoyos_electronicos/9786074482911/galeria_entrada.php?cap=10&imagen_inicial=6

Debe considerar que, a partir de este gráfico, que corresponde a una línea recta, se toman las siguientes consideraciones:

- La pendiente corresponde a $\frac{k_m}{V_{m\acute{a}x}}$
- La abscisa en el origen $\left(\frac{1}{v_0}\right) = 0$ corresponde a $-\frac{1}{k_m}$
- La ordenada en el origen $\frac{1}{[S]} = 0$ corresponde a $\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$

Esta gráfica de la doble recíproca (Figura 9) muestra la relación entre el inverso de la velocidad inicial $1/v_0$ es el $\frac{1}{v_0}$ y el inverso de la concentración



del sustrato $\frac{1}{[S]}$. La intersección de la recta con el eje vertical de $\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$ la intersección con el eje horizontal es $\frac{1}{k_m}$ y la pendiente de la recta está dada por $\frac{k_m}{V_{m\acute{a}x}}$.

En conclusión, debes considerar que existen métodos gráficos que facilitan el cálculo preciso de k_m y $V_{m\acute{a}x}$; los cuales se hacen a partir de la manipulación matemática de los datos empleados para la representación del modelo de Michaelis-Menten y del gráfico de Lineweaver-Burk.

1.3 Factores que influyen la actividad enzimática

Como ya has estudiado en los temas anteriores, las biotransformaciones se pueden acelerar a través los biocatalizadores y que, a través de un estudio de cinética enzimática, es posible monitorear la velocidad con que se efectúan las reacciones bioquímicas.

Has notado que cuando dejas un alimento a temperatura ambiente por un determinado tiempo este tiende a descomponerse a mayor velocidad que uno que se encuentra en el congelador (Figura 10) o que, si agregas unas gotas de limón sobre la pulpa, de una manzana partida por la mitad, disminuye su oxidación, o que cuando hierves la leche tiende a descomponerse más lentamente o bien que la fruta se conserva por más tiempo cuando la preparas en mermelada.



Figura 10. Fresas en descomposición y mermelada de fresa. Tomado de: <http://es.dreamstime.com/foto-de-archivo-fresas-mohosas-putrefactas-image31074460> y https://www.emaze.com/@ALQITOWL/mermelada-de-fresaphp?cap=10&imagen_inicial=6



Así, los fenómenos descritos indican que existen factores capaces de modificar la velocidad de una reacción enzimática. Por ejemplo, un pastel al ser horneado acelera las reacciones que transforman la mezcla líquida en un producto esponjoso. Ahora bien, existen sustancias que son capaces de modificar la velocidad de reacción enzimática haciéndola más lenta, es decir, retrasándola. A estas sustancias se les llama **inhibidores**. El uso de inhibidores es muy importante en la industria farmacéutica y alimenticia, ya que al hacer más lentas las reacciones, evita la formación, durante un tiempo determinado, de sustancias o productos indeseables que hacen que tanto los medicamentos como los alimentos se descompongan rápidamente.

Inhibidor

Son sustancias que disminuyen o anulan la actividad de enzimas que habitualmente están activas. Pueden ser cationes, moléculas orgánicas y, con frecuencia, el producto final de la reacción o de una serie de reacciones. En este último caso, la enzima deja de actuar cuando no se necesita más cantidad de producto y es él quien la inhibe. Se conoce como inhibición *feedback* o retroinhibición (Colegio Marista de Granada, 2016).

En la industria alimenticia a los inhibidores se les llama **conservadores**. Estos pertenecen a un grupo de sustancias llamadas aditivos que suelen agregarse a los alimentos procesados para mejorarlos.

Conservador

Son sustancias capaces de inhibir, retardar o detener los procesos de fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otras alteraciones biológicas de los alimentos y bebidas (Quiminet, 2016).



Como ves, existen múltiples factores que aceleran o retardan la velocidad de reacción, por lo tanto, es necesario analizar el empleo de enzimas en las biotransformaciones y describir la influencia de dichos factores fisicoquímicos (Figura 11).



Figura 11. Factores fisicoquímicos que afectan la cinética enzimática.

1.3.1 Especificidad

La velocidad de una biotransformación catalizada por enzimas que se ve modificada por diversos factores fisicoquímicos, entre los que se encuentra la **especificidad**. Los biocatalizadores son específicos tanto



para reconocer a la sustancia sobre la que actúan (sustrato) como por el tipo de reacción que catalizan. Su actividad catalítica puede ser regulada por ciertos mecanismos en las células, las cuales permiten adecuar y modificar la velocidad de las reacciones del metabolismo y adaptarla a las necesidades de cada momento; de modo que resulten ordenadas, tanto temporal como espacialmente, pues se realizan en determinados compartimentos celulares (Colegio Marista de Granada, 2016).

Especificidad y sus tipos

La **especificidad** enzima-sustrato se debe a la estructura proteica de la apoenzima, la cual determina una forma espacial característica del centro activo donde se acopla el sustrato.

Los radicales de los aminoácidos de fijación se unen a éste mediante enlaces débiles, no covalentes, favoreciendo la orientación apropiada del sustrato para la reacción.

Tipos de especificidad:

- a) **Especificidad de sustrato:** consiste en que los enzimas pueden catalizar la transformación de un sustrato concreto (especificidad absoluta) o una familia de sustratos relacionados estructuralmente (especificidad relativa).
- b) **Especificidad de reacción:** consiste en que cada enzima cataliza una sola de las posibles reacciones que puede experimentar un sustrato (Colegio Marista de Granada, 2016).

Es importante reconocer que la especificidad de las enzimas depende de las características del **centro activo**, región donde se une el sustrato y ocurren las transformaciones del mismo (Figura 12).



Centro activo

Todas las enzimas son proteínas. Tienen una estructura tridimensional globular y solo presentan actividad cuando tienen una conformación espacial que permite establecer una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o sitio activo. En las enzimas, el agua actúa facilitando la integración de su estructura proteínica, lo que conlleva a la formación del **centro activo**; además, también favorece la difusión de los reactivos e interviene como tal en las reacciones de hidrólisis (Gálvez *et al.*, 2006).

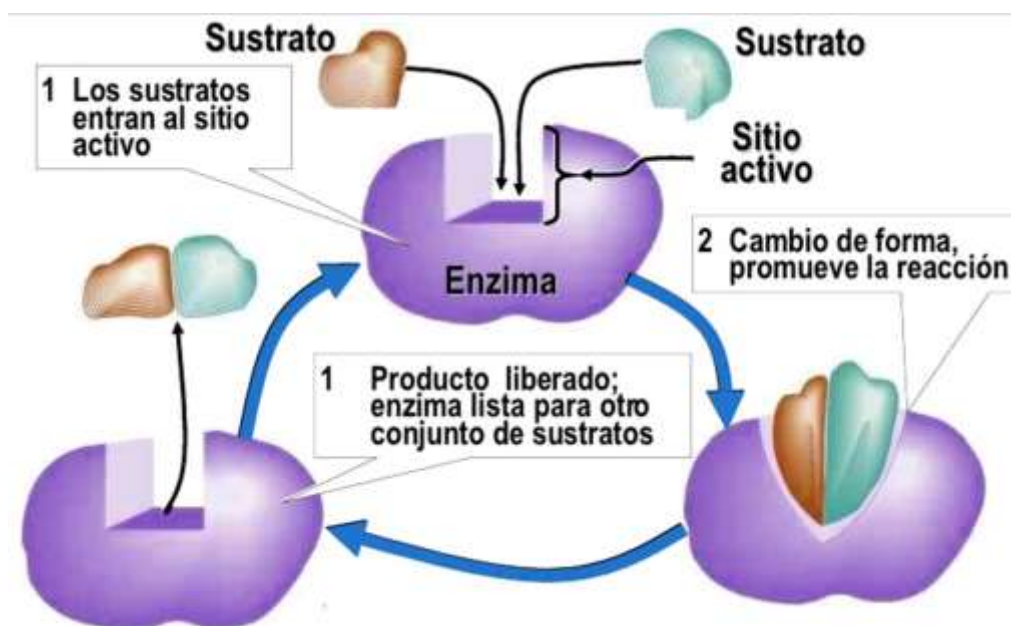


Figura 12. El sitio activo de la enzima es complementario a la estructura del sustrato. Tomado de: <http://es.slideshare.net/Valedelvalle/capitulo-4-el-flujo-de-energa-en-la-vida-de-una-clula-presentation>

La unión enzima-sustrato y la transformación que experimenta este, dependen esencialmente de los diferentes radicales de los aminoácidos constituyentes y/o relacionados con el centro activo (Tabla 3).



Tabla 3. Radicales de los aminoácidos (Colegio marista de Granada, 2016)

Tipos de enzimas	Reacción que catalizan
Aminoácidos estructurales	Forman el “esqueleto peptídico” y proporcionan la conformación apropiada del centro activo para el encaje del sustrato.
Radicales de los aminoácidos de fijación	Retienen y “obligan” al sustrato a adoptar la orientación apropiada para la reacción.
Radicales de los aminoácidos catalíticos	Son responsables de crear las tensiones necesarias para la ruptura de enlaces del sustrato y la formación de otros nuevos (transformándolo en producto/s).

Las enzimas aceleran las reacciones, alterando la conformación de sus sustratos para que logren llegar al estado de transición. Para poder entender mejor como se da este proceso, revisa a continuación dos **modelos de enzima-sustrato**.

El modelo más simple para entender esta interacción enzima-sustrato es el **modelo de llave-cerradura**, en el cual el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo de la enzima.

En muchos casos, las conformaciones tanto de la enzima como del sustrato son modificadas cuando logran unirse, este es el llamado **modelo de acoplamiento inducido**. Esta alteración de las conformaciones hace que logren llegar más rápido al estado de transición.

En las figuras 12 y 13 se muestra que el sitio activo ocupa un área relativamente pequeña de la superficie de la molécula de la enzima, por lo tanto, solo una pequeña porción es la que participa en la catálisis.



Las otras regiones de la enzima pueden permitir la unión con otras moléculas involucradas en la regulación de la actividad enzimática.

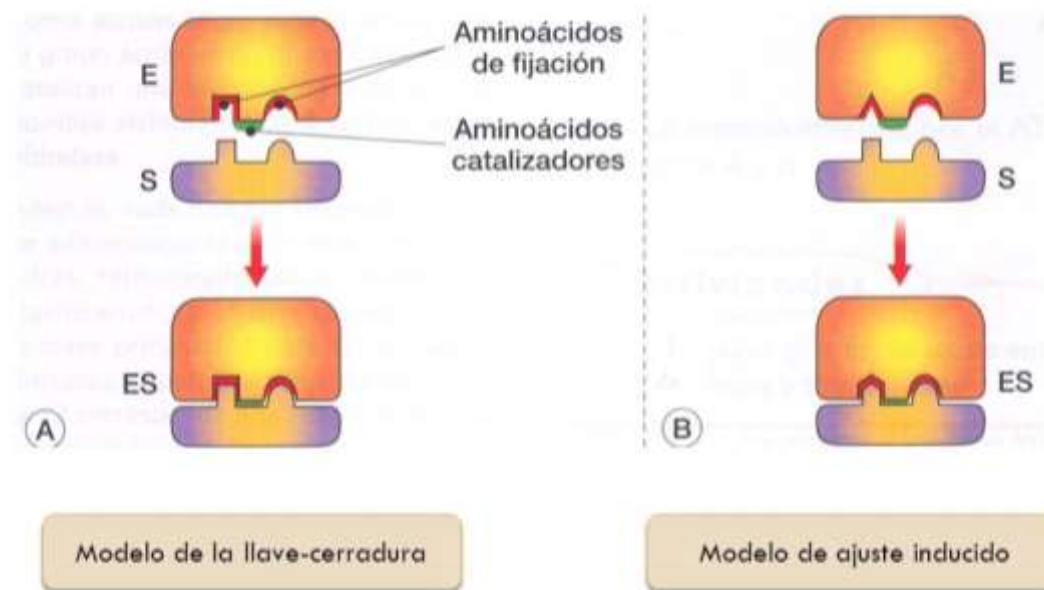


Figura 13. Modelos de especificidad enzimática. (A) El modelo llave y cerradura unido con enzimas. (B) En ocasiones, en el modelo de ajuste inducido, las enzimas y sus sustratos pueden modificar su forma durante la unión.

Tomado de: <http://slideplayer.es/slide/136334/>

Como pudimos ver, la enzima puede modificar su sitio activo para ajustarse al sustrato, adaptándose a las necesidades de cada reacción.

1.3.2 Desnaturalización

Otros de los factores que afectan la actividad enzimática es la temperatura. Los aumentos de temperatura aceleran las reacciones enzimáticas, por cada 10° C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Sin embargo, cuando la temperatura es muy elevada, los biocatalizadores se desnaturalizan.



Desnaturalización

Se define como el cambio que sufren las enzimas en su estructura, por lo que se observa pérdida de actividad catalítica hasta la anulación (Gálvez y *et al.*, 2006).

Otros factores que intervienen en esta modificación son el pH, los cambios de concentración, la velocidad de agitación o la presencia de agentes desnaturizantes.

En el caso de que las condiciones extremas vuelvan a ser normales, la enzima puede adquirir nuevamente su forma original y recuperar su actividad catalítica, es decir, se renaturaliza.

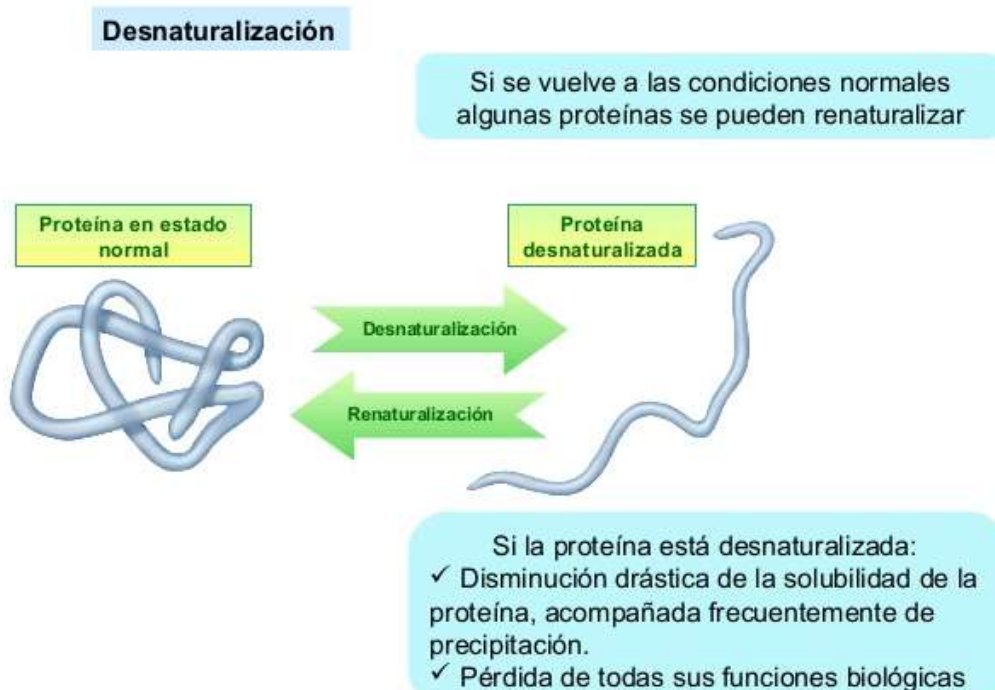


Figura 14. Desnaturalización de una proteína.
Tomado de: <http://es.slideshare.net/Alberkar/las-protenas-2013>



Se puede concluir que existe pérdida o disminución de la capacidad catalítica de las enzimas, ya que, al modificarse su estructura, la conformación del sitio activo también se ve alterada.

1.3.3 pH

Los aminoácidos que forman a las enzimas están ionizados, es decir, se encuentran cargados positiva o negativamente dependiendo el pH (potencial de hidrógeno) del medio. Los biocatalizadores al contener ambas cargas a lo largo de su cadena, experimentan fuerzas de atracción y repulsión que permiten el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína. Cualquier modificación del pH, por encima o debajo del óptimo, afecta drásticamente la actividad enzimática.

pH

El pH es una medida de la acidez o de la alcalinidad de una sustancia. Toda sustancia con pH 7, el correspondiente al agua, se denomina neutra. Las de valor inferior a 7, se consideran ácidas y las superiores a 7 básicas o alcalinas (Túnez y *et al.*, 2016).

Hay un valor óptimo de pH, propio de cada enzima, en torno al cual la actividad enzimática es máxima, debido a que en esa situación la conformación y el grado de ionización de los radicales del centro activo son los apropiados para reconocer y transformar al sustrato. Las enzimas tienen su pH óptimo cuando este es muy cercano a la neutralidad. Debido a que son proteínas, si se presentaran valores extremos de pH se podría producir la desnaturalización de la enzima, no obstante, podemos encontrarnos que algunas excepciones requieren un pH muy bajo o muy alto (Tabla 4).



Tabla 4. pH óptimo de algunas enzimas (Martínez, 2016)

Tipos de enzimas	Reacción que catalizan
Pepsina	1.5
Tripsina	7.7
Catalasa	7.6
Arginasa	9.7
Fumarasa	7.8
Ribonucleasa	7.8

Para evitar la desnaturalización de las enzimas, necesitas conocer el pH óptimo y mantenerlo siempre en equilibrio para que se lleve a cabo el proceso catalítico eficientemente.

1.3.4 Temperatura

La velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura, dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores la actividad disminuye debido a que la enzima, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y por tanto de inactivación (Tena & Jorrín, 2016; Figura 15).

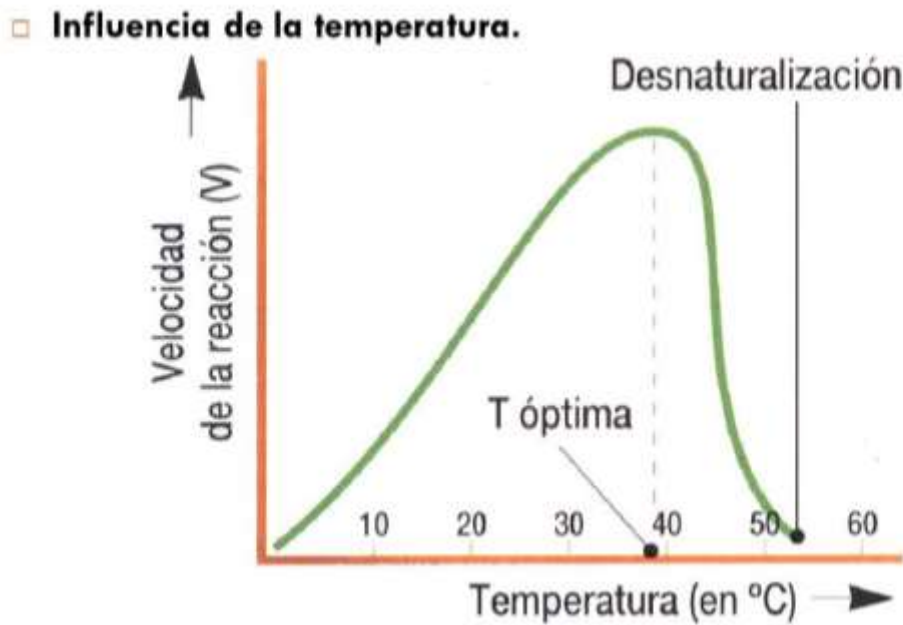


Figura 15. Gráfica de temperatura óptima de una enzima.
Tomada de: <http://slideplayer.es/slide/136334/>

La temperatura es el factor más importante y el más fácil de controlar en un biorreactor en cualquier proceso bioquímico que debamos realizar.

1.3.5 Inhibición

La actividad enzimática disminuye por la acción de sustancias que se unen fuertemente al sitio activo y bloquean la entrada del sustrato. Estas sustancias reciben el nombre de inhibidores, los cuales disminuyen o anulan la actividad de enzimas que habitualmente están activas; pueden ser cationes, moléculas orgánicas y, con frecuencia, el producto final de la reacción, o de una serie de reacciones.



Inhibidor enzimático

Un inhibidor enzimático es algún compuesto que impide que alguna, o algunas, enzimas catalicen. Este tipo de compuestos son específicos, o sea que pueden inhibir a un grupo de enzimas, pero no tener ninguna actividad con otras enzimas (Martínez, 2016).

Los inhibidores pueden clasificarse en dos tipos diferentes:

Irreversibles: se producen cuando el inhibidor, que se denomina «veneno metabólico», se une covalentemente a la enzima alterando su estructura e inutilizándola de forma permanente (Figura 16).

Reversibles: es más común. En este caso, la unión del inhibidor con la enzima se realiza por enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, iónicos, etc.) más fáciles de romper. La enzima vuelve a tener actividad una vez eliminada la sustancia inhibidora (Figura 16).

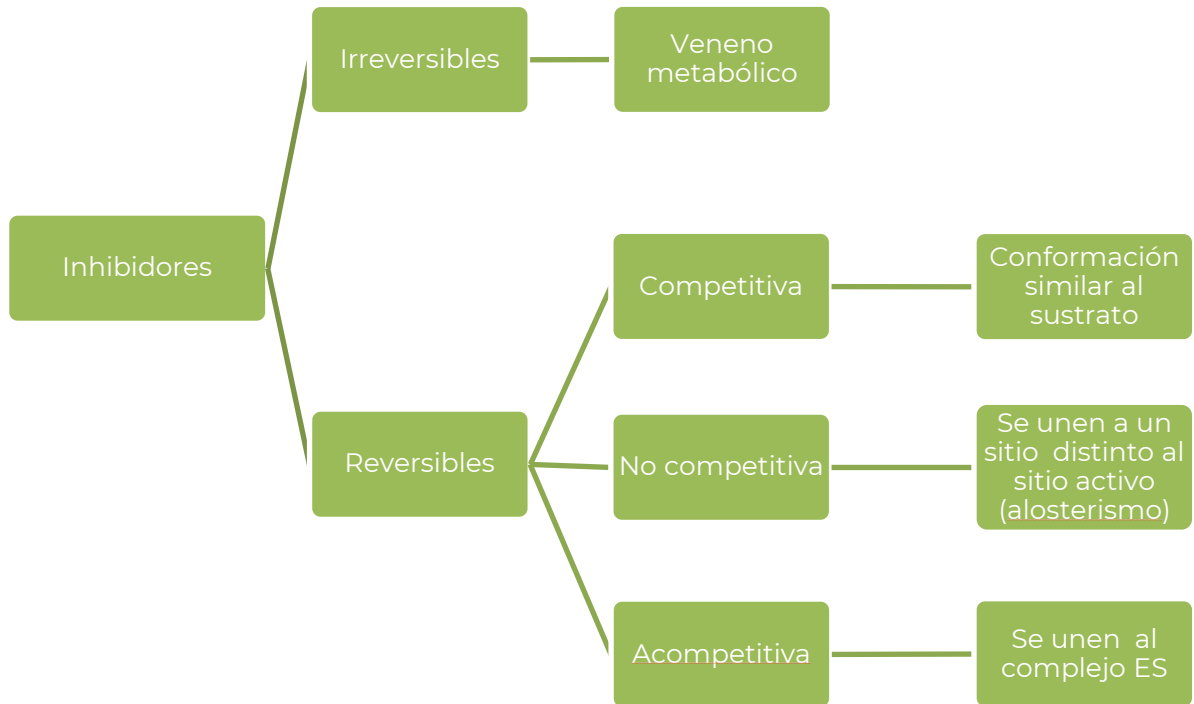


Figura 16. Clasificación de los inhibidores.

Podemos reconocer dos tipos de inhibición reversible de acuerdo a la unión del inhibidor con la enzima:

- **Inhibición competitiva:** el inhibidor (competitivo) presenta una forma similar al sustrato y se une al centro activo de la enzima impidiendo, por tanto, la unión del sustrato, por lo que la reacción no se lleva a cabo. A estos inhibidores se les llama análogos metabólicos (Algunos antibióticos, como la penicilina, actúan de esta manera).
- **Inhibición no competitiva:** el inhibidor no compete con el sustrato, sino que se une en otra zona de la enzima distinta del centro activo. Esta unión puede modificar la estructura de la enzima dificultando el acoplamiento del sustrato. En ocasiones, el inhibidor se une al



complejo enzima-sustrato; una vez creado, este se impide la posterior formación del producto.

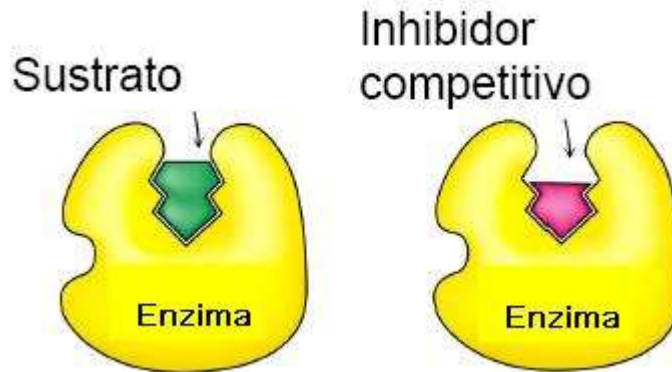


Figura 17. Inhibidor competitivo.

Tomado de:

http://www.uib.cat/facultat/ciencies/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4_14.htm

De acuerdo con UPCT (2008), un inhibidor competitivo (Figura 17) normalmente es similar a la enzima en tamaño y forma, por lo que compite con el sustrato para unirse al mismo centro activo. La velocidad de reacción se reduce porque baja la proporción de moléculas unidas al sustrato. Cuanto más inhibidor hay, se incrementa el complejo enzima-inhibidor y disminuye la formación de producto.

El nivel de inhibición real que causa un inhibidor competitivo depende de las concentraciones relativas de inhibidor $[I]$ y de sustrato $[S]$. Ambas sustancias compiten por la enzima, a bajas concentraciones de $[I]$, la inhibición puede vencerse añadiendo una gran cantidad de $[S]$ con lo que aumenta el complejo enzima-sustrato sobre el complejo enzima-inhibidor. Ya que es necesario añadir más sustrato para vencer la inhibición, k_m será mayor. Matemáticamente, la ecuación para una cinética Michaelis-Menten con **inhibición competitiva** es:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + k_m(1 + [I]/k_i)}$$

En la **inhibición no competitiva** (Figura 17), tanto el sustrato como el inhibidor, se enlazan a la enzima, pero en sitios activos diferentes. El



enlace de [I] ejerce un efecto sobre el centro activo probablemente afectando a la estructura de la enzima que ya no funciona tan eficientemente. En consecuencia, V_{\max} se altera y k_m permanece igual o no se modifica (UPCT, 2008).

La expresión matemática para el mecanismo Michaelis-Menten para este tipo de inhibición es:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{([S] + k_m)(1 + [I]/k_i)}$$

En la **inhibición acompetitiva** (Figura 18) el inhibidor se enlaza al centro activo, pero solo después de que el sustrato lo haya hecho, por tanto, el inhibidor y el sustrato no compiten. Cabe aclarar que este tipo de inhibición no es muy común.

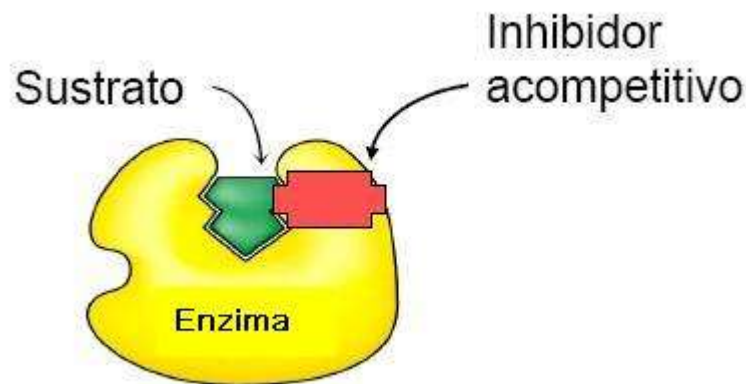


Figura 18. Inhibición acompetitiva. Tomado de:
http://www.uib.cat/facultat/ciencies/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4_14.htm

De esta manera, aunque todo el sustrato esté saturando la enzima y toda ésta se encuentre como complejo enzima-sustrato, el inhibidor puede enlazarse produciendo un **complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor**.

Como el inhibidor solo se une al complejo enzima-sustrato estimula la formación de dicho complejo, incrementando la unión del sustrato a la



enzima, disminuyendo k_m . Sin embargo, el complejo enzima-sustrato-inhibidor no conduce a productos y disminuye V_{max} (UPCT, 2008).

Conocer los diferentes tipos de inhibición permite una mayor producción y que puedan modificarse las velocidades de reacción para el consumo del sustrato, así como evitar la misma inhibición en caso de ser necesario.



1.3.6 Inmovilización de enzimas

Tras una inmovilización, la actividad de los biocatalizadores puede disminuir e incluso perderse por el impedimento del paso de sustrato al centro activo debido al bloqueo durante la unión al soporte. Los componentes principales de un sistema de inmovilización enzimático son la enzima, la matriz o soporte y el método de fijación. Como consecuencia de la inmovilización enzimática, algunas de sus propiedades como la actividad catalítica o la estabilidad térmica llegan a ser alteradas, sin embargo, puede conservar su funcionalidad durante varios ciclos.

Inmovilización de enzima

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998).

En este evento se combina la actividad elevada y específica de biomoléculas activas, como son las enzimas, con la estabilidad química y mecánica del soporte. Proporciona una base para lograr la aplicación repetida de la enzima y tiene eficacia funcional (aumento de estabilidad). No obstante, se pueden presentar algunos inconvenientes con la inmovilización como son:

- a) Alteración de la conformación de la enzima.
- b) Pérdida de actividad enzimática.
- c) Se presentan fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte.
- d) Los preparados inmovilizados en la industria son de alto costo.

Debemos considerar que no existe un método de inmovilización válido para todas las enzimas, por lo que el tipo de enzima, así como las características y aplicaciones deseadas se deben considerar para seleccionar el método más adecuado.



Existen **cinco** métodos principales para inmovilización de enzimas o células que pueden ser clasificados en aquellos dados por retención física o unión química: adsorción, unión covalente, entrecruzamiento, inclusión en membranas y atrapamiento (Tabla 5).

Métodos por unión química: unión covalente, adsorción iónica y reticulado (Figura 19).

Métodos por retención física: atrapamiento e inclusión en membranas (Figura 19).

Los métodos más comunes de inmovilización son la **adsorción**, **atrapamiento** y la **unión covalente** a un soporte. El procedimiento de inmovilización ideal para una enzima dada es aquel que le permite conservar una alta actividad catalítica con el paso del tiempo para ser utilizada continuamente. Dependiendo de la estructura de la proteína y del material, así como de las condiciones de la reacción será el método de inmovilización a utilizar.

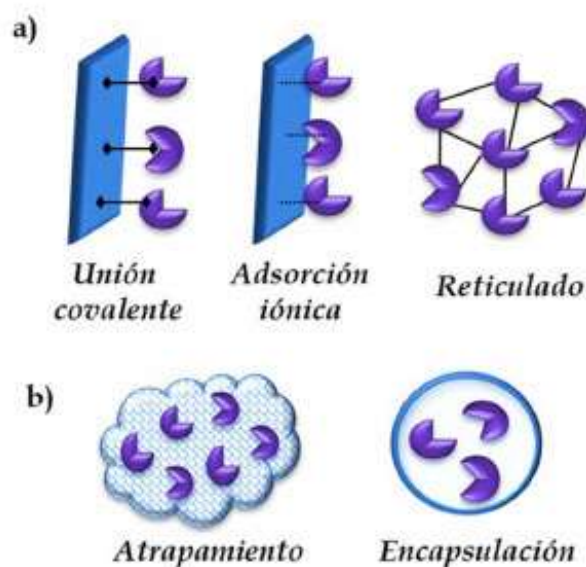


Figura 19. Métodos de inmovilización de enzimas: a) Unión química, b) Retención física. Tomado de:
http://www.uib.cat/facultat/ciencies/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4_14.htm



Tabla 5. Métodos de inmovilización (Arroyo, 1998)

Método	Descripción
Unión covalente	La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.
Adsorción iónica	En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno
Reticulado	Denominado entrecruzamiento o <i>cross-linking</i> , es una técnica ampliamente utilizada en la estabilización de enzimas. Este método consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.
Atrapamiento	Es la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.
Inclusión en membranas	<p>Microencapsulación: las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de sustratos y productos. Las microcápsulas tienen diámetros de 1 a 100 μm permitiendo encapsular enzimas, otro tipo de biomoléculas y células.</p> <p>Reactores de membrana: se emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato y no permeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa al reactor. La enzima se adsorbe previamente sobre la membrana.</p>



En este tema se han revisado los elementos más importantes sobre la inmovilización enzimática, los diferentes tipos que podemos aplicar y como su aplicación puede abarcar diferentes campos como:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores.
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas.
3. Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.

1.4 Modelos matemáticos para el diseño de biorreactores

Los modelos matemáticos aplicados en los procesos que se llevan a cabo en el interior de un biorreactor (por ejemplo, en el crecimiento microbiano) permiten una representación cuantitativa, precisa y absolutamente libre de interpretaciones subjetivas de la realidad. Su utilización se ha vuelto muy importante ya que estos permiten predecir la evolución y dinámica de los sistemas frente a perturbaciones o condiciones ambientales cambiantes; en otras palabras, mediante su utilización podemos realizar con ellos experimentos que de otra manera no serían posibles.

En este sentido, el análisis matemático y los modelos de simulación ayudan a entender el comportamiento cuantitativo del sistema biológico y a predecir el desarrollo general del biorreactor. Adicionalmente, estos pueden ayudar en la puesta en marcha y finalización de la operación del reactor, a describir la dinámica y las características de control del mismo o estimar los tiempos requeridos para alcanzar nuevos estados estables cuando se presenta una perturbación (Hassam y *et al.*, 1995).



Modelo

Se puede definir como una aproximación física o abstracta que pretende representar un fenómeno que ocurre en la naturaleza, i.e. un modelo matemático es la aproximación de un fenómeno determinado, escrito en un lenguaje matemático (Gutiérrez, 1995).

La concepción de un modelo matemático se inicia con un conjunto de observaciones experimentales. Las observaciones experimentales se centran en la búsqueda de correlaciones de causa y efecto entre un conjunto de variables relevantes, por ejemplo: aquellas variables que definen el estado del sistema o variables de estado. El conjunto de variables de estado debe definirse en el momento en que se define el dominio espacial o sistema en el que se desarrolla el fenómeno que se estudia.

Los **modelos matemáticos** están constituidos por un conjunto de ecuaciones, cada una definida para cada variable de estado. Las ecuaciones se obtienen a partir de:

- a) Balances de materia y energía.
- b) Relaciones cinéticas.
- c) Relaciones fenomenológicas.
- d) Resultados empíricos restringidos a ciertas condiciones.

Las **ecuaciones** resultantes siempre contienen constantes o parámetros que dependen de las condiciones globales bajo las que se desarrolla la experimentación. Las ecuaciones resultantes pueden expresar a las variables de estado de manera explícita o implícita y, dependiendo de esto, se resuelven directa o indirectamente.

La solución de un modelo se obtiene, dependiendo de la complejidad del mismo, utilizando técnicas analíticas o numéricas. Los **métodos analíticos** conducen a soluciones exactas, mientras que los **métodos numéricos** conducen a soluciones aproximadas.

Independientemente del método utilizado, la solución de un modelo matemático refleja siempre los cambios de una variable de estado con



respecto a una o más variables independientes, de aquí que la utilización de modelos matemáticos constituye una herramienta útil de trabajo ya que:

1. Facilitan el estudio de uno o varios fenómenos, por separado o en su conjunto.
2. Complementan los conocimientos de un fenómeno situándolo en un contexto más general.
3. Permiten predecir resultados bajo condiciones de operación diferentes a las experimentadas.
4. Permiten establecer estrategias globales para el control y el escalamiento.

Un ejemplo son los **modelos de crecimiento**, durante mucho tiempo se han propuesto diferentes modelos para la tasa de crecimiento, el más antiguo es el de Verhulst que data de 1938 y expresa la velocidad de crecimiento como una función de la concentración de la biomasa:

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{x^1}{M} \right)$$

Donde μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento y M es una constante.

La utilización de modelos matemáticos adquirirá mayor importancia conforme avancemos en las próximas unidades de la asignatura, ya que es una herramienta importante para el diseño de los biorreactores y de los bioprocesos que se llevan en los mismos.

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu Docente en línea, mismo que te indicará, a través del **Organizador Didáctico de Aprendizaje** (ODA), la dinámica que tú y tus compañeros llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.



Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes de consultar el foro *Preguntas de Autorreflexión* para realizar la actividad correspondiente y enviarlo a la herramienta de *Autorreflexiones*. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10 % de tu evaluación.

Cierre de unidad

En esta unidad estudiaste los elementos teóricos más importantes que te han introducido a la ingeniería de biorreactores, así como el concepto de biorreactor del cual reconociste sus características principales, sus componentes, así como sus diferentes clasificaciones y los diferentes microorganismos que son el elemento esencial para las transformaciones que se llevan a cabo en los biorreactores. También reconociste la importancia de las enzimas, su función y su importancia en los procesos microbiológicos, además analizaste los factores que presentan mayor influencia sobre la actividad enzimática, así como una breve introducción a los modelos matemáticos que serán parte importante de las siguientes unidades de esta asignatura.



Para saber más



Rodríguez Arévalo, A.C., Cabrera Llanos, A.I., Valencia Flores, J.I. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 24(1): 55 – 70. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/inge/ib-2003/ib031h.pdf>



Biorreactores en Biotecnología y Fermentaciones. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=0ZcheItkj30&nohtml5=False>



Enzimas: Estructura, Características y Funciones.
Disponible en:

<https://www.youtube.com/watch?v=6MbfBLbhmfs&nohtml5=False>



Enzimas: Clasificación. Disponible en:

<https://www.youtube.com/watch?v=6vEQ3o2b1wU&nohtml5=False>



Las enzimas. Disponible en:

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/enzimas.html>



Fuentes de consulta



- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39 (2), 23-98.
- Bertoluzzo, M. G., Bertoluzzo, S. M. R., Rigatuso, R. (2008). Estudio cinético de la actividad proteolítica de la enzima Ficina. *Anales AFA*. 20, 243-245.
- Cardellá-Rosales, L. (2007). *Bioquímica humana*. Cuba: Editorial Ciencias Médicas. Recuperado de: <https://bioquimicaudo.files.wordpress.com/2011/11/bioquimica.pdf>
- CSIC. (2016). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Delegación de Cataluña. Recuperado de: <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
- Colegio Marista de Granada. 2016. Enzimas.
- Escuela Politécnica del Ejército. (2012). Biotransformación. Ecuador. Procesos Bio. Wikispaces.
- Fersht, A. (1980). *Estructura y mecanismos de los enzimas*. Barcelona: Editorial Reverté. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=JjtISAiZG4YC&pg=PA246&lpg=PA246&dq=teor%C3%ADa+de+la+cat%C3%A1lisis+enzim%C3%A1tica&source=bl&ots=dfpk2UpSiS&sig=9jPWlUUbX1IRy6WYYyQ1JFXptvU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjf0va_ylnMAhVmn4MKHXYmD-g4ChDoAQgpMAM#v=onepage&q=teor%C3%ADa%20de%20la%20cat%C3%A1lisis%20enzim%C3%A1tica&f=false
- Franco, V. L. (2007). Enzimas: qué son y para qué sirven. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica*. 101 (2), 399-417.
- Gálvez, A.G., Fores, I.A., Farrés, A.G.S. (2006). Proteínas. En: Bardui, D.S. *Química de los alimentos*. 4ª. Ed. Pearson Educación. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf



- Galindo, E., Peña, C., Serrano-Carreón, L. (2008). Domesticar microorganismos en un biorreactor: Los retos del bioingeniero. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México. pp. 131-144. Disponible en: <https://bit.ly/3vwqkoY>
- Gil Garzón, M.A., Rojano B.A., Guerrero C.A. (2012). Inhibición de la polifenoloxidasas extraída del banano (cavendish) por medio de algunos derivados del isoespintanol. Corporación Universitaria Lasallista. Recuperado de: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/148/1/11.%20193-248.pdf>
- Gutiérrez, R.M. (1995). Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis Doctoral. UAM-Iztapalapa.
- Izquierdo, J.F., Cunill, F., Tejero, J., Iborra, M., Fité, C. 2004. Tema 6.2 Cinética enzimática. En: Cinética de las reacciones químicas. Ediciones Universitat de Barcelona. España. Recuperado de: https://books.google.com.mx/books?id=IdJ03bLyxH4C&pg=PA269&lpg=PA269&dq=teoria+de+cat%C3%A1lisis+enzim%C3%A1tica&source=bl&ots=TAZoWiSzqA&sig=21d6jP8dVMGC8svPFMUUYWkk9k&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiil_m7jcHKAhVkv4MKHSmBB_84ChDoAQgpMAM#v=onepage&q=teoria%20de%20cat%C3%A1lisis%20enzim%C3%A1tica&f=false
- Koolman y Rohm. (2004). Enzimas: fundamentos. Bioquímica. En: Texto y Atlas. 3era. Edición. Editorial: Panamericana. 88-97.
- Lázar, A. (2013). Tecnología de los bioprocesos-Diseño de biorreactores y fermentadores. FARMAESPAÑA INDUSTRIAL, noviembre-diciembre, 1-7. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/35961459/tecnologia-de-los-bioprocesos-diseno-de-fermentadores-y-biorreactores>
- Levenspiel, O. (2004). Capítulo 4: Introducción al diseño de biorreactores. En: "Ingeniería de las Reacciones Químicas", 3ª ed., J. Wiley. pp.83-90. Recuperado de: <https://reaccionesunefm.files.wordpress.com/2009/02/levenspiel-o-parte-i.pdf>
- Maldonado, C. E. *et al.* (2004). Análisis informático de cinética enzimática por medio de macros de Ms Excel. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2 (2), 15-20.
- Martínez, J.J.G. (2016). Libro electrónico de Bioquímica. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Recuperado de: <http://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-6-enzimas/inhibidores-enzimaticos.html>



- OSMAN. (2015). Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía. Disponible en <http://www.osman.es/>
- Quirasco B.M., López-Munguía Canales, A. (2006). Enzimas En: Badui, S. Química de los alimentos 4ª. Ed. México. PP. 301-363. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf
- Rangel, J.H., Pradilla, M.A., Burgos, C.V. (2001). Biorreactores: Modelos Matemáticos y su simulación sobre una hoja electrónica. Revista Ingeniería e Investigación 48: 20-23. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/ingeinv/article/view/21353/22312>
- Ruíz-Leza, H.A., R.M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera, J.C. Contreras-Esquivel & C.N. Aguilar. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 6(1): 33-40. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>
- Saura, L.G. 2003. 1er Seminario Nacional de Biotecnología Industrial. El Salvador. FIAGRO, Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria. 57 p.
- Quiminet. (2016). Tipos de conservadores para alimentos. Recuperado de: <http://www.quiminet.com/articulos/tipos-de-conservadores-para-alimentos-10412.htm>
- Tejero, F. (2008). Las enzimas en los nuevos procesos de panificación. La Técnica. Molinería y Panadería. 1, 16-23.
- Tena, M.A., Jorrín J.V.N. (2016). Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Universidad de Cordoba. Recuperado de: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CIN%C3%89TICA.pdf>
- Túnez, F.I., Galván, A.C., Fernández, E.R. (2016). pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. Universidad de Cordoba. Recuperado de: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf>
- Universidad de Huelva. (2012). Enzimas II. 1-12.
- Universidad de Huelva. (2015). Enzimas. Recuperado de <http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/tema11.htm>
- UPNA (2016). Introducción, morfología y estructura de los microorganismos.
- Voet, J.G. & C.W. Voet. (2009). Fundamentos de Bioquímica. Buenos Aires. Editorial: Médica Panamericana.
- Gallego, M.R. 2004. Aplicación de las herramientas informáticas en el tratamiento de la información científica. Revista Lasallista de Investigación, 2(1): 92-96. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69520115.pdf>



UNAD (2016). Lección 2. Clasificación de los procesos catalíticos.

UPCT. (2008). Anexo II. Modelo de Michaelis-Menten. Pág. 56-58. Recuperado de:

<http://repositorio.bib.upct.es/dspace/bitstream/10317/282/5/ANEXO%20II.%20MODELO%20DE%20MICHAELIS-%20MENTEN.pdf>