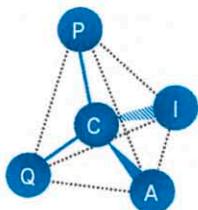








UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



## Grupo de Química de Carbohidratos, Polímeros y Aditivos Industriales

D. PEDRO ANTONIO GARCÍA RUIZ, Profesor Titular de Universidad del Área de Química Orgánica en el Departamento de Química Orgánica, de la Universidad de Murcia y D. FRANCISCO ROJAS MELGAREJO, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Enseñanza Secundaria del Área de Física y Química y colaborador habitual del grupo de investigación E047-01 de la Universidad de Murcia, AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INMOVILIZACIÓN DE TIROSINASA SOBRE ÉSTERES CINÁMICOS DE CARBOHIDRATOS FOTOENTRECruzADOS. CARACTERIZACIÓN, OPTIMIZACIÓN Y APLICACIÓN A LA OBTENCIÓN DE O-DIFENOLES", realizada por D<sup>a</sup> MARÍA ELISA MARÍN ZAMORA, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Orgánica, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de noviembre de 2012.



Fdo. D. PEDRO ANTONIO GARCÍA RUIZ

Fdo. D. FRANCISCO ROJAS MELGAREJO



Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han sido partícipes en el desarrollo de la presente Memoria:

A los **Drs. Pedro Antonio García Ruíz y Francisco Rojas Melgarejo**, Directores de esta Tesis Doctoral, por sus enseñanzas y consejos, y en especial por todo el apoyo que me han prestado dentro y fuera del laboratorio.

Al **Dr. Francisco García Cánovas** del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, de la Universidad de Murcia, por su colaboración a lo largo de todo este proyecto y la gran amabilidad que siempre me ha mostrado.

Al **Dr. Hans Heuts** por sus sabios consejos, el apoyo brindado y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: **Ana, Encarni, M<sup>a</sup> José, Jesús, Teresa, Ángel, Fernando, Patricia, David, Enrique y Ricardo**, por haber estado ahí siempre que los necesité y haberme alegrado el día a día.

A mis amigas de toda la vida: **Ana, Rosa y Lidia**, por todos los buenos momentos (y algunos no tan buenos) compartidos desde la infancia y por todos aquellos que nos quedan por vivir juntas en el futuro.

A mis amigas de la universidad, ¡ya amigas de casi media vida!: **Charo, María, M<sup>a</sup> José, María, Magalí y Manoli**, por todas las aventuras vividas desde nuestra época de estudiantes hasta el momento actual, por vuestro cariño y apoyo incondicional.

Al resto de amigos: **Nieves, Luz, Juana, Alex, Juampa, Pedro, José, Sergio, Vicente, Antonio, Isidro y algunos más**, con los que también he podido contar y compartir agradables momentos a lo largo de los años.

A mis abuelos, tíos y primos, tanto los que están como los que ya se han marchado: **Francisco, María, Francisco, María, Julia, Melchor, Clementa, Elisa, Rosa, Domingo, Rosa María y Rubén**, porque la familia nunca me ha fallado y todos ellos me han demostrado en innumerables ocasiones su amor y cariño por mí.



***A mi padre, por haberme animado siempre a conseguir mis metas y en especial en este proyecto, así como tantas cosas más imposibles de enumerar.***

***A mi marido, por haber sido mi cómplice durante los últimos once años de mi vida, por su alegría y optimismo que tanto me ayudan.***

***A mi madre y hermana, por apoyarme y quererme siempre, incluso cuando más complicada puedo llegar a ser.***



# Contenido





# CONTENIDO

<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>105</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>121</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>209</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>215</b>



# Publicaciones





Las publicaciones que conforman el cuerpo de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

### Artículos de investigación

- 1. Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2005) Cinnamic ester of D-sorbitol for immobilization of mushroom tyrosinase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 1356-1364, F.I. (Factor de Impacto): 0.981, C (Categoría): Engineering, Chemical, P (Posición): 43 de 116 (Tercio II).
- 2. Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2006) Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* **126**, 295-303, F.I.: 2.6, C: Biotechnology and Applied Microbiology, P: 39 de 140 (Tercio I).
- 3. Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2007) Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates. *J. Biotechnol.* **131**, 388-396, F.I.: 2.565, C: Biotechnology and Applied Microbiology, P: 48 de 138 (Tercio II).
- 4. Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2007) Stereospecificity of mushroom tyrosinase immobilized on a chiral and a nonchiral support. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4569-4575, F.I.: 2.532, C: Agriculture, Multidisciplinary, P: 1 de 35 (Tercio I).
- 5. Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2009) Production of *o*-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *J. Biotechnol.* **139**, 163-168, F.I.: 2.881, C: Biotechnology and Applied Microbiology, P: 48 de 152 (Tercio I).

### Patente

Inventores: García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y **Marín-Zamora, M.E.**

Título: Procedimiento de obtención de *o*-difenoles.

Titular: Universidad de Murcia

Patente Española: ES2301453B1.

Fecha de publicación: 16/02/2009

Otras publicaciones relacionadas con esta Tesis son el artículo de investigación y comunicaciones a congresos siguientes:

Artículo de investigación

Vallejo-Becerra, V., **Marín-Zamora, M E.**, Vázquez-Bahena, J.M., Rojas-Melgarejo, F., Hidalgo-Lara, M.E. y García-Ruiz, P.A. (2008) Immobilization of recombinant invertase (re-INVB) from *Zymomonas mobilis* on D-sorbitol cinnamic ester for production of invert sugar. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1392-1397.

Comunicaciones a congresos

**Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2006) *Modulación de la selectividad de tirosinasa por un tipo de sustrato mediante la elección del soporte de inmovilización adecuado*. Congreso XXIX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 7-10 Septiembre 2006. Elche (España).

**Marín-Zamora, M.E.**, Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. *Nuevo método de producción enzimática de 4-tertbutilcatecol de altos rendimientos*. Congreso XXX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 12-15 Septiembre 2007. Málaga (España).

***La autora de esta Memoria ha disfrutado de las siguientes ayudas:***

- *Beca de Formación de Profesorado y Personal Investigador de la Universidad de Murcia. Periodo 2004–2007.*
- *Beca Predoctoral de La Fundación Cajamurcia. Periodo: 2007–2008.*

# Índice





# ÍNDICE

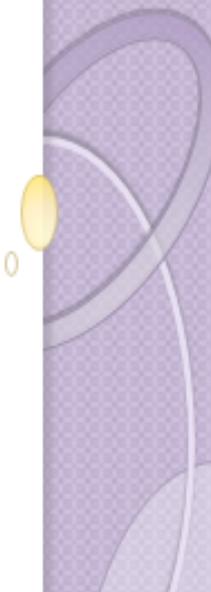
	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. Aspectos generales.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2. Métodos de inmovilización.....</b>	<b>7</b>
1.1.2.1. Soportes de inmovilización.....	7
1.1.2.2. Inmovilización por formación de enlaces covalentes.....	9
1.1.2.3. Inmovilización por adsorción.....	20
1.1.2.4. Inmovilización por atrapamiento.....	25
1.1.2.5. Comparación entre los métodos de inmovilización.....	28
<b>1.1.3. Propiedades de las enzimas inmovilizadas.....</b>	<b>29</b>
1.1.3.1. Actividad catalítica.....	29
1.1.3.2. Especificidad por el sustrato.....	29
1.1.3.3. Constantes cinéticas.....	30
1.1.3.4. Temperatura y pH óptimos.....	31
1.1.3.5. Estabilidad.....	32
<b>1.1.4. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.....</b>	<b>35</b>
1.1.4.1. Aplicaciones analíticas.....	35
1.1.4.2. Aplicaciones médicas.....	37
1.1.4.3. Aplicaciones industriales.....	37
1.1.4.4. Aplicaciones medioambientales.....	38
<b>1.2. POLÍMEROS FOTOENTRECRUZADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>1.2.1. Reacción de fotopolimerización.....</b>	<b>40</b>
1.2.1.1. Tipos de fotoentrecruzamiento.....	41
1.2.1.2. Ventajas sobre otros métodos de polimerización.....	43
<b>1.2.2. Ciclodimerización de dobles enlaces.....</b>	<b>44</b>
1.2.2.1. Historia.....	44
1.2.2.2. Fotopolimerización de cuatro centros.....	45
1.2.2.3. Grupos fotodimerizables.....	46
1.2.2.4. Fotoentrecruzamiento por excitación de cromóforos.....	48
1.2.2.5. Polímeros por entrecruzamiento derivados de esteres cinámicos.....	50
<b>1.2.3. Aplicaciones generales.....</b>	<b>51</b>
<b>1.2.4. Ésteres cinámicos de carbohidratos.....</b>	<b>52</b>
1.2.4.1. Obtención y caracterización.....	53
1.2.4.2. Fotoentrecruzamiento.....	56
1.2.4.3. Ventajas en la inmovilización.....	57

<b>1.3. TIROSINASA</b> .....	58
<b>1.3.1. Características generales</b> .....	58
1.3.1.1. Funciones fisiológicas.....	59
1.3.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas.....	60
<b>1.3.2. Estructura</b> .....	65
1.3.2.1. Propiedades moleculares.....	65
1.3.2.2. Estructura tridimensional.....	68
1.3.2.3. Sitio activo.....	72
<b>1.3.3. Actividad catalítica</b> .....	77
1.3.3.1. Mecanismo de reacción.....	78
1.3.3.2. Actividad difenolasa.....	81
1.3.3.3. Actividad monofenolasa.....	85
1.3.3.4. Estereoespecificidad.....	87
<b>1.3.4. Regulación enzimática</b> .....	88
1.3.4.1. Inactivación suicida.....	88
1.3.4.2. Inhibidores.....	89
1.3.4.3. Aplicaciones.....	92
<b>1.3.5. Tirosinasa inmovilizada</b> .....	93
1.3.5.1. Obtención de <i>o</i> -difenoles.....	96
1.3.5.2. Biosensores enzimáticos.....	99
1.3.5.3. Descontaminación de aguas.....	100
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	101
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	103
<b>2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	103
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	105
<b>3.1. REACTIVOS</b> .....	107
<b>3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS</b> .....	107
<b>3.2.1. Espectrofotometría UV-Visible</b> .....	107
<b>3.2.2. Espectroscopía de infrarrojo</b> .....	107
<b>3.2.3. Resonancia magnética nuclear</b> .....	108
<b>3.2.4. Análisis térmico</b> .....	108
<b>3.2.5. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas</b> .....	108
<b>3.2.6. Cromatografía de líquidos de alta resolución</b> .....	108
<b>3.3. MÉTODOS</b> .....	109
<b>3.3.1. Obtención de los prepolímeros fotorreactivos</b> .....	109
<b>3.3.2. Obtención de los soportes de inmovilización</b> .....	111
<b>3.3.3. Determinación de la cantidad de soporte depositado en las bolas de vidrio</b> .....	111
<b>3.3.4. Extracción de tirosinasa</b> .....	111

3.3.5. Inmovilización de tirosinasa.....	112
3.3.6. Determinación de la cantidad de tirosinasa inmovilizada.....	112
3.3.7. Ensayos de actividad enzimática.....	113
3.3.8. Estudio de los parámetros que afectan a la inmovilización.....	114
3.3.9. Ensayos de estabilidad.....	115
3.3.10. Estudio de las constantes cinéticas.....	115
3.3.11. Producción enzimática de o-difenoles.....	116
3.3.12. Determinación de los o-difenoles producidos.....	117
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>121</b>
4.1. ESTER CINÁMICO DE D-SORBITOL PARA LA INMOVILIZACIÓN DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN.....	125
4.2. INMOVILIZACIÓN DIRECTA DE ENZIMA TIROSINASA A PARTIR DE CHAMPIÑONES NATURALES ( <i>Agaricus bisporus</i> ) SOBRE ESTER CINÁMICO DE D-SORBITOL.....	137
4.3. EFECTOS DE LOS SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA: UN ESTUDIO COMPARATIVO EMPLEANDO VARIOS SUSTRATOS.....	149
4.4. ESTEREOESPECIFICIDAD DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA EN UN SOPORTE QUIRAL Y EN OTRO NO QUIRAL.....	161
4.5. PRODUCCIÓN DE O-DIFENOLES MEDIANTE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA.....	171
4.6. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE O-DIFENOLES.....	191
4.7. RESUMEN DE RESULTADOS.....	207
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>209</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>215</b>



# Introducción





# 1. INTRODUCCIÓN

El trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral ha sido íntegramente desarrollado por su autora y como resultado se han publicado cinco artículos y una patente, pertenecientes todos ellos a una misma unidad temática tal y como queda reflejado a continuación.

En el **Artículo 1** (Apartado 4.1, de la presente Memoria) se presentan los resultados obtenidos en el estudio de un nuevo método de inmovilización de tirosinasa comercial sobre cinamato de D-sorbitol fotoentrecruzado. Posteriormente, se procedió a la optimización de este nuevo método de inmovilización de tirosinasa sustituyendo la enzima comercial, de elevado precio, por tirosinasa obtenida directamente a partir de un extracto de champiñón, de modo que se obtuvieron inmovilizados de tirosinasa más económicos y con mejores propiedades de estabilidad y actividad enzimática que los primeros, resultados que se recogen en el **Artículo 2** (Apartado 4.2.).

A continuación, se procedió a estudiar las variaciones en la inmovilización y el comportamiento cinético de esta enzima al ser empleados una gran variedad de ésteres cinámicos de carbohidratos como soportes de inmovilización, así como el comportamiento de la enzima inmovilizada frente a diferentes sustratos y su estereoespecificidad, fruto de este estudio resultaron los **Artículos 3 y 4** (Apartados 4.3 y 4.4).

Una vez puesto a punto un método óptimo de inmovilización de tirosinasa sobre estos soportes orgánicos de síntesis propia y llevada a cabo la caracterización de la enzima inmovilizada, se procedió a aplicar los conocimientos adquiridos a la producción de una serie de o-difenoles, a partir de sus correspondientes monofenoles, estudio que se recoge en el **Artículo 5** y en la **Patente** (Apartados 4.5 y 4.6, de la presente Memoria).

## **1.1. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS**

### **1.1.1. Aspectos generales**

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos, generalmente en condiciones muy suaves y con una muy alta especificidad. Estos catalizadores proteicos han sido empleados por los seres humanos desde tiempos ancestrales, mucho antes de que su naturaleza y mecanismos de acción fueran entendidos. Actualmente, gracias a los grandes avances producidos en los últimos cincuenta años en el área de la bioquímica, se han clarificado muchos de los mecanismos de catálisis de estas enzimas y se ha logrado su obtención a partir de nuevas fuentes. Todo esto ha provocado que la utilización de enzimas se haya ido extendiendo a una gran variedad de campos diferentes, de gran importancia en nuestras vidas, como la medicina, mejora del medio ambiente o producción de alimentos (Roig et al., 1987; Arroyo, 1998).

A pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, las enzimas poseen una serie de desventajas respecto a su aplicación industrial (Guisan, 2006). Dichas enzimas son generalmente inestables en medios orgánicos o en condiciones no suaves como elevada temperatura y presión o valores de pH extremos. En ocasiones pueden ser inhibidas por altas concentraciones de sustratos o productos o mostrar una baja actividad y selectividad hacia sustratos que no son naturales. Además, cuando la reacción finaliza resulta difícil recuperar la enzima activa del medio de reacción, lo que impide su reutilización suponiendo un problema económico y también medioambiental, debido a la presencia en los efluentes industriales de enzima residual. Para eliminar estas desventajas y disponer de catalizadores con una elevada actividad, estabilidad y una apropiada especificidad, se han investigado varias opciones. Por un lado, se ha llevado a cabo la síntesis química de catalizadores artificiales o “enzimas sintéticas” y la obtención mediante mutagénesis dirigida de enzimas con una secuencia alterada a voluntad (Illanes et al., 2012). Sin embargo, la técnica más ampliamente desarrollada ha sido la inmovilización de enzimas ya existentes en la naturaleza (Tischer y Wedekind, 1999; Mateo et al., 2007; García-Galán et al., 2011).

Según la IUPAC la inmovilización es una “técnica utilizada para conseguir la fijación física o química de células, orgánulos, enzimas u otras proteínas en un soporte sólido, una matriz sólida o mediante retención en una membrana, con el fin de aumentar su estabilidad y hacer posible su uso repetido o continuado”.

Concretamente las enzimas inmovilizadas pueden ser definidas como “enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio con retención de su actividad catalítica y que pueden ser usadas repetidamente y de modo continuo” (Chibata, 1978). Por consiguiente, aquellas enzimas que tras ser modificadas dan lugar a una forma insoluble en agua satisfacen esta definición. En otros casos, se puede realizar una reacción enzimática usando un sustrato de alto peso molecular en un reactor equipado con una membrana de ultrafiltración semipermeable, y el producto de reacción formado de bajo peso molecular puede eliminarse continuamente a través de la membrana sin fuga de la enzima del reactor; también puede considerarse como un tipo de enzima inmovilizada. El término “enzima inmovilizada” fue recomendado en la primera Conferencia de Ingeniería Enzimática en 1971, puesto que con anterioridad a esta fecha otros muchos términos habían sido empleados.

Resulta interesante tener presente cómo ocurrió históricamente el desarrollo de la inmovilización de enzimas. Ya desde principios del siglo pasado se puso de manifiesto que enzimas insolubilizadas por diferentes métodos, mantenían su actividad enzimática (Nelson y Griffin, 1916; Sumner, 1948). Sin embargo, los primeros intentos de inmovilizar una enzima con el fin de mejorar sus propiedades para una determinada aplicación no se realizaron hasta la segunda mitad del siglo pasado, con la inmovilización de carboxipeptidasa, diastasa, pepsina y ribonucleasa (Grubhofer y Schleith, 1953). En la década de los años sesenta se publicaron numerosos artículos (Tosa et al., 1966; Axen et al., 1967; Brown et al., 1968), entre los que cabe destacar los trabajos del Profesor Katzir-Katchalski y colaboradores (Goldstein et al., 1964, Levin et al., 1964; Riesel et al., 1964; Katchalski et al. 1965), del Instituto de Ciencia de Weizmann (en Israel), sobre nuevas técnicas de inmovilización y las propiedades físicas, químicas y enzimáticas de diversas enzimas inmovilizadas. El objetivo de estos estudios era utilizar las enzimas inmovilizadas para la producción industrial en continuo. Así, en 1969 se consiguió la industrialización de un proceso continuo para la resolución óptica de DL-aminoácidos usando aminoacilasa inmovilizada (Tosa et al., 1969), siendo esta la primera aplicación industrial de enzimas inmovilizadas. Al final de la década de los sesenta el número de trabajos realizados sobre enzimas inmovilizadas tanto en Estados Unidos como en Europa aumentó de manera exponencial. Desde entonces, los estudios de enzimas inmovilizadas se han desarrollado a un paso rápido y en la actualidad, otros países como Japón y China también se encuentran en la vanguardia de los campos de investigación descritos anteriormente.

Centrándonos en el punto de vista industrial, el principal objetivo de la inmovilización de enzimas es su reutilización durante ciclos consecutivos, disminuyendo así los costes de producción (Arroyo, 1998; Brady y Jordaan, 2009). Los protocolos de inmovilización de enzimas deben ser procesos sencillos y producir una mejora de las propiedades enzimáticas (Guisan, 2006). Estos requisitos han motivado y siguen motivando el trabajo de muchos investigadores para desarrollar nuevos métodos de inmovilización de enzimas, ya que aunque se conocen muchos de ellos, muy pocos son sencillos, baratos y/o realmente capaces de mejorar las propiedades enzimáticas. Todo esto hace que el estudio y desarrollo de nuevas estrategias de inmovilización, con el fin de obtener el mayor rendimiento posible de las enzimas en las condiciones necesarias para su aplicación industrial, siga siendo un amplio campo de investigación en la actualidad (Loncar y Vujcic, 2011).

Otra ventaja derivada del estudio de enzimas inmovilizadas, al margen de la aplicación industrial, es la posibilidad de obtener información relevante que pueda ayudar a clarificar la relación entre la estructura de las proteínas y la actividad enzimática mostrada o a conocer mejor ciertos aspectos sobre los mecanismos de actuación de dichas enzimas. Además, teniendo en cuenta que muchas proteínas se encuentran inmovilizadas en su entorno natural (Brena y Batista-Viera, 2006), enlazadas a membranas celulares o partículas celulares en los organismos de procedencia, las enzimas inmovilizadas son buenos modelos para el entendimiento del comportamiento de las enzimas en su entorno natural (Rojas-Melgarejo, 2002). La inmovilización de enzimas ha sido utilizada también con gran éxito en el desarrollo de biosensores con aplicaciones analíticas (Ngo, 1980; Kuswandi et al., 2001) y también de técnicas de cromatografía de afinidad, que permiten el aislamiento específico de un determinado sustrato (Serrat et al., 1992; Girelli y Mattei, 2005).

### 1.1.2. Métodos de inmovilización

Los numerosos métodos empleados para llevar a cabo la inmovilización de enzimas se han clasificado atendiendo a diversos criterios, como por ejemplo, la naturaleza física o química de la inmovilización (Arroyo, 1998) o su carácter reversible o irreversible (Brena y batista-Viera, 2006). Algunos grupos funcionales de la enzima pueden dar lugar a fuertes enlaces covalentes que la unan a un soporte o a otras moléculas de enzima, empleándose usualmente para ello moléculas espaciadoras. La inmovilización también puede ocurrir por adsorción de la enzima a un soporte, que puede deberse a interacciones de distinta naturaleza pero más débiles que el enlace covalente. Las enzimas también pueden ser inmovilizadas por atrapamiento, donde la enzima no da lugar a ningún tipo de enlace sino que está retenida físicamente. Todos estos métodos de inmovilización se describen detalladamente a continuación, tras realizar un repaso previo de los distintos tipos de soportes de inmovilización y sus características.

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS		
<b>ENLACE COVALENTE</b>	Enlace a un soporte	Enzima fuertemente enlazada.
	Entrecruzamiento	
<b>ADSORCIÓN</b>	Fuerzas de Van der Waals Interacciones hidrofóbicas	Interacciones más débiles que el enlace covalente. Unión por afinidad
	Puentes de hidrógeno	
	Interacciones iónicas	
	Coordinación – Enlace a un metal presente en el soporte	
<b>ATRAPAMIENTO</b>	En gel o fibras.	Enzima no enlazada.
	Microcápsulas.	

**Tabla 1.1.** Clasificación de los distintos métodos de inmovilización de enzimas.

#### 1.1.2.1. Soportes de inmovilización:

La inmovilización de enzimas mediante su enlace a soportes insolubles en agua es el método de inmovilización más antiguo empleado y también el más estudiado. Esta unión de la enzima al soporte de inmovilización puede tener lugar mediante adsorción al mismo o bien mediante enlace covalente.

La naturaleza de los soportes de inmovilización y el tipo de unión de la enzima con éstos afecta de modo determinante al comportamiento de la enzima inmovilizada. Algunas de las características ideales de las que debería constar un buen soporte de inmovilización son: una buena estabilidad mecánica, un adecuado tamaño de partícula y porosidad, buena resistencia tanto a la presión como al pH, disolventes o ataques bacterianos y también buena disponibilidad y bajo coste (Brena y Batista-Viera, 2006). Las características físicas del soporte de inmovilización (diámetro de partícula si se trata de esferas, resistencia mecánica y a la compresión), también condicionan el tipo de reactor a emplear (tanque agitado, lecho empaquetado, tanque continuo o discontinuo). Además parámetros como el grado de porosidad y el tamaño de poro determinan el área total de la superficie del soporte disponible para la unión de la enzima. De modo que los soportes no porosos tienen la ventaja de no presentar problemas difusionales pero su capacidad de carga para la enzima es menor, es decir el área de la superficie disponible es menor y por tanto la cantidad de enzima inmovilizada también. Por otro lado, los soportes porosos permiten la inmovilización de una mayor cantidad de enzima, quedando ésta protegida de su entorno, pero como efecto no deseado pueden presentar graves problemas difusionales.

Los soportes de inmovilización se pueden clasificar en dos grupos: soportes orgánicos y soportes inorgánicos (Brena y Batista-Viera, 2006). Aunque los soportes de inmovilización inorgánicos presentan una alta estabilidad mecánica, química y frente a los ataques bacterianos, la mayoría de los soportes de inmovilización empleados en aplicaciones industriales son orgánicos. Los soportes orgánicos son más versátiles, pueden ser diseñados y sintetizados en el laboratorio para provocar el tipo de interacción enzima-soporte deseado. A veces es suficiente con modificar un polímero natural de modo que éste sea más óptimo para la inmovilización de la enzima con que estemos trabajando. Los soportes inorgánicos empleados para la inmovilización de enzimas pueden ser minerales naturales como zeolitas y silicatos, así como materiales procesados como vidrios. Entre los soportes orgánicos más empleados podemos encontrar polímeros naturales como la agarosa, celulosa o dextrano y polímeros sintéticos como gel de poliacrilamida y sus derivados. En la actualidad está experimentando un gran auge en la inmovilización de enzimas el uso de nanopartículas o electrodos de naturaleza inorgánica (oro o platino) recubiertos de una o varias monocapas orgánicas mediante la técnica de auto-ensamblado (Hakamada et al., 2012) o de Langmuir-Blodgett (Goto et al., 2010). Esta técnica se aplica fundamentalmente en la fabricación de biosensores enzimáticos (Park et al., 2011; Matharu et al., 2012).

SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN		
<b>ORGÁNICOS</b>	Polímeros naturales	Polisacáridos: celulosa, dextrano, agarosa, quitina, alginato.
		Proteínas: colágeno, albúmina.
	Polímeros sintéticos	Poliestireno
		Otros: poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, poliamidas, vinil y alil polímeros.
<b>INORGÁNICOS</b>	Minerales naturales	Bentonita y silicatos.
	Material procesado	Vidrio, metales, óxidos.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los distintos soportes de inmovilización.

### 1.1.2.2. Inmovilización por formación de enlaces covalentes:

La inmovilización de enzimas mediante enlaces covalentes produce inmovilizados de una gran estabilidad física y a su vez irreversibles, pues la enzima queda fuertemente retenida al ser el enlace covalente el de mayor fortaleza. Se pueden dar dos tipos de inmovilización donde se ve implicada la formación de enlaces covalentes: unión de la enzima a un soporte y entrecruzamiento.

#### **Inmovilización por enlace covalente a un soporte:**

La inmovilización de una enzima mediante unión covalente a un soporte es uno de los métodos más estudiados y desarrollados. Una de sus grandes ventajas es que la fortaleza del enlace covalente asegura que no habrá liberación de la enzima al medio de reacción. Algunos de los inconvenientes del método son la disminución en algunos casos de la actividad catalítica debido a cambios conformacionales en la enzima y la imposibilidad de reutilizar los soportes de inmovilización una vez que la actividad enzimática se agota. De entre los 20 aminoácidos que forman parte de la estructura de las enzimas, aquellos que suelen verse involucrados más frecuentemente en la formación de enlaces covalentes con el soporte son la lisina, cisteína, tirosina e histidina y en menor medida la metionina, triptófano, arginina, ácido aspártico y glutámico (Arroyo, 1998). Estos aminoácidos contienen respectivamente grupos funcionales reactivos como grupos amino, sulfhidrilo, fenol, imidazol, tioéter, indol, guanidino y carboxilo, capaces de reaccionar con grupos diazonio, azida, isocianato y haluros presentes en los soportes de inmovilización.

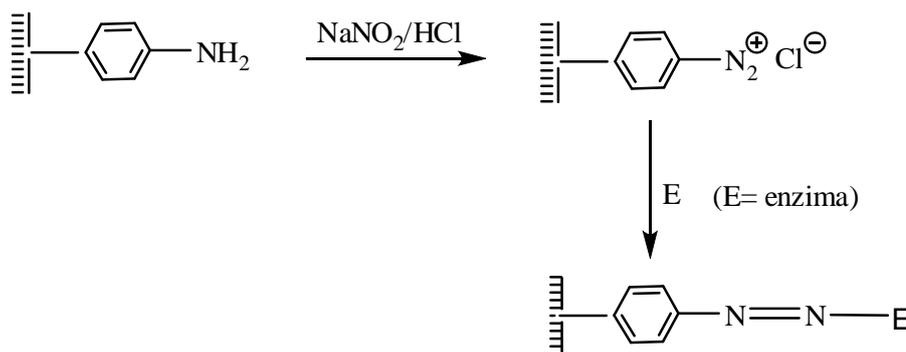
El primer paso para llevar a cabo este tipo de inmovilización consiste en la activación del soporte de modo que éste adquiera grupos (generalmente electrófilos) capaces de reaccionar covalentemente con otros grupos de la enzima (generalmente nucleófilos) (Brena y Batista-Viera, 2006). Esta funcionalización puede conseguirse introduciendo un espaciador entre el soporte y la enzima, de modo que se minimizan los impedimentos estéricos en las reacciones catalíticas. Hay que prestar especial atención a que estos enlaces covalentes que se forman entre la enzima y el soporte no afecten al centro activo de la enzima, pues en caso de hacerlo podría perder su actividad catalítica. La presencia de inhibidores u otros compuestos en el medio de reacción puede ayudar a evitar la pérdida de actividad, también son cruciales en el proceso de inmovilización parámetros como el tiempo de reacción, la temperatura, pH o tampón utilizado (Mateo et al., 2007). La inmovilización de enzimas mediante unión covalente a un soporte puede tener lugar mediante enlaces de distinta naturaleza (tipo diazo, peptídico, base de Schiff, alquilación, arilación o disulfuro) y con la intervención de diversos reactivos, tal y como se puede ver en la tabla adjunta.

UNIÓN COVALENTE A UN SOPORTE	
Formación de enlaces diazo	
Formación de enlaces tipo peptídico	Bromuro de cianógeno
	Carbonil diimidazol
	Cloroformiato
	Carbodiimida
	Cloruro de tionilo
	Fosgeno
Formación de enlaces de bases de Schiff	Peryodato
	Dialdehídos
Método de alquilación o arilación	Oxiranos
	Divinilsulfona
	Haluros de sulfonilo
	Triazina
Reacciones de intercambio tiol-disulfuro	

**Tabla 1.3.** Diversos métodos de inmovilización de enzimas mediante enlace covalente a un soporte sólido.

### a) Formación de enlaces diazo:

Este método consiste en la funcionalización del soporte con grupos diazonio capaces de enlazarse con restos amino, tirosil o histidil de la enzima. El soporte debe contener grupos amino aromáticos, que pueden ser introducidos mediante un espaciador, de modo que estos grupos amino se diazotan con ácido nitroso como paso previo a la inmovilización.



**Figura 1.1.** Esquema de un acoplamiento diazo entre el soporte de inmovilización y la enzima.

Enzimas como la glucoamilasa (Benes et al., 1996),  $\beta$ -galactosidasa (Manjón et al., 1985), 2-haloácido deshalogenasa (Parker y Colby, 1995), lacasa y tirosinasa (Durán et al., 2002) han sido inmovilizadas mediante acoplamientos diazo. Algunos de los soportes empleados para llevar a cabo este tipo de inmovilización han sido los derivados de polisacáridos como *p*-aminobencil celulosa, *m*-aminoanisol celulosa, *m*-aminobencil-oximetil celulosa o Sephadex-antraniléster. También se han empleado copolímeros de aminoácidos, derivados de poliacrilamida como Bio-Gel o Enzacryl, resinas de estireno y derivados de copolímeros de etileno y ácido maléico (Rojas-Melgarejo, 2002).

### b) Formación de enlaces tipo peptídico:

Este método de inmovilización está basado en la formación de enlaces peptídicos o de naturaleza similar entre el soporte de inmovilización y la enzima. Se trata de unir la enzima al soporte, mediante el mismo tipo de enlace que existe entre los distintos aminoácidos que forman la proteína. Para ello, es necesario llevar a cabo la activación del soporte de inmovilización, mediante el uso de reactivos como: bromuro de cianógeno, carbonil diimidazol y cloroformiato en el caso de que el soporte contenga grupos hidroxilo, o reactivos tipo carbodiimida si el soporte contiene grupos carboxilo.

Entre las enzimas inmovilizadas sobre soportes activados mediante bromuro de cianógeno podemos encontrar: catalasa inmovilizada sobre acetato de almidón/celulosa (Costa y Reis, 2004),  $\alpha$ -galactosidasa y lipasa inmovilizadas sobre agarosa modificada (Pessela et al., 2008; Rodríguez et al., 2009; Godoy et al., 2011) y tirosinasa inmovilizada sobre sefarosa activada (Ingebridgtsen y Flurkey, 1988). Esta vía de activación presenta algunas desventajas como la baja estabilidad de los derivados generados y gran toxicidad del bromuro de cianógeno.

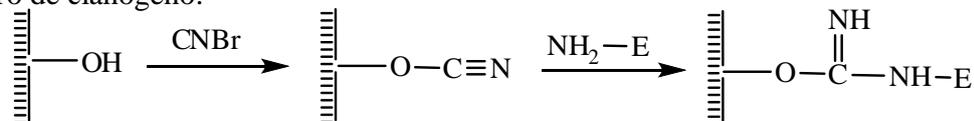
Se ha empleado carbonil diimidazol para activar soportes como la agarosa (Wang et al. 2008b), celulosa o copolímeros mixtos de polisiloxano-polivinilalcohol dando lugar a la inmovilización de las enzimas polifenol oxidasa (Sharma et al., 2009) y lipasa (Santos et al., 2008).

El cloroformiato de bencilo o de etilo es otro de los reactivos empleados para activar los grupos hidroxilo de determinados soportes. Se ha inmovilizado recientemente por este método la alinasa (Miron et al., 2006) y fosfatasa ácida (Urso y Fortier, 1996).

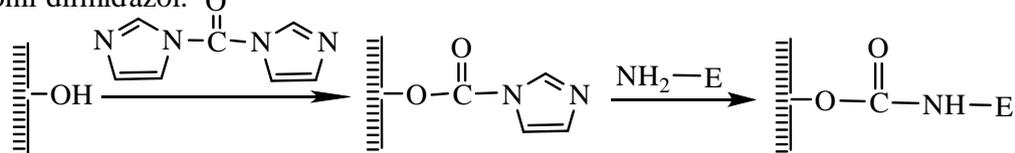
Soportes como nanoesferas magnéticas de poliestireno funcionalizadas con grupos carboxilo (Guan et al., 2009), dendrímeros de sulfuro de polifenileno (Omprakash y Toyoko, 2005) o quitosano (Ghanem y Ghaly, 2004) han sido activados mediante el empleo de carbodiimida y han dado lugar a la inmovilización de enzimas como la lipasa y glucosa oxidasa. La enzima tirosinasa también ha sido inmovilizada mediante este método sobre un polímero de ácido indol-5-carboxílico (Bieganski et al., 2005).

Existen otros reactivos, no tan empleados debido a su toxicidad o inestabilidad de los derivados generados, que también permiten la activación de determinados soportes que contienen grupos carboxilo o amino para dar lugar a la formación de enlaces peptídicos con la enzima. Algunos de estos reactivos son: cloruro de tionilo que puede actuar sobre Amberlita XE-64 para dar lugar a resinas de cloruro de carboxilo, fosgeno y tiofosgeno que al actuar sobre poliaminoestireno originan derivados de isocianato y derivados con enlaces tioamida respectivamente, o metanol/hidracina/ácido nitroso que actuando de modo secuencial sobre carboximetil celulosa dan lugar a derivados de azida de ácido. (Rojas-Melgarejo, 2002).

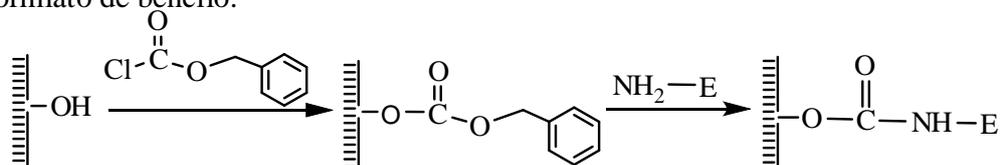
a) Bromuro de cianógeno:



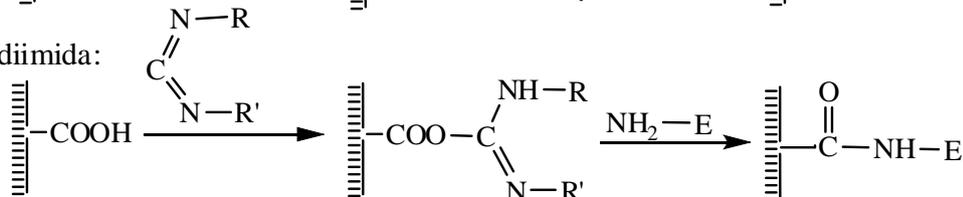
b) Carbonil diimidazol:



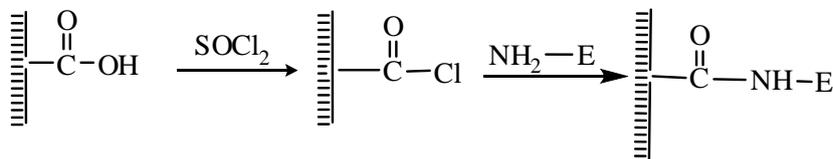
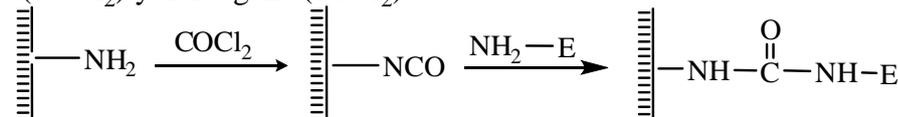
c) Cloroformiato de bencilo:



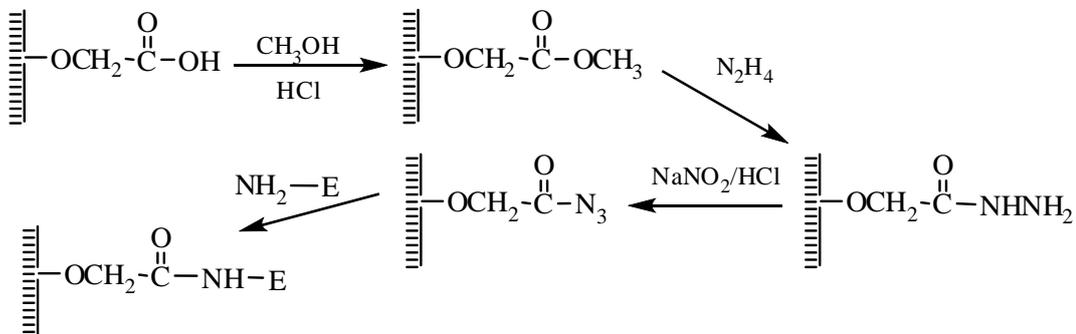
d) Carbodiimida:



e) Cloruro de tionilo:

f) Fosgeno ( $\text{COCl}_2$ ) y tiofosgeno ( $\text{CSCl}_2$ ):

g) Formación de acil-azida:



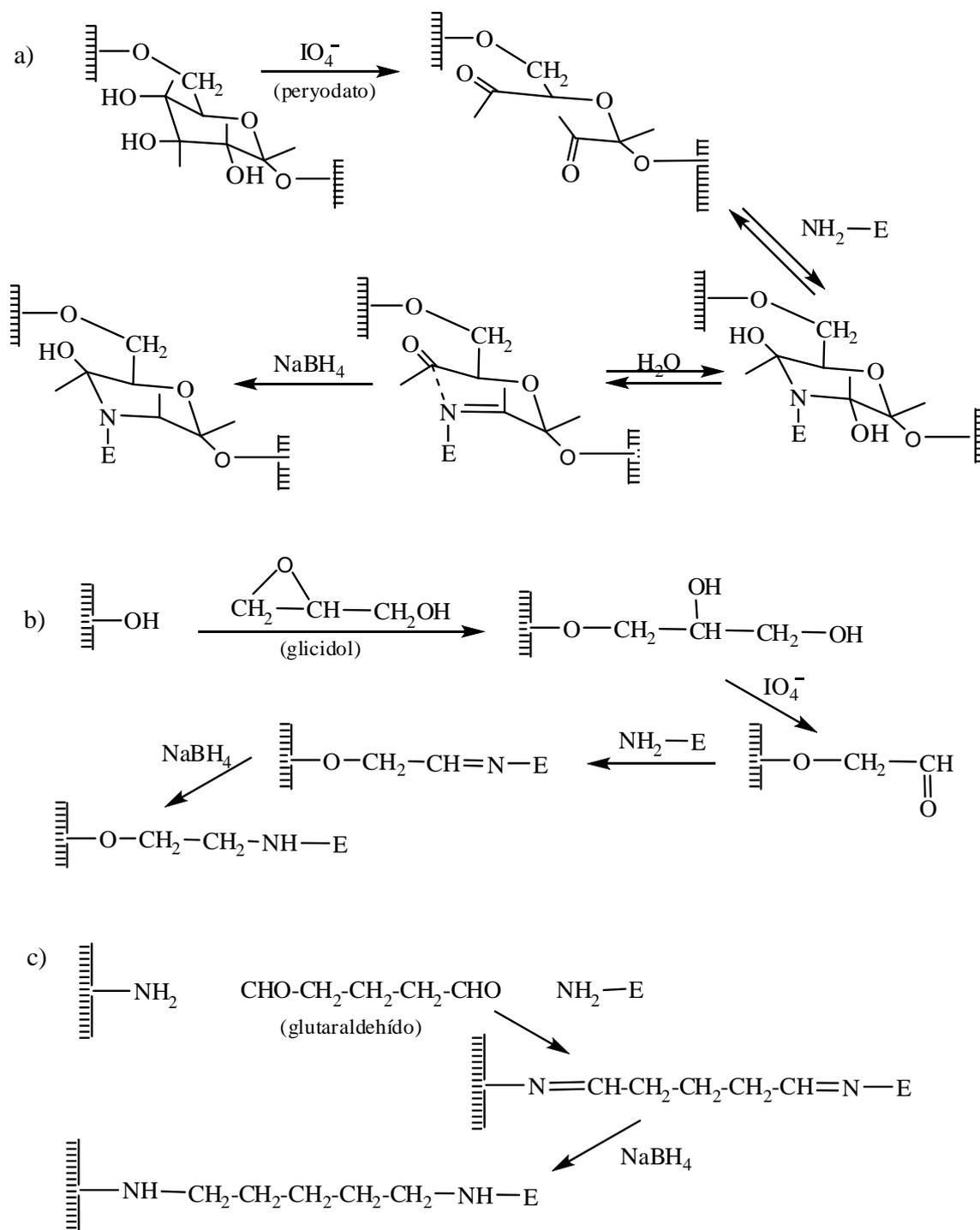
**Figura 1.2.** Esquema de diversos métodos de inmovilización enzimática mediante la formación de enlaces tipo peptídico. (E = enzima)

**c) Formación de enlaces de bases de Schiff:**

Este método de inmovilización está basado en la formación de enlaces de bases de Schiff y posterior reducción de los mismos. Para ello es necesario activar el soporte de inmovilización de modo que se obtengan grupos carbonilo capaces de reaccionar con los grupos amino presentes en la estructura de las enzimas. La activación del soporte se puede conseguir mediante oxidación con peryodato, en el caso de determinados polisacáridos o soportes activados previamente con glicidol. Otro método muy empleado consiste en utilizar un dialdehído, cuando se desea lograr la inmovilización de la enzima en soportes que contienen grupos amino.

Algunas de las enzimas que han sido inmovilizadas sobre soportes oxidados con peryodato son: L-asparaginasa inmovilizada sobre un polímero de fructosa con actividad biológica (Viña et al., 2001) y pectinasa y lipasa inmovilizadas sobre gel de agarosa activada con glicidol (Li et al., 2008, Rodrigues et al., 2009). Cuando se trata de enzimas de naturaleza glicoproteica se puede emplear peryodato para llevar a cabo esta vez la oxidación de los carbohidratos de la proteína permitiendo así su unión a un soporte de inmovilización con grupos amino, de este modo se ha inmovilizado la enzima lipasa sobre fibras de nailon (Braun y Klein, 1996).

El glutaraldehído es el reactivo bifuncional más comúnmente utilizado; provoca la formación de bases de Schiff entre sus grupos aldehído y los grupos amino del soporte de inmovilización y de la enzima. Algunos de los soportes empleados para llevar a cabo este tipo de inmovilización son: AE-celulosa, DEAE-celulosa, amino derivados de sefarosa, quitosano, AE-poliacrilamida y derivados aminosilano de vidrio poroso (Rojas-Melgarejo, 2002). Se han inmovilizado a través de glutaraldehído numerosas enzimas como tirosinasa (Arica et al., 2004; Vidal et al., 2006; Tembe et al., 2008),  $\beta$ -galactosidasa (Neri et al., 2009), peroxidasa (Bayramoglu y Arica, 2008), lipasa (Pahujani et al., 2008, Silva et al., 2012) o L-arabinosa isomerasa (Zhang et al., 2011). Una de las características del glutaraldehído es su alta reactividad. En condiciones de reacción no bien controladas, puede dar lugar a un exceso de entrecruzamientos, incluso entre distintos puntos de la propia proteína, originándose modificaciones estructurales que pueden ocasionar una disminución de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. Aún así, éste sigue siendo uno de los métodos más utilizados en la inmovilización de enzimas.



**Figura 1.3.** Esquema de diversos métodos de inmovilización enzimática mediante la formación de bases de Schiff y posterior reducción. (E = enzima)



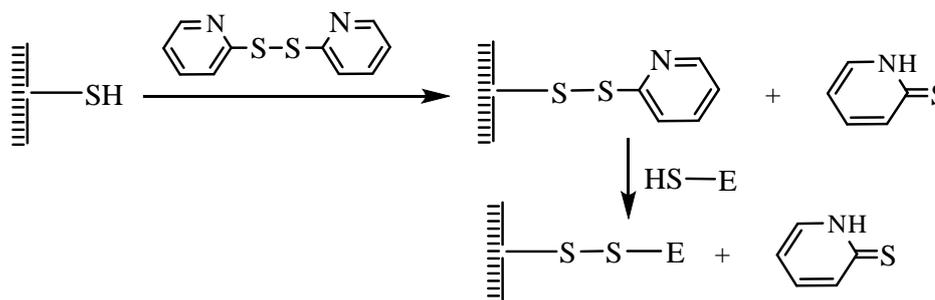
Algunas de las enzimas inmovilizadas por alquilación sobre Eupergit C, un soporte acrílico activado con grupos epoxi, han sido: lacasa (D'Annibale et al., 2000; Lloret et al., 2012), glucosa isomerasa (Tükel y Alagöz, 2008), oxalato-descarboxilasa (Lin et al., 2011) y  $\beta$ -glucosidasa (Khan et al., 2012). Las enzimas tripsina y glucoamilasa han sido inmovilizadas mediante el empleo de divinilsulfona sobre Granocel, soporte basado en celulosa modificada (Bryjak et al., 2007, 2008).

Otro soporte empleado ha sido algodón activado mediante cloruro de tosilo, permitiendo la inmovilización de enzimas como  $\beta$ -galactosidasa (Albayrak y Yang, 2002) y pepsina (Innocent et al., 2006). También se ha empleado triazina como activador de polivinil alcohol en la inmovilización de lipasa (Kartal y Kiliç, 2006) y de esferas de celulosa para la inmovilización de glucosa oxidasa (Mislovicova et al., 2007).

#### **e) Reacciones de intercambio tiol-disulfuro:**

El intercambio tiol-disulfuro se produce entre los grupos tiol presentes en la enzima y los residuos disulfuro mixtos del soporte. En primer lugar, se hace reaccionar un soporte que contiene grupos tiol con 2,2'-dipiridildisulfuro obteniendo así un derivado con enlaces disulfuro. Posteriormente, la enzima se enlaza por medio de sus grupos tiol y ocurre la liberación de 2-tiopiridona. La característica principal de este enlace es su reversibilidad, pues a pesar de su carácter covalente, existen reactivos como ditioneitol (DTT) que en condiciones suaves pueden romper esos puentes disulfuro establecidos entre la enzima y el soporte (Brena y Batista-Viera, 2006). Este aspecto aporta ventajas como la posibilidad de reutilizar el soporte, una vez que la actividad enzimática haya caído, eliminando la enzima agotada y sustituyéndola por enzima nueva.

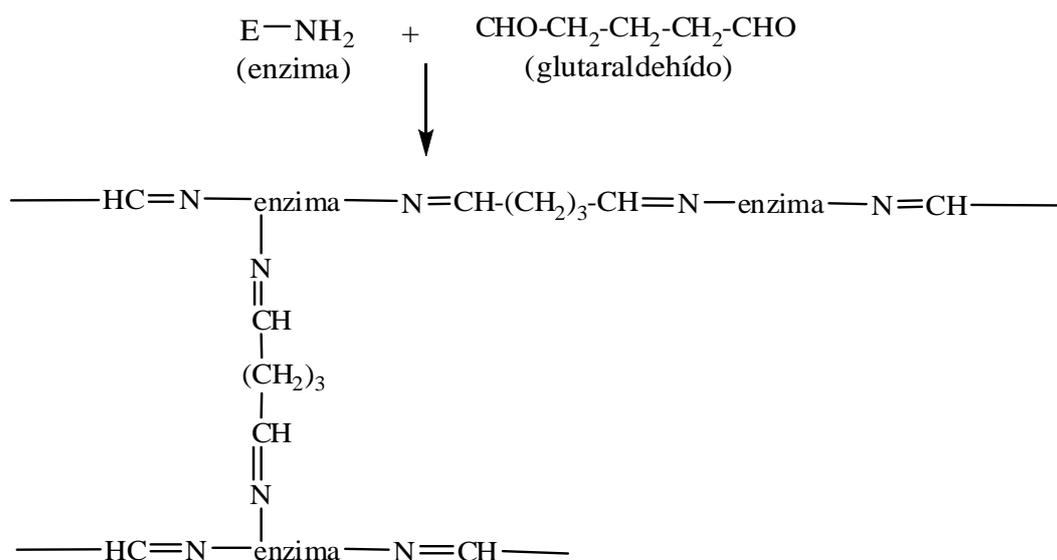
Como soportes de inmovilización han sido empleados la agarosa-glutation-2-piridil disulfuro (llamada sefarosa tiol-activada), agarosa-mercaptotiohidroxipropiléter-2-piridil disulfuro y agarosa-ácido adípico hidrazida-N-acetil-homocisteína-2-piridil disulfuro. En algunos casos, se emplea metil-3-mercaptopropioimidato bajo condiciones ligeramente alcalinas para introducir grupos tiol en la estructura de determinadas enzimas que posteriormente son inmovilizadas mediante la formación de enlaces disulfuro sobre los soportes previamente citados (Rojas-Melgarejo, 2002). Entre las enzimas inmovilizadas por enlaces disulfuro podemos encontrar: anhidrasa carbónica (Méndez et al., 2012),  $\beta$ -galactosidasa (Ovsejevi et al., 2009), penicilina G-acilasa y lipasa (Grazú et al., 2005).



**Figura 1.5.** Esquema de una inmovilización enzimática mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro. (E = enzima)

### **Entrecruzamiento o reticulado:**

La inmovilización por entrecruzamiento o reticulado ocurre en ausencia de un soporte sólido y consiste en la formación de enlaces intermoleculares entre diferentes moléculas de enzima por medio de reactivos bi-o multifuncionales. Estos reactivos pueden ser glutaraldehído, bisdiazobenzidina, N,N'-polimetilén bisiodoacetoamida, isocianatos o N,N'-etilén bismaleimida que dan lugar a entrecruzamientos mediante formación de bases de Schiff, acoplamiento diazo, alquilación o enlace peptídicos, respectivamente (Rojas-Melgarejo, 2002). De todos ellos el método más empleado es el entrecruzamiento mediante glutaraldehído.



**Figura 1.6.** Esquema de la inmovilización enzimática por entrecruzamiento con glutaraldehído.

Entre las ventajas de este método se encuentran su simplicidad, y la posibilidad de controlar el tamaño de partícula y las propiedades del producto final. Como inconvenientes podemos citar que las reacciones se realizan en condiciones relativamente severas, con lo que la conformación del centro activo de la enzima puede verse afectada, provocando una importante pérdida de actividad. Además, si no se controlan bien las condiciones, la extensión de los entrecruzamientos puede ser muy elevada lo que reducirá también la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. Por otro lado, los reactivos entrecruzantes no distinguen si los grupos a unir pertenecen a moléculas diferentes de enzima o a una misma molécula. Así, pueden formarse entrecruzamientos intramoleculares que pueden producir un cambio estructural drástico de la enzima, con la consiguiente pérdida de actividad.

El entrecruzamiento de una enzima mediante glutaraldehído se llevó a cabo por primera vez hace unos 50 años pero las enzimas entrecruzadas presentaban baja actividad enzimática, baja reproducibilidad, baja estabilidad mecánica y dificultad en su manejo debido a su forma gelatinosa. Esta técnica se ha perfeccionado existiendo dos variantes: entrecruzamiento de enzimas dando lugar a cristales y entrecruzamiento de enzimas obteniéndose agregados moleculares (Sheldon et al. 2005; Sheldon, 2007).

El entrecruzamiento de una enzima cristalina (CLEC) mediante el empleo de glutaraldehído se llevó a cabo por primera vez en 1964 (Quiocho et al., 1992) con el objetivo principal de obtener cristales estables para llevar a cabo estudios de difracción de rayos X, a su vez también quedó demostrado que la enzima retenía su actividad enzimática y poseía una gran estabilidad operacional. Sin embargo, no fue hasta los años 90 cuando se desarrolló el empleo de enzimas cristalinas entrecruzadas como biocatalizadores industriales (Margolin, 1996; Lalonde, 1997). Entre las enzimas inmovilizadas por este método podemos mencionar: termolisina, elastasa, esterasa, lipasa y asparaginasa (Navia et al. 1992), así como aldolasa (Sobolov et al. 1994) y cloroperoxidasa (Ayala et al., 2002).

Recientemente, se ha desarrollado la inmovilización por entrecruzamiento de agregados de enzimas (CLEA). Esta técnica consiste en precipitar una enzima que se encuentra en disolución acuosa mediante la adición de sales, disolventes orgánicos o polímeros no iónicos que dan lugar a la aparición de agregados de moléculas de enzima (Sheldon, 2007). Posteriormente, se origina el entrecruzamiento entre distintas moléculas de proteína a través de reactivos como glutaraldehído. Cuando la concentración de enzima es pequeña se logra facilitar la obtención de agregados entrecruzados mediante la adición de seroalbúmina bovina (Shah et al. 2006).

El método CLEA es más simple y económico que el método CLEC, pues no requiere de un complicado proceso de cristalización que además necesita partir de enzima muy pura (Brady y Jordaan, 2009). También se ha demostrado que permite la estabilización de la estructura cuaternaria de enzimas multiméricas como las catalasas (Wilson et al. 2004). Muchas enzimas, como por ejemplo, tirosinasa (Xu et al., 2012), lacasa (Vinoth Kumar et al., 2012), subtilisina (Sangeetha et al. 2008), penicilina acilasa (Ilanes et al. 2006), lipasa (López-Serrano et al., 2002), nitrilasa, galactosidasa, tripsina, glucosa oxidasa, catalasa y piruvato descarboxilasa (Sheldon et al. 2005), han sido inmovilizadas mediante esta técnica de entrecruzamiento de agregados moleculares de enzima.

### **1.1.2.3. Inmovilización por adsorción:**

La inmovilización por adsorción es probablemente el método de inmovilización más sencillo (Brady y Jordaan, 2009; García-Galán, 2011). Consiste en poner en contacto la enzima, normalmente disuelta, con el soporte de inmovilización. Las interacciones que pueden tener lugar son de varios tipos: fuerzas de van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno e interacciones iónicas. Aunque suelen darse varias de ellas al mismo tiempo, el tipo de interacción predominante dependerá de la naturaleza del soporte y de la enzima y por tanto del grado de hidrofobia/hidrofilia de cada uno de ellos. A la hora de considerar la naturaleza física o química de este tipo de interacciones no hay acuerdo entre diversos autores, debido probablemente a que nos encontramos en el umbral entre lo químico y lo físico. Brena y Batista-Viera (2006) distinguen entre adsorción por interacciones iónicas cuando la enzima se une dando lugar a enlaces de naturaleza salina, y adsorción física en los casos de fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno.

Para llevar a cabo la inmovilización por adsorción de una enzima a un soporte hay que tener en cuenta factores determinantes como el pH y la fuerza iónica del medio (Arroyo, 1998). El pH del medio controla la naturaleza y el número de cargas existentes en la superficie del sólido y de la proteína, afectando así a la fortaleza de la interacción entre ambos.

Una de las características de este método es que la fortaleza del enlace enzima-soporte es menor que cuando existe una unión de naturaleza covalente, por lo que si no se elige el soporte adecuado para la enzima en cuestión, ésta puede desprenderse parcialmente (Sheldon, 2007). Además, la estabilidad mecánica de estos inmovilizados no suele ser muy elevada.

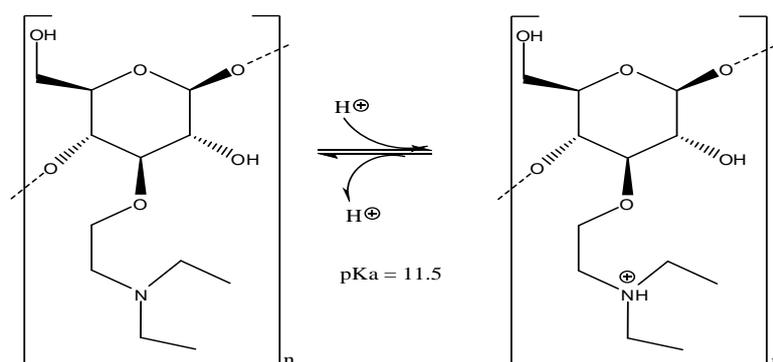
La inmovilización por adsorción presenta importantes ventajas como la sencillez a la hora de su preparación, la facilidad de reutilización de los soportes empleados cuando la enzima se agota, dado su carácter normalmente reversible, y su bajo costo (Brena y Batista-Viera, 2006). Además, la enzima inmovilizada por adsorción no sufre importantes cambios conformacionales, no viéndose alterado su centro activo, lo que le permite mantener la especificidad por su sustrato y una buena actividad catalítica tras el proceso de inmovilización.

### **Adsorción por interacciones iónicas:**

La adsorción de una enzima a un soporte mediante interacciones iónicas está basada en los principios que rigen las interacciones de naturaleza electrostática, principios también utilizados desde hace mucho tiempo en cromatografía (Brena y Batista-Viera, 2006). Las cargas de la enzima interactúan con aquellas de signo opuesto del soporte, dando lugar así a la inmovilización de la enzima. Es un método simple y reversible, pero suele ser difícil encontrar unas condiciones en que la enzima se encuentre unida fuertemente al soporte y al mismo tiempo mantenga plenamente su actividad. El pH óptimo de la enzima y el rango de pH en que ésta mantiene su actividad catalítica pueden cambiar y esto podría ser un problema en determinados casos, aunque en otros puede resultar interesante que las condiciones óptimas de la enzima varíen hacia valores de pH más ácidos o más básicos, dependiendo de la aplicación que se desee dar a los inmovilizados (Guisán et al., 1994).

Cuando los soportes empleados poseen un gran número de cargas y los sustratos y productos de la reacción enzimática también están cargados, la cinética enzimática suele verse distorsionada y pueden ocurrir problemas difusionales. Las interacciones soporte-sustrato o soporte-producto que tienen lugar en este caso, pueden modificar las concentraciones de sustratos y productos en el microambiente de la enzima, pudiendo resultar esto a veces beneficioso y otras perjudicial. Para llevar a cabo este tipo de inmovilización se suele recurrir a la modificación de un soporte inicial para obtener un nuevo soporte con residuos intercambiadores de iones.

Esta técnica se empleó por primera vez para inmovilizar la enzima catalasa sobre DEAE-celulosa, de modo que las cargas negativas de ciertos residuos de la enzima interactuaron con las cargas positivas del soporte (Mitz, 1956). Recientemente se ha empleado DEAE-celulosa para la inmovilización de tanasa (Enemuor y Odibo, 2011), lipasa (Guncheva et al., 2009) y epóxido hidrolasa (Karboune et al., 2005).



**Figura 1.7.** Estructura del polímero DEAE-celulosa y equilibrio de protonación-desprotonación del grupo amino. Este soporte se emplea en la inmovilización de enzimas por adsorción a partir de interacciones iónicas.

Otro soporte ampliamente utilizado para la inmovilización de enzimas mediante interacciones iónicas es la polietilenimina, PEI, (Brena y Batista-Viera, 2006), que puede presentarse en forma lineal o ramificada. La PEI ramificada contiene en su estructura una gran cantidad de grupos amino que pueden ser primarios, secundarios y terciarios y que al protonarse dan lugar a un polímero catiónico capaz de interactuar con un gran número de enzimas como, por ejemplo, tripsina (Bahulekar et al. 1991), glutaril acilasa (Pessela et al., 2005) y  $\alpha$ -galactosidasa (Filho et al. 2008). Entre las ventajas de la PEI podemos encontrar que puede ser utilizada como soporte único o bien junto a otros soportes como la agarosa y que está permitido su uso como aditivo alimentario.

También se han inmovilizado por interacciones iónicas enzimas como tripsina sobre esferas magnéticas modificadas mediante el anclaje de moléculas de ácido glutámico (Arica et al. 2008) y glucoamilasa e invertasa inmovilizadas sobre montomorillonita K-10 activada mediante adición de grupos ácidos (Gopinath y Sugunan, 2007), donde el soporte queda cargado negativamente al pH adecuado siendo capaz de interactuar con ciertos residuos de estas enzimas. Las enzimas lipasa (Secundo et al. 2008), invertasa (Márquez et al., 2008) y glucoamilasa (Shkutina et al., 2005) han sido adsorbidas sobre beidelita, Duolite A-568 y polielectrolitos amino-carboxílicos, respectivamente.

La modificación química de la enzima, con la finalidad de variar la carga neta de la misma y así fortalecer el posterior enlace iónico con el soporte, ha sido otra de las estrategias estudiadas. Para ello, se puede llevar a cabo, la incorporación covalente de ciertos grupos (R) a la enzima, variando así su punto isoeléctrico. La

modificación covalente de la enzima puede conseguirse mediante la formación de bases de Schiff al reaccionar grupos carbonilo de la proteína con aminas primarias portadoras de los grupos funcionales deseados (y posterior reducción con borohidruro de sodio) o también mediante reacciones de sustitución nucleófila en las que grupos nucleofílicos de las proteínas (-NH<sub>2</sub>, -OH, -SH) reaccionan con derivados halogenados que aportan los grupos responsables de las nuevas propiedades de la enzima (Domínguez-Cañas et al., 2005).

### **Adsorción por interacciones hidrofóbicas**

La adsorción mediante interacciones hidrofóbicas tiene lugar debido a la afinidad que presentan entre sí los grupos no polares presentes en la enzima y el soporte, principios que también se han utilizado en cromatografía en los últimos 30 años. La fortaleza de la adsorción será mayor cuanto mayor sea el carácter hidrofóbico de ambos, el soporte y la enzima (Brena y Batista-Viera, 2006). El anclaje de ligandos de naturaleza hidrofóbica al soporte puede regular la hidrofobicidad del mismo dependiendo del número y tamaño de ligandos unidos.

Diversos carbohidratos fueron modificados para obtener soportes con un mayor grado de hidrofobicidad. Para ello se llevó a cabo su esterificación con ácido cinámico y posterior fotoentrecruzamiento, siendo los grupos cinamoílo anclados inicialmente en el carbohidrato los que le confieren principalmente el carácter hidrofóbico al soporte resultante. De este modo se logró la inmovilización mediante interacciones hidrofóbicas de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa (Rojas-Melgarejo et al., 2006), peroxidasa (Rojas-Melgarejo, 2004a, 2004b, 2004c), invertasa (Vallejo-Becerra et al., 2008) y tirosinasa (Marín-Zamora et al., 2005, 2006, 2007a, 2007b, 2009). Otros soportes derivados de carbohidratos que incluyen grupos aromáticos en su estructura como fenilbutilamino agarosa y fenil sefarosa o grupos alquílicos como hexil u octil agarosa han sido utilizados para la inmovilización de tirosinasa (Ingebrigtsen y Flurkey, 1988),  $\beta$ -amilasa y amiloglucosidasa (Brena y Batista-Viera, 2006).

También presenta una gran afinidad por las superficies de naturaleza hidrofóbica la enzima lipasa (Mateo et al., 2007), que ha sido inmovilizada sobre bolitas de polihidroxibutirato (Mendes et al., 2012), nanopartículas de magnetita modificada mediante dodecil sulfato sódico (Dong-Geung et al., 2009) y nanopartículas de poliestireno y polimetilmetacrilato (Palocci et al., 2007), entre otros. Otras enzimas como la tripsina (Koutsopolous et al., 2007) y la endo- $\beta$ -1,3-glucanasa (Koutsopolous et al., 2005) han sido inmovilizadas sobre poliestireno y teflón, respectivamente.

Además, la enzima peroxidasa ha sido inmovilizada por interacciones hidrofóbicas sobre un material compuesto de polímero y sílice (Kwon et al., 2012).

### **Adsorción por afinidad**

El principio de afinidad entre biomoléculas complementarias se ha aplicado también a la inmovilización de enzimas (Brena y Batista-Viera, 2006). La mayor ventaja de este método se encuentra en el alto grado de selectividad de la interacción ligando-enzima. Sin embargo, normalmente se requiere la unión covalente al soporte o matriz de un ligando de afinidad (anticuerpo o lectina) que suele ser caro. Este ligando unido al soporte es selectivo y se une por afinidad a la enzima, quedando ésta inmovilizada. Una aplicación reciente de este método ha sido la inmovilización de la enzima  $\beta$ -galactosidasa sobre soportes que contienen concanavalina A (Con A), que es una lectina que actúa como ligando que presenta bioafinidad por dicha enzima. Los soportes empleados han sido Con A-Celita 545 (Ansari y Husain, 2012) y Con A-nanopartículas de óxido de aluminio (Ansari y Husain, 2011). También se han inmovilizado por bioafinidad otras enzimas como la peroxidasa (Kulshresth y Husain, 2006).

### **Adsorción por coordinación a un metal:**

Al depositar sobre un soporte sólido ciertas sales o hidróxidos de metales de transición como mercurio, cobre, níquel, titanio y zirconio, se puede producir la coordinación del metal a determinados grupos nucleofílicos del soporte y posteriormente de la enzima. A este tipo de inmovilización se le conoce como inmovilización por unión a un metal. La precipitación de estas sales o hidróxidos de metales sobre el soporte (celulosa, quitina, ácido algínico, silicatos) suele llevarse a cabo mediante calentamiento o neutralización. Debido a factores estéricos es imposible que la matriz ocupe todas las posiciones de coordinación del metal; por lo tanto, algunas de las posiciones permanecen libres para coordinarse con ciertos grupos de la enzima (Brena y Batista-viera, 2006). El método es bastante simple y la actividad específica de las enzimas inmovilizadas por este método es bastante alta.

Además, se trata de un método reversible, pues la elución de las proteínas inmovilizadas se puede conseguir fácilmente por competición con ligandos solubles o disminuyendo el pH. Por tanto, el soporte puede ser regenerado simplemente lavando con un fuerte quelatante como EDTA. Sin embargo, la estabilidad operacional alcanzada es variable y los resultados no son fácilmente reproducibles.

La razón de esta falta de reproducibilidad está relacionada posiblemente con una adsorción no uniforme y desorción de los iones metálicos del soporte. Con el fin de mejorar el control de la formación de los sitios de adsorción, se pueden inmovilizar ligandos quelatantes al soporte mediante enlaces covalentes estables. De este modo, los iones metálicos se unen por coordinación a estos ligandos formándose estables complejos capaces de retener a las enzimas.

Esta técnica de unión de la enzima a un metal ha sido utilizada por ejemplo para la inmovilización de lacasa sobre partículas magnéticas con iones  $\text{Cu}^{2+}$  quelatados (Wang et al. 2008a), tripsina sobre esferas mixtas de sílice-quitosano con iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  enlazados (Wu et al. 2006), glucosa oxidasa en hidrogeles de poli (N-vinil imidazol) con iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  (Perkel et al., 2005) y  $\beta$ -galactosidasa (Brena et al, 1994). Recientemente se han inmovilizado por esta vía otras enzimas como catalasa (Tüzmen et al., 2012), penicilina acilasa (Chen et al., 2012) y polifenol oxidasa (Loncar y Vujcic, 2011).

#### **1.1.2.4. Inmovilización por atrapamiento:**

La inmovilización por atrapamiento de una enzima puede lograrse mediante su retención física, ya sea en las cavidades interiores de una matriz polimérica o bien, en un espacio encerrado por una membrana semipermeable. La matriz o membrana logra confinar a la enzima en una determinada región del espacio, mientras que el paso de sustratos y productos a través de ella sigue siendo posible siempre y cuando se cumplan los requisitos de tamaño establecidos por la matriz. La principal diferencia de este método respecto a los anteriores radica en que no existe ningún tipo de enlace entre la enzima y el soporte (Brena y Batista-Viera, 2006).

El atrapamiento puede tener lugar mediante solidificación o polimerización del soporte en presencia de la enzima, quedando ésta retenida en el interior de un gel, en las microcavidades de una fibra sintética o en el interior de una microcápsula. También se puede llevar acabo el atrapamiento entre láminas de un polímero semipermeable o en fibras huecas. Además, existen reactores de membrana que confinan a la enzima en una determinada región del reactor.

La inmovilización de una enzima por atrapamiento posee grandes ventajas, como su sencillez desde el punto de vista experimental y la pequeña cantidad de enzima requerida para obtener derivados activos (Arroyo, 1998). Además evita el contacto directo de la enzima con el entorno protegiéndola de posibles burbujas de gas o de disolventes orgánicos (Brady y Jordaan, 2009).

Algunos de los inconvenientes son los posibles problemas difusionales que pueden presentar sustratos y productos a la hora de atravesar el soporte y la posible desnaturalización de la enzima si se emplean unas condiciones de polimerización agresivas.

### **Atrapamiento en gel o fibras:**

Uno de los métodos más utilizados para lograr la inmovilización de una enzima es su atrapamiento en un gel polimérico. Los geles empleados mayoritariamente son geles de carragenanos, alginato, agarosa y poliacrilamida. En todos los casos, la enzima queda retenida en los huecos intersticiales del soporte polimérico. La técnica consiste generalmente en disolver estos polímeros en agua, añadir la enzima deseada en disolución y posteriormente enfriar la mezcla.

En el caso de los polímeros de acrilamida, la polimerización del gel puede iniciarse a partir de un reactivo químico, directamente en presencia de la enzima. También se puede llevar a cabo el atrapamiento de la enzima en geles de sílice obtenidos mediante procesos sol-gel, que consisten en la hidrólisis en agua de un alcóxido de silicio y un proceso posterior de policondensación y secado (Gupta y Chaudhury, 2007; Brady y Jordaan, 2009). La matriz que atrapa la enzima y da lugar al gel también puede ser un copolímero (Lee y Huang, 2008). Entre las enzimas inmovilizadas por atrapamiento en gel cabe mencionar: tirosinasa (Munjal y Sawhney, 2002; Jahangiri et al., 2012), glucosa oxidasa (Przybyt et al., 2011),  $\beta$ -galactosidasa (Mammarella y Rubiolo, 2005) y  $\beta$ -glucosidasa (Ortega et al. 1998).

Una enzima también puede ser inmovilizada mediante oclusión en las microcavidades de una fibra sintética. Se puede llevar a cabo este tipo de inmovilización mediante obtención de las fibras por polimerización del correspondiente monómero en presencia de la enzima (Arroyo, 1998), o bien, por emulsión entre una disolución acuosa de enzima y una disolución de polímero inmiscible con agua y posterior extrusión de la disolución sobre un baño coagulante de tolueno o éter de petróleo (Pittalis et al., 1979). En ambos casos, se obtienen fibras en cuyo interior se encuentra retenida la enzima. Así, por ejemplo, las enzimas invertasa y aspartasa han sido atrapadas en fibras de acetato de celulosa (Pittalis et al., 1979; Ohmori y Kurokawa, 1994) y la enzima lipasa en fibras de alcohol polivinílico (Sakai et al., 2008).

**Microencapsulación:**

La microencapsulación consiste en rodear la enzima con una membrana semipermeable que permite el paso de moléculas de sustrato y de producto, pero no de la propia enzima (Arroyo, 1998). Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes o no permanentes. Las microcápsulas permanentes pueden ser originadas por ejemplo por polimerización interfacial o por eliminación/extracción del disolvente, mientras que las microcápsulas no permanentes, también llamadas “micelas reversas”, se generan por un surfactante. Las microcápsulas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y se han empleado en diferentes campos como en medicina, cosméticos o colorantes.

La microencapsulación por polimerización interfacial ocurre al emulsionar una disolución acuosa que contiene la enzima y un monómero hidrofílico, en una fase orgánica que contiene un monómero hidrofóbico (Chibata, 1978). En la interfase entre la fase acuosa y orgánica de la emulsión ocurre la polimerización entre ambos monómeros, quedando la enzima retenida en el interior de la membrana generada.

El método de eliminación/extracción del disolvente consiste en emulsionar una disolución acuosa de enzima en una fase orgánica que contiene un polímero disuelto, y esta primera emulsión, se vuelve a emulsionar con una fase acuosa que contiene sustancias coloidales protectoras (gelatina, alcohol polivinílico y surfactante). Después se elimina el disolvente orgánico mediante calentamiento a vacío y se obtiene así una membrana de polímero que forma las microcápsulas con enzima en su interior.

El método de separación de fase se basa en un fenómeno que experimentan los polímeros llamado “coacervación”. Se dispersa una disolución de enzima en un disolvente orgánico que contiene al polímero disuelto y posteriormente se añade un disolvente orgánico en el que el polímero es insoluble, de modo que el polímero se concentra y se forman las membranas alrededor de las microgotas acuosas que contienen la enzima.

La inmovilización por atrapamiento en microcápsulas se ha llevado a cabo con diferentes enzimas. Así, por ejemplo, las enzimas glucosa oxidasa, catalasa y tripsina han sido inmovilizadas en microcápsulas de polipirrol (Parthasarathy y Martin, 1996) y peroxidasa en microcápsulas de gel de sílice (Cellesi y Tirelli, 2006). Recientemente, se ha inmovilizado en microcápsulas híbridas de aminosilano-alginato la enzima formato deshidrogenasa (Kurayama et al., 2012). También tirosinasa ha sido inmovilizada por microencapsulación (Yu y Chang, 2002).

### 1.1.2.5. Comparación entre los métodos de inmovilización:

Todos los métodos de inmovilización presentan ventajas e inconvenientes con respecto al resto. No existe un método ideal y general para la inmovilización de cualquier enzima (Arroyo, 1998). Por lo tanto, la elección del método y condiciones de inmovilización deberá realizarse en base a la enzima concreta a inmovilizar y a la aplicación posterior que se va a dar a la preparación final obtenida. Otros factores como la naturaleza del sustrato, producto o tipo de reactor a emplear también son determinantes en la elección del método de inmovilización. En la siguiente tabla se muestra un resumen de las características generales de cada método de inmovilización (fortaleza del enlace, dificultad, regeneración del soporte, validez del método y coste del proceso), así como de las propiedades generales de las enzimas inmovilizadas por dicho método (actividad enzimática y estabilidad). No obstante, pueden existir excepciones a estas tendencias generales debido a que un determinado tipo de enzima con un determinado tipo de soporte puede originar la aparición de características especiales distintas a las esperadas.

	Enlace covalente a un soporte	Entrecruzamiento	Adsorción	Atrapamiento en gel o fibras	Inclusión en membranas
<b>Fortaleza del enlace</b>	Fuerte	Fuerte	Intermedio	No enlazada	No enlazada
<b>Preparación</b>	Difícil	Difícil	Sencilla	Difícil	Intermedia
<b>Actividad enzimática</b>	Alta	Media	Media/Alta	Media/Alta	Media/Alta
<b>Estabilidad</b>	Alta	Alta	Baja	Media	Media
<b>Regeneración del soporte</b>	Imposible	Imposible	Posible	Imposible	Depende
<b>Validez del método</b>	Limitada	Limitada	General	General	General
<b>Coste del proceso</b>	Alto	Medio	Bajo	Medio	Medio

**Tabla 1.4.** Comparación entre los distintos métodos de inmovilización.

### **1.1.3. Propiedades de las enzimas inmovilizadas**

Cuando se inmoviliza una enzima se producen cambios en algunas de sus propiedades como pueden ser la actividad catalítica o estabilidad térmica (Brena y Batista-Viera, 2006). Estas modificaciones pueden ser debidas a varios factores. Al interaccionar la enzima con el soporte de inmovilización pueden producirse cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína que afecten a su centro activo. Además, las interacciones que surgen entre el soporte y el sustrato, ya sean de naturaleza electrostática, hidrofóbica o impedimentos estéricos, contribuyen a que la interacción entre la enzima inmovilizada y el sustrato tenga lugar en un microentorno diferente al de la disolución. Todos estos factores actúan conjuntamente, dando lugar a la modificación de las propiedades de la enzima inmovilizada, y resulta difícil determinar qué factor concreto provoca un determinado cambio.

#### **1.1.3.1. Actividad catalítica**

La actividad catalítica de las enzimas generalmente se ve afectada tras el proceso de inmovilización (García-Galán et al., 2011). Para que un método de inmovilización sea útil la enzima debe mantener su actividad catalítica tras la inmovilización, aunque a menudo ésta disminuye. En algunas ocasiones puede llegar a perderse completamente la actividad enzimática debido a factores como que: la enzima al inmovilizarse lo haga de tal forma que quede impedido el paso del sustrato al centro activo, algún grupo del soporte reaccione con un aminoácido del centro activo esencial para la actividad catalítica, ocurra un cambio conformacional durante la inmovilización que de lugar a una forma inactiva o las condiciones del proceso ocasionen la desnaturalización de la enzima (Arroyo, 1998). Cuando la enzima mantiene su actividad después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

#### **1.1.3.2. Especificidad por el sustrato**

Cuando se lleva a cabo la inmovilización de una enzima la especificidad por su sustrato puede cambiar (Palomo, 2009). En general, al inmovilizar una enzima sobre un soporte polimérico, su actividad hacia sustratos de elevado peso molecular disminuye debido a impedimentos estéricos, especialmente en el caso de inmovilización por atrapamiento; mientras que si el sustrato es de bajo peso molecular no suelen observarse cambios en la actividad enzimática tras la inmovilización.

Una solución para minimizar estos impedimentos estéricos es la introducción de un brazo espaciador o cadena alquílica de dos a ocho átomos de carbono entre soporte y enzima (Hosseinkhani y Nemat-Gorgani, 2003; Arica et al., 2004). No obstante, se ha observado en algunos casos que la acción de determinadas enzimas inmovilizadas frente a sustratos de elevado peso molecular está favorecida respecto a sustratos de bajo peso molecular, probablemente debido a fuerzas atractivas entre sustrato y soporte de inmovilización. También se han descrito cambios tras la inmovilización en la enantioselectividad de enzimas como lipasa (Mateo et al. 2007, Tai et al., 2012), que inmovilizada sobre diferentes soportes y en las mismas condiciones experimentales puede mostrar grandes diferencias en la enantioselectividad (incluso producirse una inversión de la misma).

### 1.1.3.3. Constantes cinéticas

Por lo general, las constantes cinéticas de la enzima se ven alteradas cuando ésta es inmovilizada (Chibata, 1978; Girelli y Mattei, 2005). El estudio cinético de la enzima tras la inmovilización resulta de vital importancia para comprender como le ha afectado dicho proceso y cuáles son sus características finales. Hay que tener en cuenta que las constantes cinéticas medidas con enzimas inmovilizadas no son verdaderas constantes cinéticas equivalentes a las obtenidas en un medio de reacción homogéneo con enzimas en disolución, sino que se trata de valores aparentes debido a efectos de difusión y otros factores físicos que tienen lugar.

#### Constante de Michaelis ( $K_m$ )

En muchos casos, el valor de la constante de Michaelis,  $K_m$ , aumenta tras la inmovilización (Arica et al., 2004; Tükel y Alagöz, 2008; Lloret et al., 2012), lo que significa que disminuye la afinidad aparente de la enzima inmovilizada por el sustrato. En otras ocasiones, el cambio producido en el valor de  $K_m$  debido a la inmovilización es pequeño o nulo (Sharma et al., 2003), o incluso puede llegar a disminuir ocurriendo aparentemente un aumento de la afinidad de la enzima por el sustrato (Marín-Zamora et al., 2005, 2006; Tüzmen et al., 2012). Algunas de las explicaciones dadas a la modificación de los valores de  $K_m$  hacen referencia a cambios conformacionales de la enzima (Yashi et al., 2005), interacciones electrostáticas entre el soporte y el sustrato (Guilbault, 1984), adsorción del sustrato al soporte (Rijiravanich et al., 2004) y limitaciones en la difusión del sustrato y/o producto, especialmente en el caso de inmovilización por atrapamiento (Axén et al., 1970; Arslan et al., 2005).

### **Velocidad máxima ( $V_{\max}$ )**

Dependiendo del método de inmovilización escogido y de la naturaleza del soporte, la cantidad de enzima inmovilizada y su conformación pueden variar afectando así a la velocidad máxima aparente,  $V_{\max}$ , que muestra dicha enzima al actuar sobre un sustrato. Existen casos en los que se ha descrito una mejora de  $V_{\max}$  tras la inmovilización (Sharma et al., 2009) y en otros muchos se ha descrito una disminución (Arica et al., 2004; Lin et al., 2011; Lloret et al., 2012). Este parámetro nos da una información limitada, pues cuando ocurre un aumento de  $V_{\max}$  no se puede saber si se debe a una mayor cantidad de enzima inmovilizada o a un aumento de su actividad, por lo que es difícil establecer comparaciones entre distintos métodos de inmovilización o diferentes soportes. Resulta pues muy útil, aunque es menos frecuente, el estudio de los valores de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) de la enzima cuando se pretende establecer este tipo de comparaciones (Marín-Zamora et al., 2007a, 2007b; Vallejo-Becerra et al., 2008; Lloret et al., 2012), pues este parámetro es independiente de la cantidad de enzima inmovilizada.

#### **1.1.3.4. Temperatura y pH óptimos**

La actividad enzimática depende de la temperatura de reacción y del pH del medio. A determinados valores de temperatura y pH se pierde la actividad catalítica como consecuencia de la desnaturalización de la enzima. Por lo tanto, resulta necesario determinar cuáles son los valores óptimos de temperatura y pH que permiten a la enzima ejercer su máxima actividad catalítica. Cuando se lleva a cabo la inmovilización de una enzima, estos valores óptimos de temperatura y pH pueden verse alterados. Un buen método de inmovilización será aquel que permita a la enzima actuar con una actividad catalítica máxima durante un mayor rango de temperaturas y de pH. En muchos casos la inmovilización ha producido un cambio en la temperatura óptima de reacción de determinadas enzimas hacia valores superiores (Arica y Bayramoglu, 2004; Luo y Fu, 2010; Matte et al., 2012), en otros la temperatura óptima de reacción varía hacia valores inferiores o permanece constante respecto al valor mostrado por las enzimas nativas en disolución (Dinçer et al., 2012). Lo mismo sucede con el pH óptimo de reacción; tras la inmovilización en algunos casos la enzima adquirió su máxima actividad a valores de pH más altos que en disolución (Ohmori y Kurokawa, 1994) y en otros a valores inferiores (Luo y Fu, 2010; Lei y Yang, 2011; Monier y El-Sokkary, 2012) o similares (Dinçer et al., 2012; Matte et al., 2012).

Los cambios observados en el valor de pH óptimo suelen encontrarse entre 0,5 y 1 unidad de pH. Normalmente estos cambios ocurren debido a la carga de la enzima y/o del soporte de inmovilización. Además, se observa que a elevada fuerza iónica la curva de actividad-pH es similar a la mostrada por la enzima en disolución.

### **1.1.3.5. Estabilidad**

En muchos casos se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización. Este fenómeno puede ser debido a una estabilización conformacional de la enzima (ocasionada por una mayor rigidez de su estructura y prevención de la disociación de sus subunidades), a la protección que ejerce el soporte frente a proteasas del medio, a una disminución de los problemas de agregación intermolecular o a la creación artificial de un microentorno favorable para la enzima como resultado de la inmovilización (Arroyo, 1998; García-Galán et al., 2011). Esta estabilización es de gran importancia para la aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas, sin embargo no es una tendencia general (Mateo et al., 2007). En cada caso será necesario determinar si la inmovilización ha provocado o no un cambio sobre la estabilidad de la enzima inmovilizada y en caso afirmativo si se ha producido un aumento o disminución de ésta.

#### **Estabilidad hacia reactivos**

La inmovilización puede dar lugar a un aumento de la estabilidad de las enzimas inmovilizadas frente a agentes desnaturalizantes (Hernández y Fernández-Lafuente, 2011), inhibidores específicos y disolventes orgánicos (Oloffson y Soderberg, 2006; Brady y Jordaan, 2009). La inmovilización puede disminuir la inhibición sufrida por la enzima, aumentando así su estabilidad, mediante dos mecanismos: exclusión del agente inhibidor del microentorno de la enzima inmovilizada o disminución de la afinidad de la enzima hacia el inhibidor (Mateo et al., 2007). Esta estabilización supone un significativo aumento del campo de aplicación de las reacciones enzimáticas.

#### **Estabilidad hacia enzimas proteolíticas**

Cuando se realiza una reacción enzimática usando un extracto enzimático crudo a menudo se produce la inactivación de la actividad catalítica por la presencia de enzimas proteolíticas contaminantes. En general, se observa que la inmovilización provoca un aumento de la estabilidad de las enzimas frente a la actividad proteolítica de otras enzimas presentes en el medio de reacción (Arroyo, 1998).

Algunas de las estrategias seguidas para evitar la pérdida de actividad catalítica por proteólisis han sido el atrapamiento de la enzima en geles de poliacrilamida (Ortega et al., 1998) o en liposomas cuyas paredes han sido permeabilizadas, de modo que pueda haber tránsito de sustratos y productos al interior pero no de proteasas (Nasseau et al., 2001).

### **Estabilidad térmica**

Normalmente la actividad catalítica de las enzimas aumenta al elevar la temperatura, pero a temperaturas excesivamente altas tiene lugar su desnaturalización. A través de la inmovilización se pretende aumentar la estabilidad de una enzima frente a la temperatura operacional, de modo que su campo de aplicación sea mayor. No obstante, no siempre se consigue aumentar la estabilidad térmica y en determinados casos se mantiene o incluso disminuye. Cuando se emplea el método de inmovilización covalente, los enlaces formados entre la enzima y el soporte estabilizan la conformación de la enzima y dificultan su desnaturalización, provocando generalmente una mejora en la estabilidad térmica (Arica et al. 2004; Kumari et al. 2008; Lloret et al, 2012). Si la enzima es inmovilizada por atrapamiento, su comportamiento frente a la temperatura de incubación no suele variar mucho respecto a la enzima en disolución, pudiendo incluso mejorar (Ortega et al. 1998; Bogra et al., 2009). Sin embargo, cuando la inmovilización ocurre por adsorción física puede ocurrir una disminución de la estabilidad térmica (Zhou et al., 2009), aunque también se ha conseguido en numerosas ocasiones mantener o incluso mejorar dicha estabilidad respecto a la observada para la enzima en disolución (Arica y Bayramoglu, 2004; Marín-Zamora et al., 2006; Tutar et al., 2009).

### **Estabilidad operacional**

La estabilidad operacional de una enzima inmovilizada está ligada a su capacidad de reutilización y hace referencia al número de ciclos y duración de los mismos que es capaz de soportar manteniendo su actividad catalítica. Este factor es uno de los más importantes a la hora de que la aplicación industrial de la enzima inmovilizada resulte con éxito, ya que permite reducir enormemente los costes de la producción (Mogahrabi et al., 2012; Nwagu y Okolo, 2012). La estabilidad operacional depende de factores como la estabilidad térmica de la enzima, el método de inmovilización, la durabilidad del soporte y la presencia de inhibidores orgánicos así como de metales pesados en el medio de reacción.

**Estabilidad durante el almacenado**

La estabilidad durante el almacenado es uno de los parámetros de interesante estudio cuando se desarrolla un nuevo método de inmovilización y puede resultar muy útil para determinadas aplicaciones. En numerosos casos la estabilidad de la enzima frente al tiempo de almacenamiento fue mayor tras la inmovilización (D'Annibale et al., 2000; Arica et al., 2004), aunque no siempre ocurre así (Munjal y Sawhney, 2002).

**Estabilidad frente al pH**

La inmovilización de una enzima puede provocar cambios en el rango de pH en que ésta puede llevar a cabo su actividad catalítica. Este efecto es especialmente notable cuando el soporte de inmovilización posee cargas electrostáticas. Así, un soporte polianiónico provoca generalmente un aumento de la estabilidad de las enzimas hacia valores de pH alcalinos, mientras que uno policatiónico lo hace hacia valores de pH ácidos (Sharma et al., 2003; Chang y Yuang, 2005; Karboune et al., 2005). Cuando el soporte de inmovilización es neutro, la estabilidad de la enzima respecto a un determinado rango de pH suele ser similar a la estabilidad mostrada por la enzima en disolución (Sun y Zhao, 2011; Ansari y Husain, 2012). Sin embargo, también se han descrito algunos casos en que enzimas inmovilizadas sobre soportes neutros muestran estabilidad en regiones de pH diferentes a las mostradas por las correspondientes enzimas solubles (Oliveira et al., 2000).

#### **1.1.4. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas**

La inmovilización de enzimas ha dado lugar principalmente a aplicaciones en los campos del análisis, la medicina, la industria y el medioambiente.

##### **1.1.4.1. Aplicaciones analíticas**

La utilización combinada de enzimas inmovilizadas con instrumentos analíticos ha originado nuevos métodos de análisis, de gran aplicación en química, medicina y medioambiente. Estos métodos, utilizados normalmente para la determinación de la concentración de un sustrato, inhibidor, cofactor o activador de la enzima, consisten en la detección por medio de un sensor o instrumento analítico de un producto formado o cosustrato implicado en el proceso de catálisis. Los biosensores enzimáticos están formados por un enzima inmovilizada acoplada a un transductor, que en contacto con el analito, transforma la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, acústica o térmica, por ejemplo) (Arroyo, 1998; Mello y Kubota, 2002). La especificidad del biosensor depende de la especificidad de la enzima, que puede actuar sobre uno o más sustratos; además, resulta necesario para esta aplicación que el tiempo de vida media de la enzima inmovilizada sea suficientemente grande, al menos de varios días (Roig et al., 1987).

##### **Electrodos enzimáticos**

Los biosensores más desarrollados son aquellos que constan de un transductor electroquímico, es decir, los llamados “electrodos enzimáticos” constituidos por un electrodo en cuya superficie se ha inmovilizado la enzima. El electrodo de vidrio, capaz de medir variaciones de pH y de amonio y basado en principios potenciométricos, ha sido uno de los más utilizados. También se emplean frecuentemente el electrodo de Clark, capaz de detectar cambios en la concentración de oxígeno y el electrodo de carbono, dando lugar ambos a biosensores amperométricos (Ngo, 1980). Los biosensores son de gran utilidad en el campo de diagnóstico clínico, donde se utilizaron por primera vez para la determinación de glucosa mediante un electrodo de oxígeno (Clark y Lyon, 1962) y posteriormente para la detección de urea (Sahoo et al., 2011) y ácido úrico (Zhang et al., 2004). También se utilizan biosensores enzimáticos para el control de la calidad de los alimentos, cuantificando por ejemplo el azúcar presente en las bebidas (Arroyo, 1998). El control de la polución del medioambiente es otra de las aplicaciones de estos instrumentos, donde se han determinado numerosos pesticidas que actúan como inhibidores enzimáticos (Amine et al., 2006).

### **Métodos de análisis automatizados**

Se han diseñado sistemas de análisis automatizados donde la disolución de analito pasa primero a través de un reactor enzimático y posteriormente por un detector (Roig et al., 1987). El reactor enzimático puede consistir en una columna donde se encuentra empaquetada la enzima inmovilizada o en un tubo en cuya superficie interna se ha inmovilizado una enzima. El detector puede ser de distintos tipos: un espectrofotómetro, fluorímetro, sistema electroquímico, termistor, etc. Se puede acoplar también un sistema de muestreo automático. Este método se ha aplicado al análisis de numerosas sustancias como NADH, a partir de NADH oxidasa inmovilizada en combinación con un detector de luminiscencia (Murachi et al., 1990) y glucosa, mediante inmovilizados de glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa en combinación con un detector fotométrico o amperométrico (Schmid y Kunnecke, 1990; Saito et al., 2008; Sanz et al., 2009). También se ha determinado urea a partir de ureasa inmovilizada (Jia et al., 2011) y colesterol mediante colesterol oxidasa inmovilizada (Schmid y Kunnecke, 1990; Rhagavan et al., 1999; Baticz y Tömösközi, 2002). Además, se han desarrollado reactores enzimáticos miniaturizados o microreactores, para el análisis de proteínas y ácidos nucleicos (Urban et al. 2006).

### **Tiras reactivas multicapa**

Existen tiras reactivas de papel u otro soporte hidrofílico, que contienen enzimas inmovilizadas y reactivos de color apropiados. Estas tiras reactivas se han aplicado a la detección de glucosa, urea, bilirrubina y triglicéridos (Roig et al. 1987).

### **Técnicas Cromatográficas**

Cuando se pretende analizar los componentes de una mezcla compleja, suele ser necesario recurrir a un paso previo de separación de dichos componentes mediante una técnica cromatográfica. Las enzimas inmovilizadas han sido aplicadas al campo de la cromatografía al ser introducidas como componente esencial de determinadas columnas cromatográficas (Serrat et al., 1992). El fundamento de esta técnica se basa en las interacciones altamente específicas que se dan entre una enzima y su sustrato, producto de reacción, inhibidor competitivo, coenzima o efector alostérico y que permiten llevar a cabo la separación o purificación de estas sustancias. Los logros más importantes conseguidos han sido la resolución de mezclas racémicas y el aislamiento e identificación de drogas que actúan como sustratos o inhibidores de la enzima (Bertucci et al., 2003; Girelli y Mattei, 2005).

### 1.1.4.2. Aplicaciones médicas

Una de las aplicaciones médicas más importantes es la administración de enzimas inmovilizadas en microcápsulas para el tratamiento de enfermedades causadas por carencia o alteración de una determinada enzima (Mumtaz y Bachhawat, 1992; Rubio-Retama et al., 2007). La microcápsula protege a la enzima de la acción de proteasas y permite una liberación controlada al organismo; además, la membrana que la forma debe ser degradable de modo que el cuerpo pueda eliminarla. Por otro lado, también resulta muy útil la inmovilización de enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante u otras acciones terapéuticas. Por ejemplo, la enzima L-asparaginasa se utiliza para el tratamiento de ciertas leucemias; para ello, se suministra a la sangre asparaginasa microencapsulada o se pasa ésta por un hemodializador de fibra donde ha sido inmovilizada la enzima y así se consigue reducir los niveles de asparragina responsables del desarrollo del cáncer (Roig et al., 1987; Wolf et al., 2003). Las enzimas tripsina y colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas y quemaduras, acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes y con esta finalidad son inmovilizadas sobre celulosas y fibras del tejido de apósitos y vendas (Arroyo, 1998). La inmovilización de enzimas también ha permitido grandes avances en otras áreas relacionadas con el campo de la medicina, tales como el diagnóstico clínico y la síntesis de determinados medicamentos. Además, ha ayudado al análisis de la estructura primaria de biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos y al estudio del mecanismo de acción de enzimas, pudiendo comprender mejor ciertos procesos biológicos.

### 1.1.4.3. Aplicaciones industriales

La inmovilización consigue la estabilización de las enzimas y hace posible su uso repetido, permitiendo el diseño de reactores enzimáticos aplicables a la industria.

#### Industria farmacéutica

En el sector farmacéutico las enzimas inmovilizadas han sido utilizadas principalmente para la obtención de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y de fármacos óptimamente puros. En el primer caso, la enzima penicilina G-acilasa actúa sobre la penicilina G produciendo ácido 6-amino penicilánico, precursor de dichos antibióticos (Illanes et al., 2006; Cecchini et al., 2012). Mediante síntesis enantioselectiva se ha llevado a cabo la obtención de los antiinflamatorios no esteroideos ibuprofeno (Marszall y Siódmiak, 2012), naproxeno (Erdemir y Yilmaz, 2012) y ketoprofeno (Zhang y Liu, 2011), a partir de lipasa inmovilizada.

### **Industria química**

En el sector químico se ha llevado a cabo el empleo de enzimas inmovilizadas para la obtención de perfumes, cosméticos, detergentes y pigmentos para tintas. La inmovilización de la enzima lipasa se ha llevado a cabo para obtener fragancias y aromas producidos por determinados ésteres obtenidos mediante transesterificación enantioselectiva (Tamalampudi et al., 2007). Se han preparado cosméticos para acondicionar la piel y eliminar las células muertas superficiales que contienen proteasas o  $\beta$ -glucosidasa inmovilizadas (Auriol et al., 1996). Las proteasas, lipasas, amilasas y celulasas inmovilizadas pueden ser utilizadas en detergentes para eliminar manchas (Pundir y Chaohuan, 2012). El ácido gálico da lugar a un complejo ferroso que se utiliza como pigmento de color negro y puede ser obtenido a través de la hidrólisis de los taninos a partir de una tanasa inmovilizada (Curiel et al., 2010).

### **Industria alimentaria**

En la industria alimentaria se han empleado enzimas inmovilizadas en procesos de hidrólisis de proteínas e hidratos de carbono y en la mejora de las propiedades organolépticas de ciertos alimentos (Arroyo, 1998). Se ha conseguido la disminución de lactoglobulina en la leche mediante la aplicación de proteasas inmovilizadas y la eliminación de lactosa en la leche mediante el empleo de  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada (Bayramoglu et al., 2007; Ansari y Husain, 2012). La degradación de almidón se ha llevado a cabo mediante las enzimas amilasa (Sewhale et al. 2007), glucoamilasa y glucoisomerasa inmovilizadas, obteniendo un jarabe enriquecido en fructosa que sirve de edulcorante. El incremento del aroma de vinos y zumos se ha conseguido mediante  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada (González-Pombo et al., 2011) y la obtención de sucedáneo de manteca de cacao a partir de aceite de palma mediante lipasa inmovilizada (Mojovic et al., 1993).

#### **1.1.4.4. Aplicaciones medioambientales**

Tal y como ya se ha comentado, las enzimas inmovilizadas pueden utilizarse en la detección de ciertos contaminantes del medio natural. Además, se han aplicado al tratamiento de aguas residuales y en la obtención de biocombustibles y energía.

### **Tratamiento de aguas residuales**

La eliminación, en los procesos de descontaminación de aguas, de fenoles y pesticidas ha sido una de las importantes aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.

Los compuestos fenólicos, productos de considerable toxicidad y perjudiciales para la salud, están presentes en las aguas residuales de muchas industrias: química orgánica, colorantes, refinerías de petróleo, etc. La eliminación de fenoles y derivados fenólicos se ha conseguido mediante la utilización de tirosinasa (Chiacchierini et al., 2004; Dinçer et al., 2012), lacasa (Wang et al., 2012) y de diversos tipos de peroxidases (Durán y Espósito, 2000). Por otro lado, las enzimas cianuro hidratasa y fosfotriesterasa son capaces de destruir respectivamente cianuro y compuestos organofosforados, utilizados en pesticidas y herbicidas (Karam y Nicell, 1997).

### **Biocombustibles y células de combustible**

Determinadas enzimas facilitan la obtención de los llamados biocombustibles (bioetanol y biodiesel) a partir de biomasa. Resulta muy útil la inmovilización de dichas enzimas para optimizar esta aplicación. El bioetanol se puede obtener a partir de sacarosa, almidón o lignocelulosa, mediante catálisis enzimática con glucoamilasa y celulasa (Fukuds et al., 2009). El biodiesel se obtiene a partir de aceites vegetales y para ello puede utilizarse lipasa inmovilizada (Shieh et al., 2003; Ros et al., 2010; Soumanou et al., 2012).

También se han empleado enzimas inmovilizadas para construir células de combustible que convierten energía química en eléctrica (Ramanavicius et al., 2005; Moehlenbrock y Minteer, 2008; Lee et al. 2009). El combustible de la célula es un sustrato (metanol, etanol, glucosa o lactato), que es oxidado por una enzima apropiada (alcohol deshidrogenada, glucosa oxidasa y lactato deshidrogenada, respectivamente). Uno de los inconvenientes de este modo de obtención de energía es la corta duración de estas células.

## **1.2. POLÍMEROS FOTOENTRECRUZADOS**

La insolubilización de polímeros fotosensibles ha sido de gran relevancia a lo largo de la historia. En la antigüedad, obtuvo una gran importancia el betún de Judea, una resina fotopolimerizable de origen mineral, que se utilizó como aislante del agua, en la cementación de casas y construcción de barcos. También fue utilizada esta resina por los antiguos egipcios para el embalsamamiento de momias. Sin embargo, el betún de Judea presentaba algunos inconvenientes como la necesidad de largos tiempos de exposición a la luz y que la diferencia de solubilidad entre regiones expuestas y no expuestas no resultaba ser demasiado diferente. Louis Minsk fue el primero en sintetizar un fotopolímero sintético, el cinamato de polivinilo (Minsk y Van-Deusen, 1948), que al ser expuesto a la radiación luminosa dio lugar a un polímero fotoentrecruzado insoluble, con excelentes propiedades. Este material fue un éxito, ya que superó muchas de las desventajas de los fotopolímeros naturales. Desde entonces, se ha desarrollado una larga lista de fotopolímeros sintéticos (Balaji et al., 2003; Karagoz y Bicak, 2008).

Este tipo de compuestos puede dar lugar a la formación de una imagen, comportándose como resinas negativas. El proceso consiste en extender una capa de resina sobre una placa, dejarla secar y posteriormente exponerla a la radiación a través de una fotomáscara, que permite el paso de luz en determinadas áreas pero no en otras. Finalmente, la imagen aparece cuando se vierte sobre la placa un disolvente o mezcla de disolventes (revelador) que disuelve la zona no irradiada. Esta característica ha dado lugar a la utilización de fotopolímeros sintéticos en modernas aplicaciones como: circuitos integrados, fibras ópticas, prensas litográficas y memorias holográficas (Neipp et al., 2003; Klein y Barsella, 2005; Kwan et al., 2009). También se han aplicado los fotopolímeros en el desarrollo de biomateriales, especialmente en odontología (Baroli, 2006; Buruiana et al., 2012).

### **1.2.1. Reacción de fotopolimerización**

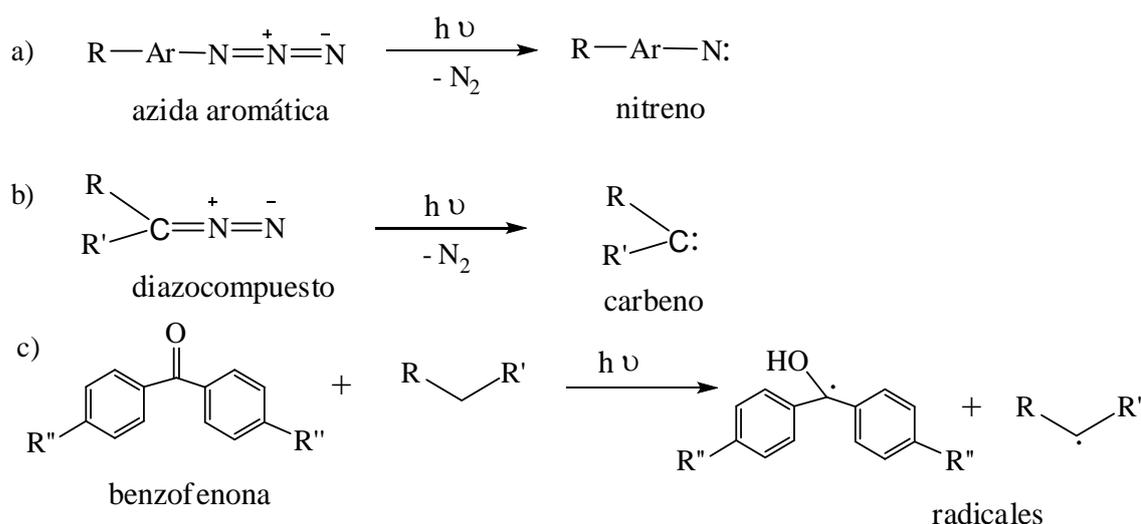
La reacción de fotopolimerización consiste en la polimerización de un monómero o prepolímero mediante exposición a la luz, obteniéndose así polímeros de mayor peso molecular que pueden tener una estructura lineal o entrecruzada. En general, el efecto neto de la energía luminosa es la producción de alguna especie que actúe como iniciador de la fotorreacción. En el caso de las resinas o polímeros fotoentrecruzables, esta reacción da lugar a una disminución de la solubilidad por la formación de una red tridimensional a partir de un conjunto de cadenas lineales.

### 1.2.1.1. Tipos de fotoentrecruzamiento

La existencia de grupos fotorreactivos en monómeros y/o polímeros produce la posibilidad de su fotoentrecruzamiento por medio de la luz. El grupo fotorreactivo puede ser añadido a un polímero ya formado, a través de grupos reactivos presentes en este último que permitan su fijación; o bien, puede formar parte inicialmente del monómero dando lugar a un entrecruzamiento directo o tras ser polimerizado.

También se han obtenido polímeros entrecruzados mediante el empleo de un fotoiniciador (especie activada por la luz y desencadenante de la polimerización) y/o un agente entrecruzante (especie fotorreactiva que establece puentes entre cadenas). Recientemente, se ha prestado especial atención al entrecruzamiento mediante fotoiniciadores catiónicos (Muller et al., 2001; Abdellah et al., 2003; Rosli et al., 2003).

Los polímeros fotoentrecruzables pueden dar lugar al entrecruzamiento principalmente por dos vías: mediante la excitación de cromóforos o por fotogeneración de especies reactivas. El primer caso explica la ciclodimerización de dobles enlaces (Bertmer et al., 2006) y será tratado con profundidad en el siguiente apartado. Mientras que el segundo caso, hace referencia a la fotogeneración, a partir de los precursores adecuados, de especies muy reactivas (nitrenos, carbenos o radicales) que son las desencadenantes del entrecruzamiento.



**Figura 1.8.** Fotogeneración a partir del correspondiente precursor de diversas especies reactivas (nitreno, carbeno y radical) capaces de producir reacciones de entrecruzamiento.



Los acilsilanos y diazocompuestos son precursores de los carbenos. Aquellos polímeros que contengan grupos acilsilil o diazo pueden ser fotoentrecruzados mediante la intervención de estos intermedios (Yamashita et al., 1995). También se han utilizado acilsilanos bifuncionales como reactivos entrecruzantes.

Los radicales intervienen en numerosas reacciones de polimerización y su acoplamiento puede usarse también para originar entrecruzamiento. La abstracción de hidrógenos por cetonas triplete excitado (ej. benzofenona) y posterior acoplamiento radicalario es uno de los procesos clásicos (Wang et al., 2005; Dongming et al., 2009). Este proceso se ha utilizado por ejemplo para fotoentrecruzar copolímeros de vinilbenzofenona y 4-dimetilaminoestireno (Reiser, 1989).

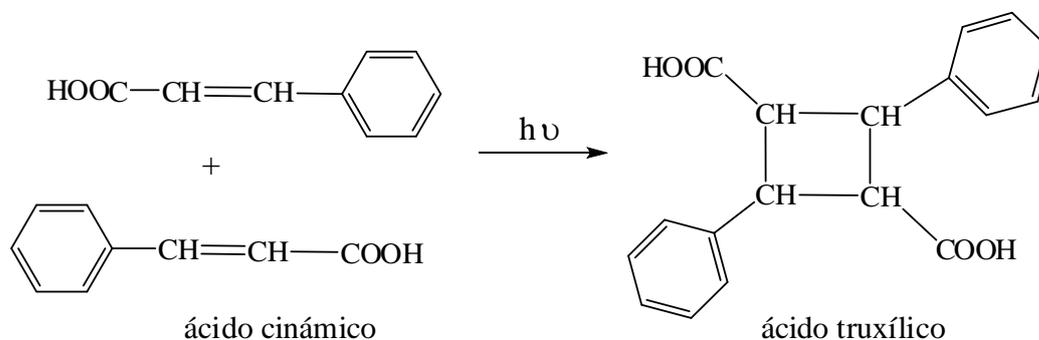
### **1.2.1.2. Ventajas sobre otros métodos de polimerización**

Entre las ventajas del uso de la irradiación respecto a otros métodos de polimerización se encuentra la rapidez con que transcurre la reacción, siendo suficiente tiempos de exposición de solamente varios segundos para muchos de los sistemas fotopoliméricos. Otras ventajas de la fotopolimerización son el bajo consumo de energía que requiere y las bajas temperaturas de operación, que evitan la alteración de grupos sensibles al calor. Además, en algunos casos resulta innecesario el empleo de disolventes, con la correspondiente ventaja medioambiental. Por último, una de las mayores ventajas es la posibilidad de entrecruzamiento selectivo, dando lugar a una resina de tipo negativo, que permite la formación de imágenes del modo expuesto anteriormente (Fouassier et al., 2003).

## 1.2.2. Ciclodimerización de dobles enlaces

### 1.2.2.1. Historia

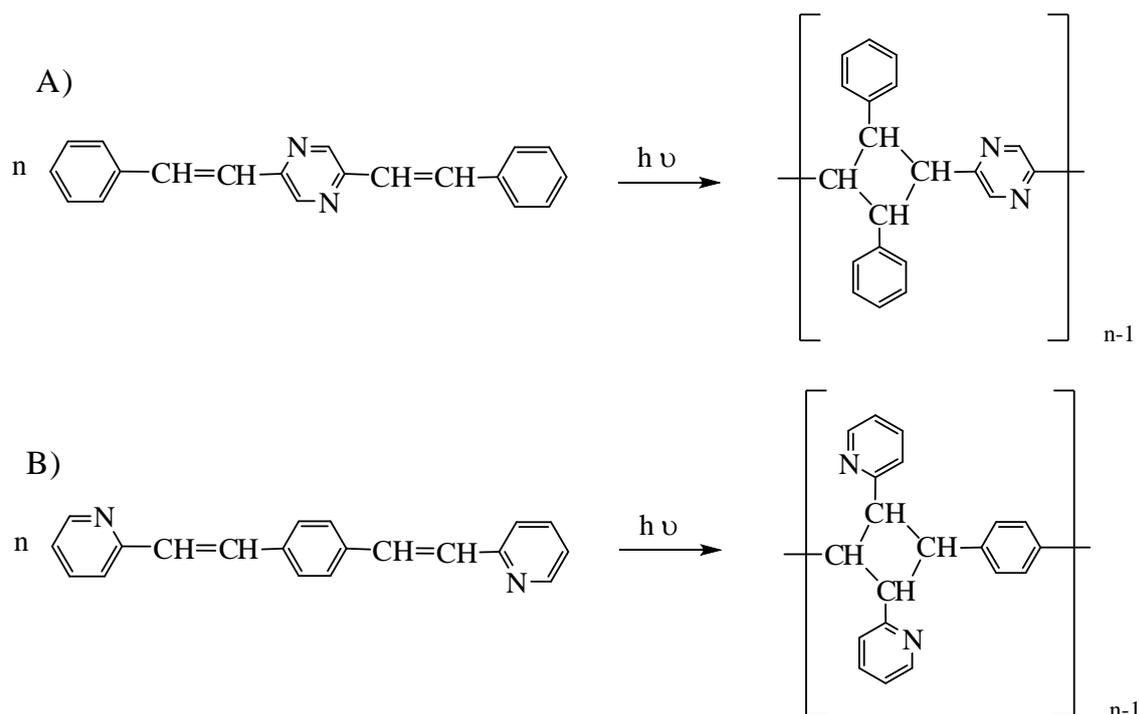
Las fotorresinas naturales presentaban varios inconvenientes, entre ellos que las imágenes formadas no eran muy resistentes al ataque ácido durante el revelado y que también había reacción en la oscuridad. Surgió así la necesidad de obtener un fotopolímero hidrofóbico que por su naturaleza resistiera los ataques en medio acuoso ácido. El camino de partida para resolver este problema consistió en la aplicación de la bien conocida fotodimerización del ácido cinámico en estado sólido (Minsk et al., 1959; Tsuda, 1964). Esta reacción da lugar a la ciclodimerización entre dos dobles enlaces de dos moléculas de ácido cinámico, por medio de la absorción de energía luminosa, obteniéndose dímeros menos solubles que el sustrato inicial (Bertmer et al., 2006). Louis Minsk aplicó este principio a la fabricación del primer fotopolímero sintético (Minsk y Van Deusen, 1948; Minsk et al., 1959), el cinamato de polivinilo (PVCN). Minsk asumió que al funcionalizar un polímero vinílico con grupos cinamoilo, se podría conseguir la fotodimerización de dos grupos pertenecientes a distintas cadenas, produciéndose así un determinado número de entrecruzamientos que daría lugar a la insolubilización del polímero. El material obtenido fue un éxito, puesto que no ocurría reacción en la oscuridad, el material tenía un tiempo de vida largo, podía usarse en fotografía ya que era resistente al revelado y tenía una resolución excelente. Desde entonces se han desarrollado una gran variedad de polímeros fotoentrecruzables basados en la excitación de cromóforos, concretamente en la ciclodimerización de dobles enlaces, con muy diversas aplicaciones (Rojas-Melgarejo et al., 2004c; Selvam y Najundam, 2005; Marín-Zamora et al., 2007a; Kurioz et al., 2008; Nechifor, 2009)



**Figura 1.10.** Esquema de la fotodimerización del ácido cinámico.

### 1.2.2.2. Fotopolimerización de cuatro centros

La fotopolimerización de “cuatro centros” es un método relacionado con la fotopolimerización de dobles enlaces. Este tipo de fotopolimerización ha sido estudiada para 2,5-diésterilpirazina y también para 1,4-bis( $\beta$ -piridil-2-vinil) benceno, entre otros muchos (Wendell, 1983; Ebei, 1986; Dobrodumov et al., 1997). Estos compuestos polimerizan gracias a la interacción entre dos dobles enlaces pertenecientes a moléculas de monómero distintas, que dan lugar a la formación de unidades de ciclobutano que actúan como eslabones de la cadena polimérica. Este tipo de fotopolimerización tiene lugar en estado cristalino pero no en disolución. Además, la distribución topoquímica de los dobles enlaces tiene una gran importancia, como lo demuestra el hecho de que los compuestos isómeros 1,4-bis( $\beta$ -piridil-3-vinil) benceno y el 1,4-bis( $\beta$ -piridil-4-vinil) benceno no sufran la fotopolimerización bajo las mismas condiciones.

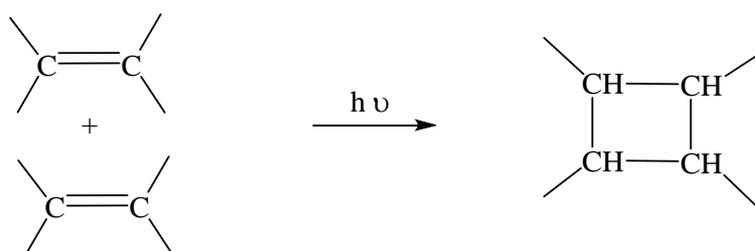


**Figura 1.11.** Reacción de fotopolimerización de “cuatro centros” de 2,5-diésterilpirazina (A) y de 1,4-bis( $\beta$ -piridil-2-vinil) benceno (B)

### 1.2.2.3. Grupos fotodimerizables

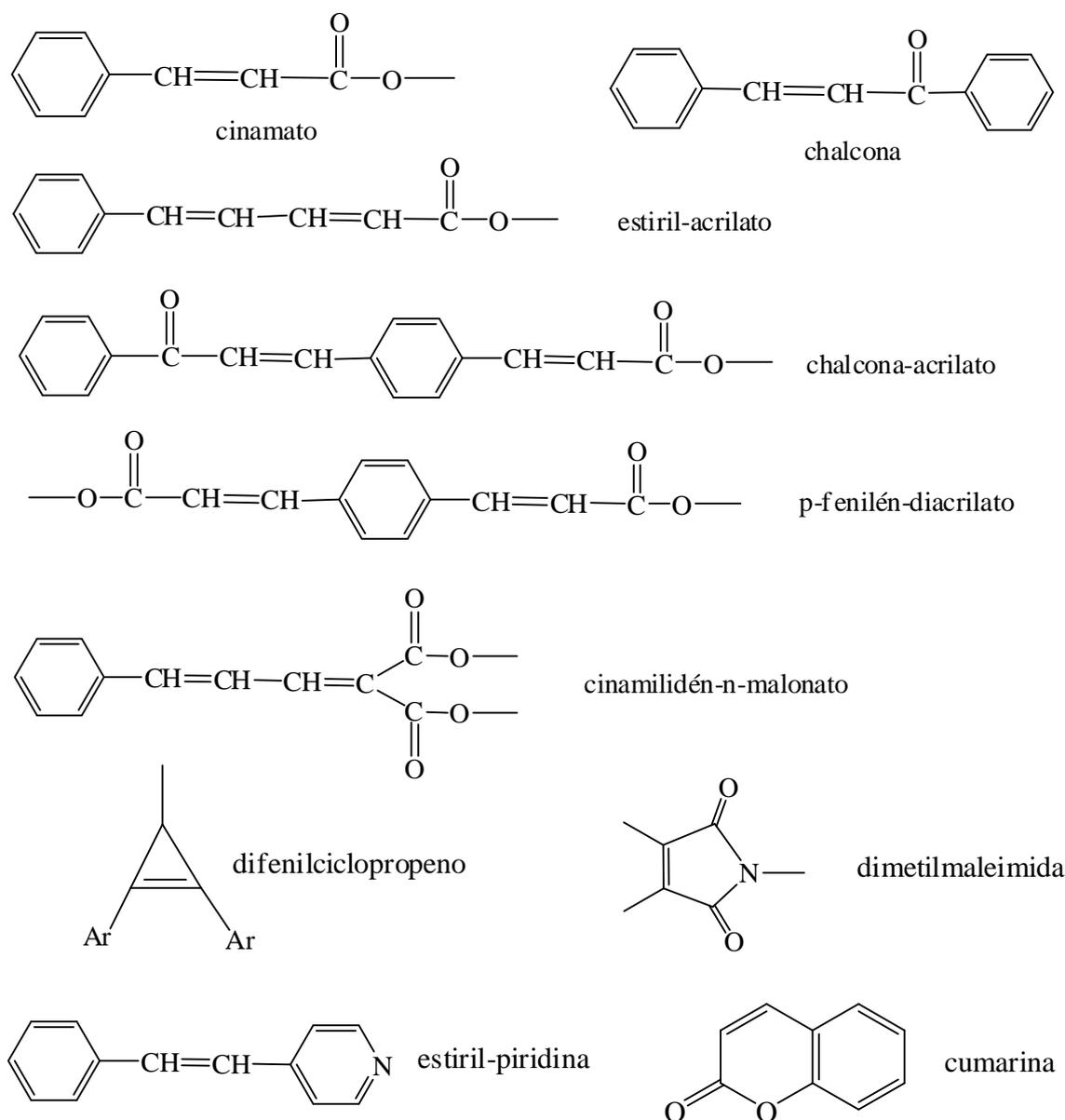
Existen diversas especies que contienen dobles enlaces y que pueden dar lugar a reacciones de dimerización por acción de la luz en base al mismo principio que rige la fotopolimerización de “cuatro centros”. En realidad, la reacción de fotodimerización se puede interpretar como un solo paso o etapa de la fotopolimerización de cuatro centros. De este modo, puede conseguirse también el fotoentrecruzamiento de polímeros que contengan grupos laterales susceptibles de sufrir fotodimerización.

La ciclodimerización de dos dobles enlaces mediante la absorción de energía luminosa tiene lugar por medio de la formación de una unidad de ciclobutano. Se trata de una cicloadición [2+2] y para que ocurra es necesario que los 2 dobles enlaces se sitúen de manera paralela el uno respecto del otro (Bertmer et al., 2006). Aunque en el “estado fundamental” la cicloadición supra-supra [2+2] de los dos dobles enlaces carbono-carbono está prohibida por la simetría orbital según Woodward-Hoffman, sí que está permitida si uno de los dos reactivos ha alcanzado el “estado excitado” (Hasegawa, 1995), situación promovida en este caso por la acción de la radiación luminosa.



**Figura 1.12.** Reacción de ciclodimerización de dobles enlaces por acción de la luz.

Este tipo de cicloadición [2+2] por medio de energía luminosa se da, además de en las olefinas, en especies como cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados y polidienos conjugados (Ranby, 1998; Balaji et al., 2003), donde la reactividad del doble enlace está potenciada. Los dobles enlaces son más reactivos en el caso de disponer de un grupo carbonilo conjugado capaz de conferir al doble enlace la polarización deseada. Además, en el caso de los cinamatos y similares, el grupo fenilo aumenta la polarizabilidad y el poder de absorción de luz del cromóforo favoreciendo la cicloadición (Rojas-Melgarejo et al., 2007). A continuación, en la Figura 1.13, se muestran algunos ejemplos de grupos dimerizables que pueden unirse a un determinado monómero y/o polímero.

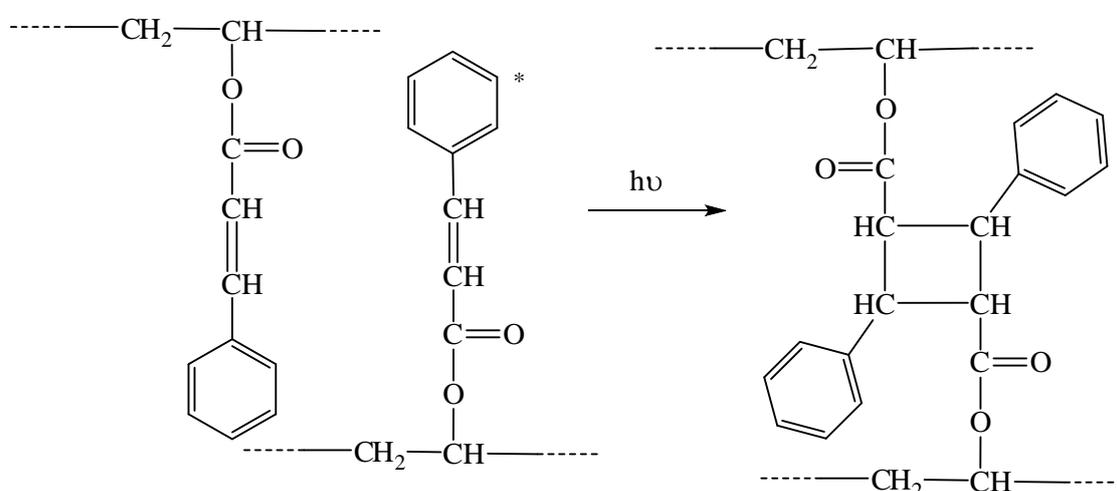


**Figura 1.13.** Algunos grupos que dan lugar a fotoentrecruzamientos por cicloadición [2+2]

Todos estos grupos (cinamato, chalcona, cumarina, etc.) aparecen una y otra vez incorporados en las estructuras de un amplio rango de fotopolímeros sintéticos y son los responsables de los entrecruzamientos que dan lugar a redes bi y tridimensionales cuando éstos son sometidos a irradiación, pudiendo ser utilizados en numerosas aplicaciones (microlitografía, circuitos integrados, fotoconductores, tecnología de impresión o pantallas de cristal líquido).

#### 1.2.2.4. Fotoentrecruzamiento por excitación de cromóforos

Uno de los cromóforos fotoentrecruzables más empleados es el grupo cinamoílo, que puede ser introducido en un compuesto de partida que contenga grupos hidroxilo mediante reacción con cloruro de cinamoílo (Rojas-Melgarejo et al., 2004c; Marín-Zamora et al. 2007a). Esta reacción se utilizó por primera vez para sintetizar el ya mencionado cinamato de polivinilo (PVCN). Cuando se irradia con luz este polímero, ocurren una serie de entrecruzamientos por fotoadición entre un grupo cinamoílo excitado (\*) de una cadena con otro en su estado fundamental perteneciente a otra cadena diferente (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Entrecruzamiento entre dos cadenas de un polímero fotoentrecruzable con grupos cinamoílo (PVCN).

El cinamato de polivinilo es el polímero fotoentrecruzable más estudiado (Minsk et al., 1959; Tsuda, 1964; Reiser, 1980; Egerton et al., 1981). Se ha comprobado que al ser sometido a irradiación con luz ultravioleta (a baja temperatura), más del 80 % de los productos de reacción son ciclobutanos, el resto son el resultado de reacciones laterales vía radical. La reacción de fotoisomerización (cis/trans) del grupo cinamoílo puede competir poco o nada con la reacción de fotodimerización. Cuando ocurre el entrecruzamiento, se obtiene el éster derivado del ácido  $\alpha$ -truxílico y no de otros isómeros tales como el ácido  $\beta$ -truxínico, de igual composición química pero diferente ordenación espacial de los grupos Ar- y COOR. Este hecho ha argumentado la necesidad de una determinada ordenación espacial de los grupos cinamoílo para que se produzca el entrecruzamiento.

La participación del estado excitado triplete del grupo cinamoilo en la reacción de fotoentrecruzamiento ha sido claramente demostrada. Este particular estado excitado puede producirse por una irradiación directa seguida de un cruce intersistema del singlete al triplete, o por transferencia de energía del triplete de una determinada sustancia (sensibilizador) al triplete del grupo cinámico. La presencia de oxígeno merma considerablemente el rendimiento de la reacción fotoquímica (Buettner, 1964), ya que éste es un eficiente bloqueador de tripletes.

También se han obtenido polímeros fotoentrecruzables con otros grupos fotodimerizables. Por ejemplo, se ha sintetizado el estiril-acrilato de polivinilo (Leubner y Unruh, 1966), cuya rapidez fotográfica es 200 veces mayor que la del PVCN. Otros cromóforos fotorreactivos de interés son las chalconas y los fenilén-diacrilatos. Se han sintetizado polímeros que contienen grupos chalcona laterales (Rehab y Salahuddin, 1999; Selvam y Najundam, 2005) y otros donde las chalconas forman parte de la estructura base de los mismos, como por ejemplo el obtenido mediante copolimerización de 4,4'-dihidroxichalcona y epiclorhidrina (Dong et al. 2001) o el obtenido mediante copolimerización de 4,4'-dihidroxichalcona, bisfenol A y 4,4'-difluorodifenilsulfona (Wen et al., 2011). Los grupos chalcona tienen elevados coeficientes de absorbanza por lo que la reacción de fotoentrecruzamiento es relativamente más rápida que la que tiene lugar entre grupos cinamoilo, lo que confiere a los derivados de chalcona una mayor resistencia y estabilidad térmica (Si et al., 2011). Los fenilén-diacrilatos se pueden unir a un polímero con grupos hidroxilo mediante una unión éster; o bien formar parte de la estructura base de un poliéster (Aert et al., 1998), que puede obtenerse por ejemplo mediante condensación del ácido *p*-fenilén-diacrílico con un glicol (Schellenberg y Bayer, 1962). Se han descrito poliésteres basados en estirilpiridina, que son térmicamente estables por encima de 450°C (Montesinos, 1996). También se han usado cadenas laterales de estirilpiridinio y estirilquinolinio como cromóforos fotorreactivos (Ichimura et al., 1979, 1986 y 1988). Además de poliésteres que contengan en su estructura grupos fotorreactivos dimerizables como monómeros constituyentes, se ha llevado a cabo la síntesis de policarbonatos de similares características (Hu et al., 2009). La mayoría de los policarbonatos se basan en la presencia en su estructura de bisfenol A. La introducción de este glicol rígido conduce a materiales resistentes al calor. La reacción se puede llevar a cabo con fosgeno, el cual formará la unión carbonato entre el -OH del bisfenol A y el -OH del diol que se desea polimerizar. Este diol puede ser el mismo grupo fotoentrecruzable o bien poseer una función a la cual posteriormente pueda unirse un grupo fotodimerizable.

Existen otros cromóforos de interés, como son la dimetilmaleimida (Reiser, 1989; Seiffer et al., 2007), difenilciclopropeno (DeBoer 1973; Deboer et al., 1973) y cumarina (Yoshiki et al. 1990; Nechifor, 2009; Ling et al., 2011), que conducen a la formación de dímeros policíclicos. Así, por ejemplo, se ha incorporado dimetilmaleimida en varios copolímeros acrílicos. Otro fotopolímero de interés se obtuvo al introducir difenilciclopropeno en alcohol polivinílico. El tiempo de vida media del estado triplete excitado del difenilciclopropeno es superior al de cualquier otro cromóforo que dimerice, por lo que las resinas basadas en difenilciclopropeno poseen una elevada rapidez fotográfica. Por último, se ha utilizado también la cumarina para originar entrecruzamientos entre cadenas poliméricas; este grupo se encuentra normalmente anclado lateralmente a la estructura base del polímero.

#### **1.2.2.5. Polímeros por entrecruzamiento derivados de esteres cinámicos**

Los monómeros o polímeros que incorporan grupos cinamoilo en su estructura pueden dar lugar a polímeros entrecruzados cuando se someten a irradiación con luz UV, mediante reacciones de fotodimerización. Los dobles enlaces de dos grupos cinamoilo de distintas cadenas dan lugar a cicloadiciones [2+2], formándose fotoentrecruzamientos basados en unidades de ciclobutano (Balaji et al., 2003; Kumar et al., 2007; Rojas-Melgarejo et al., 2007), tal y como se ha explicado anteriormente. Se ha descrito en la literatura la existencia de algunos polímeros cinamoilados que también pueden ser entrecruzados térmicamente, pero en este caso el entrecruzamiento se llevaría a cabo presumiblemente mediante un mecanismo radicalario (Sung et al., 2006). Además del cinamato de polivinilo, se ha preparado recientemente una larga lista de sustancias fotorreactivas análogas a éste. Algunos ejemplos de sustancias fotoentrecruzables sintéticas basadas en grupos cinamoilo son: 4-metoxicinamato de polivinilo (Rajesh et al., 1998), poli[4-(2'-bromocinamoil)fenil metacrilato] (Balaji et al., 2003), poli[4-bromocinamoilfenil acrilamida] (Selvan et al., 2005), poli[etil  $\alpha$ -ciano-(metacriloxi) cinamato] (Mahy et al., 2006), poli[fenil-4'-(*m*-metacrililoiloxialquiloxi) cinamato] (Kumar et al., 2007), polilactidas con grupos cinamoilo anclados (Nagata e Inaki, 2009), copolímero formado por 5-metil-5-cinamoiloximetil-1,3-dioxan-2-ona y L-lactida (Hu et al., 2009) y cinamato de polimetilestireno, obtenido mediante reacción de ácido cinámico con poliestireno previamente clorometilado (Yi et al., 2011). Cabe destacar que la síntesis de los ésteres cinámicos de una gran variedad de carbohidratos (Rojas-Melgarejo et al., 2004a, 2004b, 2004c, 2006; Marín-Zamora et al., 2005, 2007a) ha sido llevada a cabo por parte de nuestro grupo de investigación.

Este tipo de compuestos, además de ser utilizados para cualquiera de las aplicaciones generales de los fotopolímeros entrecruzables expuestas en el siguiente apartado, tienen una gran utilidad en la fabricación de materiales fotoalineados. Es decir, se han obtenido cristales líquidos basados en polímeros con grupos cinamoilo, donde la dimerización de los dobles enlaces, producida por irradiación con luz ultravioleta polarizada, confiere una orientación y ordenación molecular que da lugar a un material anisótropo (Rajesh et al., 1998; Kumar et al., 2007; Zhang et al., 2007; Kurioz et al., 2008). La anisotropía consiste en la dependencia de las propiedades de un material según la dirección que en ellos se considere y afecta a propiedades mecánicas, eléctricas y ópticas.

### **1.2.3. Aplicaciones generales**

Entre las aplicaciones industriales y científicas más importantes de los polímeros fotosensibles cabe mencionar las siguientes:

#### **Aplicaciones médicas**

Estos materiales se han utilizado para la fabricación de empastes en odontología y de prótesis óseas, en la obtención de hidrogeles que pueden actuar como lentes intraoculares, como materiales adhesivos capaces de unir tejidos y para el encapsulamiento de especies de interés y posterior liberación controlada (Peiffer, 1997; Ishihara et al. 2001; Baroli, 2006; Seppala et al., 2011; Buruiana et al., 2012).

#### **Recubrimiento de superficies**

Los fotopolímeros han sido utilizados ampliamente en el revestimiento de superficies con fines decorativos y/o protectores (Peiffer, 1997). Por ejemplo, se han utilizado soluciones de poliésteres insaturados y estireno para recubrir superficies de madera, de modo que cuando ocurre la irradiación se forma una capa protectora (García-Ruiz, 2002). También se emplean este tipo de compuestos para otros usos como el tratamiento de las imperfecciones observadas en las planchas de mármol, el recubrimiento de láminas de papel, el acabado de suelos, el recubrimiento de fibras ópticas o de electrodos.

#### **Aparatos electrónicos**

Las fotorresinas tienen una gran importancia en la elaboración de circuitos impresos y/o circuitos integrados que forman parte de los aparatos electrónicos (Peiffer, 1997).

### **Artes gráficas**

Ésta es una de las primeras y más extendidas aplicaciones de las fotorresinas. Dentro del campo de las artes gráficas se han utilizado estos materiales en la elaboración de placas litográficas, placas de texto impreso y placas flexográficas (Cusdin, 1995; Toyama y Sakamoto, 1994; Peiffer, 1997). Además, se han aplicado en la fabricación de tintas de impresión UV (Granat et al., 2004).

### **Materiales ópticos y electro-ópticos**

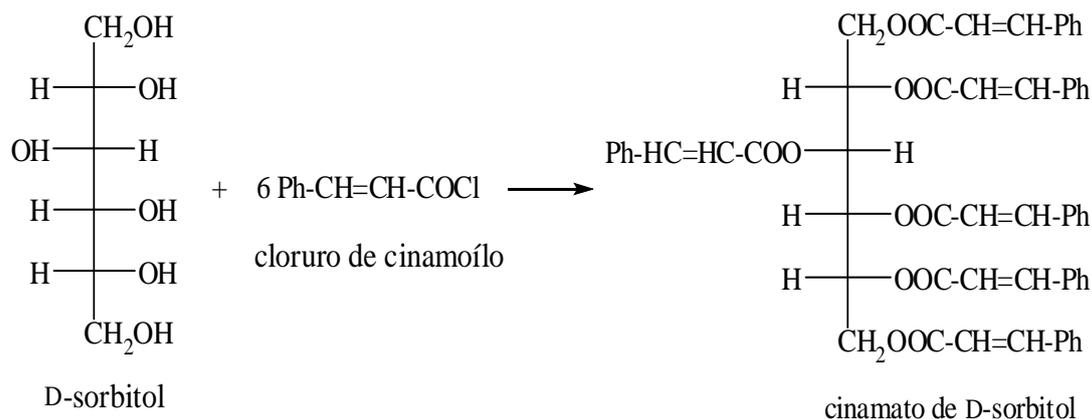
Estos materiales juegan un importante papel en la obtención de pantallas de cristal líquido, inicialmente utilizadas en pequeños aparatos como calculadoras, pero hoy día ampliado su uso a la construcción de televisores o monitores de ordenador (Peiffer, 1997; Seo et al., 2007; Zhang et al., 2007; Kurioz et al., 2008). Estos materiales son también de gran importancia en holografía, haciendo posible la reconstrucción de imágenes en tres dimensiones (Banyasz, 2000; Lawrence et al., 2001; Neipp et al., 2003; Kwan et al., 2009; Breemen et al., 2011).

#### **1.2.4. Ésteres cinámicos de carbohidratos**

Nuestro grupo de investigación, “Química de carbohidratos, polímeros y aditivos industriales” (QCPAI), ha sido pionero en la síntesis de una gran variedad de cinamatos de hidratos de carbono (Moliner-Mallén, 1986; Rojas-Melgarejo, 2002). Concretamente, hemos llevado a cabo la obtención y caracterización de los ésteres cinámicos de: glicerina, D-sorbitol, D-manitol, D-arabinosa, D-fructosa, D-glucosa, ácido D-gulónico, ácido D-glucurónico, D-glucosona, 1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-glucofuranosa, etil-D-glucopiranosido, sacarosa, maltosa, inulina, dextrano, dextrina, almidón; y el derivado parcialmente cinamoilado 3,5,6-tricinamoil-D-glucofuranosa. Estos compuestos, tal y como se ha explicado anteriormente, tienen la característica de experimentar reacciones de fotoentrecruzamiento por irradiación con luz UV, dando lugar a redes tridimensionales con un carácter más insoluble. La utilización para inmovilización de estos soportes ha sido ampliamente desarrollada por el grupo de investigación, tanto como método general (García-Ruiz, 2004) como para la inmovilización de las enzimas peroxidasa y  $\beta$ -galactosidasa (Rojas-Melgarejo et al., 2004a, 2004b, 200c, 2006), tirosinasa (Marín-Zamora et al., 2005, 2006, 2007a, 2007b, 2009) e invertasa recombinante (Vallejo-Becerra et al., 2008). Recientemente, se ha publicado un artículo donde otros autores (que nos citan en su trabajo) han sintetizado el éster cinámico de la trehalosa (un disacárido) y llevado a cabo el estudio de su fotoentrecruzamiento (Teramoto y Shibata, 2007).

### 1.2.4.1. Obtención y caracterización

Los derivados cinamoilados de los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos estudiados han sido preparados siguiendo una variante del método propuesto por Van Cleve (Van Cleve, 1963), que consiste en hacer reaccionar el carbohidrato deseado con el reactivo cloruro de cinamoílo, ambos disueltos normalmente en piridina.



**Figura 1.15.** Esquema de la reacción de síntesis del éster cinámico de D-sorbitol.

Los ésteres cinámicos de carbohidratos obtenidos han sido caracterizados mediante la realización de análisis elementales, análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría visible-UV, espectroscopía de infrarrojo (IR) y análisis térmicos (Moliner-Mallén, 1986; Rojas-Melgarejo, 2002).

Los espectros de RMN de protón muestran generalmente señales a:  $\delta \cong 4.4\text{-}4.9$  ppm y  $\delta \cong 5.3\text{-}6.1$  ppm debidas a los protones del carbohidrato;  $\delta \cong 6.4\text{-}6.6$  ppm y  $\delta \cong 7.7\text{-}7.9$  ppm debidas a los protones vinílicos; y  $\delta \cong 7.4$  ppm debida a los protones aromáticos. La relación entre los resultados de la integración de las diferentes señales da información sobre el grado de esterificación, que para nuestros soportes se pretende que sea del 100%. La ausencia de la banda de OH en espectros de RMN- $^1\text{H}$  indica cinamoilación completa, que puede confirmarse cuando no desaparece ninguna banda de ese espectro al realizarlo añadiendo agua deuterada.

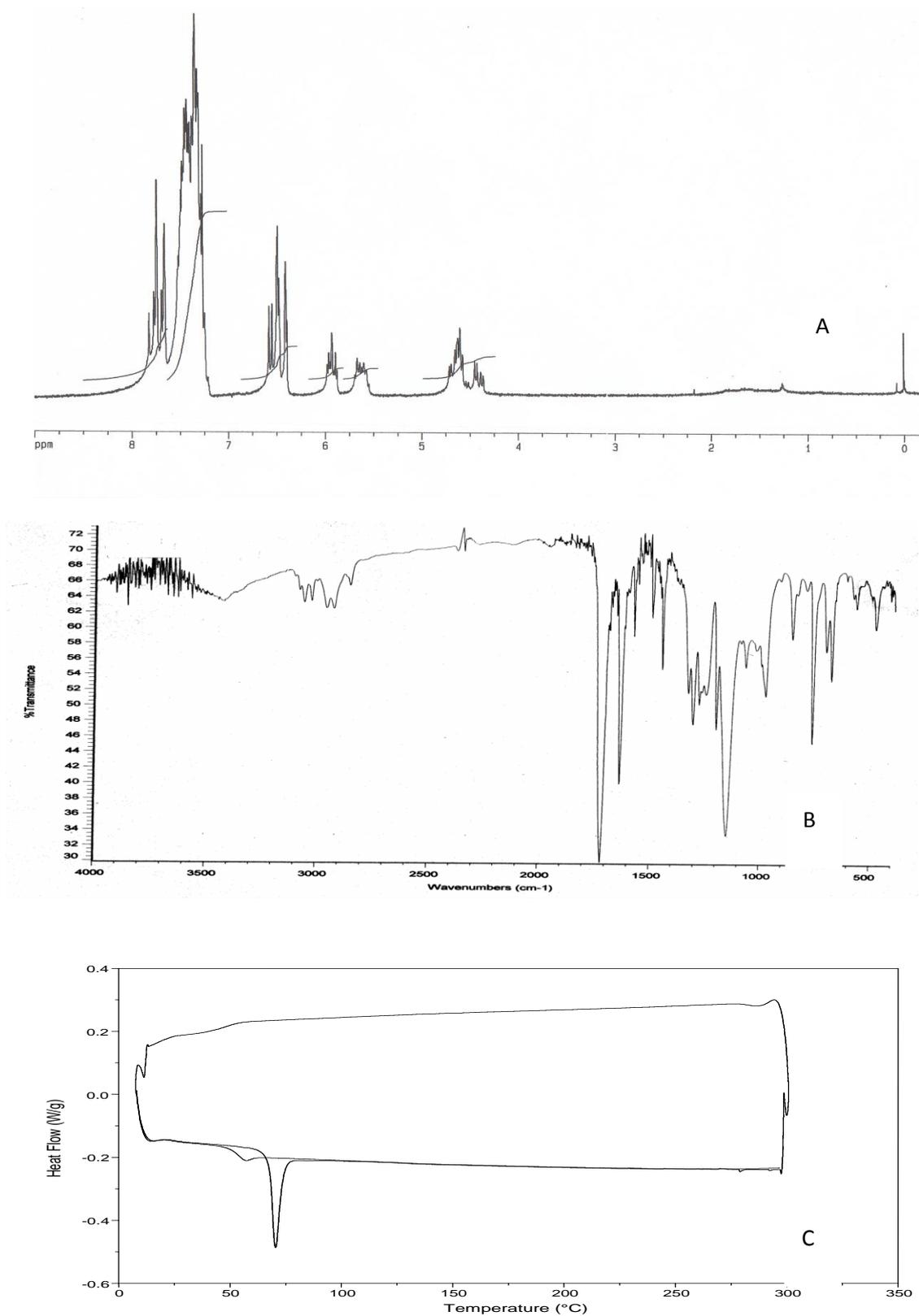
Los espectros de UV-visible muestran máximos de absorción a longitudes de onda de 278-280 nm, correspondientes a la banda típica de absorción del doble enlace del grupo cinamoílo.

En los espectros de IR se pueden distinguir las bandas típicas de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados a 1720, 1312 y 1160  $\text{cm}^{-1}$ ; las debidas al doble enlace carbono-carbono (trans) conjugado a 1637, 1285, 980 y 865  $\text{cm}^{-1}$ ; las correspondientes al núcleo aromático a 1600, 1500 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  y por último; las características del benceno monosustituido a 770 y 685  $\text{cm}^{-1}$ . Aparecen también las bandas correspondientes al polisacárido, tales como las de 1331, 1100, 1072 y 960  $\text{cm}^{-1}$ , por ejemplo. La ausencia de la banda característica del grupo hidroxilo (-OH) entre los 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$ , prueba que se trata de un compuesto totalmente cinamoilado.

El análisis térmico diferencial muestra en el caso de los derivados totalmente cinamoilados de polisacáridos y oligosacáridos, pequeños picos de absorción de calor en la primera rampa térmica, mientras que en la segunda rampa no se observan puntos de fusión ni de transición vítrea en el intervalo entre 0 y 300°C. Por lo tanto, todos estos soportes de inmovilización serán muy estables a las temperaturas de trabajo habituales, incluso sin necesidad de ser entrecruzados.

Sin embargo, los compuestos polihidroxílicos muestran picos agudos de absorción de calor mientras que en la segunda rampa ya no se detectan pues las muestras han oligomerizado. Por lo tanto, estos soportes, al igual que los anteriormente citados, serán muy estables a la temperatura, pero será necesario su entrecruzamiento previo a su utilización. Un comportamiento similar muestran los derivados de D-fructosa, D-glucosa y D-glucosona.

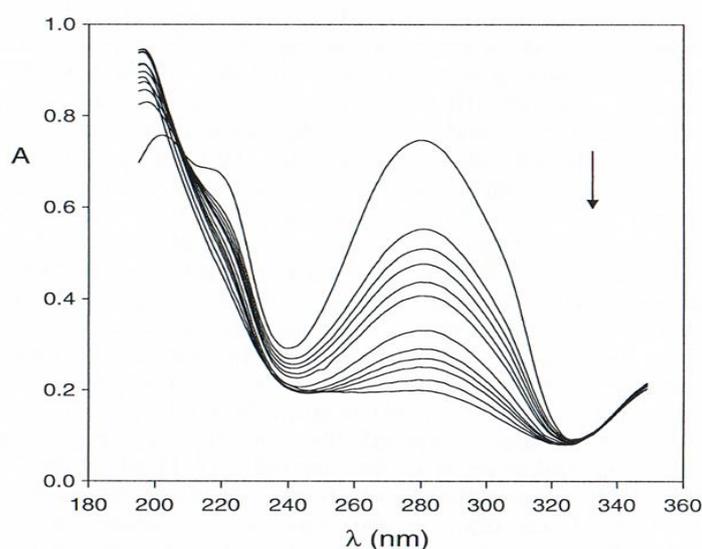
Por último, dentro del grupo de derivados cinamoilados de monosacáridos, los de D-arabinosa y 1,2-O-isopropilidén- $\alpha$ -D-glucofuranosa presentan puntos de fusión definidos a temperatura relativamente bajas tal que aún en la segunda rampa de calentamiento aparecen picos de absorción de calor debido a la presencia de moléculas que no han oligomerizado tras calentar inicialmente a 300°C. Estos compuestos deberán ser altamente entrecruzados para obtener soportes que no sufran alteraciones térmicas.



**Figura 1.16.** Espectro  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (A), espectro IR (B) y análisis térmico diferencial (C) de hexacinnamato de *D*-sorbitol.

### 1.2.4.2. Fotoentrecruzamiento

Estos prepolímeros contienen varios grupos cinamoilo en su estructura, lo que permite que al ser irradiados con luz UV se produzca la formación de un polímero entrecruzado, obtenido por el entrecruzamiento de grupos cinamoilo pertenecientes a distintas moléculas mediante cicloadición [2+2]. El procedimiento para llevar a cabo el fotoentrecruzamiento consiste en extender una película del prepolímero sobre una superficie, dejar evaporar el disolvente y posteriormente irradiar con luz UV. Conforme aumenta el tiempo de exposición a la luz UV (tiempo de irradiación) va aumentando también el grado de entrecruzamiento, hasta que llega un momento en que la fotopolimerización se ha completado. El seguimiento del grado de entrecruzamiento puede llevarse a cabo mediante un espectrofotómetro de UV-visible o análisis de RMN-<sup>1</sup>H (Rojas-Melgarejo et al., 2007). En el primer caso (el más sencillo), se miden los cambios de absorción a la longitud de onda de 280 nm, correspondiente a la absorción del doble enlace del grupo cinamoilo (cromóforo). Conforme aumenta el tiempo de irradiación se puede observar que disminuye la intensidad de la absorción del doble enlace, ya que éste va desapareciendo al dar lugar a la formación de unidades de ciclobutano. Por otro lado, en los espectros de RMN de protón se toma como referencia las señales pertenecientes al anillo aromático y se puede observar cómo las pertenecientes a los protones vinílicos van disminuyendo respecto a éstas conforme aumenta el tiempo de irradiación.



**Figura 1.17.** Cambios en el espectro UV del hexacinaamato de D-manitol durante la irradiación. De arriba a abajo, tiempos de irradiación: 0, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 300, 450 y 600 s.

En un estudio reciente de este grupo de investigación (Rojas-Melgarejo et al., 2007) se ha comprobado que se puede controlar el grado de entrecruzamiento entre monómeros de cinamato de D-manitol añadiendo como bloqueador de cadena un cinamato monofuncional (cinamato de *p*-nitrofenol). El cinamato monofuncional actúa como bloqueador de cadena (tapón de cadena), ya que al contar este reactivo con un solo grupo cinamoilo no permite que la cadena polimérica siga creciendo.

#### **1.2.4.3. Ventajas en la inmovilización**

La inmovilización de enzimas mediante la utilización de estos monómeros o polímeros fotoentrecruzados presenta numerosas ventajas. En primer lugar cabe mencionar la fácil preparación del soporte de inmovilización, que se obtiene simplemente por formación de una película del derivado cinamoilado y posterior irradiación con una fuente luminosa adecuada. Tras la irradiación ningún disolvente orgánico será requerido, viéndose favorecida la actuación de las enzimas que normalmente sufren desnaturalización en estos medios. Además, en caso de querer utilizar un medio orgánico también sería posible, ya que la insolubilización que produce el entrecruzamiento lo permitiría. La inmovilización de la enzima es posible de manera muy sencilla, simplemente poniendo en contacto el soporte con una disolución acuosa de ésta, la enzima se inmoviliza por adsorción hidrófoba en los soportes totalmente cinamoilados y entrecruzados. La naturaleza del monómero, así como el grado de cinamoilación y de entrecruzamiento, pueden afectar a aspectos tan importantes como el tamaño molecular, grado de hidrofobia/hidrofilia del soporte y su porosidad, lo que permitiría diseñar el soporte de inmovilización más adecuado según la naturaleza de la enzima y de la reacción catalítica. Por último, otros métodos de inmovilización también serían posibles eligiendo el monómero adecuado e introduciendo los grupos funcionales necesarios.

## **1.3. TIROSINASA**

La investigación sobre tirosinasa tiene ya una larga historia, pues los primeros trabajos se remontan a alrededor de un siglo atrás. Su estudio ha sido abordado desde diversas disciplinas, incluyendo la biofísica, genética, química teórica, bioquímica, espectroscopía, química aplicada y medicina. Sin embargo y a pesar de su larga andadura, cabe decir que aún siguen sin conocerse completamente algunos aspectos de su estructura y mecanismo. Además, actualmente siguen siendo objeto de estudio sus posibles aplicaciones, especialmente tras la inmovilización.

En los siguientes apartados se tratarán las principales características de las tirosinasas de diversos organismos, entre ellas sus funciones fisiológicas y propiedades generales, así como los aspectos fundamentales de su sitio activo y su mecanismo de reacción. También se hará referencia a los diversos estudios de inmovilización realizados sobre dicha enzima y las aplicaciones de los mismos.

### **1.3.1. Características generales**

La enzima tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) (monofenol, *o*-difeno: oxígeno óxido-reductasa, EC 1.14.18.) es una cuproproteína de tipo 3 que cataliza dos tipos de reacciones acopladas en las que interviene oxígeno molecular, (a) la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y (b) la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa).

En los organismos aerobios la mayor parte del oxígeno consumido es reducido a agua en la oxidasa terminal de la cadena respiratoria. Sin embargo, también se utiliza una cantidad significativa del mismo en reacciones catalizadas por una clase de enzimas denominadas oxigenasas. Estas enzimas incorporan uno o dos átomos de oxígeno por mol de sustrato, por lo que se dividen respectivamente en monooxigenasas y dioxigenasas. Las monooxigenasas, llamadas oxidasas de función mixta, catalizan la reducción de un átomo de oxígeno a agua, mientras el otro es transferido al sustrato. Estas enzimas pueden presentar cuatro tipos distintos de grupos prostéticos: cobre, hierro no "hemo", hierro "hemo" y flavinas. Las monooxigenasas que contienen cobre como grupo prostético representan un grupo bastante reducido en comparación con las otras tres clases, y a este reducido grupo pertenece la enzima tirosinasa (Peñalver-Jara, 2006).

### 1.3.1.1. Funciones fisiológicas

La enzima tirosinasa es una enzima ampliamente distribuida en toda la escala filogenética, que ha sido aislada a partir de un gran número de especies. La gran variedad de posibles sustratos y la elevada reactividad de las o-quinonas generadas determinan la participación de esta enzima en procesos fisiológicos tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de los artrópodos y la biosíntesis de melaninas (Lozano y Solano, 1989; Sugumaran, 2001; Nagai et al., 2007).

Las melaninas son polímeros heterogéneos de carácter polifenólico y estructura poco definida, con coloración variable desde el amarillo hasta el negro (Rosas et al., 2000). La melanogénesis lleva a cabo numerosas funciones fisiológicas en distintos organismos, tal y como se describe a continuación (Halaouli et al., 2006).

En las *frutas*, *hortalizas* y *hongos*, las melaninas son las responsables del pardeamiento que aparece en tejidos que han sufrido algún tipo de daño, corte o infección, expuestos al aire y que ocurre con frecuencia en el almacenamiento post-cosecha, lo que supone un importante problema para el consumo en fresco y la transformación industrial de frutas y hortalizas (Seo et al., 2003). La implicación de la enzima tirosinasa en este proceso ha sido claramente demostrada (Halaouli et al., 2006; Mayer, 2006). Es posible que las melaninas y sus diversos metabolitos precursores (melanógenos) constituyan un mecanismo de defensa de las plantas, debido a sus propiedades bacteriostáticas e inhibidoras de proteasas de insectos (Mayer, 2006; Thipyapong, 2007). En los hongos, se ha establecido que las melaninas están conectadas con la formación de los órganos reproductores y las esporas, la virulencia de los hongos patógenos y la protección de tejidos después de resultar dañados (Halaouli et al., 2006).

En los *invertebrados*, la melanina aparte de dar pigmentación, está envuelta en otros importantes procesos fisiológicos, como mecanismos de defensa o inmunidad, para protegerse de la invasión de microorganismos y otros parásitos (Nappi et al., 2005). En algunos insectos y artrópodos, la producción de melanina es utilizada para encapsularse ante organismos extraños o para llevar a cabo el proceso de esclerotización, favoreciendo el endurecimiento de la cutícula (Parkinson et al., 2001; Nagai et al., 2007). Además, la formación de melanina en sitios dañados previene la pérdida de sangre, mientras que los precursores de quinonas melanogénicas citotóxicas podrían actuar atacando microorganismos en el sitio herido.

En los cefalópodos, la acción de las melaninas también es de defensa. Al ser atacados expulsan tinta, una sustancia de naturaleza melánica, que les permite ocultarse y bloquear el olfato de sus depredadores (Russo et al., 2003).

Dentro del grupo de los *vertebrados*, los peces, anfibios y reptiles llevan a cabo rápidos cambios de coloración, con fines de camuflaje, provocados por la reorganización de gránulos de pigmentos en la epidermis (Caliman et al., 2005).

Sin embargo, el sistema melánico más conocido es el de los *mamíferos* cuya piel, cabello y ojos muestran variaciones debidas a numerosos factores, siendo el más determinante de ellos el grado y la distribución de los pigmentos de melanina. Los pigmentos de melanina participan en procesos de reconocimiento y atracción sexual, camuflaje, termorregulación y protección frente a radiaciones solares (Chi et al., 2006; Herrling et al., 2008). También se han atribuido a las melaninas acciones protectoras frente a diversos agentes tóxicos naturales y algunos fármacos. En los humanos, la principal función de las melaninas es la fotoprotección de la piel mediante la absorción de radiaciones UV, pues de no ser absorbidas estas radiaciones por estos pigmentos, el ADN podría resultar dañado a través de la formación de especies reactivas de oxígeno. La deficiencia humana en melaninas provoca el albinismo y el vitíligo, que son dos enfermedades caracterizadas por la aparición en la piel de zonas sin pigmentar (Spritz et al., 2003). La producción anormal de melanina puede manifestarse en forma de pecas, melasmas (grandes manchas oscuras en la piel) y lunares (manchas de sol). Actualmente, existe un gran interés hacia la implicación de las melaninas en los melanomas malignos, tumores cancerosos de la piel cuya incidencia está aumentando entre la población, probablemente debido a una mayor exposición a las radiaciones solares y a la disminución de la capa de ozono sobre la Tierra (Kaur y Hill, 2001; Godbole et al., 2006). Por otra parte, se ha comprobado la existencia de melaninas en diversos tipos de neuronas. Se están estudiando las posibles relaciones de las neuromelaninas con lesiones neuronales y con el aumento de la vulnerabilidad selectiva de estas células en la enfermedad de Parkinson (Kulisevsky et al., 2001; Fedorow et al., 2005).

### **1.3.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas**

La enzima tirosinasa del champiñón común, *Agaricus bisporus*, y la del ascomiceto, *Neurospora crassa*, son las más conocidas desde el punto de vista molecular, estructural y cinético (Fan y Flurkey, 2004; Fenoll et al., 2004b; Lerch, 1983; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Peñalver et al., 2005; Selinheimo et al., 2007).

Esta enzima, ha sido extraída y purificada también de muchos tejidos vegetales, entre ellos: manzana (Espín et al., 1995), alcachofa (Espín et al., 1997), aguacate (Gómez-López, 2002), pera (Espín et al., 1996), menta (Kavrayan y Aydemir, 2001), tabaco (Shi et al., 2001), tomate (Newman et al., 1993), latex (Wititsuwannakul et al., 2002), patata (Marri et al., 2003), café (Pereira-Goulart et al., 2003), álamo (Wang y Constabel, 2003), caqui (Núñez-Delicado et al., 2003), mora (Arslan et al., 2004), remolacha (Gandía-Herrero et al., 2004) y melocotón (Cabanés et al., 2007).

La función de la enzima tirosinasa sigue siendo confusa y objeto de controversia (Onsa et al., 2000; Mayer, 2006). A este hecho se atribuyen varias características propias del sistema enzimático, como pueden ser su doble actividad (monofenolasa y difenolasa) y la complejidad en su extracción y purificación (Nagai y Suzuki, 2001; Halaouili et al., 2006). Aun así, se han sugerido para ella diversas funciones, basadas casi todas ellas en su capacidad generadora de quinonas, tal y como se describe a continuación.

#### **Participación en procesos biosintéticos**

Se ha relacionado la enzima tirosinasa con la obtención de *o*-difenoles y la biosíntesis de fenilpropanoides y betalainas (Azcón-Bieto et al., 1993; Strack et al., 2003; Gandía-Herrero et al., 2005a). Sin embargo, aún no se han obtenido resultados concluyentes al respecto (Mayer, 2006).

#### **Actuación como transportador electrónico**

Se ha sugerido la actuación de tirosinasa como transportador electrónico, ya que las *o*-quinonas que produce poseen un alto poder oxidante (Mayer y Harel, 1979; Mayer, 2006). Ha sido postulada su intervención en la “Reacción de Mehler”, un sistema de transporte electrónico no cíclico que incluye oxígeno como aceptor terminal (Tolbert, 1973). También se cree que esta enzima está asociada con los fotosistemas I y II y se especula con su posible participación en la producción de ATP y la regulación de O<sub>2</sub> (Lax y Vaughn, 1991). Recientemente, se ha demostrado que la tirosinasa *melB* de *Aspergillus oryzae* funciona como transportador de oxígeno (Fujieda et al., 2012).

#### **Intervención en la regulación del crecimiento de las plantas**

A este respecto, se ha observado que los niveles de tirosinasa en tejidos de zanahoria mantenidos en cultivo aumentan en la etapa de crecimiento de la raíz. También se ha comprobado que durante la fase de maduración de ciertas frutas resulta inducida la producción de tirosinasa (Joy et al., 1995).

### **Acción de defensa**

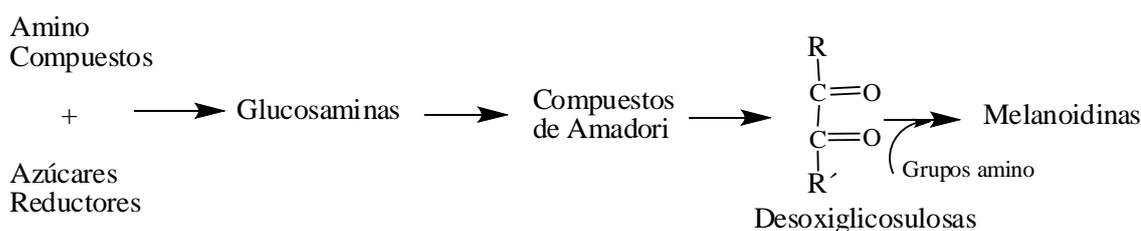
Frecuentemente se asocia a la actuación de tirosinasa en hongos y plantas una función de defensa (Mayer, 2006; Thipyapong et al., 2007). Así, un corte, daño o infección en un tejido produce la mezcla de la enzima con sus sustratos, que hasta el momento han estado confinados en otros compartimentos celulares, dando lugar a la formación de *o*-quinonas. Éstas pueden unirse a proteínas, inactivándolas, o polimerizar dando lugar a melaninas. Tanto las melaninas como las *o*-quinonas tienen un gran poder bacteriostático e incluso se ha comprobado su capacidad para inactivar parcialmente un tipo de virus de la patata (Pierpoint et al., 1977). En este sentido, se conoce desde hace tiempo que la producción de quinonas es esencial en la resistencia de la manzana a la infección por *Venturia inequalis* y que ayudan también a prevenir la extensión de la infección por *Botrytis cinerea* en haba (Deverall, 1961). Estudios realizados recientemente sobre plantas de tomate transgénicas han demostrado que un mayor nivel de tirosinasa provoca un aumento de la resistencia de la planta frente a la bacteria *Pseudomonas Syringae*, así como a diversos insectos (Thipyapong et al., 2007). También se ha establecido una posible correlación entre los niveles de tirosinasa en la planta y su grado de resistencia al estrés hídrico, sugiriéndose que niveles bajos de tirosinasa ocasionan una mejor resistencia a la sequía (Thipyapong et al., 2004; Mayer, 2006). En hongos parece claro que la función de la enzima tirosinasa radica en la formación de melaninas durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos y esporas (Bell y Wheeler, 1986), incrementando así la resistencia de las paredes celulares de las esporas a las enzimas hidrolíticas originadas por bacterias, tales como glucanasa y quitinasa (Halaouli et al., 2006).

### **Intervención en el proceso de pardeamiento de frutas y hortalizas**

Un gran número de estudios ha relacionado la enzima tirosinasa con el proceso de pardeamiento que tiene lugar en frutas y hortalizas (Mayer, 2006; Vitti et al., 2011; Loizzo et al., 2012). El proceso de pardeamiento de los alimentos abarca reacciones de aminoácidos, proteínas, glúcidos, lípidos y fenoles que causan el deterioro de champiñones, frutas y hortalizas durante su almacenamiento y su procesamiento doméstico, comercial e industrial. La pérdida en calidad nutritiva y potencialmente en seguridad se atribuye a la destrucción de aminoácidos esenciales, descenso en digestibilidad, inhibición de enzimas proteolíticas y glucolíticas, interacción con cationes metálicos y formación de sustancias antinutritivas y tóxicas (Kim y Uyama, 2005). Este pardeamiento puede ser de dos tipos: enzimático y no enzimático (Rocha y Morais, 2002; Billaud et al., 2005).

### a) Pardeamiento no enzimático

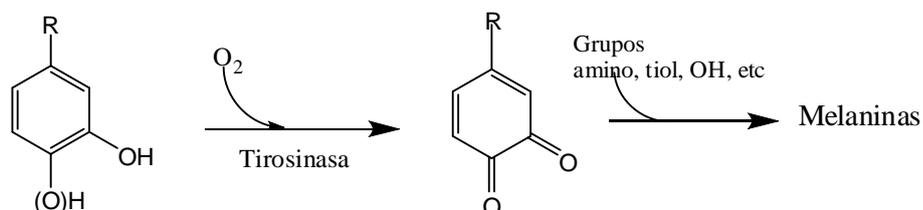
El pardeamiento no enzimático se debe a una serie de reacciones químicas, que se dan principalmente al calentar los alimentos, denominadas reacciones de Maillard (Hidalgo y Zamora, 2000; Finot, 2005; Welner et al., 2011). Se trata de reacciones entre aminas, aminoácidos, péptidos o proteínas (compuestos con un grupo amino libre) con azúcares reductores u otros compuestos, como ácido ascórbico o ácidos grasos oxidados (que contienen un grupo carbonilo libre).



**Figura 1.18.** Esquema del transcurso del proceso de pardeamiento no enzimático.

### b) Pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático es el principal causante del oscurecimiento de los tejidos vegetales. Este proceso ocurre debido a alteraciones celulares, originadas por lesiones mecánicas o cambios de temperatura, que dan lugar a la descompartimentación de sustratos y enzimas. La enzima tirosinasa es la responsable en mayor medida del proceso de pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas (Rodríguez-López et al., 1999; Rocha y Morais, 2002; Mayer, 2006), aunque otras enzimas como las lacasas y peroxidasas también pueden contribuir al mismo (Chilaka et al., 2002; Nagai, 2003).



**Figura 1.19.** Esquema del transcurso del proceso de pardeamiento enzimático.

La actuación de tirosinasa sobre monofenoles y *o*-difenoles da lugar a la formación de *o*-quinonas, que a su vez experimentan reacciones de polimerización generándose los indeseados productos de naturaleza melánica, de color pardo/marrón, que originan además del cambio de color, alteraciones en el aroma y sabor, en la textura y propiedades nutritivas de estos alimentos (Kim y Uyama, 2005; Muñoz-Muñoz et al., 2009).

Otras enzimas como las lacasas y peroxidases pueden también contribuir al proceso de pardeamiento. Las frutas y hortalizas parecen estar casi desprovistas de lacasa (Billaud et al., 2003), por lo que su influencia en el oscurecimiento se considera mínima. Las peroxidases, mucho más difundidas en el reino vegetal, no suelen intervenir de forma decisiva en el proceso de oscurecimiento debido al bajo contenido de peróxido de hidrógeno existente en los tejidos vegetales (Billaud et al., 2003; Toivonen y Brummell, 2008). Aun así, se han descrito determinados casos en los que se reconoce que la enzima peroxidasa juega un papel de cierta relevancia en dicho proceso (Gandía-Herrero et al., 2003; Chisari et al., 2007), debido posiblemente a una actuación sinérgica peroxidasa–tirosinasa, donde la primera utiliza el peróxido de hidrógeno e intermedios oxidables originados por la actuación de la segunda (Chisari et al., 2008).

El pardeamiento enzimático es característico del champiñón, en el cual predomina sobre el pardeamiento no enzimático. El champiñón recolectado sufre un oscurecimiento que se incrementa con el tiempo post-cosecha, así como con la iluminación, la ventilación y el calentamiento ambiental, especialmente cuando los carpóforos sufren golpes, cortes o rasgaduras. La enzima tirosinasa es, sin lugar a dudas, la principal responsable del pardeamiento en el champiñón (Jolivet et al., 1998). Este fenómeno supone un grave problema a nivel industrial y provoca grandes pérdidas económicas en el sector del champiñón, al reducir la vida útil del producto (Seo et al., 2003). Por esta razón, se han desarrollado numerosas estrategias con la finalidad de atenuar o eliminar el proceso de pardeamiento enzimático. Estas técnicas consisten en la inactivación de la enzima por altas temperaturas, ácidos, inhibidores, eliminación del medio de alguno de los sustratos de la reacción o reducción de los productos quinónicos (Kim y Uyama, 2005). Estos procedimientos se comentan detalladamente en el apartado 1.3.4.3 de la presente Memoria, referido a las aplicaciones de la regulación enzimática de tirosinasa.

## 1.3.2. Estructura

### 1.3.2.1. Propiedades moleculares

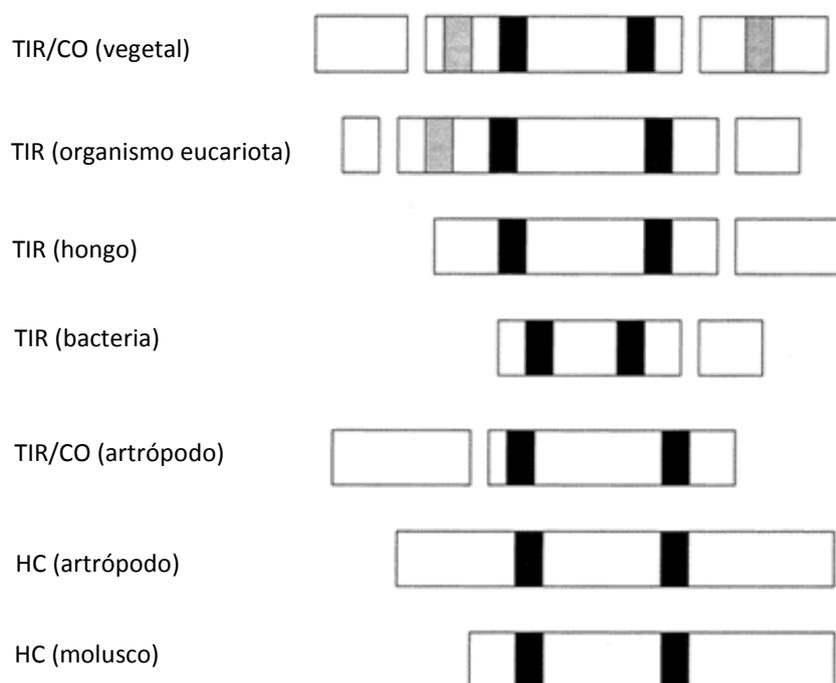
El nivel y localización predominante de tirosinasa en la célula depende de la especie, variedad, madurez y edad (Vámos-Vigyázó, 1981). Se trata de una enzima intracelular que en las plantas más evolucionadas se localiza principalmente en la membrana tilacoidal del cloroplasto, pero también puede encontrarse en la mitocondria, microsoma, peroxisoma y citoplasma (Mayer, 2006; Zawistowski et al., 1991). En hongos y frutos se suele considerar como una enzima citosólica (Mayer, 2006; Halaouli et al., 2006). En mamíferos, se encuentra ligada a la membrana de los melanosomas y en la especie bacteriana *Streptomyces*, la enzima es secretada fuera de la célula.

Se ha encontrado una gran variedad de formas múltiples de tirosinasa, la mayoría originadas por artificios de la extracción (Vámos-Vigyázó, 1981; Halaouli et al., 2006). A pesar de ello el empleo de nuevas técnicas de cromatografía y de purificación con adsorbentes específicos ha permitido la eliminación de algunos de estos isomorfos (Halaouli et al., 2006). Dependiendo de su origen la enzima estará constituida por una o varias cadenas poliméricas. En *Agaricus bisporus* se ha caracterizado como una proteína tetramérica ( $H_2L_2$ ) con una masa molecular de 120 kDa, compuesta de dos subunidades pesadas (H) de aproximadamente 43 kDa y 392 residuos y dos subunidades ligeras (L) de aproximadamente 14 kDa y 150 residuos (Strothkamp et al., 1976; Ismaya et al., 2011a, 2011b). El aislamiento de una forma de tirosinasa monomérica activa de 43 kDa sugiere que la subunidad H de la proteína tetramérica  $H_2L_2$  es tirosinasa, mientras que la función de la subunidad L se desconoce (Ismaya et al., 2011a, 2011b). Tirosinasa de *Aspergillus oryzae* es también una proteína tetramérica, pero formada por subunidades de 67 kDa (Ichishima et al., 1984), mientras que tirosinasa de *Neurospora Crassa* es considerada como un monómero de 46 kDa, formado por proteólisis a partir de un precursor de 75 kDa (Halaouli, 2006). De los frutos de *Lentinula edodes* se han aislado seis isomorfos de tirosinasa, formados por una subunidad con actividad catalítica (54 a 55 kDa) y una subunidad hipotéticamente reguladora (15 ó 50 kDa) (Kanda et al., 1996). La tirosinasa de la bacteria *Bacillus megaterium* puede aparecer en disolución como un monómero de 35 kDa o un dímero de 70 kDa, en un equilibrio que depende de la concentración de enzima (Sendovski et al., 2011).

Tanto en plantas, hongos como en invertebrados existen tirosinasas en forma latente que tienen que ser activadas. La pro-enzima en forma latente parece ser muy estable y en algunos casos ha sido extraída y purificada parcialmente (Gandía-Herrero et al., 2004; Cabanes et al., 2007). En *Agaricus bisporus* se ha determinado que aproximadamente entre el 98-99% de la tirosinasa de champiñón está en forma latente (Espín y Wichers, 1999a, 1999b; Espín et al., 1999). En el mecanismo de activación *In vivo* se ha sugerido la intervención de una proteasa endógena cortando un péptido protector. En cambio, *In vitro*, la pro-enzima puede ser activada mediante una gran variedad de métodos. Se ha descrito la activación de la enzima latente, *In vitro*, mediante choque ácido (Cabanes et al., 2007, Yota et al., 2008) o por tratamiento con detergentes, alcoholes y proteasas. Uno de los detergentes más utilizados con esta finalidad ha sido el dodecil sulfato sódico (Espín y Wichers, 1999a; Gandía-Herrero et al., 2005b, 2005c). También se ha logrado la activación de tirosinasa con alcohol bencílico (Espín y Wichers, 1999b) y proteasas como la tripsina (Gandía-Herrero et al., 2005c) o serín proteasa (Espín et al., 1999).

La secuencia de aminoácidos de diversas tirosinasas pertenecientes a un considerable número de organismos, incluyendo desde procariotas hasta humanos, ha sido estudiada y convenientemente descrita (Gelder et al., 1997; Halaouli et al., 2006; Mayer, 2006; Ismaya et al., 2011b). A pesar de las diferencias taxonómicas, la homología secuencial entre estas proteínas es alta y se han identificado tres dominios que se repiten (Gerdemann et al., 2002).

El dominio central corresponde a la secuencia primaria entre los dos sitios de unión al ión cobre A, CuA, e ión cobre B, CuB. El sitio de unión a CuA y CuB de tirosinasa de bacterias y humana muestra un 42% de aminoácidos idénticos. Para las enzimas de *Neurospora crassa* y *Agaricus bisporus* la homología con humanos es del 44% y 49% respectivamente. En la Figura 1.20, se puede observar la homología secuencial entre distintas proteínas con cobre tipo 3. La zona más conservada en todos los casos se corresponde con las regiones de unión a los iones cobre, ricas en histidinas (His), pues cada ión cobre está enlazado a tres residuos His. Concretamente, la región de unión a CuB es la más conservada, mientras que la región de unión a CuA, presenta algunas diferencias en la secuencia que se consideran responsables de la diferente función asociada a tirosinasas, catecol oxidasas y hemocianinas (Gerdemann et al., 2002).



**Figura 1.20.** Estructura primaria de proteínas con cobre tipo 3.

Las longitudes de los segmentos son proporcionales al número de residuos de aminoácidos. Regiones ricas en histidinas de las uniones a cobre se muestran en negro, regiones ricas en cisteína en color gris (Gerdemann et al., 2002). (TIR: tirosinasa; CO: catecol oxidasa; HC: Hemocianina)

Además de las histidinas características, en tirosinasa de *Agaricus bisporus*, se ha demostrado la presencia de un enlace tioéter entre los residuos cisteína Cys83 e histidina His85 coordinada a CuA, fijando la orientación de esta última (Ismaya et al., 2011b). Este enlace tioéter se mantiene en tirosinasa de *Neurospora crassa*, entre el segundo residuo de histidina en el CuA y una cisteína localizada dos aminoácidos hacia el N-terminal (Lerch, 1982). En hemocianina de molusco y catecol oxidasa también está presente un enlace tioéter (Ling et al., 1994; Decker et al., 2006), pero no en tirosinasa de bacterias (Matoba et al., 2006). El papel de este enlace tioéter no está claro, aunque se especula que imponga restricciones estructurales en la zona de unión a los dos cobre para optimizar el potencial redox y permitir una rápida transferencia electrónica (Ismaya et al., 2011b)

En el dominio N-terminal de tirosinasa de plantas y mamíferos se ha identificado un péptido señal, que sería responsable de dirigir la enzima para ser transportada y procesada en el cloroplasto y melanosoma, respectivamente. Este péptido señal no está presente en la tirosinasa de hongos (Gelder et al., 1997), insectos, ni en el género de bacterias *Streptomyces*.

El tercer dominio presente en algunas tirosinasas es el dominio transmembrana (García-Molina, 2011). En las enzimas de hongos como *Agaricus bisporus* y *Neurospora crassa*, al estar presentes en el citosol no hay evidencia de regiones transmembrana. En plantas superiores y en mamíferos la enzima está insertada en membranas. En el caso de plantas la enzima tiene el cuerpo de la proteína en el lumen, mientras que la parte C-terminal está hacia el estroma. En los melanosomas ocurre algo parecido con el resto C-terminal dirigido al citosol y el resto de la proteína hacia el lumen del melanosoma.

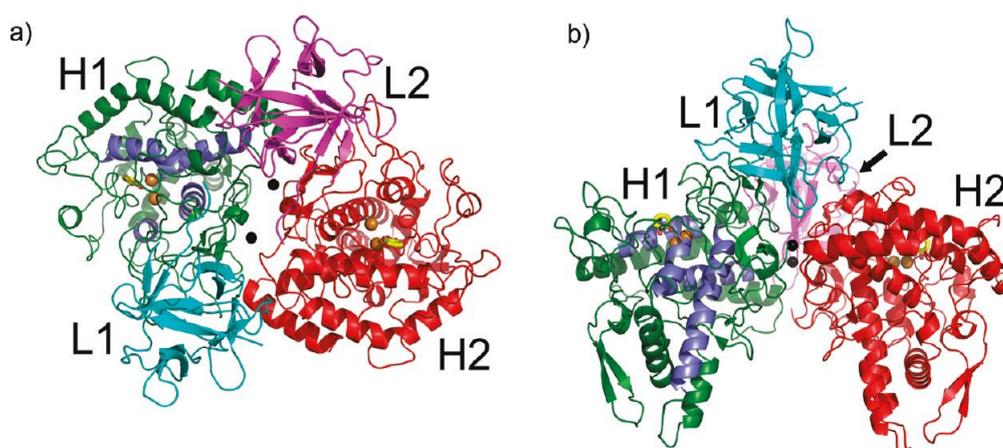
### 1.3.2.2. Estructura tridimensional

La enzima tirosinasa pertenece al conjunto de proteínas con cobre tipo 3, junto a las enzimas hemocianina y catecol oxidasa. Estas proteínas presentan similitudes en su centro activo, pero cada una tiene una función, que viene determinada por su particular estructura. Para determinar la estructura de una enzima es indispensable lograr su cristalización y realizar un análisis posterior mediante difracción de rayos X. En primer lugar se logró la cristalización de las hemocianinas de *Panulirus interruptus* (Volbeda et al., 1984), *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993) y *Octopus dofleini* (Cuff et al., 1998). La enzima catecol oxidasa de *Ipomea batatas* también fue cristalizada y analizada (Klabunde et al., 1998). Posteriormente se llevó a cabo la cristalización de una pro-fenoloxidasas de artrópodo, *Manduca sexta* (Li et al., 2009) y de la polifenol oxidasa de uva, *Vitis vinifera* (Virador et al., 2010a, 2010b). La primera tirosinasa cristalizada fue de origen bacteriano, tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* y se cristalizó formando un complejo con una proteína expresada como ORF 378 (Matoba et al., 2006). También se ha cristalizado una tirosinasa procedente de otra bacteria, *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2010, 2011). Recientemente, se ha logrado por fin, la cristalización de tirosinasa de champiñón del género *Agaricus bisporus* (nuestra enzima objeto de estudio en esta Memoria) y ha sido descrita su estructura tridimensional (Ismaya et al., 2011a, 2011b).

#### Tirosinasa de *Agaricus bisporus*

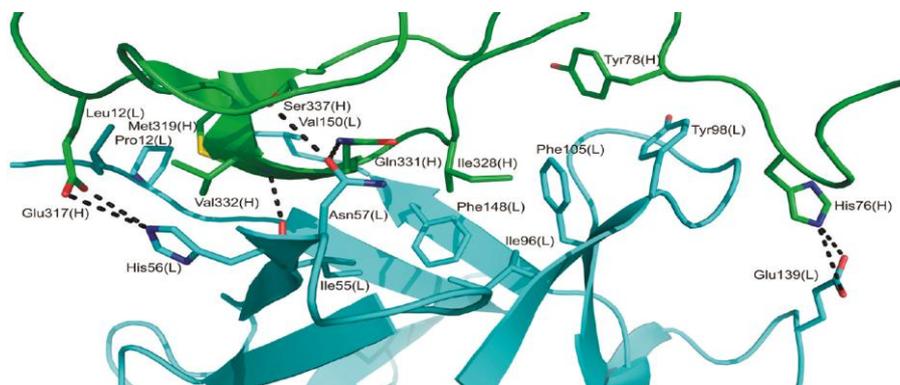
Los cristales de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011b) se han resuelto a 2.03 Å. Se trata de una proteína que cristaliza con uno o dos tetrámeros H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> en la unidad asimétrica. En la Figura 1.21 se puede ver la estructura cuaternaria de la enzima vista desde arriba y lateralmente. El tetrámero está estabilizado por dos iones holmio (Ho<sup>3+</sup>) presentes en la interfase de las subunidades H–H. El holmio es un aditivo análogo al calcio empleado en los experimentos de cristalización.

La interfase H–L de tirosinasa de *Agaricus Bisporus*, representada en la Figura 1.22, cubre un área de aproximadamente 800 Å<sup>2</sup>. La asociación de las subunidades H y L queda estabilizada tanto por interacciones polares como hidrofóbicas. La subunidad H contiene 13 hélices  $\alpha$ , 8 hebras  $\beta$  en su mayoría cortas y varios bucles. Un haz de 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_{10}$  y  $\alpha_{11}$ ) en el centro del dominio da lugar al sitio activo bicúprico de la enzima. La subunidad L contiene un plegamiento tipo lectina, adoptando un pliegue trébol  $\beta$ , que consiste en 12 hebras  $\beta$  antiparalelas ensambladas en un barril cilíndrico de 6 láminas de 2 hebras cada una. Las subunidades H y L aparecen representadas de forma individual en la Figura 1.23.



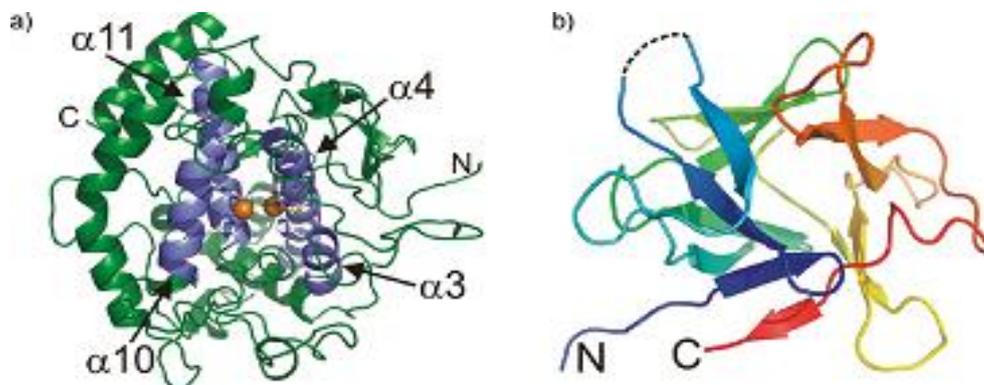
**Figura 1.21.** Estructura del tetrámero H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> de tirosinasa de *Agaricus bisporus*.

a) Vista superior. b) Vista lateral. Pueden apreciarse la subunidad H1 (verde), L1 (cian), H2 (rojo) y L2 (magenta); los iones cobre (esferas marrones) e iones holmio (esferas negras), la tropolona (amarillo) y las 4 hélices  $\alpha$  que conforman el sitio activo (azul). (Ismaya et al., 2011b)



**Figura 1.22.** Región de contacto entre las subunidades H y L de tirosinasa de *A. bisporus*.

Aparecen en verde los átomos de carbono de la subunidad H y en cian los de la subunidad L. Los átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre aparecen en azul, rojo y amarillo, respectivamente. Los enlaces de hidrógeno aparecen como líneas negras discontinuas. (Ismaya et al., 2011b)



**Figura 1.23.** Representación de las subunidades H (a) y L (b) de tirosinasa de *A. bisporus*.

La subunidad H sigue el código de colores de la Figura 1.21. La subunidad L sigue el rango de colores del arco iris desde el azul (N-terminal) al rojo (C-terminal) (Ismaya et al., 2011b).

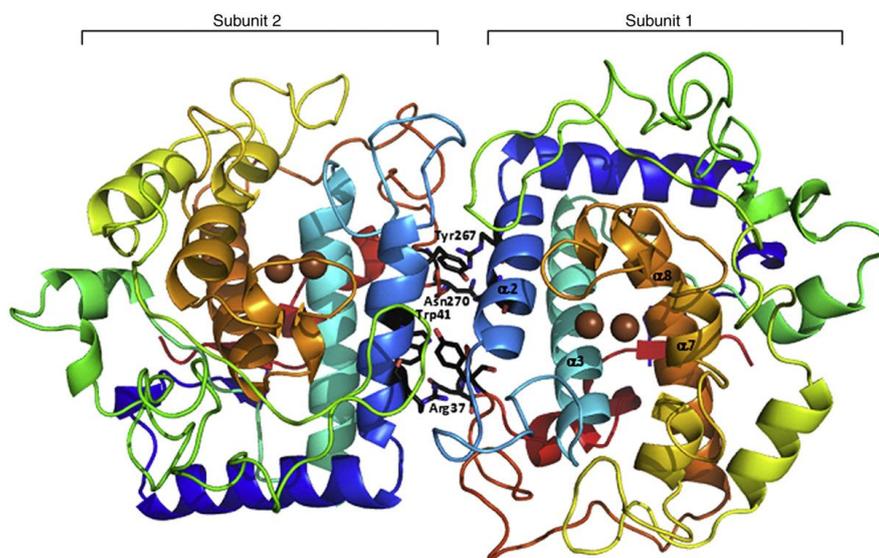
Recientemente, se ha predicho la estructura de cuatro isoenzimas de tirosinasa de *Agaricus bisporus* mediante la utilización de un programa de modelado molecular (Inlow, 2012).

### **Otras proteínas con cobre tipo 3**

Podemos comparar la estructura de tirosinasa de *Agaricus bisporus* con otras estructuras como la de tirosinasa de *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2011) o polifenol oxidasa de *Vitis vinifera* (Virador et al., 2010a, 2010b).

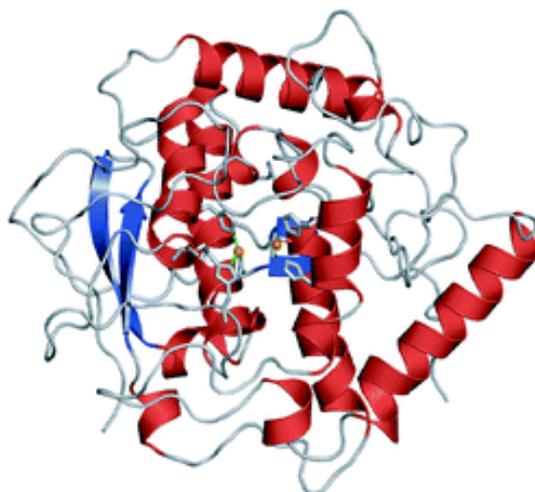
Los cristales de tirosinasa de *Bacillus megaterium* se han resuelto a 2.0-2.3 Å y en la Figura 1.24 se puede ver que la estructura es un dímero de la enzima. Se asocian dos monómeros en una estructura homodimérica que tiene forma de elipse con dimensiones de 45 Å x 25 Å x 80 Å. La hélice  $\alpha$  es la principal estructura secundaria. El sitio activo está formado por una haz de 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_7$  y  $\alpha_8$ ) y cada ión Cu está coordinado por tres residuos de histidina, al igual que ocurre en el resto de proteínas con cobre tipo 3.

Los cristales de polifenol oxidasa de *Vitis vinifera* se han resuelto a 2.2 Å. La estructura es un monómero de 38.4 KDa con forma elipsoidal (Figura 1.25) y con unas dimensiones de 56.7 x 48.0 x 48.3 Å. Al igual que el resto de tirosinasas descritas hasta ahora, el sitio activo está formado por un haz de cuatro hélices  $\alpha$  ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_{12}$  y  $\alpha_{14}$ ) y cada ión Cu está coordinado por tres residuos de histidina.



**Figura 1.24.** Estructura del dímero de tirosinasa de *Bacillus megaterium*.

Se representa la subunidad uno (derecha) y la dos (izquierda) en un espectro N-terminal a C-terminal. Los iones de Cu se representan en marrón. Los contactos entre las dos subunidades Trp41-Tyr267 y Arg37-Asn270 se muestran en negro. Las cuatro hélices desde donde se proyectan los residuos de His que coordinan los iones de cobre se destacan en la subunidad 1 como:  $\alpha 2$  en azul fuerte,  $\alpha 3$  en azul claro,  $\alpha 7$  en amarillo oscuro, y  $\alpha 8$  en naranja (Sendovski et al., 2011).



**Figura 1.25.** Estructura tridimensional de la polifenol oxidasa de *Vitis vinifera* vista en el modelo estructural de cintas (Virador et al., 2010a).

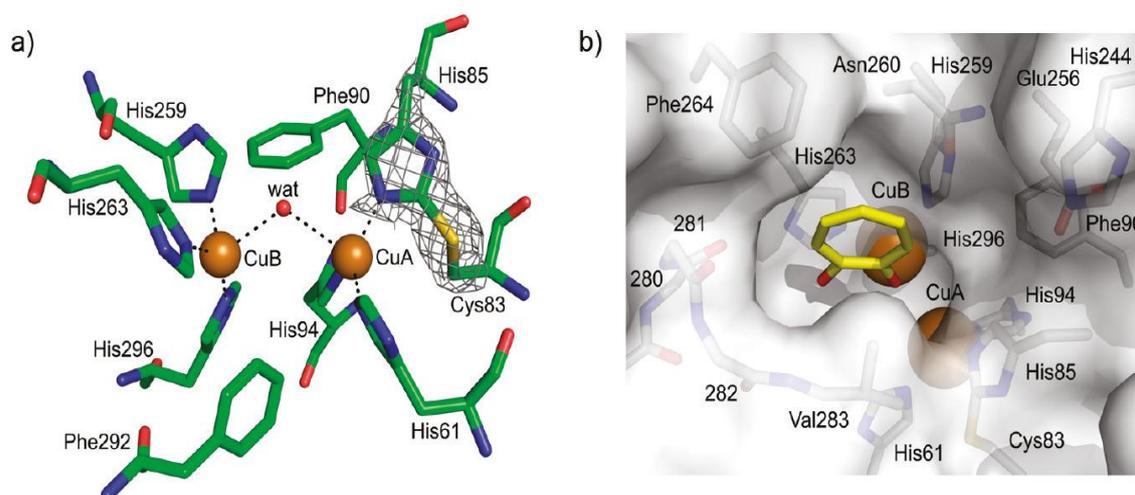
### 1.3.2.3. Sitio activo

#### Tirosinasa de *Agaricus bisporus*

Tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011b) dispone de dos sitios activos situados en las subunidades H del tetrámero. En cada sitio activo se encuentran dos iones cobre, CuA y CuB, coordinados cada uno de ellos a tres residuos histidina. El sitio activo se encuentra en el centro de dos pares de hélices  $\alpha$  antiparalelas ( $\alpha 3/\alpha 4$  y  $\alpha 10/\alpha 11$ ) que forman un ángulo entre sí de aproximadamente  $90^\circ$ , tal y como se puede observar en la Figura 1.23a. El primer ión cobre, CuA, está coordinado a los átomos N $\epsilon$ 2 de His61 (situada al final de la hélice  $\alpha 3$ ), His 85 (situada en el bucle entre  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) y His94 (situada al principio de  $\alpha 4$ ). El segundo ión cobre, CuB, posee como ligandos los átomos N $\epsilon$ 2 de His259, His263 ( $\alpha 10$ ) y His296 ( $\alpha 11$ ). Cuatro de estos residuos (His61, His94, His59 y His263) forman enlaces de hidrógeno entre sus átomos N $\delta$ 1 y un átomo de oxígeno de un grupo carbonilo del péptido. Un enlace tioéter con Cys83 fija la orientación de His85. El único residuo coordinado a cobre cuya cadena lateral no presenta interacciones directas con otros residuos de la proteína es His296. Sin embargo, la cadena lateral de His296 mantiene su posición gracias a un enlace de hidrógeno con una molécula interna de agua, que a su vez establece un enlace de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de His296 y otro enlace de hidrógeno con otra molécula de agua enlazada del mismo modo a O $\delta$ 1 de Asp300 y O de Pro91. Por lo tanto, estas interacciones limitan la libertad rotacional de todos los residuos histidina que coordinan a los iones cobre. Además, Phe90 está incrustada entre His94, His259, y His 296, mientras que Phe292 se encuentra entre His61, His263 y His 296, lo que también contribuye a restringir las conformaciones de las cadenas laterales de estas histidinas y ayuda a mantener la integridad de los sitios de unión al cobre.

La geometría de ambos sitios activos de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al. 2011b) es muy cercana a una geometría plana trigonal. Los iones cobre están ligeramente ( $0.5 \pm 0.1 \text{ \AA}$ ) fuera del plano definido por los átomos N $\epsilon$ 2 de los ligandos. La distancia entre los iones CuA y CuB es de  $4.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$ , similar a la determinada para las formas desoxi de otras proteínas con cobre tipo 3 (Klabunde et al., 1998; Matoba et al., 2006; Yoon et al., 2009; Li et al., 2009), sugiriendo esto que los cristales obtenidos y estudiados son de desoxitirosinasa. Una molécula de agua o ión hidroxilo establece un puente entre los dos iones cobre del sitio activo y contribuye a la obtención de una esfera de coordinación piramidal trigonal para cada ión cobre.

El sitio activo de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011b) se encuentra en el fondo de una cavidad espaciosa situada en la superficie de la subunidad H de la proteína. Esta cavidad es muy accesible ya que no está obstruida ni por la subunidad L ni por bucles de la subunidad H. La tropolona, un inhibidor reversible, se une débilmente sin provocar cambios conformacionales en la proteína formando un complejo pre-Michaelis con la enzima. El detalle del sitio activo se puede observar en la Figura 1.25.



**Figura 1.26.** Sitio activo de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011b).

a) Geometría del sitio activo. Los átomos de C, N, O y S han sido coloreados de verde, azul, rojo y amarillo, respectivamente. Los átomos de cobre están coloreados en marrón.

b) Geometría del sitio activo unido a tropolona (amarillo) en una representación superficial.

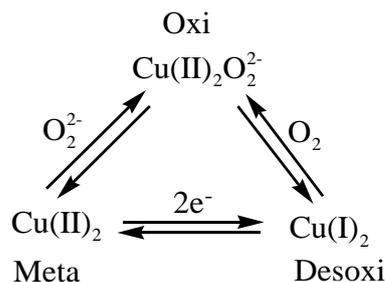
### Otras proteínas con cobre tipo 3

Si comparamos tirosinasa con el del resto de proteínas con cobre tipo 3, se puede ver que el sitio activo es prácticamente idéntico, pero su función varía (Sendovski et al., 2011). En hemocianinas no se ha detectado actividad enzimática alguna, el acceso al sitio activo está bloqueado por la propia proteína, siendo su papel fisiológico únicamente de enlace y transporte de oxígeno (Decker et al., 2006). El residuo Leu2830 o Phe49 se extiende en el sitio de unión al sustrato y éste no puede acceder al centro activo (Hazes et al., 1993; Cuff et al. 1998). Sin embargo, si se logra desplazar estos residuos, se puede obtener actividad fenoloxidasas a partir de una hemocianina (Decker y Rimke, 1998; Cong et al., 2009).

El sitio activo en tirosinasa y en catecol oxidasa está cerca de la superficie de la proteína permitiendo a los sustratos acceder al mismo (Sendovski et al., 2011). El sitio de CuB está muy conservado para catecol oxidasa y tirosinasa, sin embargo hay variaciones en el sitio de CuA, lo que hace que cada enzima tenga una función específica (Eicken et al., 1999). Catecol oxidasa únicamente cataliza la oxidación de difenoles a quinonas, mientras que tirosinasa lleva a cabo además la *orto*-hidroxilación de monofenoles. En catecol oxidasa de *Ipomea batatas* aparece un puente tioéter entre los residuos His109 y Cys92 en el CuA y la falta de actividad monofenolasa se atribuye a la presencia de Phe261 cerca del ión CuA (Klabunde et al., 1998), que es capaz de rotar su cadena lateral permitiendo la entrada del *o*-difenoal al sitio activo pero no del monofenol. En polifenol oxidasa de *Vitis vinifera* existe un puente tioéter entre Cys91 y His108, que provoca que el CuA tenga muchos impedimentos estéricos, no presentando actividad monofenolasa esta enzima, probablemente debido a que el CuA tiene el acceso al monofenol bloqueado (Virador et al., 2010a). En la fenoloxidas de *Manduca sexta*, existe un residuo de ácido glutámico (Glu395), que se encuentra libre y próximo al CuA, y que podría ser el encargado de aceptar el protón proveniente del sustrato fenólico y coordinar la unión del fenolato al CuA, lo cual es fundamental para la *orto*-hidroxilación (Li et al., 2009). En tirosinasa de bacterias se ha comprobado que el sitio activo con los iones de cobre muestra flexibilidad durante la catálisis (Matoba et al., 2006; Sendovski et al. 2011), esto sería debido a una arginina Arg209 que está próxima al CuB y además, se ha propuesto que el monofenol es orientado hacia el CuA, mientras que el *o*-difenoal se une al CuB. No existe un análisis estructural de tirosinasa de mamíferos, pero sí que se ha propuesto un modelo para su sitio activo, basándose en las similitudes entre las secuencias de aminoácidos de distintas tirosinasas (García-Borrón y Solano, 2002).

### **Formas del sitio activo de tirosinasa**

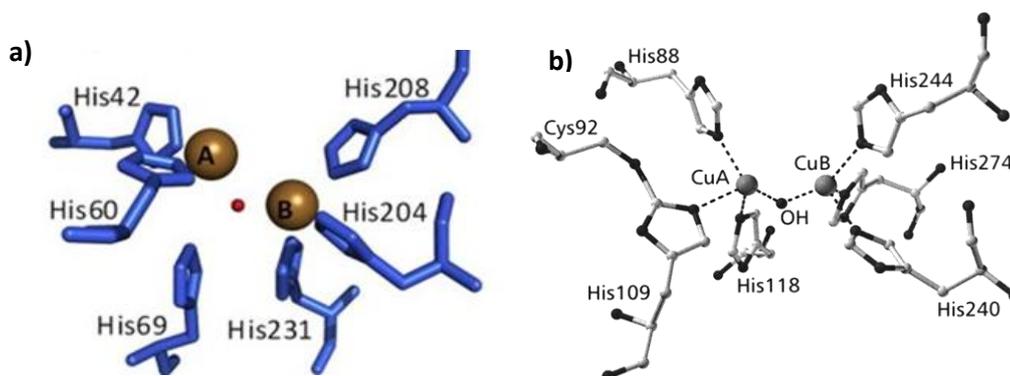
Existen varias formas diferentes del sitio activo de tirosinasa, dependiendo del estado de oxidación de los iones de cobre y de la unión o no de un grupo peróxido a éstos (Sánchez-Ferrer et al., 1995). La enzima nativa normalmente es una mezcla de metatirosinasa ( $E_m$ ), con los iones de cobre en estado Cu (II), y de oxirosinasa ( $E_{ox}$ ), con un grupo peróxido unido a los iones de cobre en estado de oxidación (II). La forma enzimática con los iones de cobre reducidos, Cu (I), es la desoxirosinasa ( $E_d$ ). Estas tres formas de la enzima tirosinasa intervienen en su ciclo catalítico y están relacionadas según se muestra en la Figura 1.27 (Jackman et al., 1992).



**Figura 1.27.** Equilibrio entre las especies enzimáticas Meta, Desoxi y Oxi de tirosinasa (Jackman et al., 1992).

### a) Metatirosinasa

La forma meta de tirosinasa es el componente principal de la enzima nativa (Lerch, 1981). El término metatirosinasa indica la forma bicúprica de la enzima completamente libre de oxígeno, donde cada uno de los iones  $\text{Cu(II)}$  está coordinado por tres residuos de histidina y ambos están unidos a un hidroxilo. Las distancias entre los iones cobre en metatirosinasa de *Bacillus megaterium* y *Streptomyces castaneoglobisporus* es de 3,6 y 3,9 Å, respectivamente (Matoba et al., 2006; Sendovski et al., 2011). El  $\text{Cu(II)}$  del sitio activo no es detectable por resonancia de espín electrónico y es diamagnético (Makino et al., 1974; Deinum et al., 1976). Esta forma de la enzima no presenta bandas de absorción características en los espectros de UV/VIS. La metatirosinasa es activa catalíticamente sobre *o*-difenoles. Sin embargo, los sustratos monofenólicos se unen a metatirosinasa pero no son transformados (Fenoll et al., 2001). En la Figura 1.28ab, se pone de manifiesto la similitud entre las estructuras de la forma meta de tirosinasa de *Bacillus megaterium* y de catecol oxidasa de *Ipomea batatas*.



**Figura 1.28.** Sitio activo en la forma meta de tirosinasa de *Bacillus megaterium* (a) y de catecol oxidasa de *Ipomea batatas* (b) (Sendovski et al., 2011; Gerdemann et al., 2002).

## b) Oxitirosinasa

La forma enzimática oxitirosinasa es un intermedio del ciclo catalítico (Makino y Mason, 1973; Rodríguez-López et al., 2000), aunque también puede encontrarse (pero en menor medida que metatirosinasa) como componente de la enzima nativa. El oxígeno está enlazado en forma de peróxido a los dos iones Cu(II) incluyéndose en el mismo plano. La distancia entre los iones cobre en oxitirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* es de 3,4 Å (Matoba et al., 2006). Esta forma de la enzima actúa tanto sobre sustratos monofenólicos como difenólicos (Sánchez-Ferrer et al., 1995). La oxitirosinasa se puede obtener mediante la adición de peróxido de hidrógeno a metatirosinasa o mediante la unión reversible de una molécula de oxígeno a desoxitirosinasa (Halaouli et al., 2006). El espectro de absorción UV/VIS de oxitirosinasa presenta un máximo de absorción a 345 nm y una banda ancha más débil a 640 nm (Makino et al., 1974).

## c) Desoxitirosinasa

La forma enzimática reducida cuyo sitio activo consta de dos iones Cu(I) es la desoxitirosinasa (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Esta forma enzimática es un intermedio del ciclo catalítico y no actúa sobre monofenoles u *o*-difenoles. Para poder llevar a cabo la oxidación de los sustratos es necesario que previamente desoxitirosinasa se una a oxígeno transformándose en oxitirosinasa, con los dos iones de cobre oxidados a Cu(II). La distancia entre los dos iones de cobre en desoxitirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* es de 4.1 Å, similar a la distancia observada en desoxihemocianina que es de 4.2 Å (Matoba et al., 2006; Yoon et al., 2009). Los iones de cobre son diamagnéticos (Solomon et al., 1996) y no detectables por resonancia de espín electrónico. Esta forma enzimática no posee rasgos característicos en sus espectros UV/VIS.

El enlace de oxígeno ha sido estudiado en desoxihemocianina (Chen y Solomon, 2004; Ronda et al., 2007; Erker et al., 2008) y se han estudiado algunas propiedades de la forma desoxi de tirosinasa de *Streptomyces glaucescens* y de *Neurospora crassa* (Sorrell et al., 1998).

En un estudio reciente (Muñoz-Muñoz et al., 2010b), se puso de manifiesto mediante estudios cinéticos con desoxitirosinasa de *Agaricus bisporus* obtenida en condiciones anaerobias, la existencia de una transición lenta entre una forma desoxi relajada y otra forma desoxi tensa, que llevaría consigo la separación de los iones de cobre al pasar a la forma tensa, probablemente debido a la repulsión de cargas.

### 1.3.3. Actividad catalítica

La actividad catalítica de tirosinasa ha sido calificada como EC 1.14.18.1. Se trata de una enzima que cataliza, con la intervención de oxígeno molecular, la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa) (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Estas *o*-quinonas posteriormente sufren un proceso de polimerización dando lugar a pigmentos amarillos, rojos o negros (Halouili et al., 2006). Se trata de una enzima bastante inespecífica ya que puede actuar sobre un amplio número de sustratos naturales y sintéticos, presentando una menor eficacia catalítica sobre monofenoles que sobre *o*-difenoles (Fenoll et al., 2004b).

Al ser el producto de la reacción enzimática de naturaleza quinónica y por tanto inestable, puede resultar dificultosa la caracterización cinética de los sustratos sobre los que actúa tirosinasa. No obstante, diferentes métodos de medida de la actividad enzimática han sido desarrollados (Muñoz-Muñoz et al., 2006; García-Molina et al., 2007a), siendo los más empleados los métodos espectrofotométricos. Algunos de ellos consisten en: el seguimiento espectrofotométrico durante la reacción enzimática de la *o*-quinona generada cuando ésta es suficientemente estable (válido para el sustrato 4-*tert*-butilcatecol), el seguimiento del aminocromo obtenido por evolución de la *o*-quinona generada inicialmente (en sustratos como dopamina o dopa), la medida de la formación del correspondiente aducto obtenido al añadir MBTH o cisteína al medio de reacción o el seguimiento de la desaparición de ácido ascórbico al llevar a cabo la reducción de la *o*-quinona (García-Molina et al., 2007a). La detección y caracterización de la actividad monofenolasa de tirosinasa requiere además una profunda comprensión de su complejo mecanismo de reacción. En un principio se confundieron auténticas polifenol oxidasas como simples catecol oxidasas en varias frutas y hortalizas, en las que posteriormente sí se logró identificar y caracterizar la actividad monofenolasa de tirosinasa (Espín et al., 1995, 1996, 1997, 1998a, 1998b).

Los sustratos fisiológicos más importantes encontrados en frutas y hortalizas son: las catequinas, derivados del ácido cinámico, catecoles y derivados, derivados del ácido benzoico, flavonoles, flavonas, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas y leucoantocianidinas (Vámos-Vigyázó, 1981). También puede actuar esta enzima sobre otros sustratos sintéticos cuya estructura posea un anillo bencénico con un sustituyente en posición 1 y con un grupo hidroxilo en posición 4 (monofenol) o en 3 y 4 (*o*-difenol). Además, se ha visto que tirosinasa presenta actividad enzimática sobre sustratos con estructura química distinta a monofenoles y *o*-difenoles.

Se ha descrito para tirosinasa actividades ascorbato oxidasa (Muñoz-Muñoz et al., 2009), catalasa (García-Molina et al., 2005), tetrahidropterina oxidasa (García-Molina et al., 2009), nicotinamin adenin dinucleotido oxidasa (García-Molina et al., 2010a) y tetrahidrofólico oxidasa (García-Molina et al., 2011). Se ha demostrado su acción sobre monoaminas y diaminas aromáticas, así como sobre *o*-aminofenoles (Gasowska et al., 2004; Muñoz-Muñoz et al., 2011b; Rescigno et al., 2011a).

### 1.3.3.1. Mecanismo de reacción

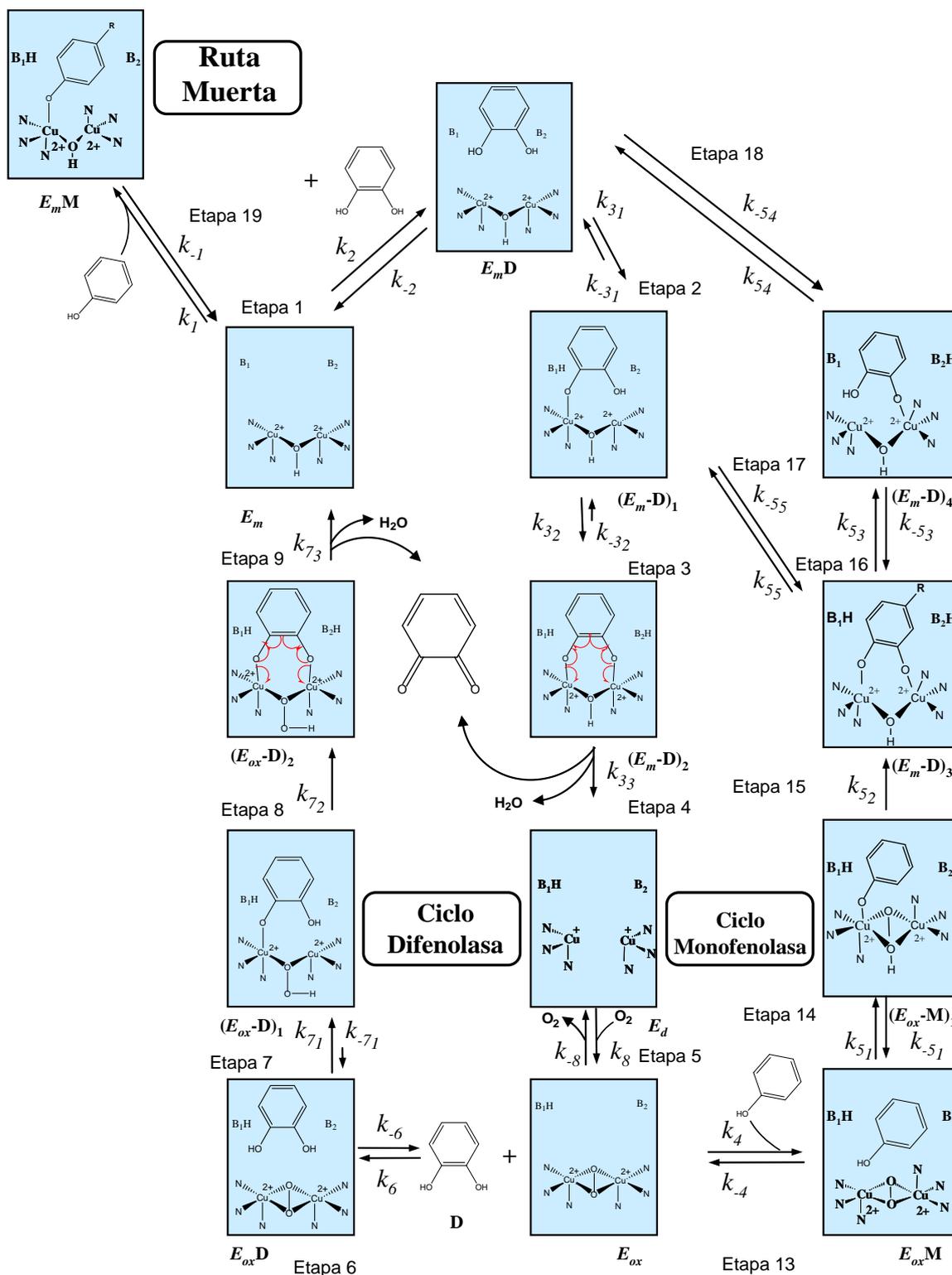
El estudio de las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa ha dado lugar a la propuesta de distintos mecanismos de reacción para la enzima (Duckworth y Coleman, 1970; Hearing y Ekel, 1976; Riley, 2000, Sánchez-Ferrer et al., 1995). Si bien actualmente se acepta que ambas actividades son catalizadas en el mismo sitio activo de la enzima, otros mecanismos propuestos inicialmente sugirieron la participación de dos sitios activos en la misma molécula (Laskin y Piccinini, 1986) e incluso en diferentes moléculas (Macrae y Duggleby, 1968). El Grupo de investigación en Enzimología, GENZ, de la Universidad de Murcia, con el que colabora habitualmente el director de la presente tesis doctoral, D. Pedro Antonio García Ruiz, ha propuesto un mecanismo de reacción para las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, ampliamente avalado por numerosos trabajos de investigación (Rodríguez-López et al., 2000, 2001; Fenoll et al., 2001, 2002, 2004a, 2004b; Peñalver et al., 2002, 2003, 2005; García-Molina et al., 2007b; Muñoz-Muñoz et al., 2011b). Este mecanismo de reacción se muestra en la Figura 1.29.

Referido a la actividad difenolasa, se conoce desde hace tiempo que tirosinasa oxida L-dopa a *o*-dopaquinona, esta quinona es inestable, cicla a leucodopacromo y esta molécula es oxidada por otra de *o*-dopaquinona originando dopacromo y regenerando *o*-difenol en el medio (García-Carmona et al., 1982). Esto permitió proponer para la actividad difenolasa de tirosinasa un mecanismo EzCC (enzimático-químico-químico con regeneración de sustrato), que predecía que la velocidad de consumo de oxígeno debía ser la mitad de la velocidad de formación de *o*-quinona y por otra parte igual a la velocidad de formación de dopacromo. La confirmación experimental de estas predicciones llevó a considerar para esta actividad de la enzima un mecanismo Uni Uni Bi Uni Ping Pong (Galindo et al., 1983), un mecanismo trisustrato con dos sustratos y dos productos iguales entre sí. Posteriormente, se profundizó más en el mecanismo íntimo de la oxidación de *o*-difenoles (Muñoz-Muñoz 2012 y Muñoz Muñoz et al., 2012), que se corresponde con el “ciclo difenolasa” del esquema mostrado en la Figura 1.29.

El establecimiento del mecanismo de la actividad monofenolasa ha sido más lento y dificultoso. La enzima cataliza la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa y la oxidación de éste a *o*-dopaquinona, que es inestable y evoluciona hacia dopacromo regenerando L-dopa en el medio. Esta secuencia de reacciones puede describirse como un mecanismo EzEzCC (enzimático-enzimático-químico-químico con regeneración de sustrato). La actividad monofenolasa de tirosinasa siempre se expresa junto a la actividad difenolasa (Figura 1.29) puesto que el producto de la primera actividad, el *o*-difenol, es el sustrato de la actividad difenolasa. Cuando se estudió mediante simulación por integración numérica este mecanismo (Fenoll et al., 2001; Molina et al., 2007), se comprobó que concuerda perfectamente con los siguientes hechos experimentales:

- a) Se origina un periodo de retardo en la acumulación de dopacromo con el tiempo.
- b) El periodo de retardo, a concentración de sustrato (monofenol) constante, disminuye al aumentar la concentración de enzima.
- c) El periodo de retardo, a concentración de enzima constante, aumenta al aumentar la concentración de sustrato.
- d) El *o*-difenol (L-dopa) se acumula en el medio de forma sigmoideal, hasta alcanzar un valor constante de estado estacionario.

En el mecanismo propuesto, la hidroxilación del monofenol, no lleva siempre acoplada la oxidación del *o*-difenol resultante a *o*-quinona, pudiendo liberarse *o*-difenol al medio (Rodríguez-López et al., 2001). Además, puede apreciarse como el monofenol puede unirse a metatirosinasa dando lugar a una ruta muerta. Estos dos aspectos del mecanismo motivaron una gran discusión científica con el grupo Quintox (Inglaterra) dirigido por el Profesor Riley (Cooksey et al., 1997; Naish-Byfield, 1998; Riley, 2000; Land et al., 2003), que no los incluían en su propuesta del mecanismo de reacción de tirosinasa. No obstante, diversas publicaciones del director de esta tesis ponen de manifiesto y confirman la validez del mecanismo propuesto en la Figura 1.29 (Rodríguez-López et al., 2001; Peñalver et al., 2002, 2003, 2005; Fenoll et al., 2004b). Seguidamente, se describirán con mayor detalle las actividades difenolasa y monofenolasa de tirosinasa.



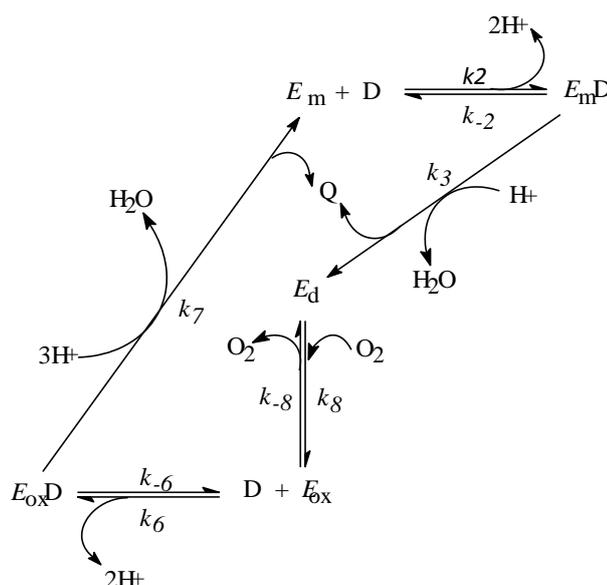
**Figura 1.29.** Mecanismo estructural propuesto para explicar la hidroxilación de monofenoles y la oxidación de o-difenoles a o-quinonas catalizada por tirosinasa de *Agaricus bisporus* en presencia de oxígeno (Muñoz-Muñoz, 2012).

( $E_m$  = metatirosinasa;  $E_d$  = desoxitirosinasa;  $E_{ox}$  = oxitirosinasa;  $D$  = o-difenol;  $M$  = monofenol).

### 1.3.3.2. Actividad difenolasa

La actividad difenolasa consiste en la oxidación de dos moléculas de *o*-difenol obteniéndose dos moléculas de *o*-quinona, mediante la reducción concomitante de una molécula de oxígeno y formación de dos moléculas de agua. El ciclo catalítico para la oxidación de un sustrato *o*-difenólico a *o*-quinona por tirosinasa en presencia de oxígeno comienza con la forma metatirosinasa. Un *o*-difenol se oxida produciendo la reducción del Cu(II) del sitio activo de metatirosinasa al estado Cu(I), originando así la forma desoxitirosinasa, en un proceso en el que están implicados dos electrones y en el que se genera una molécula de *o*-quinona y otra de agua. Se ha demostrado que durante el ciclo catalítico de la enzima no se forman intermedios semiquinónicos (Mason et al., 1961). En la etapa siguiente, desoxitirosinasa reacciona reversiblemente con oxígeno molecular formándose oxitirosinasa, con lo que los cobres del sitio activo vuelven al estado Cu(II). La reacción de oxitirosinasa con una segunda molécula de *o*-difenol da lugar a metatirosinasa y *o*-quinona, cerrándose así el ciclo catalítico.

La etapa determinante de la velocidad de la reacción catalítica está controlada por  $k_7$ , como se ha demostrado por estudios de efecto isotópico (Peñalver et al., 2003; Fenoll et al., 2004a). La mayor potencia nucleofílica de los *o*-difenoles respecto a los monofenoles da lugar a una mayor rapidez de catálisis para los primeros, convirtiéndolos en mejores sustratos de tirosinasa. La afinidad de la unión de los sustratos comprende, en cambio, etapas de enlace y transformación.



**Figura 1.30.** Mecanismo cinético para explicar la actividad difenolasa de tirosinasa. ( $E_m$  = metatirosinasa;  $E_d$  = desoxitirosinasa;  $E_{ox}$  = oxitirosinasa;  $D$  = *o*-difenol;  $Q$  = *o*-quinona).

El mecanismo descrito para la actividad difenolasa de tirosinasa coincide con el “ciclo difenolasa” del mecanismo estructural de la Figura 1.29 y con el mecanismo cinético de la Figura 1.30. En la unión del sustrato *o*-difenólico al sitio activo de tirosinasa están, probablemente, involucrados una serie de procesos moleculares que incluyen: la difusión del *o*-difenol hacia el sitio activo de la enzima, su orientación en el mismo y la coordinación del átomo de oxígeno fenólico del sustrato a uno de los iones de cobre del sitio activo. Algunas de las cadenas de aminoácidos, presentes en el sitio activo o en sus proximidades, pueden facilitar o dificultar la unión del sustrato a la enzima. El impedimento estérico es un factor de considerable importancia en el acceso de los *o*-difenoles al sitio activo de oxitirosinasa, hecho que se puede deducir a partir de los valores de la constante de unión  $k_6$  (Rodríguez-López et al., 2000). Por otro lado, la etapa de coordinación al ión de cobre lleva asociada una catálisis ácido-base.

Los *o*-difenoles se unen con mayor rapidez a la forma metatirosinasa que a la forma oxitirosinasa ( $k_2 \gg k_6$ ), tal y como se ha comprobado a partir de estudios cinéticos de estado estacionario y de fase de transición. Muchos de los mecanismos propuestos para explicar la unión de *o*-difenoles a tirosinasa contemplan una coordinación inicial del sustrato a uno de los iones de cobre (Wilcox et al., 1985; Ismaya et al., 2011b). Este mecanismo implica que la desprotonación del grupo -OH ocurre al mismo tiempo que la unión del sustrato, y está catalizada probablemente por una cadena lateral básica de un residuo próximo. Esta idea se ha justificado mediante datos cinéticos y también a través de estudios de difracción de rayos X. En catecol oxidasa de *Ipomea batatas* se ha identificado el residuo Glu<sup>236</sup> como posible catalizador ácido-base en la unión del sustrato al sitio activo de la enzima (Klabunde et al., 1998). Además se ha comprobado que, en fenoloxidasa de *Manduca sexta* y en polifenol oxidasa de *Vitis vinifera*, también existe un residuo de ácido glutámico que podría actuar como catalizador ácido-base (Li et al., 2009; Virador et al., 2010a). La diferencia en la velocidad de unión de un *o*-difenol a metatirosinasa y oxitirosinasa, puede ser debida a que en metatirosinasa los iones de cobre están en la forma Cu(II), y así el ataque nucleofílico del fenolato está más favorecido que en oxitirosinasa, donde los iones de cobre tienen menos carga positiva debido a la unión del oxígeno (puente peróxido) (Etapas 2 y 7, Figura 1.29).

Una vez que se ha producido la unión del *o*-difenol al sitio activo, tirosinasa cataliza su oxidación a *o*-quinona. Los *o*-difenoles se coordinan como fenolatos en una posición axial del centro bicúprico tetragonal, probablemente por desplazamiento de una molécula de agua (Etapas 2 y 3, Figura 1.29).

El hecho de que sólo los *o*-difenoles, y no los *p*-difenoles, sean oxidados por tirosinasa hace suponer la existencia de una coordinación bidentada entre el *o*-difenol y los dos iones de cobre.

Por otra parte, hasta 2010, se ha postulado que el segundo grupo -OH del *o*-difenol se coordina al sitio activo de la enzima produciendo el desplazamiento de un residuo de histidina del CuA (Matoba et al., 2006). Esta hipótesis ha estado avalada por el hecho de que estudios realizados mediante RMN-<sup>1</sup>H de tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* han puesto de manifiesto que el comportamiento de uno de los hidrógenos, de uno de los picos correspondientes a NH de las seis histidinas ligadas al cobre, difiere del de los otros cinco (Bubacco et al., 1999).

Sin embargo, los datos cristalográficos obtenidos recientemente sobre las estructuras de tirosinasa de diferentes fuentes (Decker et al., 2006; Deeth y Diedrich, 2010; Sendovski et al., 2011), han revelado que las histidinas axiales del sitio activo se encuentran en posición *cis*, y no en posición *trans* como postuló Matoba et al. (2006). Estos estudios demuestran que las histidinas unidas a los iones de cobre del sitio activo son rígidas y su enlace no se rompe en la catálisis. Esto ha llevado a que, actualmente, se postule la existencia, en el sitio activo de tirosinasa, de dos grupos básicos capaces de aceptar los dos protones de los grupos -OH del *o*-difenol (Etapas 3 y 8, Figura 1.29). Estudios recientes también han demostrado la existencia de dos pKas cinéticamente significativos en el sitio activo de la enzima que apoyan esta hipótesis (Muñoz-Muñoz et al., 2010a; Muñoz-Muñoz et al., 2012).

Este mecanismo establece que dos electrones son transferidos desde una molécula de *o*-difenol al sitio activo binuclear de metatirosinasa, y lo mismo ocurre con el grupo peróxido de oxtirosinasa, que acepta dos electrones provenientes de otra molécula de *o*-difenol. Esto supone que los *o*-difenoles con alta densidad electrónica en los átomos de carbono que soportan los grupos -OH, es decir, C3 y C4 (Duckworth y Coleman, 1970), serán buenos sustratos de tirosinasa y, por lo tanto, tendrán una alta constante catalítica  $k_{cat}$ .

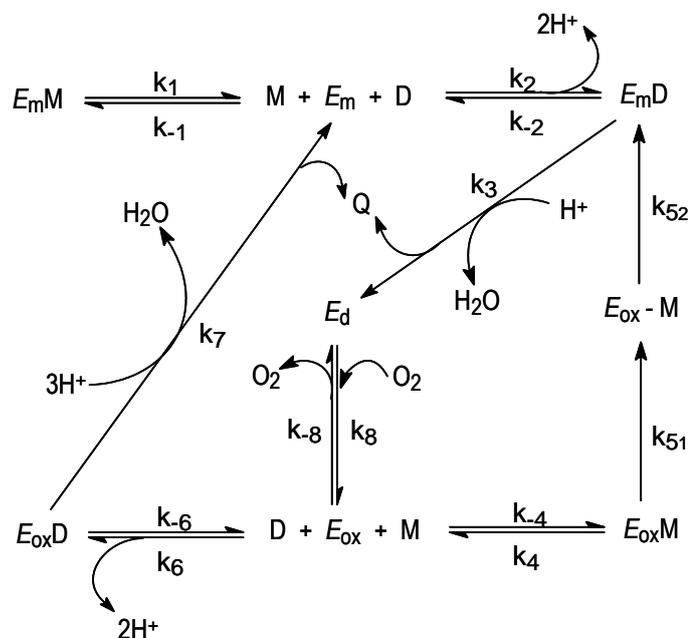
Sin embargo, la constante catalítica también puede ser modulada por factores estéricos y polares de los sustratos (Solomon et al., 1996; Espín et al., 2000; Rodríguez-López et al., 2000). Esto último explicaría, por ejemplo, que sustratos, como catecol y L-dopa, con valores similares de desplazamiento químico en sus carbonos C3 y C4, en análisis de RMN-<sup>13</sup>C, sean oxidados por tirosinasa con velocidades bastante diferentes (Rodríguez-López et al., 2000).

En el mecanismo estructural (Figura 1.29), puede observarse que el *o*-difenol se une a metatirosinasa ( $E_m$ ), en la Etapa 1, posiblemente formando un enlace de puente de hidrógeno con la base  $B_1$ . Posteriormente, el sustrato se une en posición axial a uno de los iones de cobre de la forma  $E_m$ , quizás CuB (Etapa 2). Esta coordinación va acompañada de la transferencia del protón a un residuo proteico  $B_1$  (posiblemente una histidina) (Etapa 2). La coordinación bidentada del *o*-difenol (Etapa 3) está acompañada de una segunda transferencia de protón, probablemente a una segunda base  $B_2$  próxima al CuA. La transferencia electrónica a partir del *o*-difenol conduce a la formación de *o*-quinona y a la forma desoxitirosinasa ( $E_d$ ), (Etapa 4). A continuación, tiene lugar la unión del oxígeno en el plano ecuatorial de los cobres (Etapa 5), generando la forma oxitirosinasa, en la cual el peróxido está coordinado a los dos iones de cobre oxidados, Cu (II). En la reacción de oxitirosinasa ( $E_{ox}$ ) con una segunda molécula de difenol (Etapa 6), la coordinación de *o*-difenol a uno de los iones de cobre del sitio activo está acompañada de la transferencia de un protón al grupo peróxido (Etapa 7), lo que está de acuerdo con trabajos anteriores (Peñalver et al., 2003; Piquemal et al., 2003; Fenoll et al., 2004b). La coordinación de *o*-difenol se ha propuesto que se realiza diaxialmente, ya que el plano ecuatorial estaría ocupado por el peróxido (Etapa 8). Para la coordinación bidentada del *o*-difenol se transfiere un segundo protón, probablemente al igual que en la forma meta, por transferencia a una segunda base  $B_2$  próxima al CuA, lo que está de acuerdo con la flexibilidad del sitio activo (Matoba et al., 2006; Sendovski et al., 2011; Ismaya et al., 2011). La transferencia electrónica del *o*-difenol al grupo peróxido origina la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno y la formación de una molécula de agua y la correspondiente *o*-quinona, regenerándose metatirosinasa (Etapa 9). En esta última etapa, los residuos proteicos  $B_1$  y  $B_2$  actúan como ácidos proporcionando los protones necesarios para la liberación de la molécula de agua.

### 1.3.3.3. Actividad monofenolasa

Las características mejor descritas acerca de la actividad monofenolasa son:

- En tirosinasa la actividad monofenolasa siempre se expresa junto a la actividad difenolasa, puesto que el producto de la primera actividad, el *o*-difeno, es el sustrato de la actividad difenolasa.
- La expresión de la actividad monofenolasa abarca las mismas etapas no enzimáticas, desde *o*-quinona hasta aminocromo, que las encontradas en la actividad difenolasa.
- La actividad monofenolasa de tirosinasa se caracteriza por la existencia de un periodo de retardo característico antes de que el sistema llegue al estado estacionario. Este periodo de retardo es de duración muy variable, según la naturaleza de la enzima. La eliminación de este periodo de retardo se puede conseguir por adición de pequeñas cantidades de L-dopa (Pomerantz, 1966), lo que ha llevado a muchos autores a postular la existencia de un sitio activador para este sustrato y evaluar su constante de activación sobre la actividad monofenolasa (Duckworth y Coleman, 1970). Sin embargo, actualmente se ha llegado a una interpretación cinética del periodo de retardo y por otra parte se ha obtenido una expresión analítica aproximada para el mismo (Rodríguez-Lopez et al., 1992b; Fenoll et al., 2001; Molina et al., 2007).



**Figura 1.31.** Mecanismo cinético para explicar la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus*.

( $E_m$  = metatirosinasa;  $E_d$  = desoxitirosinasa;  $E_{ox}$  = oxitirosinasa;  $D$  = *o*-difeno;  $Q$  = *o*-quinona).

Según el mecanismo de actuación de tirosinasa (Figuras 1.29 y 1.31), la forma oxi de la enzima reacciona con un monofenol y origina su hidroxilación, obteniéndose un *o*-difeno. Este *o*-difeno puede ser oxidado en el sitio activo dando lugar a la correspondiente *o*-quinona o puede ser liberado al medio. Si el *o*-difeno es oxidado se forma desoxitirosinasa,  $E_d$  y ésta se une en equilibrio rápido a una molécula de oxígeno, convirtiéndose en oxirosinasa,  $E_{ox}$ . Si se libera el *o*-difeno al medio, se origina metatirosinasa,  $E_m$ , que reacciona con otra molécula de *o*-difeno y la oxida a *o*-quinona, transformándose en  $E_d$ , que posteriormente reacciona con oxígeno, regenerando  $E_{ox}$ . Esta secuencia de reacciones coincide con la primera mitad del ciclo de la actividad difenolasa, lo que demuestra el íntimo acoplamiento de ambas actividades, monofenolasa y difenolasa, de tirosinasa (Fenoll et al., 2001). La necesidad de mantener un nivel adecuado de *o*-difeno en el estado estacionario de la actividad monofenolasa, para llevar a cabo la hidroxilación, hace pensar que el *o*-difeno desempeña una función de cosustrato en lugar de activador (Rodríguez-López et al., 1992; Ros et al., 1994). Para alcanzar el estado estacionario, cuando tirosinasa actúa sobre monofenoles, es necesaria la acumulación de una cantidad determinada de *o*-difeno, debiéndose cumplir que la relación  $[D]/[M] = R$  tenga un valor constante (Rodríguez-López et al., 1992, 2001; Ros et al., 1993a, 1993b, 1994). En esta situación, la enzima realiza dos ciclos en la ruta monofenolasa por uno en la difenolasa, así que la concentración de *o*-difeno no varía (Fenoll et al., 2001).

En el mecanismo estructural de la Figura 1.29, se puede observar que en la Etapa 13, el monofenol se enlaza a la forma  $E_{ox}$  de la enzima. Posteriormente, el monofenol podría transferir el protón del grupo hidroxilo en C-4 al peróxido, mediante la Etapa 14 uniéndose en axial al CuB. En la Etapa 15, un ataque electrofílico por parte del oxígeno del grupo peróxido al anillo en C-3, origina un intermedio  $(E_m - D)_3$ , en el cual el *o*-difeno naciente está unido en posición axial/ecuatorial. En esta situación, puesto que los orbitales no son coplanares, entre los iones de cobre y los carbonos en posiciones 3 y 4 no puede ocurrir la oxidación/reducción concertada y el *o*-difeno puede romper el enlace con el ión CuB (Etapa 16) originando la especie  $(E_m - D)_4$ , y a través de la Etapa 18 se puede originar la especie  $(E_m D)$ . Nótese que a partir del intermedio  $E_m D$  se puede liberar *o*-difeno al medio (Etapa 1). A su vez, la especie  $(E_m - D)_3$  puede romper el enlace con el CuA mediante la Etapa 17, originando el intermedio  $(E_m - D)_1$ , que conecta con el ciclo difenolasa.

### **Periodo de retardo**

El periodo de retardo o lag es una característica fundamental de la actividad monofenolasa de tirosinasa, que radica en la aparición de una fase de transición antes de que el sistema llegue al estado estacionario. Esta fase de transición da lugar a un periodo de inducción o periodo de retardo, que puede ser determinado por extrapolación de la acumulación lineal de producto con el tiempo (Rodríguez-López et al., 1992; Ros et al., 1994). Los estudios cinéticos realizados indican que el periodo de retardo es el tiempo necesario para que una concentración de tirosinasa actuando sobre L-tirosina acumule en el medio una cantidad determinada de L-dopa, de manera que el valor de la relación  $R = [L-Dopa]/[L-Tirosina]$  pase a ser constante (Rodríguez-López et al., 1992b; Ros et al., 1994; Fenoll et al., 2001). Diversos estudios han demostrado que el periodo de retardo puede ser eliminado en presencia de *o*-difenoles y de otros agentes reductores como ácido ascórbico (Ros et al., 1993a), tetrahidropterinas (García-Molina et al., 2010b), NADH (García-Molina et al., 2010a) y ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2011).

No es posible obtener una solución analítica rigurosa del periodo de retardo, aunque sí que es posible obtener una solución analítica aproximada bajo la aproximación del estado estacionario y teniendo en cuenta el balance de materia para el sistema (tirosinasa actuando sobre L-tirosina). Esta solución analítica aproximada cumple con los resultados experimentales, que son: a) cuando la concentración de monofenol es constante, al aumentar la concentración de tirosinasa el periodo de retardo disminuye (ya que se acumula más rápidamente el *o*-difenoel necesario para cumplir la relación constante indicada anteriormente), b) cuando la concentración de tirosinasa se mantiene constante, al aumentar la concentración de monofenol aumenta el periodo de retardo (pues se hace necesario acumular cada vez más *o*-difenoel para alcanzar el estado estacionario) (Molina et al., 2007).

#### **1.3.3.4. Estereoespecificidad**

La estereoespecificidad de tirosinasa de champiñón (Espín et al., 1998b), pera y fresa (Espín et al., 1998a) ha sido estudiada en disolución. También se ha estudiado la estereoespecificidad de tirosinasa de champiñón inmovilizada sobre un soporte quiral y otro no quiral (Marín-Zamora et al., 2007b), tal y como se detalla en la presente Memoria. Se ha podido demostrar que tirosinasa es estereoespecífica respecto a la afinidad por el sustrato, ya que la enzima presenta más afinidad por el enantiómero L que por el D.

Por otra parte, se ha observado que tirosinasa presenta la misma velocidad máxima con los distintos estereoisómeros, debido probablemente a que la potencia nucleofílica de los oxígenos de los grupos hidroxilos del sustrato no varía para los distintos estereoisómeros. La estereoespecificidad se pone de manifiesto también en los estudios de la inactivación suicida de la enzima. La enzima mostró más afinidad por el ácido L-ascórbico, pero la rapidez de inactivación fue la misma para ambos isómeros, una situación similar se encuentra al estudiar los isómeros de dopa (Muñoz-Muñoz et al., 2009; 2010a).

### 1.3.4. Regulación enzimática

La regulación de tirosinasa presenta un gran interés desde el punto de vista médico, agrícola e industrial (Kim y Uyama, 2005; Chang, 2009) y es llevada a cabo combinando estrategias de inactivación y de inhibición. A su vez, la inhibición abarca la eliminación de sustratos fenólicos y/o de oxígeno y el uso de inhibidores estructuralmente análogos a los sustratos fenólicos. En este apartado, se describe una forma de regulación particular que tiene tirosinasa (la inactivación suicida), así como los intentos externos de regular su actividad mediante la acción de inhibidores o inactivadores. La aplicación de la regulación enzimática al pardeamiento de frutas y hortalizas y a la industria cosmética es también tratada a continuación.

#### 1.3.4.1. Inactivación suicida

La inactivación suicida es un proceso de inactivación que sufre la enzima tirosinasa cuando reacciona con sus sustratos fenólicos, conocido desde hace bastante tiempo (Padrón et al., 1975; Tudela et al., 1987; García-Cánovas et al., 1989; Muñoz-Muñoz et al., 2008; Muñoz-Muñoz et al., 2010c). Se ha comprobado que durante el proceso de inactivación suicida de tirosinasa de *Neurospora crassa*, tiene lugar una pérdida de cobre y se modifica el residuo His<sup>306</sup> (Dietler y Lerch, 1982).

Los tres mecanismos propuestos inicialmente para explicar la inactivación suicida de la enzima tirosinasa han resultado ser insatisfactorios (Ingraham et al., 1952; Seiji et al., 1978; Land et al., 2007). La inactivación suicida no puede tener lugar por unión covalente al sitio activo de la enzima de los productos de reacción, ya que ocurre también en presencia de sustancias reductoras, como NADH o ácido ascórbico, que reducen las quinonas generadas (Dietler y Lerch, 1982). La inactivación por medio de especies oxigenadas altamente reactivas, como los radicales hidroxilo, que podrían atacar el sitio activo de la enzima, ha sido rechazada porque la presencia de

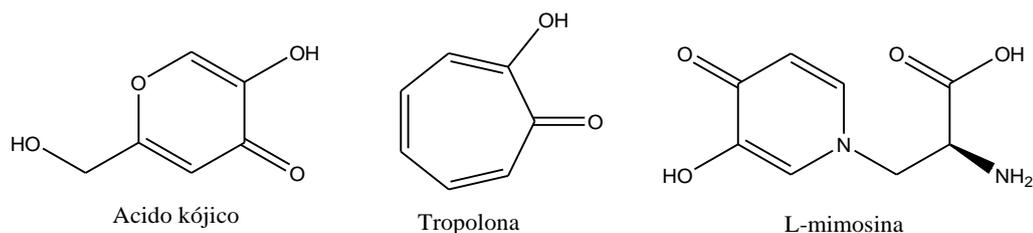
atrapadores de radicales libres, como manitol, no la detienen (Dietler y Lerch, 1982). La hipótesis de inactivación suicida por procesamiento de un catecol como si fuese un monofenol, “presentación cresolasa” (Land et al., 2007, 2008), tampoco es válida ya que, según ésta, los sustratos trihidroxilados en posición vecinal no provocarían inactivación suicida y se ha comprobado que el pirogalol es uno de los sustratos suicidas más potentes de tirosinasa (Muñoz-Muñoz et al., 2008).

Estudios recientes sobre la caracterización cinética de la inactivación suicida de tirosinasa por *o*-difenoles como catecol, L-dopa y dopamina (García-Moreno et al., 1994; Muñoz-Muñoz et al., 2008, 2009, 2010a, 2012), han llevado a proponer un nuevo mecanismo acorde con los resultados experimentales obtenidos. A partir de este mecanismo, se han caracterizado otras moléculas no fenólicas como sustratos suicidas de tirosinasa. Así, se ha llevado a cabo el estudio de la inactivación suicida de tirosinasa ocasionada por peróxido de hidrogeno (García-Molina et al., 2005), ácido ascórbico (Muñoz-Muñoz et al., 2009a), NADH (García-Molina et al., 2010b), ácido tetrahidrofólico (THF) (García-Molina et al., 2011) y tetrahidropterinas (Muñoz-Muñoz et al., 2011a).

#### **1.3.4.2. Inhibidores**

Actualmente, se conoce un gran número de inhibidores, de origen natural y sintético, de tirosinasa (Kim et al., 2005; Parvez et al., 2006, 2007; Tareq y Khan, 2007; Chang, 2009). El término “inhibidor de tirosinasa” puede resultar algo confuso ya que a veces se aplica a inhibidores de la melanogénesis en general, independientemente de que afecten o no a la enzima. Existen inactivadores enzimáticos no específicos, que pueden provocar la desnaturalización de la enzima inhibiendo su actividad, tal es el caso de los ácidos y bases. Los inactivadores específicos de tirosinasa o sustratos suicidas son inhibidores basados en el mecanismo de la enzima, que logran inactivarla irreversiblemente.

De otra parte, se consideran inhibidores específicos de tirosinasa, aquellos compuestos que se unen a la enzima de modo reversible y disminuyen su actividad catalítica. Como inhibidores de referencia de tirosinasa tenemos el ácido kójico (Chen et al., 1991; Sendovski et al. 2011), tropolona (Espín y Wichers, 1999c; Ismaya et al., 2011) y L-mimosina (Cabanés et al., 1987; Khan et al., 2010), cuyas estructuras químicas aparecen en la Figura 1.32.



**Figura 1.32.** Estructuras químicas de los inhibidores de referencia de tirosinasa: ácido kójico, tropolona y L-mimosina.

### Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de biomoléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se pueden encontrar en estructuras complejas de flores, cortezas, hojas, raíces de plantas, así como en la mayoría de las frutas y hortalizas. Dependiendo de en qué posición en la molécula están los grupos hidroxilos, los polifenoles son considerados sustratos de tirosinasa o inhibidores de ella. La familia de polifenoles mejor estudiada, por su acción de inhibición de tirosinasa, es la de los flavonoides. Los más de 4000 flavonoides descritos se dividen en 7 grandes grupos. Algunos de los flavonoides de mayor poder inhibitorio son los siguientes:

- La norartocarpetina (5,7,2',4'-tetrahidroxiflavona), que es 10.4 veces más activa que el ácido kójico frente a la actividad monofenolasa de tirosinasa de champiñón y la estreptogenina (5,7,2',4'-tetrahidroxiflavanona), ambas pertenecientes al grupo de las flavonas y obtenidas de extractos de especies de *Morus* (Ryu et al., 2008).
- La dihidromorina (5,7,2',4'-tetrahidroxiflavanol) y artocarpetina (5,2',4' trihidroxi-7-metoxiflavona), obtenidas a partir de *Artocarpus heterophyllus* (Arung, et al., 2006; Zheng et al., 2008).
- La glabridina y gliasperina C, que son compuestos de naturaleza isoflavonoide extraídos de la raíz de especies de *Glycyrrhiza* (Kim et al., 2005b; Chang, 2009).
- Del grupo de las chalconas tenemos la licochalcona, curaridina y curaridinol. Recientemente se ha aislado la 2,4,2',4'-tetrahidroxi-3-(3-metil-2-butenil) chalcona, que ha resultado ser 26 veces más potente que el ácido kójico (Zhang et al., 2009).
- El oxiresveratrol (2,4,3',5'-tetrahidroxi-trans-estilbeno) aislado de *Morus alba* exhibe una actividad inhibitoria 32 veces mayor que la del ácido kójico (Shin et al., 1998).
- La aloesina, aislada de *Aloe vera*, es la más importante dentro del grupo de las cumarinas (Jones et al., 2002).

### **Derivados de benzaldehído y benzoatos**

Se han aislado de plantas un gran número de inhibidores de tirosinasa de este grupo, con una potencia inhibidora débil/moderada. Entre ellos están el ácido benzoico, benzaldehído, ácido anísico, anisaldehído, ácido cinámico y metoxicinámico (Lee, 2002). El poder inhibidor de los derivados de benzaldehído se basa en su capacidad para formar bases de Schiff con un grupo amino de la enzima, mientras que los benzoatos forman un complejo con el cobre del sitio activo (Chang, 2009).

### **Lípidos de cadena larga y esteroides**

Algunos lípidos obtenidos de fuentes naturales han demostrado ser inhibidores de tirosinasa. La trilinoleína, un triacilglicerol del ácido linoléico, presenta una potencia de inhibición semejante al ácido kójico (Jeon et al., 2006). Se han aislado algunos esteroides que también muestran inhibición sobre tirosinasa. Cabe mencionar, el estigmast-5-en-3 $\beta$ ,26diol, obtenido de las partes aéreas de *Trifolium balanae* (Sabudak et al., 2006) y el 17 $\alpha$ -etil-esteroide aislado del hongo *Cunninghamella elegans* (Choudhary et al., 2005).

### **Inactivadores Irreversibles**

La inhibición irreversible ocurre por formación de algún enlace covalente entre el inhibidor y la enzima, normalmente en el sitio activo. El captopril, por ejemplo, es un medicamento antihipertensivo que forma un complejo cobre-captopril y un puente disulfuro con la enzima (Chang, 2009). El anión 3,5-dihidroxifenil decanoato, también ha sido descrito como un inhibidor irreversible de tirosinasa (Qiu et al., 2005). Aunque se ha estudiado la cinética de inactivación suicida de tirosinasa (Muñoz-Muñoz et al., 2008), se han encontrado pocos sustratos suicidas potentes. Se han patentado como sustratos suicidas dos isoflavonas: la 7,8,4'-trihidroxiisoflavona y la 5,7,8,4'-tetrahidroxi isoflavona (Chang, 2007; Chang y Wu, 2008).

### **Diseño de inhibidores**

El estudio y descubrimiento de nuevos inhibidores es útil para las industrias farmacéutica y cosmética. Actualmente, se están empleando métodos de simulación por ordenador para estudiar la relación cuantitativa estructura/actividad de un gran número de moléculas, y posteriormente se lleva a cabo el ensayo experimental de aquellas más prometedoras (Casañola-Martín et al., 2008, 2010; Marrero-Ponce et al., 2010). Así, por ejemplo, se han estudiado los derivados de cumarinas (Le-Thi-Thu et al., 2011) y vanillinas (Rescigno et al., 2011b).

### **1.3.4.3. Aplicaciones**

#### **Pardeamiento de frutas y hortalizas**

El pardeamiento de frutas, hortalizas y champiñones es una gran preocupación para los agricultores y el sector industrial, debido a la alteración que causa en las propiedades organolépticas del producto y la reducción de su vida útil. Por esta razón, se han desarrollado numerosas estrategias con la finalidad de atenuar o eliminar el proceso de pardeamiento enzimático.

La inactivación de tirosinasa se puede llevar a cabo mediante el empleo de elevadas temperaturas, altas presiones, valores de pH extremos, exposición a microondas o utilización de inhibidores enzimáticos como el 4-hexilresorcinol (Kim y Uyama, 2005).

Otra técnica empleada consiste en eliminar del medio de reacción a uno de los dos sustratos de la enzima. Por un lado, los compuestos fenólicos pueden ser eliminados mediante el empleo de especies complejantes y absorbentes como son los carragenatos, ciclodextrinas, polivinilpirrolidona y quitosanos o mediante la adición de enzimas como las fenil-O-metiltransferasas que actúan sobre estos compuestos fenólicos produciendo su modificación (Billaud et al., 2003). Por otro, aunque no es recomendable eliminar totalmente el oxígeno presente, por las desviaciones metabólicas que se pueden producir, sí que puede resultar útil la utilización de atmósferas controladas con un bajo contenido del mismo (Soliva-Fortuny et al., 2001)

También se ha llevado a cabo la reducción de los productos quinónicos producidos, evitando así su polimerización, mediante el empleo de reactivos como sulfito, cisteína, ácido ascórbico y eritórbito (Billaud et al., 2003; Kim y Uyama, 2005).

#### **Industria cosmética**

Los inhibidores de tirosinasa se están desarrollando también en la industria cosmética por su efecto blanqueador de la piel, aunque sólo unos pocos de ellos se llegan a aplicar realmente debido a razones de seguridad (Kubo et al., 2000). La arbutina y aloesina se utilizan ampliamente como despigmentantes (Jin et al., 1999) y se utilizan conjuntamente ya que así producen una inhibición sinérgica de tirosinasa. Como inhibidores de segunda generación se ha descrito la desoxiarbutina, que inhibe tanto a la actividad monofenolasa como a la difenolasa de forma reversible (Chawla et al., 2008).

### 1.3.5. Tirosinasa inmovilizada

La enzima tirosinasa ha sido inmovilizada en un gran número de soportes mediante distintos métodos y técnicas de inmovilización (Durán et al. 2002; Halouili et al., 2006; Octavio de Faria et al., 2007). La principal ventaja de la inmovilización es la posibilidad de reutilización de la enzima, aunque también se persigue la obtención de mejoras en la estabilidad y en la actividad enzimática. Debido a las numerosas aplicaciones biotecnológicas de tirosinasa, su inmovilización sigue siendo objeto de estudio en la actualidad, produciendo un importante número de publicaciones científicas cada año (Bertolino et al., 2011; Nicolucci, 2011; Malzahn et al., 2011; Oriero et al., 2011; Sima et al., 2011; Singh, 2011; Algeri et al., 2012; Donato et al., 2012; Xu et al., 2012; Dinçer et al., 2012; Yang et al., 2012).

En los trabajos que conforman la presente Memoria, ha sido llevada a cabo con éxito la inmovilización de tirosinasa mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas, sobre diversos ésteres cinámicos de carbohidratos, obteniendo notables mejoras en los valores de actividad y estabilidad enzimática (Marín-Zamora et al., 2005, 2006, 2007a, 2007b). La adsorción de la enzima, también puede lograrse por interacciones electrostáticas, mediante el empleo de soportes de inmovilización como nanopartículas o nanotubos de ZnO (Li et al., 2006; Gu et al., 2009) y membranas de poli(HEMA-co-GMA)-PEI-Cu(II) (Arica y Bayramoglu, 2004). Otros soportes, empleados para la inmovilización por adsorción de tirosinasa, han sido: montmorillonita-Al(OH)<sub>x</sub> (Naidja et al., 1997), electrodos de carbono (Yaropolov et al., 1995; Mohammadi et al., 2008; Moghaddan et al., 2008) y electrodos de oro modificados (Nakamura et al., 2006).

La técnica de inmovilización de tirosinasa por atrapamiento en geles o matrices poliméricas ha sido ampliamente utilizada. La enzima ha sido inmovilizada en geles de gelatina, alginato y poli(acrilamida) (Munjal y Sawhney, 2002). Se ha llevado a cabo el atrapamiento de tirosinasa en películas sol-gel de titania (TiO<sub>2</sub>), mediante un método de deposición por vapor (Yu et al., 2003) y en películas sol-gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) (Wang et al., 2000; Oriero et al., 2011) y de alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Liu et al., 2000; Zejli et al., 2008). Se han empleado matrices compuestas de alginato-SiO<sub>2</sub> (Shao et al., 2009) y de agarosa-goma guar (Tembe et al., 2006), como soportes de inmovilización de la enzima. Además, se ha logrado el atrapamiento de tirosinasa mediante polimerización electroquímica, en presencia de la enzima, de los copolímeros poli(óxido de etileno)/polipirrol y polisiloxano/polipirrol (Arslan et al., 2005; Yildiz et al., 2005) y, también, mediante electrodeposición catódica de un polímero funcionalizado con un complejo de osmio sobre la superficie de un electrodo de platino (Yildiz et al., 2007).

La inmovilización por atrapamiento de tirosinasa se ha conseguido, también, por fotocurado de membranas metacrílicas/acrílicas (Hanifah et al., 2009). Otra técnica de inmovilización desarrollada ha sido la adsorción y atrapamiento de tirosinasa entre dos capas de poli(cloruro de dialildimetilamonio) (Fiorentino et al., 2010).

De otra parte, el método de inmovilización covalente de tirosinasa ha sido uno de los más utilizados (Durán et al., 2002; Zynek et al., 2011). Cabe destacar el uso del agente entrecruzante glutaraldehído, que actúa como puente, enlazándose al soporte y a la enzima por formación de bases de Schiff. Tirosinasa ha sido inmovilizada covalentemente, por medio de glutaraldehído, a soportes como: microesferas reactivas basadas en metacrilato de glicidilo donde los grupos epoxi han sido convertidos en grupos amino por reacción con 1,6-hexanodiamina (Arica et al., 2004), nanopartículas magnéticas ( $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ) modificadas con grupos amino en su superficie (Liu et al., 2005), microfibras de carbono funcionalizadas con grupos amino (Wang y Hasebe, 2009), gelatina depositada sobre un electrodo (Asav et al., 2009), polietilentereftalato modificado químicamente (Irena et al., 2009), vidrio poroso funcionalizado con grupos aminopropilo (Girelli et al., 2009) y esferas compuestas de quitosano-arcilla (Dinçer et al., 2012). También se ha llevado a cabo la formación de agregados de tirosinasa por precipitación con sulfato de amonio y entrecruzamiento con glutaraldehído (Aytar y Bakir, 2008; Xu et al., 2012), lo que permite la inmovilización de la enzima sin en el empleo de un soporte. Otros métodos de inmovilización covalente de tirosinasa incluyen el empleo de reactivos tipo carbodiimida (Bieganski et al., 2006; Zhou et al., 2007; Tamura et al., 2010; Wang et al., 2010), cloruro cianúrico (Wang y Asebe, 2011) o la diazotación del soporte (Girelli et al., 2007).

La optimización del proceso de inmovilización de tirosinasa, en un determinado soporte, incluye el estudio de parámetros como: la concentración de enzima en la disolución empleada para llevar a cabo la inmovilización, el tiempo y pH de inmovilización, la cantidad de enzima inmovilizada, y otros aspectos relacionados con la naturaleza del soporte y técnica de inmovilización elegidos en cada caso (Arica et al., 2004; Marín-Zamora et al., 2005, 2006; Abdullah et al., 2006; Mita et al., 2007; Shao et al., 2007; Tamura et al., 2010). Tras la inmovilización es crucial el estudio del comportamiento y las características de la enzima inmovilizada: pH y temperatura óptima de reacción, efecto de la reutilización, estabilidad térmica y frente al almacenado, así como el estudio de las constantes cinéticas mostradas por la enzima en su actuación sobre el sustrato utilizado (Arslan et al., 2005; Marín-Zamora et al., 2005, 2006, 2007a, 2007b; Girelli et al., 2007; Asav et al., 2009; Zynek et al., 2011).

Existe una gran variedad de sustratos conocidos sobre los que puede actuar la enzima tirosinasa y muchos de ellos han sido estudiados con tirosinasa inmovilizada. En los trabajos de la presente memoria se han empleado los sustratos: 4-*tert*-butilcatecol, dopamina, L-dopa, DL-dopa, D-dopa, L- $\alpha$ -metildopa, DL- $\alpha$ -metildopa, L-isoprenalina, DL-isoprenalina, L-adrenalina, DL-adrenalina, L-noradrenalina, D-noradrenalina, L-tirosina, DL-tirosina, D-tirosina, hidroxianisol, 4-metilfenol, 4-*tert*-butilfenol, ácido 4-hidroxifenilacético y ácido 4-hidroxifenilpropiónico (Marín-Zamora et al., 2007a, 2007b, 2009; García-Ruiz et al., 2009). Otros sustratos, estudiados también con tirosinasa inmovilizada, han sido, por ejemplo: catecol (Arslan et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Zhang et al., 2009), p-cresol (Zhao et al., 2009; Yu et al., 2010), L-tirosina (Arica et al., 2004; Sima et al., 2011), fenol (Gu et al., 2009; Chen y Yin, 2010; Oriero et al., 2011; Dinçer et al., 2012), *o*-aminofenol (Cabaj et al., 2010), 4-clorofenol y 4-cloro-3-metilfenol (Hanifah et al., 2009).

Al realizar el estudio cinético de la actividad enzimática frente a la concentración de sustrato, se pueden determinar los valores aparentes de la constante de Michaelis,  $K_m^{ap}$ , y la velocidad máxima,  $V_{max}^{ap}$ . Los valores de  $K_m^{ap}$  mostrados por tirosinasa inmovilizada normalmente experimentan variaciones respecto a los obtenidos por tirosinasa en disolución, siendo el soporte y método de inmovilización empleados importantes factores a tener en cuenta (Chibata, 1978; Arroyo, 1998). Es habitual encontrar que los valores de  $K_m^{ap}$  de tirosinasa inmovilizada para un determinado sustrato sean mayores que los mostrados por dicha enzima en disolución para el mismo sustrato (Arica et al., 2004; Arslan et al., 2005; Yilditz et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Marín-Zamora et al., 2007a, 2007b; Shao et al., 2007; Tembe et al., 2008; Sima et al., 2011). También se ha descrito una disminución del valor de  $K_m^{ap}$ , mostrando la enzima inmovilizada una mayor afinidad aparente por el sustrato (Rijiravanish et al., 2004; Marín-Zamora et al., 2006; Wang y Hasebe, 2009; Zhang et al., 2009; Sánchez-Paniagua et al., 2010).

Los valores de  $V_{max}^{ap}$  dependen de la cantidad de enzima inmovilizada, por lo que la comparación de la actividad de tirosinasa sobre diversos sustratos, solo debe hacerse cuando la enzima ha sido inmovilizada sobre el mismo soporte y con la misma técnica y condiciones de inmovilización. Para determinar las variaciones en la actividad enzimática cuando tirosinasa es inmovilizada sobre distintos soportes y/o con distintas técnicas de inmovilización y comparar con la actividad de tirosinasa en disolución, es necesario obtener los valores de las constantes catalíticas ( $k_{cat}^{ap}$ ).

En muy pocos trabajos de enzimas inmovilizadas se da el valor de la constante catalítica. No obstante, sí se han determinado los valores de  $k_{cat}^{ap}$  para tirosinasa inmovilizada sobre diversos ésteres cinámicos de carbohidratos (Marín-Zamora et al., 2007a, 2007b) y para tirosinasa complejada no covalentemente a polibreno en disolventes mixtos agua/etanol (Shipovskov and Levashov, 2003). También se han determinado los valores de  $k_{cat}^{ap}$  para otras enzimas como anhidrasa carbónica inmovilizada sobre octil-sefaraosa (Hosseinkhani y Nemat-Gorgani, 2003), mioglobina inmovilizada sobre fosfonatos de circonio (Belleza et al., 2004) y lacasa inmovilizada en Eupergit C (LLoret et al., 2012).

La inmovilización de tirosinasa puede ser muy útil en la producción de L-dopa y otros *o*-difenoles, en la detección de compuestos fenólicos y de algunos inhibidores de la enzima, y en los procesos de descontaminación de aguas mediante eliminación de compuestos fenólicos (Octavio de Faria et al., 2007), tal y como se describe a continuación.

#### 1.3.5.1. Obtención de *o*-difenoles

Desde hace décadas, la terapia de elección para el tratamiento del Parkinson es el L-dopa. Por este motivo, se calcula que se consumen cada año cerca de 250 toneladas de este medicamento. El L-dopa, mayoritariamente, se genera mediante síntesis química a partir de vanillina e hidantoína, en un proceso muy laborioso que requiere de ocho pasos consecutivos (Reinhold et al., 1987). Una de las alternativas estudiadas es la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina mediante catálisis enzimática con tirosinasa inmovilizada. Para ello, el método clásico utilizado consiste en hacer actuar tirosinasa en un medio de reacción compuesto por tampón fosfato y concentraciones iguales de L-tirosina y ácido ascórbico. Así, se ha llevado a cabo la producción de L-dopa mediante tirosinasa inmovilizada en nailon (Pialis et al., 1996), quitosano (Carvalho et al., 2000; Chuang et al., 2005), ceolita (Seetharan y Saville, 2002), poliestireno modificado (Ho et al., 2003), gel Cu-alginato (Ates et al., 2007), agar activado (Norouzian et al., 2007) y membranas tubulares de poliamida (Algieri et al., 2012). En todos estos estudios los rendimientos conseguidos en la obtención de L-dopa son bastante bajos. En un artículo de revisión sobre el potencial biotecnológico de tirosinasa (Octavio de Faria et al., 2007), se afirma que en los intentos realizados para producir L-dopa, mediante tirosinasa inmovilizada, las productividades conseguidas son bajas, del rango de 1.44 a 54 mg/l/h (Pialis et al., 1996; Carvalho et al., 2000; Seetharan y Saville, 2002; Ho et al., 2003; Ates et al., 2007).

Este bajo rendimiento de tirosinasa (Octavio de Faria et al., 2007) se atribuye principalmente a dos factores:

1. La conversión de L-tirosina en L-dopa es incompleta (menos del 30% es consumida durante el proceso).
2. En este sistema de producción, parte del L-dopa producido vuelve a reaccionar con tirosinasa y produce *o*-dopaquinona. Esta dopaquinona cicla espontáneamente a leucodopacromo el cual, mediante una reacción de oxidación/reducción con una segunda molécula de dopaquinona, regenera una molécula de L-dopa pero también genera una molécula de dopacromo, el cual polimeriza espontáneamente dando lugar a la formación de melaninas.

Para evitar la producción de melaninas, se puede añadir ácido ascórbico al medio, el cual reduce *o*-dopaquinona a L-dopa en una reacción no enzimática instantánea. Sin embargo, se necesitarían elevadas cantidades de ácido ascórbico para obtener rendimientos aceptables en la obtención de *o*-difeno, ya que se entraría en una dinámica de ciclos fútiles (el *o*-difeno obtenido por reducción química de la *o*-quinona, compite con el monofenol para ser oxidado de nuevo por la enzima, lo que supone que parte de él volverá a ser oxidado a *o*-quinona y tendrá que volver a ser reducido, antes de que nuevas moléculas de monofenol sean hidroxiladas en orto, aumentando la concentración final de *o*-difeno). Esta dinámica de ciclos fútiles a su vez facilitaría la inactivación suicida de la enzima. Además, se ha demostrado que altas concentraciones de ácido ascórbico inhiben la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa y, además, inactivan irreversiblemente a la enzima (Ros et al., 1993a, 1995; Muñoz-Muñoz et al., 2009).

Recientes estudios de producción de L-dopa mediante este método (Algieri et al., 2012; Donato et al., 2012), están en concordancia con los bajos rendimientos descritos anteriormente (Octavio de Faria et al., 2007). Se ha empleado tirosinasa inmovilizada sobre membranas de ceolita (Donato et al., 2012) y de poliamida (Algieri et al., 2012), con rendimientos en la obtención de L-dopa de aproximadamente el 5 y 10 %, respectivamente. También se han empleado agregados de tirosinasa obtenidos por entrecruzamiento (Xu et al., 2012), para la obtención de L-dopa, en un medio constituido por tampón fosfato y una concentración de ácido ascórbico 7,5 veces superior a la de L-tirosina, lográndose en este caso rendimientos del 53 %. Además del L-dopa existen otros *o*-difenoles de considerable interés por su actividad biológica y antioxidante.

Recientemente se ha publicado la síntesis de L-dopa con buenos rendimientos mediante una técnica electroenzimática, donde tirosinasa está inmovilizada en un electrodo que permite la reducción de la *o*-dopaquinona a L-dopa sin ser necesaria la adición de ácido ascórbico (Min et al., 2010). También se ha descrito la inmovilización de tirosinasa en resinas epoxi Eupergit C250L y posterior deposición de varias películas de polielectrolito sobre la enzima (Guazzaroni et al., 2012a, 2012b), que ha sido aplicada a la síntesis de una serie de catecoles (distintos a L-dopa) en medio acuoso o añadiendo diclorometano como extractor en contacto con el medio acuoso. Últimamente se ha avanzado en la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina mediante el empleo de microorganismos (Surwase y Yadhav, 2011; Surwase et al., 2012).

En la presente Memoria se ha desarrollado con éxito un nuevo procedimiento de obtención de *o*-difenoles con muy altos rendimientos. Teniendo en cuenta los malos resultados obtenidos, hasta el inicio de nuestro estudio, en la obtención de L-dopa empleando tampón fosfato como medio de reacción, hemos llevado a cabo la invención de un procedimiento alternativo de producción de *o*-difenoles que utiliza como medio de reacción tampón borato (Marín-Zamora et al., 2009; García-Ruiz et al., 2009). El anión borato en presencia de *o*-difenol da lugar a un complejo estable borato-difenol (Mochizuki et al., 2002; Yamazaki y Itoh, 2003; Waite, 1984). Este hecho permite mejorar la acumulación de *o*-difenol en el medio, ya que el anión borato compleja al *o*-difenol formado impidiendo la oxidación de éste por parte de tirosinasa, logrando así minimizar la entrada en la dinámica de ciclos fútiles comentada anteriormente. Además, añadimos al medio de reacción hidroxilamina o una concentración inicial de *o*-difenol que facilitan que la forma metatirosinasa pase a desoxitirosinasa (cerrando así el ciclo catalítico). También es necesaria la presencia de ácido ascórbico en exceso para reducir la *o*-quinona generada a *o*-difenol. En nuestro caso el ácido ascórbico no inactiva prácticamente a la enzima, porque forma a su vez un complejo con el borato (Obi et al., 1998; Roomi y Tsao, 1998). Siguiendo esta metodología, hemos sintetizado *o*-difenoles de diferentes características y cargas: 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y L-dopa, a partir de sus monofenoles correspondientes (4-*tert*-butilfenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico, ácido *p*-hidroxifenilacético y L-tirosina). Los rendimientos conseguidos han sido muy altos (88-96 %) en todos los casos. En el caso de la obtención de L-dopa se obtuvo por primera vez, mediante tirosinasa inmovilizada, un rendimiento del 90 % en un proceso en continuo escalable industrialmente.

### 1.3.5.2. Biosensores enzimáticos

Las aguas residuales pueden contener residuos fenólicos procedentes de industrias textiles, químicas, petroquímicas y papeleras, entre otras (Yamada et al., 2005). Estos compuestos fenólicos pueden ser contaminantes también de suelos y alimentos. La legislación medioambiental es cada vez más estricta y se requieren métodos de análisis sencillos y precisos para detectar los niveles de compuestos fenólicos en aguas. Los métodos empleados tradicionalmente para llevar a cabo estos análisis han sido métodos espectrofotométricos y cromatográficos. Actualmente, el campo de los biosensores enzimáticos está siendo fruto de numerosos trabajos de investigación en este sentido. Una de las principales ventajas de los biosensores es la posibilidad de la determinación *in situ* de los compuestos que se requiere analizar.

Numerosos son los biosensores basados en tirosinasa inmovilizada (Zhao et al., 2009; Fiorentino et al., 2010; Apetrei et al., 2011; Han et al., 2012), que permiten determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el medio. Para ello, se recurre a la medida del consumo de oxígeno por parte de la enzima al llevar a cabo la oxidación catalítica o a la reducción electroquímica de la *o*-quinona liberada por la enzima como producto de reacción (Tembe et al., 2009). Además, los biosensores de tirosinasa también son utilizados para la determinación de sustancias inhibitoras de la actividad catalítica de esta enzima, como son los compuestos organofosforados (Vidal et al., 2006), el ácido benzoico (Kochana et al., 2012) y el ión fluoruro (Asav et al., 2009).

Algunos de los numerosos biosensores basados en tirosinasa inmovilizada se describen a continuación. La determinación de catecol se ha llevado a cabo, por ejemplo, mediante un biosensor basado en tirosinasa inmovilizada en una película compuesta de quitosano, carbón y nanopartículas de níquel (Yang et al., 2012), a través de otro biosensor compuesto de un electrodo de óxido de grafeno enlazado a nanopartículas de oro recubiertas de tirosinasa (Song et al., 2011) y mediante un biosensor basado en tirosinasa inmovilizada sobre nanopartículas de oro encapsuladas por un dendrímero (Singh, 2011).

La detección de bisfenol A ha sido posible gracias a un biosensor de tirosinasa basado en nanografeno (Wu et al., 2012). También se ha llevado a cabo la detección de norepinefrina, mediante tirosinasa inmovilizada en nanotubos de carbono (Mohammadi et al., 2011).

Además, debido a su efecto inhibitorio, se ha llevado a cabo la determinación de sustancias como el ácido benzoico, mediante un biosensor basado en tirosinasa adsorbida sobre fosfato de calcio (Sánchez-Paniagua y López-Ruiz, 2011) y también el ión Cr(III), mediante un biosensor constituido por un electrodo con tirosinasa atrapada en polipirrol obtenido por electropolimerización (Dominguez-Renedo et al., 2004).

### **1.3.5.3. Descontaminación de aguas**

Los compuestos fenólicos son importantes contaminantes orgánicos, que confieren al agua un mal sabor y un mal olor, además de ser muy tóxicos. La contaminación de medios acuáticos naturales por presencia de fenoles se produce, principalmente, por el vertido de aguas residuales de industrias de pintura, carbón, insecticidas, fármacos, curtidos y petróleo. La supresión de compuestos fenólicos en los vertidos industriales es un problema prioritario. Algunos de los métodos empleados para llevar a cabo la descontaminación de aguas, liberándolas de compuestos fenólicos, consisten en la extracción con disolventes, oxidación química, degradación microbiana o utilización de enzimas (Octavio de Faria, 2007). La enzima tirosinasa ha sido utilizada en la eliminación de fenoles y biorremediación tanto en disolución, como inmovilizada a un soporte, con la consiguiente ventaja de su posible reutilización. Generalmente, los productos *o*-quinónicos formados por la oxidación enzimática dan lugar a reacciones de polimerización, obteniéndose compuestos insolubles que pueden ser eliminados por filtración o precipitación.

Así, por ejemplo, recientemente se ha empleado tirosinasa inmovilizada covalentemente sobre esferas de quitosano-arcilla para la eliminación de fenol (Dinçer et al., 2012). También se ha logrado la biodegradación de una serie de bisfenoles mediante un reactor que contiene tirosinasa inmovilizada sobre esferas de poliacrilonitrilo (Nicolucci et al., 2011). La eliminación de alquilfenoles puede conseguirse mediante un sistema formado por dos columnas, la primera rellena de una resina intercambiadora de iones sobre la que se ha inmovilizado covalentemente la enzima, y la segunda, rellena de esferas de quitosano (entrecruzado con epíclorhidrina) que adsorben las quinonas producto de la reacción catalizada por tirosinasa (Tamura et al., 2010). Otro ejemplo de aplicación de tirosinasa en biorremediación, ha sido la utilización de tirosinasa inmovilizada sobre un soporte compuesto por quitosano-alginato para la eliminación de fenol en un 92 % (Ensuncho et al., 2005).

# Objetivos





## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo fundamental del trabajo de investigación desarrollado es la inmovilización de la enzima tirosinasa de champiñón sobre esteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados y la optimización del proceso para obtener una buena actividad catalítica y estabilidad frente a diferentes factores, así como el estudio de los parámetros cinéticos de los inmovilizados de tirosinasa al actuar frente a sustratos de distinta naturaleza, su estereoespecificidad y su aplicación a la producción de diversos o-difenoles de elevado interés como L-dopa.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos establecidos con la finalidad de alcanzar el objetivo general propuesto son los siguientes:

- Diseñar y obtener un método de inmovilización de tirosinasa adecuado, basado en la adsorción de esta enzima a un éster cinámico de un carbohidrato fotoentrecruzado mediante irradiación con luz ultravioleta y conseguir la optimización del procedimiento.
- Determinar los parámetros que afectan a la inmovilización (pH, tiempo de inmovilización y concentración de enzima) y las características de la enzima inmovilizada (actividad catalítica, pH y temperatura óptimos de reacción, estabilidad térmica, operacional y frente al almacenado).
- Obtener inmovilizados de tirosinasa directamente a partir de extractos de champiñón, que proporcionen mejoras tanto económicas en posibles procesos de industrialización, como aumentos de la actividad enzimática.
- Optimizar el proceso de extracción e inmovilización, incluyendo el estudio de la cantidad de inhibidor de la actividad durante el proceso. Comparar las características de tirosinasa inmovilizada así obtenida con aquellas de la enzima comercial inmovilizada.

- Realizar el estudio de las propiedades cinéticas de tirosinasa inmovilizada (constante de Michaelis, velocidad máxima y constante catalítica) en su actuación sobre sustratos de distinta naturaleza y con distinto grado de hidrofobia/hidrofilia.
- Comparar diferentes ésteres cinámicos de carbohidratos de distinta naturaleza (monosacáridos, disacáridos y oligómeros) como soportes de inmovilización y estudiar las posibles variaciones en el comportamiento de la enzima.
- Determinar la estereoespecificidad de tirosinasa inmovilizada sobre un soporte quiral y otro no quiral, al actuar sobre los isómeros L y D y racémicos de diversos difenoles y de un monofenol.
- Llevar a cabo la producción de diversos *o*-difenoles como L-dopa, a partir de los correspondientes monofenoles, mediante tirosinasa de champiñón inmovilizada. Optimizar el medio necesario para llevar a cabo la reacción y estudiar el rendimiento en la obtención de cada *o*-difenol frente al tiempo de reacción.

# **Materiales y Métodos**





## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. REACTIVOS

La enzima tirosinasa (T-7755; EC 1.14.18.1 de champiñón, 6680 U/mg sólido) utilizada en algunos de los ensayos de esta Memoria fue suministrada por Sigma (España). Los champiñones (*Agaricus bisporus*) utilizados para la extracción y posterior inmovilización directa de tirosinasa fueron suministrados por Mercadona (España). Los distintos monofenoles y *o*-difenoles utilizados como sustratos, fueron obtenidos de Sigma (España). Las disoluciones madre de los sustratos fenólicos se prepararon en ácido fosfórico diluido (0.15 mM) para prevenir la autoxidación. Los carbohidratos: D(-)-sorbitol, dextrina, D-glucosa anhidra, ácido D-glucurónico, glicerina e inulina fueron suministrados por Fluka (España); D(-)-arabinosa, D(-)-fructosa y D(-)-manitol fueron obtenidos de Merck (Alemania); dextrano, sacarosa y almidón se obtuvieron de Panreac (España) y 1,2-*o*-isopropilidén- $\alpha$ -D-glucofuranosa y ácido D-gulónico fueron proporcionados por Aldrich (España). El cloruro de cinamoilo fue suministrado por Sigma (España). Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico y fueron obtenidos de Fluka (España), Panreac (España), J.T. Baker (Holanda), Sigma (España) y Lab-Scan (Irlanda). Se utilizó agua ultrapura obtenida a partir de un sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

### 3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 3.2.1. Espectrofotometría UV-Visible

Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Visible UNICAM 8625 controlado por un ordenador PC provisto del programa Unicam Software Scan 8620/25 y en un espectrofotómetro UV/Visible PerkinElmer, Lambda 35, controlado por un PC provisto de un programa Lambda 35, KinLab. Una bomba peristáltica de flujo variable (DINKO D25V) fue utilizada para bombear el medio de reacción (50-55 ml/min) hacia el espectrofotómetro, donde se sitúa una cubeta de cuarzo (1 cm).

#### 3.2.2. Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se realizaron en pastillas de KBr utilizando un aparato Nicolet Impact 400 en representaciones de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.3. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se realizaron en un espectrómetro Varian Unity 300 MHz. En el caso de los prepolímeros sintetizados se empleó como disolvente cloroformo deuterado. Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los sustratos se llevaron a cabo utilizando como disolvente agua deuterada. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se midieron respecto al valor de tetrametilsilano ( $\delta = 0$ ).

### 3.2.4. Análisis térmico

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido modelo TGA-DSC 2920. Se trabajó en corriente de nitrógeno seco con un flujo de 5 ml/min. Como método de trabajo, se realizó un equilibrado de 10 °C y se utilizó una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 300 °C. Se emplearon cápsulas selladas herméticamente de aluminio, y como material de referencia se utilizó una cápsula vacía.

### 3.2.5. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Finnigan Trace GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan Polaris Q y un muestreador automático Termo Finnigan AS 2000 sampler. La separación de sustancias se llevó a cabo mediante una columna RTX-5MS de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro. Como gas portador se utilizó helio, con una velocidad de flujo de 0.3 ml/min. La temperatura del horno se programó de 100 °C a 220 °C con una rampa de calentamiento de 6 °C/min, y después se mantuvo a temperatura final constante durante un tiempo total de 40 minutos. El volumen de inyección fue de 2  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.6. Cromatografía de líquidos de alta resolución

El equipo cromatográfico utilizado para realizar los ensayos de HPLC fue un VWR Hitachi Elite Lachrom equipado con una bomba L-2130 y acoplado a un muestreador automático L-2200 y un detector de sistema de diodos L-2455 (medida a 250 nm, barrido de 200 a 600 nm). La separación de sustancias se llevó a cabo mediante una columna TeKnoKroma Mediterranea Sea C-18, con unas medidas de 25 cm x 0.40 cm y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . El medio de elución empleado consistió en una disolución de acetato amónico 50 mM y  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  5 mM de pH 3 con una velocidad de elución de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ .

### **3.3. MÉTODOS**

#### **3.3.1. Obtención de los prepolímeros fotorreactivos**

Los prepolímeros fotorreactivos precursores de los soportes de inmovilización fueron los derivados totalmente cinamoilados de diversos carbohidratos y polioles. La preparación se realizó mediante una modificación del método propuesto por Van Cleve (Van Cleve, 1963), del modo que se describe a continuación (Rojas-Melgarejo et al., 2004a, 2004b, 2004c).

#### **Preparación de los ésteres cinámicos de carbohidratos y polioles**

En primer lugar, se disolvieron 0.02 moles de carbohidrato o poliol en 100 ml de piridina en general. En el caso de etil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y D-arabinosa se empleó piridina: dimetilformamida (2:1 v/v), para dextrano la proporción fue 1:2 (v/v) y para D-glucosa la proporción fue 1:1 (v/v). La mezcla se calentó a 60 °C durante una hora hasta la completa disolución del carbohidrato. Una vez enfriada la disolución hasta temperatura ambiente, se agregó una cantidad de cloruro de cinamoilo correspondiente a multiplicar la cantidad equimolar necesaria por el número de grupos hidroxilo a cinamoilar en el hidrato de carbono, más un exceso del 20 %, para asegurar la completa cinamoilación. En concreto se añadieron: 0.15 moles de cloruro de cinamoilo para preparar los derivados cinamoilados de D-sorbitol y D-manitol; 0.07 moles para glicerina, inulina, dextrina, dextrano, almidón, 1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-glucofuranosa y el derivado parcialmente cinamoilado 3,5,6-tricinamoil-D-glucofuranosa; 0.10 moles para D-glucosona, D-arabinosa, etil-D-glucopiranosido, ácido D-glucurónico, y ácido D-gulónico; 0.12 moles para D-fructosa y D-glucosa; y 0.19 moles para sacarosa. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 4 horas.

Transcurrido ese tiempo, se vertió la mezcla producto de la reacción sobre agua fría fuertemente agitada. Al decantar y filtrar esta mezcla, se obtuvo un precipitado que se disolvió en cloroformo. La purificación se llevó a cabo adicionando gota a gota la disolución del producto en cloroformo sobre hexano fuertemente agitado, el sólido obtenido se redisolvió de nuevo en cloroformo, se reprecipitó de nuevo en hexano y se desecó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a presión reducida. La obtención de 3,5,6-Tricinamoil-D-glucofuranosa se realizó por hidrólisis ácida del cinamato de 1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-glucofuranosa (Rojas-Melgarejo et al., 2004c).

Se comprobó que tras la reacción todos los grupos hidroxilo quedaron cinamoilados, es decir que la esterificación fue completa (Rojas-Melgarejo et al. 2004c), mediante diversos análisis experimentales de los compuestos preparados:  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT (experimento de  $^{13}\text{C}$  con transferencia de polarización), experimentos bidimensionales (COSY y proporción de C/H) y espectros de IR.

### **Preparación de D-glucosona y etil- $\alpha$ -D-glucopiranosido**

Para obtener los cinamatos de D-glucosona y etil- $\alpha$ -D-glucopiranosido del modo indicado anteriormente, en primer lugar hubo que llevar a cabo la síntesis de los compuestos de partida.

La preparación de D-arabino-2-hexosulosa (D-glucosona) se llevó a cabo disolviendo 12 g de acetato de cobre(II) y 7.21 g de D-fructosa en 120 ml de metanol-ácido acético-agua (12:1:2). Este medio de reacción se calentó hasta que alcanzó el reflujo, que fue mantenido durante un tiempo de dos horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el medio de reacción para eliminar el óxido de cobre(II) formado. Posteriormente, la disolución se pasó a través de una columna de Amberlita IR-120 con el fin de fijar el  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$  que hubiesen podido quedar libres en la disolución. La disolución resultante se colocó en un matraz y se eliminó el disolvente calentando en un rotavapor. La D-glucosona así obtenida se empleó como producto de partida en la obtención del correspondiente cinamato.

La preparación de etil- $\alpha$ -D-glucopiranosido se llevó a cabo colocando en un matraz de 250 ml 15 g de D-glucosa anhidra, 160 ml de etanol absoluto y unas gotas de ácido sulfúrico hasta que el pH se ajustó entre 3 y 4. El matraz se colocó dentro de un baño con agua y se calentó hasta alcanzar el reflujo, manteniéndose así durante dos horas más. Acabada la reacción se dejó enfriar y se neutralizó el medio con carbonato de plomo. Tras neutralizar, se filtró el medio de reacción y a la disolución final obtenida se le eliminó el disolvente llevando a sequedad el contenido del matraz en un rotavapor. Finalmente, el sólido resultante fue disuelto en metanol y vuelto a llevar a sequedad en el rotavapor. Este producto fue posteriormente cinamoilado del modo descrito.

### 3.3.2. Obtención de los soportes de inmovilización

Los soportes de inmovilización se prepararon por fotoentrecruzamiento de los ésteres cinámicos de los carbohidratos y polioles obtenidos (Rojas-Melgarejo et al., 2004c). Como matriz inerte se emplearon bolas de vidrio Microperl Industrial (Tipo A, 0.6-1.0 mm de diámetro) o JM-50 (1.7-2.4 mm de diámetro) fabricadas por Sovitec Iberia S.A (Barcelona), dependiendo de la cantidad de enzima inmovilizada requerida para cada tipo de experimento. Previamente a su utilización las esferas de vidrio fueron lavadas y desengrasadas. Después se sumergieron en una disolución clorofórmica de prepolímero de 15 g/l o de 5 g/l y se eliminó el disolvente mediante evaporación, quedando una película de prepolímero fotorreactivo sobre las bolas de vidrio. Finalmente, se procedió a la polimerización por entrecruzamiento del prepolímero mediante irradiación durante 15 min en la zona ultravioleta, con una lámpara de vapor de mercurio Osram HOL-125W (de 1.6 mW/cm<sup>2</sup> de potencia) situada a 18 cm de la película a irradiar, obteniendo así el soporte de inmovilización.

### 3.3.3. Determinación de la cantidad de soporte depositado en las bolas de vidrio.

La determinación de la masa de cinamato de sorbitol depositada sobre las bolas de vidrio, se realizó mediante redisolución en un volumen conocido de cloroformo de la película de prepolímero y medida espectrofotométrica de la absorbancia a 280nm ( $\epsilon_{280\text{nm}} = 112000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) atribuida al enlace >C=C< del grupo cinamoilo y se extrapolaron los datos obtenidos en una recta de calibrado realizada en el rango de concentraciones de 3-10 mg/l.

### 3.3.4. Extracción de tirosinasa

Los champiñones utilizados como fuente de tirosinasa fueron liofilizados a -40 °C, en un liofilizador FTS-Systems TDS-3D-MP con cámara y condensador DURA-TOP MP., pulverizados mediante molienda y almacenados a -18 °C. Con el fin de extraer la enzima tirosinasa, se añadieron 600 mg de champiñones, liofilizados y molidos, a 16 ml de una disolución acuosa de *p*-nitrofenol (30 mM, pH 7.0) y posteriormente se agitó magnéticamente durante 30 minutos a 4 °C. Se utilizó un valor de pH 7 con el fin de evitar el pardeamiento del extracto (Nuñez-Delicado et al., 1996). Después, se centrifugó el extracto en un equipo Selecta P-Mixtasel a 6000 rpm durante 5 min, recogiendo unos 9 ml de sobrenadante con la enzima y equilibrándolo a pH 5.5 mediante adición de 1 ml de una disolución acuosa de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M. Finalmente se realizó una segunda centrifugación.

### 3.3.5. Inmovilización de tirosinasa

Para llevar a cabo la inmovilización de tirosinasa de Sigma se añadieron 5 ml de una disolución de enzima de concentración 0.2 mg/ml preparada en tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.8, a una jeringuilla con 14 g de bolitas de vidrio Microperl Industrial (Tipo A, 0.6 - 1.0 mm de diámetro) recubiertas del soporte de inmovilización. La inmovilización se dejó transcurrir durante 20 h a una temperatura de 4 °C.

La inmovilización directa de tirosinasa a partir de un extracto de champiñón, se llevó a cabo añadiendo 3.5, 5 o 10 ml de extracto de tirosinasa (pH 5.5) obtenido del modo indicado en el apartado 3.3.4, a una jeringuilla con 1.5, 3 o 14 g de bolas de vidrio JM-50 (1,7 - 2,4 mm de diámetro), recubiertas del soporte de inmovilización. Se dejó transcurrir la inmovilización durante 1 hora a 4 °C. Cuando se necesitó obtener mayores valores de actividad enzimática, se emplearon bolas de vidrio Microperl Industrial (Tipo A, 0.6-1.0 mm de diámetro) recubiertas del soporte de inmovilización. Para llevar a cabo los ensayos de actividad monofenolasa la inmovilización se realizó añadiendo 5 ml de extracto a 11 g de bolas del tipo Microperl Industrial, mientras que los reactores empleados en la producción de *o*-difenoles se obtuvieron añadiendo 10 ml de extracto de champiñón (pH 5.5) a 22 g de bolas de este tipo.

Una vez transcurrido el tiempo de inmovilización establecido se retiró la disolución de enzima y se procedió al lavado de las muestras de tirosinasa inmovilizada. Para ello se utilizó un dispositivo de lavado de la jeringa en contracorriente y en continuo. Se comprobó que no se liberaba enzima al agua de lavado durante este proceso, al no detectar actividad en las fracciones de lavado.

### 3.3.6. Determinación de la cantidad de tirosinasa inmovilizada

Se llevó a cabo la determinación de la cantidad de enzima tirosinasa inmovilizada en 14 g de bolas de vidrio (de ambos tipos) recubiertas del correspondiente soporte, tras ser sometidas éstas a un tratamiento en el que se disolvió el soporte de inmovilización. Se añadió a cada muestra de tirosinasa inmovilizada, 10 ml de cloroformo y 5 ml de tampón fosfato sódico 400 mM, pH 6.8, y se agitó durante 3 minutos. Se tomó una alícuota de 1.5 ml de la fase acuosa y se ensayó la actividad tirosinasa añadiendo, 0.5 ml de 4-*tert*-butilcatecol 20 mM ( $[TBC]_{\text{final}} = 4 \text{ mM}$ ) y 0.5 ml de tampón fosfato sódico 250 mM, pH 6.8. La cantidad de enzima inmovilizada se determinó extrapolando a partir de una recta de calibrado realizada a partir de concentraciones conocidas de enzima purificada (Rodríguez-López et al., 2000) sometidas al mismo tratamiento.

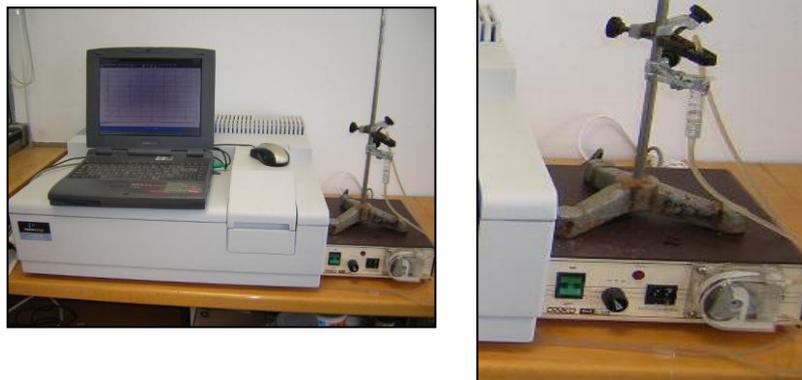
Es decir, se mezclaron 5 ml de una disolución de tirosinasa purificada a una concentración conocida en tampón fosfato sódico 400 mM, pH 6.8, 10 ml de cloroformo, y 14 g de bolas de vidrio recubiertas del soporte (sin enzima), se agitó durante 3 minutos y se tomó una alícuota de 1.5 ml de la fase acuosa para medir su actividad.

### 3.3.7. Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática de tirosinasa se determinó espectrofotométricamente para todos los sustratos. Cada jeringuilla con bolas de vidrio recubiertas de soporte y enzima inmovilizada fue utilizada a modo de un pequeño reactor continuo de lecho empaquetado con recirculación y flujo descendente, a través del cual se bombea la disolución de sustrato, que a su vez pasa por la cubeta de cuarzo situada en el interior del espectrofotómetro. La disolución de sustrato se preparó a la concentración deseada, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6.8. El volumen recirculante varió de 8 a 12.5 ml dependiendo de la masa y tipo de bolas utilizados en el ensayo. La medida de actividad se llevó a cabo registrando el incremento de absorbancia a la longitud de onda adecuada para cada sustrato. En el caso de actividad difenolasa el tiempo máximo de registro fue de 3 minutos y se determinó la velocidad inicial de la reacción enzimática ( $\Delta A/\text{min}$ ) en el tramo inicial recto del espectro obtenido. Cuando se ensayó la actividad monofenolasa, la velocidad de reacción en el estado estacionario se midió después del lag ( $\tau$ =periodo de retardo) que precede a dicho estado, siendo necesarias medidas de 7 minutos de duración. Cuando se utilizó como sustrato 4-*tert*-butilcatecol se siguió el incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm ( $\epsilon_{400\text{nm}} = 1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), provocado por la formación de la correspondiente *o*-quinona durante el transcurso de la reacción enzimática. Cuando se emplearon los sustratos dopamina, dopa,  $\alpha$ -metildopa, isoprenalina, adrenalina, noradrenalina y tirosina se midió el incremento de la absorbancia a las longitudes de onda de 480 nm ( $\epsilon_{480\text{nm}} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 475 nm ( $\epsilon_{475\text{nm}} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 475 nm ( $\epsilon_{475\text{nm}} = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 500 nm ( $\epsilon_{500\text{nm}} = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 475 nm ( $\epsilon_{475\text{nm}} = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 490 nm ( $\epsilon_{490\text{nm}} = 3580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y 302 nm ( $\epsilon_{302\text{nm}} = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) respectivamente, debido a la formación de los correspondientes aminocromos derivados de las *o*-quinonas generadas.

La medida de la actividad enzimática de tirosinasa de Sigma en disolución se llevó a cabo añadiendo 0.6 ml de una disolución de 4-*tert*-butilcatecol 20 mM a 2.4 ml de disolución de enzima de 6.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en una cubeta de cuarzo y midiendo el cambio de absorbancia a 400 nm.

En la presente Memoria se define una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que genera 1  $\mu\text{mol}$  de *o*-quinona en 1 minuto a 20 °C y a pH 6.8 y una concentración inicial de 4-*tert*-butilcatecol de 4 mM. Para la enzima inmovilizada la actividad se expresa como unidades de tirosinasa por gramo de soporte de inmovilización seco (U/g).



**Figura 3.1.** Imagen de una jeringuilla con soporte de inmovilización y enzima inmovilizada, durante el curso de una medida enzimática.

### 3.3.8. Estudio de los parámetros que afectan a la inmovilización

Cuando se estudiaron los parámetros que afectan a la inmovilización de tirosinasa de champiñón, las medidas de actividad enzimática se realizaron empleando una disolución de 4-*tert*-butilcatecol (4 mM) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 6.8) y se expresaron como unidades de tirosinasa por gramo de soporte seco (U/g). Las medidas se realizaron por triplicado considerando el valor medio. Para cada medida, se preparó una jeringuilla de bolas de vidrio con enzima inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol fotoentrecruzado mediante luz ultravioleta. En la inmovilización de tirosinasa de Sigma se estudió el efecto de la concentración de tirosinasa (0.001 – 0.200 mg/ml), en la disolución de inmovilización de tampón fosfato sódico 0.1 M de pH 6.8. En la inmovilización de tirosinasa directamente a partir de un extracto de champiñón, se estudió el efecto del tiempo de extracción (0.25 – 24 h) y de la cantidad de champiñón liofilizado (1- 75 mg/ml) y *p*-nitrofenol (0 – 60 mM) añadidos al extracto. Otros parámetros como el efecto de la concentración inicial de soporte de inmovilización (1 – 15 g/l) en la disolución clorofórmica, el tiempo de irradiación del soporte (5 – 20 minutos), el tiempo de inmovilización (0.5 – 27 h) o el pH de inmovilización (4.0 – 9.5) también fueron objeto de estudio.

### 3.3.9. Ensayos de estabilidad

Las medidas de actividad enzimática en los estudios de estabilidad de tirosinasa de champiñón se realizaron empleando una disolución de 4-*tert*-butilcatecol (4 mM) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 6.8), excepto cuando se estudió el efecto del pH de reacción donde el rango de pH fue de 1.0 a 7.5. Para cada valor de pH, temperatura o tiempo de incubación ensayado se preparó una jeringuilla de bolas de vidrio con enzima inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol fotoentrecruzado. En los estudios de estabilidad térmica se incubaron las muestras de tirosinasa inmovilizada o tirosinasa en disolución en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 6.8), a la temperatura deseada (20 - 65 °C), durante distintos periodos de tiempo (0 - 312 h). La estabilidad de tirosinasa inmovilizada durante el almacenado se evaluó añadiendo a las jeringuillas con enzima inmovilizada 5 ml de agua destilada y almacenándolas a -18 °C durante 7, 14 días o periodos de larga duración de hasta 6 meses. La estabilidad operacional se determinó sometiendo a una misma jeringuilla con enzima inmovilizada a distintos ciclos de 1 minuto de reacción. Los resultados del estudio de los efectos del pH (1.0 - 7.5) y de la temperatura de reacción (15 - 75 °C) sobre la actividad enzimática fueron normalizados, considerando el 100% de actividad enzimática el valor más alto obtenido en cada serie de medidas realizada. En el caso de la estabilidad térmica, operacional o al almacenado se calculó la actividad residual o relativa, RA (%), considerando la actividad inicial (100%) como aquella que poseen las muestras con enzima inmovilizada justo después de la inmovilización y el lavado.

### 3.3.10. Estudio de las constantes cinéticas

Se determinaron las constantes cinéticas en el estado estacionario, velocidad máxima aparente ( $V_{máx}^{ap}$ ) y constante de Michaelis aparente ( $K_m^{ap}$ ), de tirosinasa inmovilizada al actuar sobre diversos sustratos. Para ello, se midieron las velocidades iniciales de la reacción con 4-*tert*-butilcatecol (0.1 - 1.5 mM), dopamina (0.1 - 9.0 mM), L-dopa (0.1 - 7.0 mM), DL-dopa (0.1 - 18.0 mM), D-dopa (0.1 - 7 mM), L- $\alpha$ -metildopa (0.1 - 20.0 mM), DL- $\alpha$ -metildopa (0.1 - 20.0 mM), L-isoprenalina (0.1 - 35.0 mM), D,L-isoprenalina (0.1 - 35.0 mM), L-adrenalina (0.1 - 10.0 mM), DL-adrenalina (0.1 - 12.0 mM), L-noradrenalina (0.1 - 20.0 mM), D-noradrenalina (0.1 - 10.0 mM), L-tirosina (0.05 - 2.0 mM), DL-tirosina (0.05 - 1.50 mM) y D-tirosina (0.05 - 2.00 mM) en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6.8. Las medidas de la velocidad inicial se realizaron por triplicado. Con el fin de evitar el efecto del oxígeno, segundo sustrato, en la actividad enzimática, la concentración de oxígeno se mantuvo saturada en el medio (0.26 mM).

Se utilizaron los recíprocos de las varianzas de la velocidad inicial ( $v_0$ ) como factores de ponderación en el ajuste de regresión no lineal de  $v_0$  frente a la concentración de sustrato en la ecuación de Michaelis. El ajuste se llevó a cabo empleando el programa Sigma Plot 8.0 para Windows. Los valores de las constantes catalíticas aparentes, se obtuvieron a partir de los datos de velocidad máxima y la cantidad de enzima inmovilizada en cada soporte.

### 3.3.11. Producción enzimática de *o*-difenoles

La producción de *o*-difenoles se produjo en pequeños reactores enzimáticos de lecho empaquetado, régimen continuo y flujo recirculante (11.5 ml), consistentes en jeringuillas con 22 g de bolas de vidrio Microperl Industrial (0.6 - 1.0 mm de diámetro) recubiertas de cinamato de D-sorbitol fotoentrecruzado y tirosinasa adsorbida. La reacción enzimática se llevó a cabo en tampón borato sódico 0.5 M, de pH 9.0, siendo la concentración inicial de monofenol de 1 mM. Al medio de reacción se añadió hidroxilamina resultando una concentración de 6.7 mM, o alternativamente, se empleó en su lugar un cebado de *o*-difenol 0.4 mM. En todos los casos se añadió ácido ascórbico, con una concentración inicial de 3, 4.2, 5.5 o 15 mM según se indica en cada caso. Se comprobó que la concentración de ácido ascórbico en el medio de reacción se mantuvo siempre en exceso sobre el necesario para reducir todas las *o*-quinonas producidas, mediante la verificación de la ausencia de formación de color debido a dichas *o*-quinonas. Con el fin de evitar el efecto del oxígeno, segundo sustrato, en la actividad enzimática, la concentración de oxígeno se mantuvo saturada en el medio (0.26 mM). La reacción se dejó transcurrir hasta el tiempo deseado y después se detuvo separando el medio del reactor. A la disolución obtenida, se ajustó el pH del medio a 6.5 en el caso de 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol y 4-metoxicatecol, a pH 3.0 para el ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y a pH 0.5 para el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, añadiendo la cantidad necesaria de HCl (37%), con el fin de facilitar la extracción de los *o*-difenoles. La extracción se llevó a cabo con dos alícuotas 10 ml de dietiléter, separando las fases y recogiendo la fase orgánica, la cual se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró en papel Watman nº 1. Después se evaporó el dietiléter en un rotavapor a temperatura ambiente. Se obtuvieron los trimetilsilil derivados (TMS-derivados) y se analizaron mediante Cromatografía de gases-Espectrometría de masas. Alternativamente, los evaporados que contienen los *o*-difenoles fueron oxidados con peryodato en exceso y las *o*-quinonas generadas se midieron inmediatamente en un espectrofotómetro UV-Visible.

En el caso de L-dopa, transcurrida la reacción enzimática se separó la disolución del reactor enzimático y se ajustó a pH 3.0. Las muestras así obtenidas se analizaron por HPLC.

### **3.3.12. Determinación de los o-difenoles producidos**

#### **Espectrofotometría UV-Visible**

La cantidad de o-difenol producido en cada reacción enzimática se determinó mediante oxidación de la muestra con peryodato sódico en exceso, obteniendo así la correspondiente o-quinona, y midiendo inmediatamente después la absorbancia a su longitud de onda característica: 400 nm en el caso de las o-quinonas generadas a partir de 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol y ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 420 nm para 4-metoxicatecol y 395 nm para ácido 3,4-dihidroxifenilacético. Para esto, después de la evaporación del dietiléter, se añadieron 4 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, de pH 6.8, al matraz seco y se agitó la muestra. Finalmente, se tomó una alícuota de 2 ml y se depositó en una cubeta de cuarzo midiéndose la absorbancia que se tomó como blanco y después, se añadieron 0.5 ml de peryodato sódico 0.2 M (en exceso) y se midió la absorbancia de la o-quinona generada.

La concentración de o-difenol producido se calculó por extrapolación en la correspondiente recta de calibrado, obtenida a partir de disoluciones de concentración conocida del correspondiente o-difenol (0.1 - 1.5 mM), que fueron preparadas en las mismas condiciones y sometidas al mismo proceso de extracción y oxidación descrito anteriormente. Los ensayos se realizaron por triplicado, considerándose el valor medio.

#### **Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS)**

La identificación y cuantificación de los o-difenoles estudiados se llevó a cabo preparando los correspondientes TMS-derivados volátiles y analizándolos en el instrumento de GC-MS. Los TMS-derivados volátiles se prepararon añadiendo al matraz seco (después de la evaporación del dietiléter): 600  $\mu$ L de piridina como disolvente (conteniendo fenantreno como estándar interno), 800  $\mu$ L de hexametildisilazano y 200  $\mu$ L de trimetilclorosilano, siguiendo el método de Makita (Rodríguez-López et al., 2001; Sweely et al., 1963). Las muestras se centrifugaron y filtraron antes de ser analizadas.

La identificación de 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético, así como la de los correspondientes monofenoles (cuando la conversión no fue completa) se confirmó mediante los correspondientes espectros de masas (MS) y cromatogramas GC-MS y su comparación con los de patrones.

Compuesto	$t_r$ (min)	$M^+$ (m/z)	M-15 (m/z)
4- <i>tert</i> -butilfenol	8.3 ± 0.1	222.2 ± 0.1	207.2 ± 0.1
4-metilfenol	5.0 ± 0.1	180.1 ± 0.1	165.1 ± 0.1
4-metoxifenol	7.3 ± 0.1	196.1 ± 0.1	181.1 ± 0.1
ácido <i>p</i> -hidroxifenilpropiónico	16.0 ± 0.2	310.2 ± 0.1	295.2 ± 0.1
ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	13.8 ± 0.2	296.2 ± 0.1	281.2 ± 0.1
4- <i>tert</i> -butilcatecol	12.0 ± 0.1	310.2 ± 0.1	295.2 ± 0.1
4-metilcatecol	9.2 ± 0.1	268.2 ± 0.1	253.2 ± 0.1
4-metoxicatecol	11.7 ± 0.1	284.2 ± 0.1	269.2 ± 0.1
ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico	19.2 ± 0.2	398.3 ± 0.1	383.3 ± 0.1
ácido 3,4-dihidroxifenilacético	17.3 ± 0.2	384.2 ± 0.1	369.2 ± 0.1
fenantreno	16.8 ± 0.1	178.1 ± 0.1	

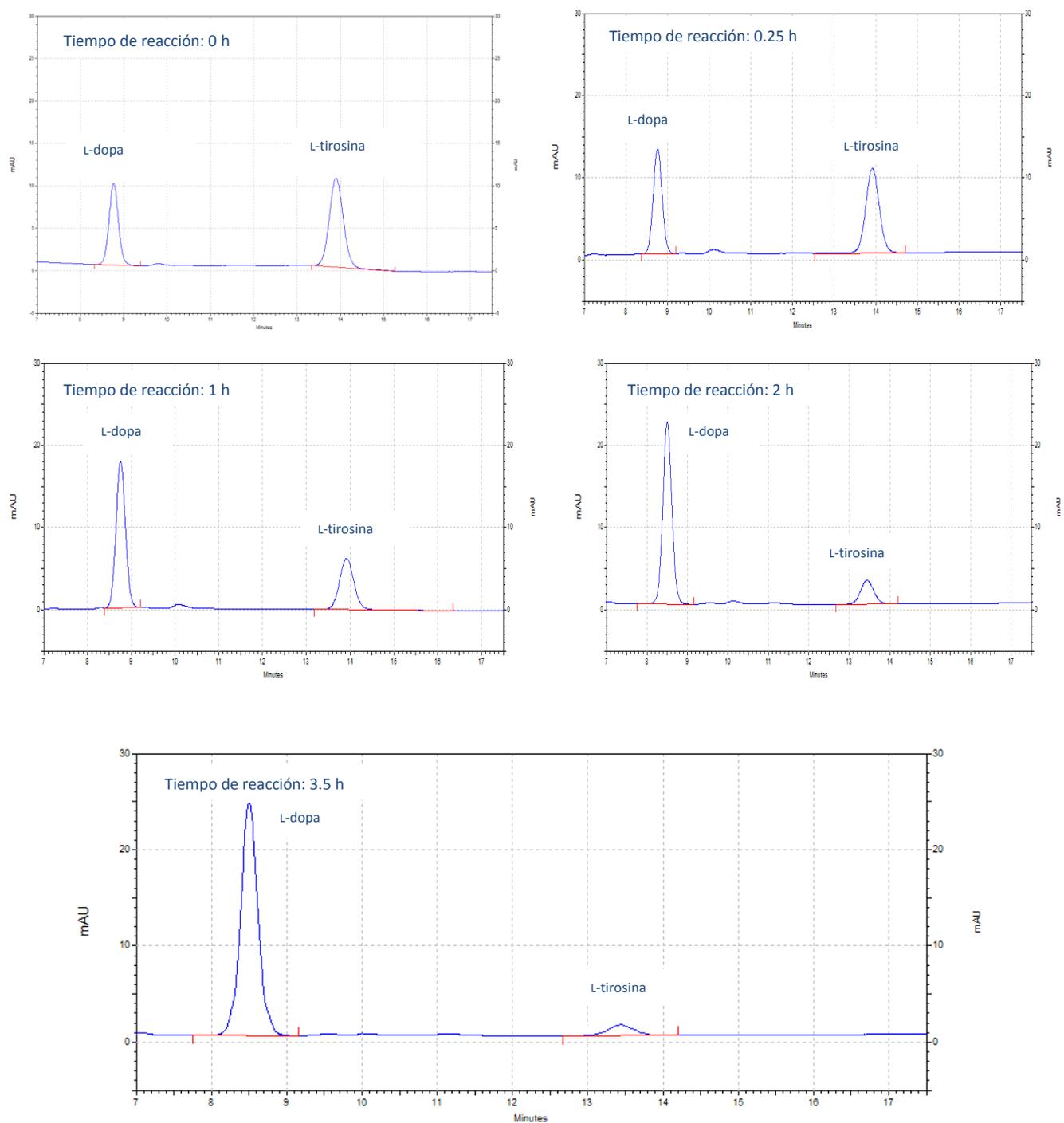
**Tabla 3.1.** Tiempo de retención del Cromatograma de gases y picos  $M^+$  y M-15 del espectro de masas de los TMS-derivados de los monofenoles y *o*-difenoles estudiados.

Para llevar a cabo la cuantificación de 4-*tert*-butilcatecol se construyó una recta de calibrado obtenida con muestras de concentración conocida de este *o*-difenol (0.1 - 1.2 mM), en las mismas condiciones (11.5 ml en 0.5 M tampón borato pH 9, ácido ascórbico 5.5 mM e hidroxilamina 6.7 mM) y sometidas al mismo proceso de extracción, preparación y análisis de los TMS-derivados descrito para el medio de reacción recogido de los reactores enzimáticos. Se determinó en el cromatograma la relación entre el área de la señal de 4-*tert*-butilcatecol y la de fenantreno (estándar interno) ( $A_{TBC}/A_{Fenantreno}$ ), y este valor se extrapolaró en la correspondiente recta de calibrado obtenida del mismo modo. Tanto la GC-MS como la espectrofotometría UV-Visible fueron utilizadas para cuantificar el *o*-difenol producido y los resultados obtenidos mostraron un alto grado de concordancia entre ambos métodos. El cromatograma de gases se utilizó además para llevar a cabo el seguimiento de la reacción enzimática.

### **Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

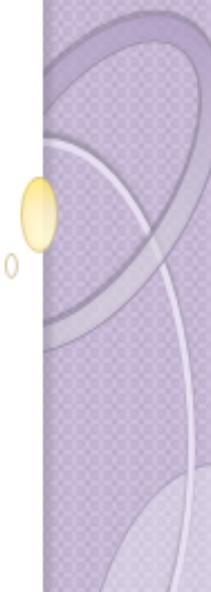
La cantidad de L-dopa producida se determinó mediante análisis de HPLC. Tras detener la reacción enzimática, el medio se ajustó a pH 3.0 y las muestras se analizaron mediante HPLC, tal y como se describe en el apartado 3.2.6. En los cromatogramas obtenidos se detectaron señales a tiempos de retención de  $4.8 \pm 0.2$ ,  $8.6 \pm 0.2$ ,  $13.6 \pm 0.2$  y  $18.6 \pm 0.2$  min que se correspondieron con ácido ascórbico (en exceso), L-dopa, L-tirosina (cuando la conversión no fue completa) y tiramina (estándar interno, 0.3 mM), respectivamente, tal y como se pudo establecer a partir de la comparación con los tiempos de retención de muestras conocidas de cada una de estas sustancias. Para la cuantificación se prepararon y analizaron muestras con sustancias patrón a diferentes concentraciones teóricas y se construyeron rectas de calibrado para cada una de las sustancias implicadas (L-tirosina 0.1- 1 mM, L-dopa 0.4 – 1.4 mM) en las que se representaron las concentraciones añadidas frente a las áreas relativas al estándar interno. Las concentraciones de L-tirosina y L-dopa en las muestras obtenidas se determinaron a partir de las áreas de las señales en los cromatogramas del mismo modo, determinando la relación de áreas  $A_{L-dopa}/A_{tiramina}$  y  $A_{L-tirosina}/A_{tiramina}$  y los valores se llevaron a la correspondiente recta de calibrado (obtenidas en concentraciones y composición análoga) y se calcularon los % de conversión.

Los cromatogramas se utilizaron también para realizar el seguimiento de la reacción enzimática. En la Figura 3.2 se aporta un ejemplo de cómo al inicio de la reacción se observa una señal grande debida a la presencia de L-tirosina, y otra algo más pequeña debida a la presencia de la cantidad inicial de cebado de L-dopa. Conforme aumenta el tiempo de reacción la señal de L-dopa crece mientras que la de L-tirosina disminuye, hasta que a tiempos largos la señal de L-tirosina casi desaparece y la señal de L-dopa es muy grande.



**Figura 3.2.** Análisis de HPLC en la producción de L-dopa a partir de L-tirosina. Evolución de los picos respecto al tiempo de reacción.

# Resultados y Discusión





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aportación de la autora de la Tesis en los trabajos publicados incluidos en esta Memoria, fruto íntegramente de su labor experimental, se describe brevemente a continuación, y es tratada en mayor profundidad en cada apartado de este capítulo.

- Nuevo método de inmovilización de tirosinasa de champiñón obtenida de Sigma sobre cinamato de D-sorbitol fotoentrecruzado; estudio de los parámetros que afectan a la inmovilización y de las características de la enzima inmovilizada (Apartado 4.1 - Artículo 1).
- Inmovilización directa de tirosinasa a partir de un extracto de champiñón; optimización de los parámetros que afectan a la inmovilización y estudio de las características de estos inmovilizados en comparación con los obtenidos anteriormente a partir de tirosinasa de Sigma (Apartado 4.2 - Artículo 2).
- Estudio comparativo de las propiedades cinéticas (constante de Michaelis, velocidad máxima y constante catalítica) que muestra la enzima tirosinasa al actuar sobre sustratos difenólicos de distinta naturaleza (carácter hidrófobo o iónico), tras su inmovilización sobre una gran variedad de ésteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados (Apartado 4.3 - Artículo 3).
- Caracterización de la estereoespecificidad de tirosinasa inmovilizada sobre un soporte quiral y otro no quiral, al actuar sobre los isómeros L y D puros y sobre el racémico DL de diversos difenoles y de un monofenol, mediante la determinación y comparación de las propiedades cinéticas en cada caso (Apartado 4.4 - Artículo 4).
- Producción de L-dopa y otros *o*-difenoles a partir de tirosinasa de champiñón inmovilizada; estudio del rendimiento en la obtención de *o*-difenoel frente al tiempo de reacción y optimización del medio necesario para llevar a cabo la reacción (Apartados 4.5 y 4.6 - Artículo 5 y Patente).



## **4.1. ESTER CINÁMICO DE D-SORBITOL PARA LA INMOVILIZACIÓN DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN**

*Los resultados del estudio de los parámetros que afectan a la inmovilización de tirosinasa de champiñón en este soporte y su comportamiento tras la inmovilización, han dado lugar a la siguiente publicación adjunta.*

### **4.1.1. Título**

Cinnamic ester of D-sorbitol for immobilization of mushroom tyrosinase.

### **4.1.2. Autores**

María Elisa Marín Zamora, Francisco Rojas Melgarejo, Francisco García Cánovas y Pedro Antonio García Ruiz.

### **4.1.3. Referencia**

Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 1356-1364 (2005).

### **4.1.4. Resumen**

La enzima tirosinasa de champiñón fue inmovilizada por adsorción sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol. La polimerización y entrecruzamiento del derivado obtenido inicialmente se llevó a cabo mediante irradiación en la región ultravioleta, donde este prepolímero muestra su máxima sensibilidad. La inmovilización de tirosinasa en este soporte conlleva un proceso de adsorción física e intensas interacciones hidrofóbicas entre los grupos cinamoilo del soporte y grupos de la enzima relacionados. El valor de pH, la concentración de enzima y el tiempo de inmovilización fueron todos ellos parámetros importantes que afectan a la eficiencia de la inmovilización; también, la eficiencia en la inmovilización de enzima se correlacionó bien con el punto isoeléctrico de tirosinasa. La enzima inmovilizada mostró un pH óptimo de medida de 3.5 y una mayor actividad a valores de pH ácidos y neutros que la enzima soluble. La temperatura óptima de reacción fue de 35 °C y el perfil de temperaturas fue más amplio que el de la enzima libre o el de la enzima inmovilizada sobre otros soportes. La constante de Michaelis aparente de tirosinasa de champiñón inmovilizada sobre el derivado de cinamato de D-sorbitol al actuar sobre el sustrato 4-*tert*-butilcatecol fue de  $0.40 \pm 0.02$  mmol dm<sup>-3</sup>, que fue inferior que para la enzima soluble, sugiriendo que la afinidad de esta enzima por este sustrato fue mayor estando inmovilizada que en disolución. La inmovilización estabilizó la enzima y la hizo menos susceptible a la pérdida de actividad durante el almacenado a valores de pH del rango

de 4-5.5, y la inactivación suicida de tirosinasa inmovilizada fue nula o despreciable en un medio de reacción con 4-*tert*-butilcatecol a una concentración de 0.4 mmol dm<sup>-3</sup>. Los resultados muestran que el éster cinámico del carbohidrato D-sorbitol es un soporte apropiado para la inmovilización de tirosinasa y podría utilizarse para diversas aplicaciones de esta enzima.

#### **4.1.5. Dirección URL**

<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1334>

## **4.2. INMOVILIZACIÓN DIRECTA DE ENZIMA TIROSINASA A PARTIR DE CHAMPIÑONES NATURALES (*Agaricus bisporus*) SOBRE ESTER CINÁMICO DE D-SORBITOL**

Los resultados del estudio de los parámetros que afectan al proceso de extracción de tirosinasa a partir de champiñones (*Agaricus bisporus*) y a su inmovilización, así como el estudio del comportamiento de la enzima inmovilizada, han dado lugar a la siguiente publicación adjunta.

### **4.2.1. Título**

Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester.

### **4.2.2. Autores**

María Elisa Marín Zamora, Francisco Rojas Melgarejo, Francisco García Cánovas y Pedro Antonio García Ruíz.

### **4.2.3. Referencia**

Journal of Biotechnology, 126, 295-303 (2006).

### **4.2.4. Resumen**

Tirosinasa de champiñón fue inmovilizada a partir de un extracto sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol mediante adsorción directa como resultado de las intensas interacciones hidrofóbicas que tuvieron lugar. El valor del pH de inmovilización y la masa de champiñones liofilizados fueron parámetros importantes que afectaron a la eficiencia de la inmovilización, mientras que el tiempo de inmovilización y la concentración del soporte de inmovilización no fueron importantes a este respecto. La enzima extraída/inmovilizada pudo ser medida mejor a pH por encima de 3.5 y la temperatura óptima de medida fue de 55 °C. La constante de Michaelis aparente utilizando 4-*tert*-butilcatecol como sustrato fue de  $0.38 \pm 0.02$  mM, que fue menor que la de la enzima soluble de Sigma ( $1.41 \pm 0.20$  mM). La inmovilización estabilizó la enzima extraída frente a la inactivación térmica y la hizo menos susceptible a la pérdida de actividad durante el almacenado. La estabilidad operacional fue mayor que en el caso de tirosinasa suministrada por Sigma e inmovilizada en el mismo soporte. Los resultados muestran que el uso de *p*-nitrofenol como un sustrato-inhibidor de la enzima durante su extracción e inmovilización hizo innecesario el uso de ácido ascórbico y es un método apropiado para extraer e

inmovilizar la enzima tirosinasa, proporcionando una buena actividad enzimática y estabilidad.

#### **4.2.5. Dirección URL**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.04.024>

### **4.3. EFECTOS DE LOS SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA: UN ESTUDIO COMPARATIVO EMPLEANDO VARIOS SUSTRATOS.**

*Los resultados obtenidos al estudiar las propiedades cinéticas de la enzima tirosina inmovilizada sobre diversos ésteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados, al actuar sobre diversos sustratos enzimáticos de distinto carácter iónico, han dado lugar a la siguiente publicación adjunta.*

#### **4.3.1. Título**

Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates.

#### **4.3.2. Autores**

María Elisa Marín Zamora, Francisco Rojas Melgarejo, Francisco García Cánovas y Pedro Antonio García Ruiz.

#### **4.3.3. Referencia**

Journal of Biotechnology, 131, 388-396 (2007).

#### **4.3.4. Resumen**

Tirosinasa de champiñón fue inmovilizada a partir de un extracto sobre bolas de vidrio recubiertas con uno de los siguientes compuestos: los derivados totalmente cinamoilados entrecruzados de glicerina, D-sorbitol, D-manitol, 1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-glucofuranosa, ácido D-glucurónico, ácido D-gulónico, sacarosa, D-glucosona, D-arabinosa, D-fructosa, D-glucosa, etil-D-glucopiranosido, inulina, dextrina, dextrano o almidón, o el derivado parcialmente cinamoilado 3,5,6-tricinamoil-D-glucofuranosa obtenido a partir de la hidrólisis ácida de 1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -D-glucofuranosa. La enzima fue inmovilizada por adsorción directa sobre el soporte y se halló que la cantidad de tirosinasa inmovilizada aumenta con la hidrofobicidad de los soportes. Se estudiaron las constantes cinéticas de tirosinasa inmovilizada al actuar sobre los sustratos 4-*tert*-butilcatecol, dopamina y DL-dopa. Cuando tirosinasa inmovilizada actuó sobre 4-*tert*-butilcatecol, los valores de  $K_m^{ap}$  fueron menores que los obtenidos para tirosinasa en disolución, mientras que cuando se utilizaron dopamina y DL-dopa, las  $K_m^{ap}$  aparentes fueron mayores. El orden de los sustratos respecto a sus grupos ionizables, DL-dopa (dos grupos ionizables) > dopamina (un grupo ionizable) > 4-*tert*-

butilcatecol (ningún grupo ionizable) coincidió con el orden de los valores de  $K_m^{ap}$  mostrados por tirosinasa inmovilizada en los soportes hidrofóbicos, y fue el inverso del observado para tirosinasa en disolución. Los valores de  $k_{cat}^{ap}$  de tirosinasa inmovilizada fueron en todos los casos superiores a los de tirosinasa soluble y dependieron de la naturaleza del soporte y de la hidrofobicidad del sustrato, significando esto que es posible diseñar soportes con diferentes grados de selectividad para una mezcla de sustratos de la enzima en el medio de reacción.

#### 4.3.5. Dirección URL

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.004>

#### **4.4. ESTEREOESPECIFICIDAD DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA EN UN SOPORTE QUIRAL Y EN OTRO NO QUIRAL**

*Los resultados obtenidos sobre las propiedades cinéticas de la enzima tirosina inmovilizada sobre un soporte quiral y otro no quiral, al actuar sobre los isómeros L, DL y D de diversos o-difenoles y de un monofenol, han dado lugar a la siguiente publicación adjunta.*

##### **4.4.1. Título**

Stereospecificity of mushroom tyrosinase immobilized on a chiral and a nonchiral support.

##### **4.4.2. Autores**

María Elisa Marín Zamora, Francisco Rojas Melgarejo, Francisco García Cánovas y Pedro Antonio García Ruíz.

##### **4.4.3. Referencia**

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 4569-4575 (2007).

##### **4.4.4. Resumen**

Tirosinasa de champiñón fue inmovilizada a partir de un extracto sobre bolas de vidrio recubiertas con los derivados totalmente cinamoilados entrecruzados de D-sorbitol (cinamato de sorbitol) y glicerina (cinamato de glicerina). La enzima fue inmovilizada sobre el soporte por adsorción directa, y la cantidad de tirosinasa inmovilizada fue mayor para cinamato de sorbitol, el soporte con mayor número de hidroxilos esterificados por unidad de monosacárido, que para cinamato de glicerina. Se presentan los resultados obtenidos del estudio de estereoespecificidad de la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de champiñón inmovilizada. Los enantiómeros L-tirosina, DL-tirosina, D-tirosina, L-dopa, DL-dopa, D-dopa, L- $\alpha$ -metildopa, DL- $\alpha$ -metildopa, L-isoprenalina, D,L-isoprenalina, L-adrenalina, DL-adrenalina, L-noradrenalina y D-noradrenalina se ensayaron con tirosinasa inmovilizada sobre un soporte quiral (cinamato de sorbitol), mientras que L-tirosina, DL-tirosina, D-tirosina, L-dopa, DL-dopa, D-dopa, L- $\alpha$ -metildopa y DL- $\alpha$ -metildopa se ensayaron con tirosinasa inmovilizada en un soporte no quiral (cinamato de glicerina). Se obtuvieron los mismos valores de  $V_{\max}^{ap}$ , para cada serie de enantiómeros. Sin embargo, los valores de  $K_m^{ap}$  fueron diferentes, los isómeros L mostraron valores

menores que los isómeros DL, mientras que los mayores valores de  $K_m^{ap}$  se obtuvieron con los isómeros D. No se observaron diferencias en la estereoespecificidad de tirosinasa inmovilizada en un soporte quiral (cinamato de sorbitol) o uno no quiral (cinamato de glicerina).

#### **4.4.5. Dirección URL**

<http://dx.doi.org/10.1021/jf0701178>

## 4.5. PRODUCCIÓN DE O-DIFENOLES MEDIANTE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN INMOVILIZADA.

Los resultados obtenidos en la producción de diversos o-difenoles mediante la utilización de tirosinasa de champiñón inmovilizada, ha dado lugar a la siguiente publicación adjunta.

### 4.5.1. Título

Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase.

### 4.5.2. Autores

María Elisa Marín Zamora, Francisco Rojas Melgarejo, Francisco García Cánovas y Pedro Antonio García Ruíz.

### 4.5.3. Referencia

Journal of Biotechnology, 139, 163-168 (2009).

### 4.5.4. Resumen

Los o-difenoles 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético fueron producidos a partir de los correspondientes monofenoles (4-*tert*-butilfenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico y ácido *p*-hidroxifenilacético) utilizando tirosinasa de champiñón inmovilizada de *Agaricus bisporus*. En todos los casos el rendimiento fue  $R_{\text{difenol}} \geq 88-96\%$ , siendo éste, de acuerdo con la bibliografía, el mayor rendimiento obtenido hasta la fecha, utilizando tirosinasa. La reacción se llevó a cabo en tampón borato 0.5 M de pH 9.0, que fue utilizado para minimizar la actividad difenolasa de tirosinasa mediante complejación de los o-difenoles generados. El medio de reacción incluía también hidroxilamina y ácido ascórbico, siendo la primera utilizada para reducir la metatirosinasa a desoxitirosinasa, cerrando el ciclo catalítico, y el segundo para reducir la o-quinona producida a o-difenol. La inactivación de tirosinasa por ácido ascórbico también fue minimizada por la formación de un complejo ácido ascórbico-borato. Se determinaron las concentraciones de los compuestos o-difenólicos obtenidos a diferentes tiempos de reacción, mediante análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopía UV-Visible, llevándose a cabo la discusión de los resultados experimentales.

#### **4.5.5. Dirección URL**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.014>

## **4.6. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE O-DIFENOLES.**

Los resultados obtenidos tras la optimización de la producción de diversos *o*-difenoles mediante la utilización de tirosinasa de champiñón inmovilizada y la posterior aplicación de este método a la obtención de *L*-dopa, han dado lugar a la siguiente publicación adjunta.

### **4.6.1. Patente**

Inventores: Pedro Antonio García Ruiz., Francisco García Cánovas y María Elisa Marín Zamora.

Título: Procedimiento de obtención de *o*-difenoles.

Titular: Universidad de Murcia

Patente Española: ES2301453B1.

Fecha de publicación: 16/02/2009

### **4.6.2. Resumen**

Procedimiento de síntesis enzimática de *o*-difenoles a partir del correspondiente monofenol que es susceptible de ser hidroxilado en posición orto con respecto al grupo hidroxilo. La reacción es catalizada enzimáticamente con tirosinasa y transcurre en presencia de tampón borato.

### **4.6.3. Dirección URL**

[http://lp.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20090216&D=B=lp.espacenet.com&locale=es\\_LP&CC=ES&NR=2301453B1&KC=B1&ND=4](http://lp.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20090216&D=B=lp.espacenet.com&locale=es_LP&CC=ES&NR=2301453B1&KC=B1&ND=4)

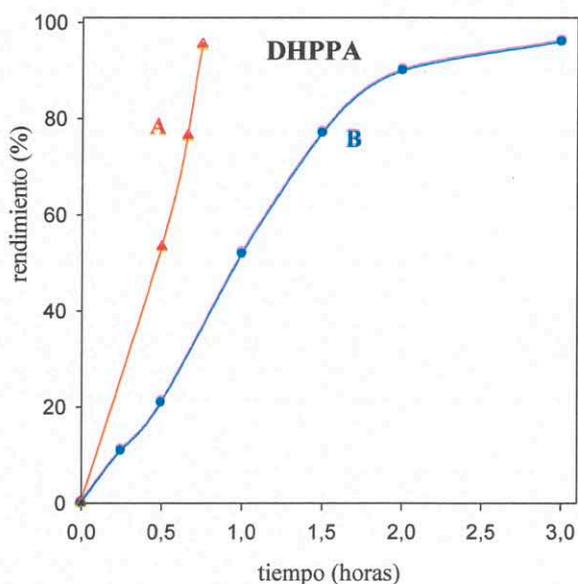
### **4.6.4. Descripción de los ejemplos de la patente**

Se llevó a cabo la producción de *L*-dopa y otros *o*-difenoles como 4-*tert*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético a partir de los correspondientes monofenoles (*L*-tirosina, 4-*tert*-butilfenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico y ácido *p*-hidroxifenilacético, respectivamente), mediante el empleo de tirosinasa inmovilizada directamente a partir de un extracto de champiñón sobre bolas de vidrio recubiertas con el derivado fotoentrecruzado y totalmente cinamoilado de *D*-sorbitol, en pequeños reactores de lecho empaquetado de régimen continuo y flujo recirculante. La reacción se llevó a cabo en tampón borato sódico 0.5 M de pH 9.0 y en presencia de ácido ascórbico en exceso, siendo la concentración inicial de monofenol y *o*-difenol de 1.0 mM y 0.4 mM respectivamente. La adición al medio de una cantidad inicial del

correspondiente *o*-difenoil permitió la reducción de metatirosinasa a desoxitirosinasa, cerrando el ciclo catalítico en ausencia de hidroxilamina (Apartado 4.5). Se empleó ácido ascórbico para reducir la fracción de quinona producida a *o*-difenoil. El borato complejó al *o*-difenoil minimizando así otras reacciones enzimáticas no deseadas y al ácido ascórbico minimizando la inactivación enzimática. La cantidad de *o*-difenoil y ácido ascórbico libres en el medio (en equilibrio con sus correspondientes complejos con borato) fue suficiente para cumplir las funciones descritas (cerrar el ciclo catalítico en el primer caso y reducir la quinona producida en el segundo). La concentración de *o*-difenoil presente en el medio a distintos tiempos de reacción fue determinada mediante espectroscopía UV-Visible, o en el caso de L-dopa, mediante análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC. Se obtuvieron elevados rendimientos del 89-96 % en la síntesis de los diferentes *o*-difenoiles ensayados. Los tiempos de reacción necesarios para obtener la máxima conversión fueron de 3 a 6 veces inferiores a los obtenidos cuando se empleó hidroxilamina para cerrar el ciclo catalítico (Apartado 4.5), lo que puso claramente de manifiesto la ventaja de emplear un cebado con *o*-difenoil. Este método optimizado se empleó finalmente para la obtención de L-dopa obteniendo un rendimiento del 90% en un tiempo de 3'5 horas, no ensayándose tiempos mayores por los pequeños incrementos de rendimiento obtenibles para un proceso de obtención industrial y el consumo creciente de ácido ascórbico. Por primera vez se describió en la bibliografía un rendimiento tan elevado en la obtención de L-dopa mediante tirosinasa inmovilizada.

#### 4.6.5. Información adicional

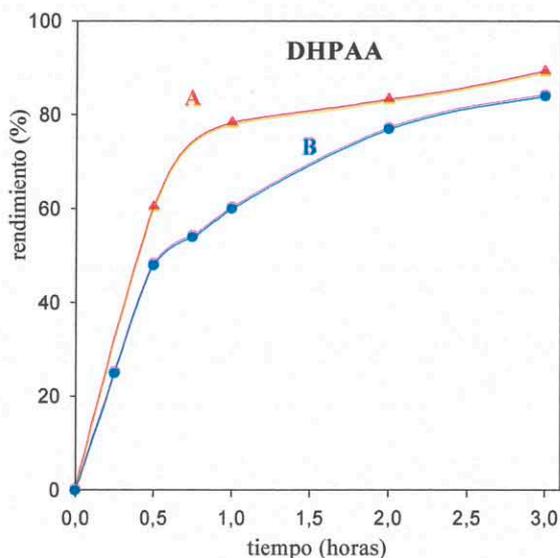
Aunque estos resultados se recogen en los ejemplos de la patente que se adjunta a continuación, se ha considerado oportuno añadir las siguientes gráficas aclarativas (Figuras 4.1 – 4.6), donde además se lleva a cabo la comparación con los resultados obtenidos en el Apartado 4.5. En ellas, se ha representado el rendimiento conseguido en la producción del correspondiente *o*-difenoil a distintos tiempos de reacción. La curva A, de color rojo, representa el rendimiento de la reacción cuando se utilizó una cantidad inicial de *o*-difenoil para cerrar el ciclo catalítico. Mientras que la curva B, de color azul, representa los resultados obtenidos cuando se utilizó una cantidad inicial de hidroxilamina para dicha función. En el caso de la producción de L-dopa se empleó el método óptimo desarrollado.



**Figura 4.1. Producción de ácido 3,4-dihidroxi fenilpropiónico (DHPPA).**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de DHPPA frente al tiempo de reacción (horas).

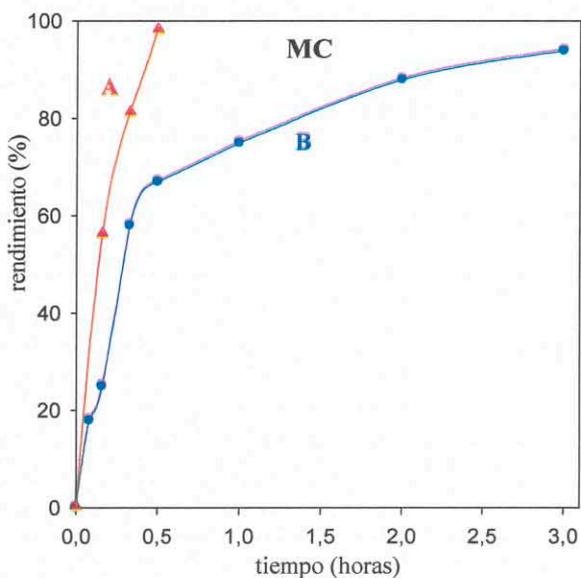
El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, ácido p-hidroxifenilpropiónico 1 mM, ácido ascórbico en exceso, y ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico 0.4 mM (A) o hidroxilamina 6.7 mM (B).



**Figura 4.2. Producción de ácido 3,4-dihidroxi fenilacético (DHPAA).**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de DHPAA frente al tiempo de reacción (horas).

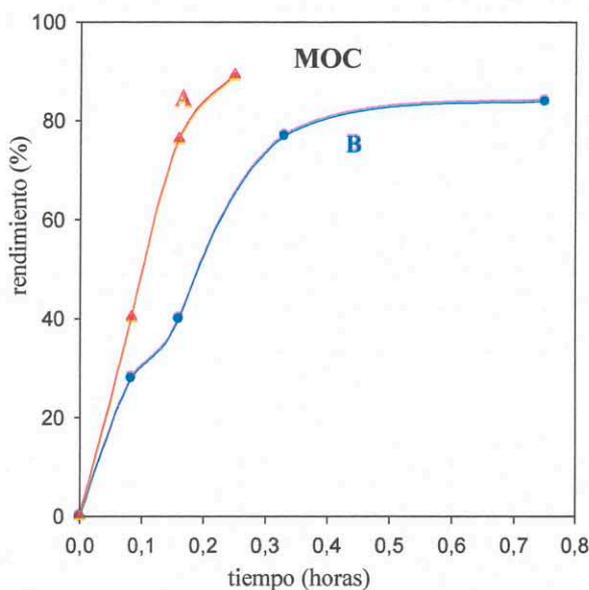
El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, ácido p-hidroxifenilacético 1 mM, ácido ascórbico en exceso, y ácido 3,4-dihidroxifenilacético 0.4 mM (A) o hidroxilamina 6.7 mM (B).



**Figura 4.3. Producción de 4-metilcatecol (MC).**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de MC frente al tiempo de reacción (horas).

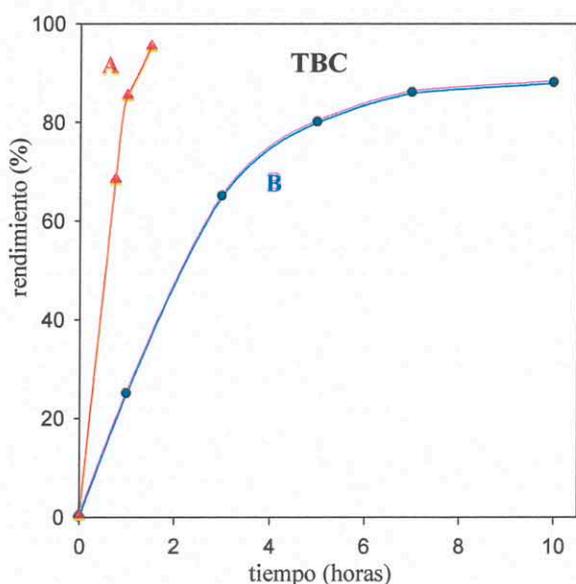
El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, 4-metilfenol 1 mM, ácido ascórbico en exceso, y 4-metilcatecol 0.4 mM (A) o hidroxilamina 6.7 mM (B).



**Figura 4.4. Producción de 4-metoxicatecol (MOC).**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de MOC frente al tiempo de reacción (horas).

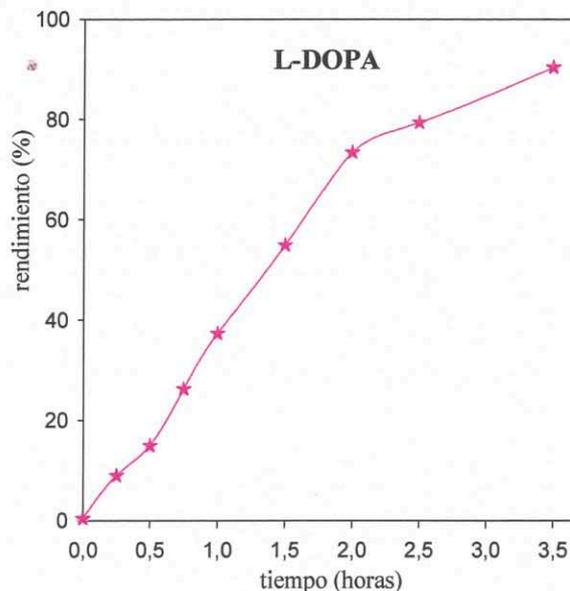
El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, 4-metoxifenol 1 mM, ácido ascórbico en exceso, y 4-metoxicatecol 0.4 mM (A) o hidroxilamina 6.7 mM (B).



**Figura 4.5. Producción de 4-tert-butilcatecol (TBC).**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de TBC frente al tiempo de reacción (horas).

El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, 4-*tert*-butilfenol 1 mM, ácido ascórbico en exceso, y 4-*tert*-butilcatecol 0.4 mM (A) o hidroxilamina 6.7 mM (B).



**Figura 4.6. Producción de L-Dopa.**

Representación del rendimiento (%) en la obtención de L-Dopa frente al tiempo de reacción (horas).

El medio de reacción fue tampón borato 0.5 M de pH 9, L-tirosina 1 mM, L-dopa 0.4 mM y ácido ascórbico en exceso.

## 4.7. RESUMEN DE RESULTADOS.

1. Se ha desarrollado y optimizado un método de inmovilización de tirosinasa de champiñón sobre el éster cinámico de D-sorbitol fotoentrecruzado, determinándose los parámetros que afectan a la inmovilización y las características de la enzima inmovilizada.
2. También se ha llevado a cabo la inmovilización de tirosinasa sobre una gran variedad de ésteres cinámicos de carbohidratos obteniendo buenas actividades enzimáticas en todos ellos.
3. Se ha desarrollado un nuevo método de inmovilización directa de tirosinasa a partir de un extracto de champiñón liofilizado, en el que se usa *p*-nitrofenol como un sustrato de baja actividad para preservar a la enzima durante el proceso de extracción/inmovilización.
4. Los inmovilizados de tirosinasa obtenidos a partir de extractos de champiñón presentan un mejor comportamiento en cuanto a los datos de actividad y estabilidad registrados, que los inmovilizados de tirosinasa de champiñón de Sigma o tirosinasa en disolución.
5. Del estudio de las constantes cinéticas de tirosinasa inmovilizada sobre diversos ésteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados al actuar sobre sustratos de distinta naturaleza cabe resaltar:
  - El orden de valores de  $K_m^{ap}$  respecto a sustratos de distinta hidrofilia para tirosinasa inmovilizada fue el inverso del obtenido para tirosinasa en disolución.
  - Los valores de  $k_{cat}^{ap}$  para tirosinasa inmovilizada dependen de la naturaleza del soporte y del sustrato y son en todos los casos superiores a los de tirosinasa en disolución, lo que supone otra gran ventaja de la inmovilización.
6. Del estudio de la estereoespecificidad de tirosinasa inmovilizada sobre un soporte quiral y otro no quiral al actuar sobre los enantiómeros L y D y racémicos DL de diversos difenoles y de un monofenol, es de resaltar que:
  - La estereoespecificidad de tirosinasa inmovilizada no depende de la quiralidad o no del soporte de inmovilización, ni de la naturaleza difenólica o monofenólica del sustrato.

- La estereoespecificidad mostrada respecto a los valores de  $V_{\max}^{ap}$  y  $K_m^{ap}$  sigue la misma tendencia que la estereoespecificidad presentada por tirosinasa en disolución.
  - Los valores de  $V_{\max}^{ap}$  y  $k_{cat}^{ap}$  son iguales en cada serie de enantiómeros, mientras que los valores de  $K_m^{ap}$  son distintos y siguen el orden  $L < DL < D$ .
7. Se ha desarrollado un nuevo método de obtención de *o*-difenoles, a partir de sus correspondientes monofenoles, utilizando los nuevos inmovilizados de tirosinasa obtenidos a partir de extractos de champiñón del cual cabe destacar:
- La utilización de tampón borato permite obtener altos rendimientos en *o*-difenoles, al preservarse estos y el ácido ascórbico, de la acción de la enzima, por complejación.
  - La velocidad de obtención de *o*-difenoles aumenta por la adición de sustratos capaces de cerrar el ciclo catalítico como hidroxilamina o un *o*-difenol, siendo mucho más eficiente el cebado con una cantidad inicial del *o*-difenol a obtener.
  - Se obtienen en todos los casos rendimientos de reacción muy elevados (88-96%).
  - Permite obtener L-dopa (medicamento de gran consumo) y toda una serie de otros *o*-difenoles de aplicación industrial (resultados protegidos mediante patente de invención).

# Conclusiones





## 5. CONCLUSIONES

1. Los ésteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados son soportes adecuados para la inmovilización de tirosinasa de champiñón.
2. Los ésteres cinámicos de carbohidratos con un mayor grado de hidrofobia retienen una mayor cantidad de enzima y el pH óptimo de inmovilización coincide con el punto isoeléctrico de la enzima, lo que confirma que la inmovilización ocurre por adsorción hidrófoba al soporte orgánico.
3. La optimización de factores como la concentración de tirosinasa en la disolución de inmovilización y el pH de inmovilización, permite obtener actividades enzimáticas más altas en los inmovilizados.
4. La inmovilización da lugar a una estabilización de la enzima frente a la temperatura y pH de reacción respecto a tirosinasa en disolución.
5. El método desarrollado de inmovilización directa de tirosinasa a partir de extractos de champiñón liofilizado es muy eficaz para extraer e inmovilizar la enzima y apropiado para aplicaciones industriales.
6. La minimización de la actividad enzimática durante la extracción e inmovilización de tirosinasa a partir de champiñón liofilizado puede hacerse eficazmente utilizando *p*-nitrofenol como sustrato competitivo de muy baja actividad.
7. Los inmovilizados de extractos de champiñón presentan una gran mejora de los valores de actividad enzimática, de la estabilidad térmica, de la estabilidad operacional y de la estabilidad durante el almacenado, respecto a los inmovilizados de tirosinasa obtenida de Sigma.
8. La afinidad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada para una serie de sustratos sigue un orden inverso del obtenido para tirosinasa en disolución y depende del soporte de inmovilización utilizado, siendo las constantes de Michaelis ( $K_m^{ap}$ ) menores para sustratos hidrófobos y mayores para sustratos iónicos, lo que puede explicarse por variaciones en la concentración de sustrato en el microentorno de la enzima dependiendo del grado de afinidad soporte-sustrato.
9. Los valores de las constantes catalíticas aparentes  $k_{cat}^{ap}$  de tirosinasa inmovilizada son en todos los casos superiores a los de tirosinasa en disolución y mayores para

sustratos iónicos, lo que sugiere que cuando la enzima se inmoviliza, se despliega uniéndose al soporte por la parte hidrófoba, quedando los centros activos más accesibles al sustrato que los de la enzima en disolución.

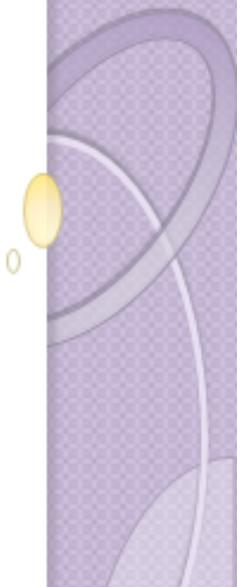
10. Estos resultados apuntan a que además de ser determinantes las interacciones sustrato-enzima en el comportamiento cinético de la enzima, en el caso de tirosinasa inmovilizada habría que considerar también las interacciones sustrato-soporte, así como las interacciones enzima-soporte
11. Las eficacias catalíticas ( $k_{cat}^{ap}/K_m^{ap}$ ) de tirosinasa inmovilizada dependen de la naturaleza del soporte y del sustrato, y son superiores a las de tirosinasa en disolución.
12. Eligiendo el soporte adecuado puede regularse la selectividad de la enzima hacia un determinado sustrato, atenuando la competencia de otros sustratos también presentes en el medio de reacción, lo que es de gran interés en el diseño de biosensores enzimáticos.
13. Tirosinasa inmovilizada, al igual que tirosinasa en disolución, no muestra estereoespecificidad respecto a los valores de  $V_{max}^{ap}$  y  $k_{cat}^{ap}$ , lo que se explica por el hecho de que la quiralidad del grupo alejado de los hidroxilos fenólicos no tiene efecto sobre su poder nucleofílico y consecuentemente no la tiene sobre la etapa determinante de la velocidad de reacción.
14. Tirosinasa inmovilizada, al igual que tirosinasa en disolución, muestra estereoespecificidad respecto a su afinidad por el sustrato, siendo menores los valores de  $K_m^{ap}$  para los isómeros L que para los racémicos y estos a su vez menores que para los isómeros D.
15. Tirosinasa inmovilizada, al igual que tirosinasa en disolución, muestra un comportamiento distinto para los isómeros D y L con respecto al periodo de retardo o lag ( $\tau$ ) de la actividad monofenolasa, siguiendo un orden inverso al de los valores de  $K_m^{ap}$ .
16. La quiralidad del soporte de inmovilización no afecta a la estereoespecificidad de tirosinasa, pues se obtienen resultados análogos cuando la inmovilización ocurre en un soporte quiral o en otro no quiral.
17. El procedimiento desarrollado para la obtención de *o*-difenoles a partir de sus correspondientes monofenoles, mediante el empleo de reactores de lecho

empaquetado de régimen continuo y flujo recirculante, consistentes en tirosinasa inmovilizada sobre esferas de vidrio recubiertas de cinamato de D-sorbitol fotoentrecruzado, permite obtener rendimientos elevados (88-96%), muy superiores a los descritos en la bibliografía.

- 18.** La utilización de borato para complejar los *o*-difenoles obtenidos y el ácido ascórbico, consigue minimizar tanto la actividad difenolasa como la inactivación de tirosinasa por *o*-difenoles y ácido ascórbico y permite obtener *o*-difenoles con un menor consumo de ácido ascórbico.
- 19.** El empleo de hidroxilamina para reducir metatirosinasa ( $E_m$ ) a desoxitirosinasa ( $E_d$ ) y cerrar así el ciclo catalítico en la obtención de orto difenoles mediante tirosinasa inmovilizada disminuye significativamente el tiempo de retardo (lag).
- 20.** La sustitución de hidroxilamina añadiendo en su lugar una concentración inicial de *o*-difenol para cerrar el ciclo catalítico permite reducir en mayor medida el tiempo de reacción.



# Bibliografía





## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdellah, L., Boutevin, B., Caporiccio, G. y Guida-Pietrasanta, F. (2003) Study of photocrosslinkable polysiloxanes bearing gem di-styrenyl groups. Synthesis and thermal properties. *Eur. Polym. J.* **39**, 49-56.
- Abdullah, J., Ahmad, M., Karuppiah, N., Heng, L.Y. y Sidek, H. (2006) Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sens. Actuators B* **114**, 604-609.
- Aert, H.A.M., Sijbesma, R.P., Fischer, H., Waal, B.F.M, Gilberts, J., Maas, J.H., Broer, D. y Meijer, E.W. (1998) Selective photo-crosslinking of microphase-separated multiblock copolymers of poly(dimethylsiloxane) and phenylene diacrylate polyesters. *Acta Polym. Sin.* **49**, 18-26.
- Albayrak, N. y Yang, S-T. (2002) Immobilization of *Aspergillus oryzae* galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 371-383.
- Algieri, C., Donato, L., Bonacci, P. y Giorno, L. (2012) Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the L-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study. *Biochem. Eng. J.* **66**, 14-19.
- Amine, A., Mohammadia, H., Bourais, I. y Palleschi, G. (2006) Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1405-1423.
- Ansari, S.A. y Husain, Q. (2011) Immobilization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$  galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles. Its future aspects in biosensor applications. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **70**, 119-126.
- Ansari, S.A. y Husain, Q. (2012) Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase. *Food Bioprod. Process* **90**, 351-359.
- Apetreia, C., Rodríguez-Méndez, M.L. y De Sajac, J.A. (2011) Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochim. Acta* **56**, 8919-8925.
- Arica, M.Y y Bayramoglu, G. (2004) Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **27**, 255-265.
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G. y Bıcak, N. (2004) Characterization of tyrosinase immobilized onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochem.* **39**, 2007-2017.
- Arica, M.Y., Berkan, A.A. y Bayramoglu, G. (2008) Adsorption of trypsin onto magnetic ion-exchange beads of poly(glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate). *J. Appl. Polym. Sci.* **107**, 2810-2819.
- Arroyo, M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* **39**, 23-39.
- Arslan, A., Kiralp, S., Toppare, L. y Yagci, Y. (2005) Immobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrices. *Int. J. Biol. Macromol.* **35**, 163-167.
- Arslan, O., Erzençin, M., Sinan, S. y Ozensoy, O. (2004) Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chem.* **88**, 479-484.

- Arung, E.T., Shimizu, H. y Kondo, R. (2006) Inhibitory effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1966-1969.
- Asav, E., Yorganci, E. y Akyilmaz, E. (2009) An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta* **78**, 553-556.
- Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E. y Mehmetoglu, U. (2007) Production of L-dopa using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 683-687.
- Auriol, D.H., Paul, F.M.B., Gallot, B.M.T. y Monsan, P.E.F. (1996) *Cosmetic compositions containing immobilized enzymes for removing superficial skin cells*. Patente, FR 2732593.
- Axen, R., Ernback, S. y Porath, J. (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* **214**, 1302-1304.
- Axen, R., Myrin, P.A. y Janson, J.C. (1970) Chemical fixation of chymotrypsin to water-insoluble cross-linked dextran (Sephadex®) and solubilization of the enzyme derivatives by means of dextranase. *Biopolymers* **9**, 401-413.
- Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M.A. y Vazquez-Duhalt, R. (2002) Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **295**, 828-831.
- Aytar, B.S. y Bakir, U. (2008) Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.* **43**, 125-131.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (1993) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Bahulekar, R., Ayyangar, N.R y Ponrathman, S. (1991) Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 858-868.
- Balaji, R., Grande, D. y Najundan, S. (2003) Studies on photocrosslinkable polymers having bromo-substituted pendant cinnamoyl group. *React. Funct. Polym.* **56**, 45-57.
- Banjasz, I. (2000) Hologram build-up in a near infrared sensitive photopolymer. *Opt. Commun.* **181**, 215-221.
- Baroli, B. (2006) Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications. *J. Chem. Biotechnol.* **81**, 491-499.
- Baticz, O. y Tömösközi, S. (2002) Determination of total cholesterol content in food by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase enzyme reactor. *Food* **46**, 46-50.
- Bayramoglu, G. y Arica, M.Y. (2008) Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *J. Hazard. Mater.* **156**, 148-155.
- Bayramoglu, G., Tunali, Y. y Arica, M.Y. (2007) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catal. Commun.* **8**, 1094-1101.
- Bell, A.A. y Wheeler, M.H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 411-451.
- Belleza, F., Cipiciani, A., Costantino, U. y Nicolis, S. (2004) Catalytic activity of myoglobin immobilized on zirconium phosphonates. *Langmuir* **20**, 5019-5025.
- Benes, M.J., Lenfeld, J. y Pradová, O. (1996) Diazotizable supports of potential interest as affinity chromatography matrices. *J. Mol. Recognit* **9**, 701-705.
- Bertolino, F.A., De Vito, I.E., Messina, G.A., Fernández, H. y Raba, J. (2011) Microfluidic-enzymatic biosensor with immobilized tyrosinase for electrochemical detection of pipemidic acid in pharmaceutical samples. *J. Electroanal. Chem.* **651**, 204-210.

- Bertucci, C., Bartolini, M., Gotti, R. y Andrisano, V. (2003) Drug affinity to immobilized target biopolymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **797**, 111-129.
- Bieganski, A.T., Michota, A., Bukowska, J. y Jackowska, K. (2006) Immobilization of tyrosinase on poly(indole-5-carboxylic acid) evidenced by electrochemical and spectroscopic methods. *Bioelectrochemistry* **69**, 41-48.
- Billaud, C., Philippon, J. y Rouet-Mayer, M.A. (2003) Browning/Enzymatic-biochemical aspects. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 678-686.
- Billaud, C., Taraschin, C., Chow, Y., Chériot, S., Peyrat-Maillard, M. y Nicola, J. (2005) Maillard reaction products as “natural antibrowning” agents in fruit and vegetable technology. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 656-662.
- Bogra, P., Singh, J. y Singh, H. (2009) Immobilization of goat brain aminopeptidase B in calcium alginate beads. *Biocatal. Biotransform.* **27**, 96-101.
- Brady, D. y Jordaan, J. (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1639-1650.
- Braun, B. y Klein, E. (1996) Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 327-341.
- Breemen, A.J.J.M., Putten, B.P.H., Cai, R., Reimann, K., Marsman, A.W., Willard, N., Leeuw, D.M. y Gelinck, G.H. (2011) Photocrosslinking of ferroelectric polymers and its application in three-dimensional memory arrays. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 183302-3.
- Brena, B.M. y Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of Enzymes: A literature survey. En Guisan, J.M (Ed). *Immobilization of enzymes and cells*. Second Edition. Humana Press, New Jersey, 15-30.
- Brena, B.M, Rydén, I. y Porath, J. (1994) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on metal-chelated substituted gels. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 217-231.
- Brown, H.D., Patel, A.B. y Chattopadhyay, S.K. (1968) Enzyme entrapment within hydrophobic and hydrophilic matrices. *J. Biomed. Mater Res.* **2**, 231-235.
- Bryjak, J., Aniulyteb, J. y Liesiene, J. (2007) Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization. *Carbohydr. Res.* **342**, 1105-1109.
- Bryjak, J. Liesiene, J. y Kolarz, B.N. (2008) Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. *Colloids Surf. B- Biointerfaces* **61**, 66-74.
- Bubacco, L., Salgado, J., Tepper, A.W., Vijgenboom, E. y Canters, G.W. (1999)  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy of the binuclear Cu(II) active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *FEBS Lett.* **442**, 215-220.
- Buettner, A.V. (1964) Flash photolysis in thin films of gelatin and other polymers. *J. Phys. Chem.* **68**, 3253-3259.
- Buruiana, E.C., Jitaru, F., Melinte, V. y Buruiana, T. (2012) Effect of cinnamate comonomers on the dental formulation properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **127**, 5442-5452.
- Cabaj, J., Soloducho, J. y Swist, A. (2010) Active Langmuir-Schaefer films of tyrosinase-characteristic. *Sens. Actuators B* **150**, 505-512.
- Cabanes, J., García-Cánovas, F., Tudela, J., Lozano, J. A. y García-Carmona, F. (1987) L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **26**, 917-919.
- Cabanes, J., García-Carmona, F., Escribano, J., Gandía-Herrero, F. y Jiménez-Atiénzar, M. (2007) Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10446-10451.

- Caliman-Filadelfi, A.M., Vieira, A. y Mazzilli-Louzada, F. (2005) Circadian rhythm of physiological color change in the amphibian *Bufo ictericus* under different photoperiods. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **142**, 370-375.
- Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M. y Freire, D.M.G. (2000) L-dopa production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84**, 791-800.
- Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Tareq-Hassan-Khan, M., Torrens, F., Pérez-Jiménez, F. y Rescigno, A. (2008) Atom-and bond-based 2D TOMOCOMD-CARDD approach and ligand-based virtual screening for the drug discovery of new tyrosinase inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **13**, 1014-1024.
- Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M.T., Khan, S.B., Torrens, F., Perez-Jiménez, F., Rescigno, A. y Abad, C. (2010) Bond-based 2D quadratic fingerprints in QSAR studies: virtual and in vitro tyrosinase inhibitory activity elucidation. *Chem. Biol. Drug Des.* **76**, 538-545.
- Cecchini, D.A., Pavesi, R., Sanna, S., Daly, S., Xaiz, R., Pregnotato, M. y Terreni, M. (2012) Efficient biocatalyst for large-scale synthesis of cephalosporins, obtained by combining immobilization and site-directed mutagenesis of penicillin acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1491-1500.
- Cellesi, F. y Tirelli, N. (2006) Sol-gel synthesis at neutral pH in W/O microemulsion: A method for enzyme nanoencapsulation in silica gel nanoparticles. *Colloids Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **288**, 52-61.
- Chang, M.Y. y Yuang, R. (2005) Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 75-82.
- Chang, T.S. (2007) Two potent suicide substrates of mushroom tyrosinase: 7,8,4'-trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2010-2015.
- Chang, T.S. (2009) An update review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2440-2475.
- Chang, T.S. y Wu, C.Y. (2008) *Suicide substrate of tyrosinase and use thereof*. Patente, US0317692 A1.
- Chawla, S., deLong, M.A., Visscher, M.O., Wickett, R.R., Manga, P. y Boissy, R.E. (2008) Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. *Br. J. Dermatol.* **159**, 1267-1274.
- Chen, J. y Jin, Y. (2010) Sensitive phenol determination based on co-modifying tyrosinase and palygorskite on glassy carbon electrode. *Microchim. Acta* **169**, 249-254.
- Chen, J.I., Ko, I.M., Liena, W.L., Lin, Y.H., Li, I.T.M., Chena, C.H., Shiehc, C.J. y Liu, Y.C. (2012) Development of the reversible PGA immobilization by using the immobilized metal ion affinity membrane. *J. Membr. Sci.* **401**, 33-39.
- Chen, J.S., Wei, C. y Marshall, M.R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.* **39**, 1897-1901.
- Chen, P. y Solomon, E.I. (2004) O<sub>2</sub> activation by binuclear Cu sites: noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13105-13110.
- Chi, A., Valencia, J.C., Zhang-Zhi, H., Watabe, H., Yamaguchi, H., Mangini, N.J., Huang, H., Canfield, V.A., Cheng, K.C., Yang, O.F., Abe, R., Yamagishi, S., Shabanowitz, J., Hearing, V.J., Wu, C., Appella, E. y Hunt, D.F. (2006) Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J. Proteome Res.* **5**, 3135-3144.
- Chiacchierini, E., Restuccia, D. y Vinci, G. (2004) Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. *Food Sci. Tech. Int.* **10**, 373-382.
- Chibata, I. (1978) *Immobilized enzymes: Research and development*. John Wiley & Sons, New York.

- Chilaka, F.C., Eze, S., Anyadiegwu, C. y Uvere, P. (2002) Browning in processed yams: peroxidase or polyphenol oxidase? *J. Sci. Food Agric.* **82**, 899-903.
- Chisari, M., Barbagallo, R.N. y Spagna, G. (2007) Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3469-3476.
- Chisari, M., Barbagallo, R.N. y Spagna, G. (2008) Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 132-138.
- Choudhary, M.I., Sultan, S., Khan, M.T. y Rahman, A.U. (2005) Microbial transformation of 17 alpha-ethynyl and 17alpha-ethylsteroids, and tyrosinase inhibitory activity of transformed products. *Steroids* **70**, 798-202.
- Chuang, G.S., Chao, A.C., Chiou, M.S. y Shyu, S.S. (2005) Immobilization of tyrosinase on chitosan- An optimal approach to enhance the productivity of L-DOPA from L-tyrosine. *J. Chin. Chem. Soc.* **52**, 353-362.
- Clark, L.C. y Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* **102**, 29-45.
- Cong, Y., Zhang, Q., Woolford, D., Schweikardt, T., Khant, H. y Dougherty, M. (2009) Structural mechanism of SDS-induced enzyme activity of scorpion hemocyanin revealed by electron cryomicroscopy. *Structure* **17**, 749-758.
- Cooksey, C.J., Garrat, P.J., Land, E.J., Pavel, S., Ramsden, C.A., Riley, P.A. y Smith, N.P. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26226-26235.
- Costa, S.A. y Reis, R.L. (2004) Immobilization of catalase on the surface of biodegradable starch-based polymers as a way to change its surface characteristics. *J. Mater. Sci.-Mat. Med.* **15**, 335-342.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E. y Hendrickson, W.A. (1998) Crystal structure of a functional unit from octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- Curiel, J.A., Betancor, L., Rivas, B., Muñoz, R., Guisan, J.M. y Fernández-Lorente, G. (2010) Hydrolysis of tannic acid catalyzed by immobilized-stabilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6403-6409.
- Cusdin, G. (1995) Gaining control of the process for corrugated post print. *Tappi J.* **78**, 177-182.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. y Sermanni, G. (2000) Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* **77**, 265-273.
- DeBoer, C.D. (1973) Fast, stable photosensitive polymers containing ciclopropene groups. *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* **11**, 25-27.
- DeBoer, C.D., Wadsworth, D.H. y Perkins, W.C. (1973) Photodimerization of some ciclopropenes. *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 861-869.
- Decker, H. y Rimke, T. (1998) Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 25889-25892.
- Decker, H., Schweikardt, T. y Tuczec, F. (2006) The first crystal structure of tyrosinase: All question answered? *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4546-4550.
- Deeth, J.D. y Diecrich, C. (2010) Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 117-129.
- Deinum, J., Lerch, K. y Reinhammar, B. (1976) An EPR study of *Neurospora* tyrosinase. *FEBS Lett.* **69**, 161-164.

- Deverall, B.J. (1961) Phenolase and pectic enzyme activity in the chocolate spot disease of beans. *Nature* **189**, 311-311.
- Dietler, C. y Lerch, K. (1982) *Oxidases and related redox systems*. Pergamon Press, New York., 305-317.
- Dinçer, A., Becerik, S. y Aydemir, T. (2012) Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 815-820.
- Dobrodumov, A.V., Yakimanski, A.V., Matveeva, G.M., Voigt-Martin, I.G., Nosova, G.I. y Kudryavtsev, V.V. (1997) Structural investigation of four-centre photopolymerisation of bis-phthalamic bis-chalcone derivative in the crystalline state. *Adv. Funct. Mater.* **7**, 9-7.
- Domínguez-Cañas, E., Suarez, G. y Narvaez-García, A. (2005) *Modification of nucleophilic proteins used in construction of e.g. enzymatic biosensors, by chemical reaction between nucleophilic groups free of protein residuals and halogenated derivatives, while controlling characteristics of proteins*. Patente ES2242456 (A1).
- Domínguez-Renedo, M.A., Lomillo, A. y Arcos-Martinez, M.J. (2004) Optimisation procedure for the inhibitive determination of chromium(III) using an amperometric tyrosinase biosensor. *Anal. Chim. Acta* **521**, 215-221.
- Donato, L., Algieri, C., Miriello, V., Mazzei, R., Clarizia, G. y Giorno, L. (2012) Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-DOPA. *J. Membr. Sci.* **407**, 86-92.
- Dong, H.C., Sang, J.O, Hyo, B.C. y Joon, Y.L. (2001) Photochemically bifunctional epoxy compound containing a chalcone moiety. *Eur. Polym. J.* **37**, 1951-1957.
- Dong-Geun, L., Kanagasabai, M.P., Mir, K., Sangpill, H., Ik-Sung, A. y Chang-Ha, L. (2009) Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **57**, 62-66.
- Dongming, H., Susanto, H. y Ulbricht, M. (2009) Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 62-98.
- Duckworth, H.W. y Coleman, J.E. (1970) Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1613-1625.
- Durán, N. y Esposito, E. (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B-Environ.* **28**, 83-99.
- Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A. y Gíafrenda, L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 907-931.
- Ebei, E.M. (1986) Fluorescence as a means for kinetic studies of four-center type photopolymerization in the solid-state. *J. Phys. Chem. Solids* **47**, 945-948.
- Egerton, P.L., Pitts, E. y Reiser., A. (1981) Photocycloaddition in solid poly(vinylcinnamate). The photoreactive polymer matrix as an ensemble of chromophore sites. *Macromolecules* **14**, 95-100.
- Eicken, C., Krebs, B. y Sacchetti, J.C. (1999) Catechol oxidase-structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 677-683.
- Enemuor, S.C. y Odibo, F.J. (2011) Characterization of immobilized tannin acyl hydrolase of *Aspergillus tamarii* IMI388810 (B). *J. Microbiol. Biotech. Res.* **1**, 160-168.
- Ensuncho, L., Álvarez-Cuenca, M. y Legge, R.L. (2005) Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**, 185-191.
- Erdemir, S. y Yilmaz, M. (2012) Catalytic effect of calix[n]arene based sol-gel encapsulated or covalent immobilized lipases on enantioselective hydrolysis of (R/S)-naproxen methyl ester. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **72**, 189-196.

- Erker, W., Hübler, R. y Decker, H. (2008) Tryptophan quenching as linear sensor for oxygen binding of arthropod hemocyanins. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1143-1147.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999a) Activation of latent mushroom tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3518-3525.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999b) Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3503-3508.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999c) Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2638-2644.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1995) A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* **231**, 237-246.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1996) Continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J. Food. Sci.* **61**, 1177-1182.
- Espín, J.C., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997) Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) heads. *Food Sci. Technol.- London* **30**, 819-825.
- Espín, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998a) Study of stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2469-2473.
- Espín, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998b) Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem. J.* **331**, 547-551.
- Espín, J.C., Leeuwen, J. y Wichers, H.J. (1999) Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3509-3517.
- Espín, J.C., Varón, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2000) Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1270-1279.
- Fan, Y. y Flurkey, W.H. (2004) Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* **65**, 671-678.
- Fedorow, H., Tribl, F., Halliday, G., Gerlach, M., Riederer, P. y Double, K.L. (2005) Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **75**, 109-124.
- Fenoll, L.G., García-Sevilla, F., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Ruiz, P.A., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2001) Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly instable o-quinones. *Biochim. Biophys. Acta* **1548**, 1-22.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2002) Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-tyrosine methyl ester/L-dopa methyl ester. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1594-1607.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004a) Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* **380**, 643-650.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004b) Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 235-246.

- Filho, M., Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J.M. (2008). Reversible immobilization of a hexameric  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 on polymeric ionic exchangers. *Process Biochem.* **43**, 1142-1146.
- Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazzo, G. y Mallardi, A. (2010) Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2033-2037.
- Fouassier, J.P., Allonas, X. y Burget, D. (2003) Photopolymerization reactions under visible lights: principle, mechanisms and examples of applications. *Prog. Org. Coat.* **47**, 16-36.
- Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y. y Itoh, S. (2012) Multifunctions of MelB, a fungal tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. *Chem. Bio. Chem.* **13**, 193-201.
- Fukuda, H., Kondo, A. y Tamalampudi, S. (2009) Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalyst. *Biochem. Eng. J.* **44**, 2-12.
- Galindo, J.D., Pedreño, E., García-Carmona, F., García-Cánovas, F., Solano-Muñoz, F. y Lozano, J.A. (1983) Steady-state study of the mechanism of dopa-oxidase activity of tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **15**, 1455-1461.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atienzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F. y Escribano, J. (2003) Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds: enzymes responsible for browning in cucumber. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7764-7769.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J. y García-Carmona, F. (2004) Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 609-615.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J. y García-Carmona, F. (2005a) Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta* **222**, 307-316.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atienzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F. y Escribano, J. (2005b) Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6825-6830.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atienzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F. y Escribano, J. (2005c) Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* **386**, 601-607.
- García-Borron, J.C. y Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* **15**, 162-173.
- García-Cánovas, F., Tudela, J., Varón, R. y Vazquez, A.M. (1989) Experimental methods for kinetic study of suicide substrates. *J. Enzyme Inhib.* **3**, 81-90.
- García-Carmona, F., García-Cánovas, F., Iborra, J.L. y Lozano, J.A. (1982) Kinetic study of the pathway of melanization between Ldopa and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta.* **717**, 124-131.
- García-Galán, C., Berenguer-Murcia, A., Fernández-Lafuente, R. y Rodrigues, R.C. (2011) Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2885-2904.
- García-Molina, F. (2011) *Estudios cinéticos sobre el mecanismo de reacción, actividades catalíticas y aplicaciones analíticas de tirosinasa*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- García-Molina, F., Hiner, A.N.P., Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2005) Mushroom tyrosinase: Catalase activity, inhibition, and suicide inactivation, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3702-3709.

- García-Molina, F., Muñoz, J.L., Varón, R., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2007a) A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9739-9749.
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J.L., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Cánovas, F., Tudela, J. y Varón, R. (2007b) A further step in the kinetic characterisation of the tyrosinase enzymatic system. *J. Math. Chem.* **41**, 393-406.
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J.L., Acosta, J.R., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2009) Melanogenesis inhibition by tetrahydropterines. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 1766-1774.
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, M., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010a) Melanogenesis inhibition due to NADH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1777-1787.
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J.L., Martínez-Ortiz, F., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010b) Effects of tetrahydropterines on the generation of quinones catalyzed by tyrosinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1108-1109.
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J.L., Martínez-Ortiz, F., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2011) Tetrahydrofolic acid is a potent suicide substrate of mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1383-1391.
- García-Moreno, M., Varón, R., Sanchez-Gracia, A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1994) The effect of pH on the suicide inactivation of frog epidermis tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1205**, 282-288.
- García-Ruiz, P.A. (2002) *Procedimiento de curado de resinas en mármoles*. Patente ES2160542A1.
- García-Ruiz, P.A. (2004) *Procedimiento para la inmovilización de un ligando sobre un soporte*. Patente ES2189602.
- García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Marín-Zamora, M.E. (2009) *Procedimiento de obtención de o-difenoles*. Patente ES2301453B1.
- Gasowska, B., Kafarski, P. y Wojtasek, H. (2004) Interaction of mushroom tyrosinase with aromatic amines, *o*-diaminas and *o*-aminophenols. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 170-177.
- Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. y Wichers, H.J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323.
- Gerdemann, C., Eicken, C. y Krebs, B. (2002) The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* **35**, 183-191.
- Ghanem, A. y Ghaly, A. (2004) Immobilization of glucose oxidase in chitosan gel beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 861-866.
- Girelli, A.M. y Mattei, E. (2005) Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. B.* **819**, 3-16.
- Girelli, A.M., Mattei, E., Messina, A. y Papaleo, D. (2007) Immobilization of mushroom tyrosinase on controlled pore glass: Effect of chemical modification. *Sens. Actuators B* **125**, 48-54.
- Girelli, A.M., Papaleo, D., Mattei, T. y Giulina, T. (2009) Determination of an antioxidant capacity index by immobilized tyrosinase bioreactor. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5178-5186.
- Godbole, D., Mojamda, M. y Pal, J.K. (2006) Increased level of p27 subunit of proteasomes and its co-localization with tyrosinase in amelanotic melanoma cells indicate its direct role in the regulation of melanin biosynthesis. *Cell Biol. Int.* **30**, 895-902.
- Godoy, C.A., Rivas, B., Bezbradica, D., Bolivar, J.M., López-Gallegoa, F., Fernandez-Lorente, G. y Guisan, J.M. (2011) Reactivation of a thermostable lipase by solid phase

- unfolding/refolding. Effect of cysteine residues on refolding efficiency. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 388-394.
- Goldstein, L., Levin, Y., Pecht, M. y Katchalski, E. (1964) A water-insoluble polyanionic derivatives of trypsin, effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behaviour of the bound trypsin. *Biochemistry* **3**, 1914-1919.
- Gómez-López, V.M. (2002) Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chem.* **77**, 163-169.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F. y Brena, B.M. (2011) A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem.* **46**, 385-389.
- Gopinath, S. y Sugunan, S. (2007) Enzymes immobilized on montmorillonite K-10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay Sci.* **35**, 67-75.
- Goto, T.E.; Lopez, R.F., Oliveira, O.N. y Caseli, L. (2010) Enzyme activity of catalase immobilized in Langmuir-Blodgett films of phospholipids. *Langmuir* **26**, 11135-11139.
- Granat, P., Pudasa, M., Hormi, O., Hagberga, J. y Leppavuori, S. (2004) Synthesis of acrylated ethylcellulose for UV-curing ink. *Carbohydr. Polym.* **57**, 225-228.
- Grazu, V., Abian, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J.M. (2005) Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 597-605.
- Grubhofer, N. y Schleith, L. (1953) Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. *Naturwissenschaften* **40**, 508-508.
- Gu, B.X., Xu, C.X., Zhu, G.P., Liu, S.Q., Chen, L.Y. y Li, X.S. (2009) Tyrosinase Immobilization on ZnO Nanorods for Phenol Detection. *J. Phys. Chem.* **113**, 377-381.
- Guan, N., Liu, C., Sun, D. y Xu, J. (2009) A facile method to synthesize carboxyl functionalized magnetic polystyrene nanospheres. *Colloids Surf. A- Physicochem. Eng. Aspects* **335**, 174-180.
- Guazzaroni, M., Crestini, C. y Saladino, R. (2012a) Layer-by-layer coated tyrosinase: An efficient and selective synthesis of catechols. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 157-166.
- Guazzaroni, M., Pasqualini, M., Botta, G. y Saladino, R. (2012b) A novel synthesis of bioactive catechols by layer-by-layer immobilized tyrosinase in an organic solvent medium. *Chem. Cat. Chem.* **4**, 89-99.
- Guilbault, G.G. (1984) *Analytical of immobilized enzymes*. Marcel Dekker, New York.
- Guisan, J.M. (2006) Immobilization of Enzymes as the 21 st century begins: An already solved problem or still and exciting challenge? En Guisan, J.M (Ed). *Immobilization of enzymes and cells*. Second Edition. Humana Press, New Jersey, 1-14.
- Guisán, J.M., Álvaro, G., Rosell, C.M. y Fernández-Lafuente, R. (1994) Industrial design of enzymatic processes catalyzed by very active immobilized derivatives: utilization of diffusional limitations (gradients of pH) as a profitable tool in enzyme engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20**, 357-369.
- Guncheva, M., Zhiryakova, D., Radchenkova, N. y Kambourova, M. (2009) Properties of immobilized lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Acidolysis of triolein with caprylic acid. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 727-731.
- Gupta, R. y Chaudhury, N.K. (2007) Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2387-2399.
- Hakamada, M., Takahashi, M. y Mabuchi, M. (2012) Enzyme electrodes stabilized by monolayer-modified nanoporous Au for biofuel cells. *Gold Bull* **45**, 9-15.

- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M. y Lomascolo, A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 219-232.
- Han, R., Cui, L., Ai, S., Yin, H., Liu, X. y Qiu, Y. (2012) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *J. Solid State Electrochem.* **16**, 449-456.
- Hanifah, S.A., Heng, L.Y. y Ahmad, M. (2009) Biosensors for phenolic compounds by immobilization of tyrosinase in photocurable methacrylic-acrylic membranes of varying hydrophilicities. *Anal. Sci.* **25**, 779-784.
- Hasegawa, M. (1995) Photodimerization and photopolymerization of diolefin crystals. *Adv. Phys. Org. Chem.* **30**, 117-171.
- Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H. y Hol, W.G. (1993) Crystal-structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit-II hemocyanin at 2.18- angstrom resolution- clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* **2**, 597-619.
- Hearing, V.J. y Eckel, T.M. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosinase hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* **157**, 549-557.
- Hernandez, K. y Fernandez-Lafuente, R. (2011) Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Process Biochem.* **46**, 873-878.
- Herrling, T., Jung, K. y Fuchs, J. (2008) The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* **69**, 1429-1435.
- Hidalgo, F.J. y Zamora, R. (2000) The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas Aceites* **51**, 35-49.
- Ho, P.Y., Chiou, M.S. y Chao, A.C. (2003) Production of L-dopa by tyrosinase immobilized on modified polystyrene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **111**, 139-152.
- Hosseinkhani, S. y Nemat-Gorgani, M. (2003) Partially unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 179-184.
- Hu, X., Chen, X., Cheng, H. y Jing, X. (2009) Cinnamate-functionalized poly(ester-carbonate): Synthesis and its UV irradiation-induced photo-crosslinking. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **47**, 161-169.
- Ichimura, K. y Watanabe, S. (1979) *New photosensitive polymeric compound and its preparation*. Patente JP54114593.
- Ichimura, K., Tochisawa, T. y Yamazawa, Y. (1986) *Production of aqueous solution of photosensitive resin*. Patente JP61184534.
- Ichimura, K., Yamana, M., Ito, M. y Ito, H. (1988) *Photosensitive resin composition*. Patente US4777114.
- Ichishima, E., Maeba, H., Amikura, T. y Sakata, H. (1984) Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3. *Biochim. Biophys. Acta* **786**, 25-31.
- Illanes, A., Wilson, L., Caballero, E., Fernandes-Lafuente, R. y Guisan, J.M. (2006) Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics in organic medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **133**, 189-202.
- Illanes, A., Wilson, L., Cauerrhff, A. y Casro, G.R. (2012) Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* **115**, 48-57.
- Ingebritsen, J. y Flurkey, W.H. (1988) Affinity and hydrophobic chromatography of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **27**, 1593-1599.

- Ingraham, L.L., Corse, J. y Makower, B. (1952) Enzymatic browning of fruits. III. Kinetics of the reaction inactivation of polyphenoloxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2623-2626.
- Inlow, J.K. (2012) Homology models of four *Agaricus bisporus* tyrosinases. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 283-293.
- Innocent, C., Bouhaine, N., Djerourou, A., Gherrou, A., Seta, P. y Xu, Z.K. (2006) Preparation of catalytic materials by covalent immobilisation of pepsin on cotton fibers activated by tosyl chloride. *Mater. Sci.- Indian J.* **2**, 161-168.
- Irena, G., Jolanta, B. y Karolina, Z. (2009) Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) and immobilization of the selected enzymes on the modified film. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 8293-8298.
- Ishihara, M., Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Hattori, H., Matsui, T. y Kurita, A. (2001) Photocrosslinkable chitosan: an effective adhesive with surgical applications. *Int. Cong. Ser.* **1223**, 251-257.
- Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Schurink, C.G., Boeriu, C.G.,F., Wichers, H.J. y Dijkstra, B.W. (2011a). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from mushroom *Agaricus bisporus*. *Acta Cryst.* **67**, 575-578.
- Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Weijn, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H.J. y Dijkstra, B.W. (2011b) Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **50**, 5477-5486.
- Jackman, M.P., Huber, M., Hajnal, A. y Lerch, K. (1992) Stabilization of the oxy form of tyrosinase by a single conservative amino acid substitution. *Biochem. J.* **282**, 915-918.
- Jahangiri, E., Agharafeiea, R., Kaiserb, H-J, Tahmasbia, Y., Legge, R.L. y Haghbeen, K. (20012) Medium engineering to enhance mushroom tyrosinase stability. *Biochem. Eng. J.* **60**, 99- 105.
- Jameela, S.R., Lakshmi, S., James, N.R. y Jayakrishnan, A. (2002) Preparation and evaluation of photocrosslinkable chitosan as a drug delivery matrix. *J. Appl. Polym. Sci.* **86**, 1873-1877.
- Jeon, H.J., Noda, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T. y Sugiyama, M. (2006) Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J Agric. Food Chem.* **54**, 9827-9833.
- Jia, W., Su, L. y Lei, Y. (2011) Pt nanoflower/polyaniline composite nanofibers based urea biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **30**, 158-164.
- Jin, Y.H., Lee, S.J., Chung, M.H., Park, J.H., Park, Y.I., Cho, T.H. y Lee, S.K. (1999) Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 232-236.
- Jolivet, J., Arpin, N., Wichers, H.J. y Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* **102**, 1459-1483.
- Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q. y Orndorff, S. (2002) Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* **15**, 335-340.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H. y Komamine, A. (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* **107**, 1083-1089.
- Kanda, K., Sao, T., Ishii, S. Enei, H. Y Ejiri, S. (1996) Purification and properties of tyrosinase isozymes from gill of *Lentinus edodes* fruiting bodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1273-1278.
- Karagoz, B y Bicak, N. (2008) Novel photocurable polyethers with methacrylate pendant groups. *Eur. Polym. J.* **44**, 106-112.
- Karam, J. y Nicell, J.A. (1997) Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 141-153.

- Karboune, S., Archelas, A., Furstoss, R. y Baratti, J. (2005) Immobilization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* onto DEAE-cellulose: enzymatic properties and application for the enantioselective resolution of a racemic epoxide. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **32**, 175-183.
- Kartal, F. y Kiliç, A. (2006) Immobilization of pancreatic lipase on polyvinyl alcohol by cyanuric chloride. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **36**, 139-151.
- Katchalski, E., Weizman, N., Levin, Y. y Blumberg, S. (1965) *Preparation of water-insoluble enzyme derivatives*. Patente US3706633.
- Kaur, J. y Hill, H.Z. (2001) Transfection of nonmelanocytic cells with tyrosinase gene constructs for survival studies. *Environ. Mol. Mutagen.* **38**, 216-222.
- Kavrayan, D. y Aydemir, T. (2001) Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem.* **74**, 147-154.
- Khan, S.,B., Khan, M.T.H, Jang, E,S, Akhtar, K., Seo, J. y Han, H. (2010) Tyrosinase inhibitory effect of benzoic acid derivatives and their structure-activity relationships. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **25**, 812-817.
- Khan, S., Lindahl, S., Turner, C. y Karlsson, E.N. (2012) Immobilization of thermostable glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **80**, 28-38.
- Kim, H.J., Seo, S.H., Lee, B.G. y Lee, Y.S. (2005) Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med.* **71**, 785-787.
- Kim, Y.J. y Uyama, H. (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition, mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life. Sci.* **62**, 1707-1723.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. y Krebs, B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084-1090.
- Klein, S. y Barsella, A. (2005) One-step waveguide and optical circuit writing in photopolymerizable materials processed by two-photon absorption. *Appl. Phys. Lett.* **86**, 211118, 1-3.
- Kochana, J., Kozak, J., Skrobisz, A. y Wozniakiewicz, M. (2012) Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system. *Talanta* **96**, 147-152.
- Koutsopoulos, S., Tjeerdsma, A.M., Lieshout, J.F.T., Oost, J. y Norde, W. (2005) In situ structure and activity studies of an enzyme adsorbed on spectroscopically undetectable particles. *Biomacromolecules* **6**, 1176-1184.
- Koutsopoulos, S., Patzsch, K., Bosker, W.T.E. y Norde, W. (2007) Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir* **23**, 2000-2006.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Kubo, Y., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T. y Haraguchi, H. (2000) Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1393-1399.
- Kulisevsky, J., Campos-Arillo, V.M., Linazasoro, G., Luquin, R. y Vela, L. (2001) Dopamina agonists situation in Parkinson disease. *Rev. Neurol.* **33**, 1071-1093.
- Kulshrestha, Y. y Husain, Q. (2006) Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Biomol. Eng.* **23**, 291-297.
- Kumar, R.M., Balamurugan, R. y Kannan, P. (2007) Investigation of liquid crystalline and photocrosslinkable poly[4-x-phenyl-4'-(m-methacryloyloxyalkoxy)cinnamate]s. *Polym. Int.* **56**, 1230-1239.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Kumar, G.V. y Banerjee, R. (2008) Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **31**, 291-298.

- Kurayama, F., Suzuki, S., Bahadur, N.M., Furusawa, T., Ota, H., Sato, M. y Suzukiabc, N. (2012) Preparation of aminosilane–alginate hybrid microcapsules and their use for enzyme encapsulation. *J. Mater. Chem.* **22**, 15405-15411.
- Kurioz, Y., Reznikov, Y., Tereshchenko, O., Gerus, I., Buluy, O., Ha, K.R., Kim, D.H., Kwon, S.B. y Park, S.K. (2008) Highly sensitive photoaligning materials on a base of cellulose-cinnamates. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* **480**, 81-90.
- Kuswandi, B., Andres, R. y Narayanaswany, R. (2001) Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *Analyst* **126**, 1469-1491.
- Kwan, W.L., Lei, B., Shao, Y., Prikhodko, S.V., Bodzin, N. y Yang, Y. (2009) Direct observation of localized conduction pathways in photocross-linkable polymer memory. *J. Appl. Phys.* **105**, 124516 -1,5.
- Kwon, S.W., Jeong, B.O., Lee, E.H., Kim, Y.S. y Jung, Y. (2012) Conducting polymer-silica composites for immobilization of enzymes. *Bull. Korean Chem. Soc.* **33**, 1593-1596.
- Lalonde, J. (1997) Practical catalysis with enzyme crystals. *Chem. Tech.* **27**, 38-45.
- Land, E.J., Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2003) Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc. Chem. Res.* **36**, 300-308.
- Land, E.J., Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2007) The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation. *Tohoku J. Exp. Med.* **212**, 341-348.
- Land, E.J., Ramsden, C.A., Riley, P.A. y Stratford, M.R. (2008) Evidence consistent with the requirement of cresolase activity for suicide inactivation of tyrosinase. *Tohoku J. Exp. Med.* **216**, 231-138.
- Laskin, J.D. y Piccinini, L.A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626-16635.
- Lawrence, J.R., O'Neill, F.T. y Sheridan, J.T. (2001) Photopolymer holographic recording material. *Optik* **112**, 449-463.
- Lax, A.R. y Vaughn, K.C. (1991) Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* **96**, 26-31.
- Lee, H.S. (2002) Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1400-1403.
- Lee, J.Y., Shina, H.Y., Lee, J.H., Songa, Y.S., Kanga, S.W., Park, C. y Kima, J.B. (2009) A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **59**, 274-278.
- Lee, W.F. y Huang, C.T. (2008) Immobilization of trypsin by thermal-responsive hydrogel for the affinity separation of trypsin inhibitor. *Desalination* **234**, 195-203.
- Lei, Z. y Jiang, Q. (2011) Synthesis and properties of immobilized pectinase onto the macroporous polyacrylamide microspheres. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2592-2599.
- Lerch, K. (1981) Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. En Sigel, H (Ed). *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker, New York, 43-186.
- Lerch, K. (1982) Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa* II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* **257**, 6414-6419.
- Lerch, K. (1983) *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* **52**, 125-138.
- Le-Thi-Thu, H., Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Rescigno, A., Saso, L., Parmar, V.S., Torrens, F. y Abad, C. (2011) Novel coumarin-based tyrosinase inhibitors discovered by OECD principles-validated QSAR approach from an enlarged, balanced database. *Mol. Divers.* **15**, 507-520.
- Leubner, G.W. y Unruh, C.C. (1966) *Light-sensitive polymers*. Patente US3257664.

- Levin, Y., Pecht, M., Goldstein, L. y Katchalski, E. (1964) A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. *Biochemistry* **3**, 1905-1913.
- Li, Y.F., Liu, Z.M., Yang, Y.H., Shen, G.L. y Yu, R.Q. (2006) A mediator-free phenol biosensor on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Anal. Biochem.* **349**, 33-40.
- Li, T., Li, S., Wang, N. y Tain, L. (2008) Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chem.* **109**, 703-708.
- Li, Y., Wang, Y., Jiang, H. y Deng, J. (2009) Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 17002-17006.
- Lin, R., Wu, R., Huang, X. y Xie, T. (2011) immobilization of oxalate decarboxylase to Eupergit and properties of the immobilized enzyme. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **41**, 154-165.
- Ling, J., Rong, M.Z. y Zhang, M.Q. (2011) Coumarin imparts repeated photochemical remendability to polyurethane. *J. Mater. Chem.* **21**, 18373-18380.
- Ling, J.S., Nestor, L.P., Czernuszewicz, R.S., Spiro, T.G., Fraczkiewicz, R., Sharma, K.D., Loehr, T.M. y Sandersloehr, J. (1994) Common oxygen-binding site in hemocyanins from arthropods and mollusks evidence from raman spectroscopy and normal coordinate analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7682-7691.
- Liu, Z.J., Liu, B.H., Kong, J.L. y Deng, J.Q. (2000) Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor. *Anal. Chem.* **72**, 4707-4712.
- Liu, Z., Liu, Y., Yang, H., Yang, Y., Shen, G. y Yu, R. (2005) A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* **533**, 3-9.
- Lloret, L., Hollmann, F., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T. y Lema, J.M. (2012) Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. *Biodegradation* **23**, 373-386.
- Loizzo, M.R., Tundis, R y Menichini, F. (2012) Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: An update. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* **11**, 378-398.
- Loncar, N. y Vujcic, Z. (2011) Tentacle carrier for immobilization of potato phenoloxidase and its application for halogenophenols removal from aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* **196**, 73-78.
- López-Serrano, P., Cao, L.F., Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (2002) Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1379-1383.
- Lozano, J.A. y Solano, F. (1989) Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investigación y Ciencia* **157**, 87-93.
- Luo, Z. y Fu, X. (2010) Immobilization of urease on dialdehyde porous starch. *Starch* **62**, 652-657.
- Macrae, A.R. y Duggleby, R.G. (1968) Substrates and inhibitors of potato tuber phenolases. *Phytochemistry* **7**, 855-861.
- Mahy, R., Bouammali, B., Oulmidi, A., Challioui, A., Derouet, D. y Brose, J.C. (2006) Photosensitive polymers with cinnamate units in the side position of chains: Synthesis, monomer reactivity ratios and photoreactivity. *Eur. Polym. J.* **42**, 2389-2397.
- Makino, N. y Mason, H.S. (1973) Reactivity of oxytyrosinase toward substrates. *J. Biol. Chem.* **248**, 5731-5735.
- Makino, N., McMahill, P. y Mason, H.S. (1974) The oxidation state of copper in resting tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 6062-6066.
- Malzahn, K., Windmiller, J.R., Valdés-Ramírez, G., Shöning, M.J. y Wang, J. Wearable electrochemical sensors for *in situ* analysis in marine environments. *Analyst* **136**, 2912-2917.

- Mammarella, E.J. y Rubiolo, A.C. (2005) Study of the deactivation  $\beta$ -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **34**, 7-13.
- Manjón, A., Llorca, F.I., Bonete, M.J., Bastida, J. y Iborra, J.L. (1985) Properties of  $\beta$ -galactosidase covalently immobilized to glycophase-coated porous glass. *Process Biochem.* **20**, 17-22.
- Margolin, A.L. (1996) Novel crystalline catalysts. *Tibtech.* **14**, 223-230.
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2005) Cinnamic ester of D-sorbitol for immobilization of mushroom tyrosinase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 1356-1364.
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2006) Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* **126**, 295-303.
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., y García-Ruiz, P.A. (2007a) Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates. *J. Biotechnol.* **131**, 388-396
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., y García-Ruiz, P.A. (2007b) Stereospecificity of mushroom tyrosinase immobilized on a chiral and a nonchiral support. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4569-4575.
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., y García-Ruiz, P.A. (2009) Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *J. Biotechnol.* **139**, 163-168.
- Marquez, L.D.S., Cabral, B.V., Freitas, F.F., Cardoso, V.L. y Ribeiro, E.J. (2008) Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **51**, 86-92.
- Marrero-Ponce, Y., Casañola-Martín, G.M., Khan, M.T., Torrens, F., Rescigno, A. y Abad, C. (2010) Ligand-based computer-aided discovery of tyrosinase inhibitors. Applications of the TOMOCOMD-CARDD method to the elucidation of new compounds. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2601-2624.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A. y Poggi, V. (2003) Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* **63**, 745-752.
- Marszał, M y Siódmiak, T. (2012) Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. *Catal. Commun.* **24**, 80-84.
- Mason, H.S., Spencer, E. y Yamazaki, I. (1961) Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase-catalyzed catechol oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 236-238.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisán, J.M. y Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451-1463.
- Matharu, Z., Solanki, P.R., Gupta, V. y Malhotra, B.D. (2012) Mediator free cholesterol biosensor based on self-assembled monolayer platform. *Analyst* **137**, 747-753.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. y Sugijama, M. (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Bol. Chem.* **281**, 8981-8990.
- Matte, C.R., Nunes, M.R., Benvenuttib, E.V., Schöffera, J.N., Ayub, M.A.Z. y Hertz, P.F. (2012) Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a "spacer arm". *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **78**, 51-56.
- Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**, 2318-2331.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **18**, 193-215.

- Mello, L.D. y Kubota, L.T. (2002) Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* **77**, 237-256.
- Méndez, J., Monteagudo, A. y Griebenow, K. (2012) Stimulus-responsive controlled release system by covalent immobilization of an enzyme into mesoporous silica nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **23**, 698-704.
- Min, K., Park, D.H. y Yoo, Y.J. (2010) Electroenzymatic synthesis of L-Dopa. *J. Biotechnol.* **146**, 40-44.
- Minsk, L.M., Smith, J.G., Van Deusen, W.P. y Wright, J.F. (1959) Photosensitive polymers. I. Cinnamate esters of poly(vinyl alcohol) and cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* **2**, 302-307.
- Minsk, L.M. y Van-Deusen, W.P. (1948) *Photomechanical resist*. Patente US2690966.
- Miron, T., Raman, H.S., Rabinkov, A., Mirelman, D. y Wilcheck, M. (2006) A method for continuous production of allicin using immobilized alliinase. *Anal. Biochem.* **351**, 152-154.
- Mislovicova, D., Michalkova, E. y Vikartovska, A. (2007) Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose from oligosaccharide mixtures. *Process Biochem.* **42**, 704-709.
- Mita, D.G., Attanasio, A., Arduini, F., Diano, N., Grano, V., Bencivenga, U., Rossi, S., Amine, A. y Moscone, D. (2007) Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. *Biosens. Bioelectron* **23**, 60-65.
- Mitz, M.A. (1956) New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science* **123**, 1076-1077.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K. y Ikeda, T. (2002) Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta* **1569**, 35-44.
- Moehlenbrock, M.J. y Minteer, S.D. (2008) Extended lifetime biofuel cells. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1188-1196.
- Moghaddan, A.B., Ganjali, M.R., Niasari, M. y Ahadi, S. (2008) Bioelectrocatalysis of dopamine using adsorbed tyrosinase on single-walled carbon nanotubes. *Anal. Lett.* **41**, 3161-3176.
- Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Nafissi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G. y Faramarzi, M.A. (2012) Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. *Bioinorg. Chem. Appl.* **823830**, 1-6.
- Mohammadi, A., Moghaddam, A.B., Dinarvand, R., Adraghi, J., Atyabi, F. y Aboury, A.A. (2008) Bioelectrocatalysis of methyl dopa by adsorbed tyrosinase on the surface of modified glassy carbon with carbon nanotubes. *Int. J. Electrochem. Sci.* **3**, 1248-1257.
- Mohammadi, A., Moghaddam, A.B., Hosseini, S., Kazemzade, M. y Dinarvand, R. (2011) A norepinephrine biosensor based on a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes. *Anal. Methods* **3**, 2406-2411.
- Mojovic, L., Siler-Marinkovic, S., Kukic, G. y Vunjak-Novakovic, G. (1993) *Rizhopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 438-443.
- Molina, F.G., Muñoz, J.L., Varón, R., López, J.N., Cánovas, F.G. y Tudela, J. (2007) An approximate analytical solution to the lag period of monophenolase activity of tyrosinase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**, 238-252.
- Moliner-Mallén, J.F. (1986) *Fotopolímeros entrecruzables. Cinamatos de hidratos de carbono*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Monier, M. y El-Sokkary, A.M.A. (2012) Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 18-24.
- Montesinos-Tormo, M.P. (1996) *Resinas entrecruzables. Sensibilidad de nuevos monómeros derivados de 2-ulosas*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Murcia.

- Müller, U., Utterodt, A., Mörke, W., Deubzer, B. y Herzig, C. (2001) New insights about diazonium salts as cationic photoinitiators. *J Photochem. Photobiol. A-Chem.* **140**, 53-66.
- Mumtaz, S. y Bachhawat, B.K. (1992) Enhanced intracellular stability of dextran-horse radish peroxidase conjugate: an approach to enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**, 174-178.
- Munjal, N. y Sawhney, S.K. (2002) Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 613-619.
- Muñoz-Muñoz, J.L. (2012) *Caracterización cinética de catálisis, inactivación suicida e inhibición irreversible de tirosinasa*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varón, R., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2006) Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* **351**, 128-138.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Molina-Alarcon, M., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2008) Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism. *Biochem. J.* **416**, 431-440.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varon, R., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-Lopez, J.N. (2009) Stereospecific inactivation of tyrosinase by L- and D-ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 244-253.
- Muñoz-Muñoz, J.L., Acosta-Motos, J.R., García-Molina, F., Varón, R., Tudela, J., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010a) Tyrosinase inactivation in its action on dopa. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1467-1475.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-Lopez, J.N. (2010b). Some kinetic properties of deoxytyrosinase. *J. Mol. Catal.-B Enzymatic* **62**, 173-182.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varon, R., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010c) Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life* **62**, 539-547.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Arribas, E., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2011a) Suicide inactivation of tyrosinase in its action on tetrahydropterines. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26**, 728-733.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varon, R., Tudela, J., Rodríguez-Lopez, J.N. y García-Canovas, F. (2011b) Catalytic oxidation of *o*-aminophenols and aromatic amines by mushroom tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1974-1983.
- Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, P., Garcia-Molina, F., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012) Unravelling the suicide inactivation of tyrosinase: A discrimination between mechanisms. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **75**, 11-19.
- Murachi, T., Totani, M., Ikemoto, M. y Tabata, M. (1990) A flow injection analysis system involving immobilized NADH oxidase in column form for clinical analysis. *J. Biotechnol.* **14**, 33-41.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K. y Miyamoto, H. (2007) Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **146**, 207-214.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K. y Sato, T. (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* **149**, 2455-2462.
- Nagai, T. y Suzuki, N. (2001) Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3922-3926.

- Nagata, M. y Inaki, K. (2009) Synthesis and characterization of photocrosslinkable poly(L-lactide)s with a pendent cinnamate group. *Eur. Polym. J.* **45**, 1111-1117.
- Naidja, A., Huang, P.M. y Bollag, J.M. (1997) Activity of tyrosinase immobilized on hydroxyaluminum-montmorillonite complexes. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **115**, 305-316.
- Naish-Byfield, S. y Riley, P.A. (1998) Tyrosinase autoactivation and the problem of the lag period. *Pigment Cell Res.* **11**, 127-133.
- Nakamura, T., Ren, J., Zhu, K., Kawara, S. y Jin, B. (2006) Application of the nanogold-4,4'-bis(methanethiol)biphenyl modified gold electrode to the determination of tyrosinase-catechol reaction kinetics in acetonitrile. *Anal. Sci.* **22**, 1261-1264.
- Nam, C-Y., Qin, Y., Park, Y.S., Hlaing, H., Lu, X., Ocko, B.M., Black, C.T. y Grubbs, R.B. (2012) Photo-cross-linkable azide-functionalized polythiophene for thermally stable bulk heterojunction solar cells. *Macromolecules* **45**, 2338-2347.
- Nappi, A.J. y Christensen, B.M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 443-459.
- Nasseau, M., Boublik, Y., Meier, W., Winterhalter, M. y Fournier, D. (2001) Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 615-618.
- Navia, M. (1992) *Use of crosslinked crystals as a novel form of enzyme immobilization*. Patente WO 92/02617.
- Nechifor, M. (2009) Synthesis and properties of some aromatic polyamides with coumarin chromophores. *React. Funct. Polym.* **69**, 27-35.
- Neipp, C., Gallego, S., Ortuño, M., Márquez, A., Beléndez, A. y Pascual, I. (2003) Characterization of a PVA/acrylamide photopolymer. Influence of a cross-linking monomer in the final characteristics of the hologram. *Opt. Commun.* **224**, 27-34.
- Nelson, J.M. y Griffin, E.G. (1916) Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 1109-1115.
- Neri, D., Balcão, V., Costa, R., Rocha, I., Ferreira, E., Torres, D., Rodrigues, L., Carvalho, L. y Teixeira, J.A. (2009) Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chem.* **115**, 92-99.
- Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., Vicente, C.M., Tanksley, S.D. y Steffens, J.C. (1993) Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1035-1051.
- Ngo, T.T. (1980) Bioanalytical applications of immobilized enzymes. *Int. J. Biochem.* **11**, 459-465.
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Boanco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D.G. y Diano, N. (2011) Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* **22**, 673-683.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Mirdamadi, S., Khetami, S. y Fahanghi, A. (2007) Immobilization of mushroom tyrosinase by different methods in order to transform L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa). *Biotechnology* **6**, 436-439.
- Núñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F. (1996) Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *J. Chromatogr. B* **680**, 105-112.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2003) Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2058-2063.
- Nwagu, T.N. y Okolo, B.N. (2012) Stabilization of a raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius* via immobilization on activated and non-activated agarose gel. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 335-345.

- Obi, N., Katayama, M., Sano, J., Kojima, Y., Shigemitsu, Y. y Takada, K. (1998) NMR spectroscopic study of the formation of borate esters ascorbic acid and isoascorbic acid. *New J. Chem.* **22**, 933-934.
- Octavio de Faria, R., Rotuno-Moure, V., Lopes de Almeida, M.A., Krieger, N. y Mitchell, D.A. (2007) The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 287-294.
- Ohmori, Y y Kurokawa, Y. (1994) Preparation of fibre-entrapped enzyme using cellulose acetate-titanium-iso-propoxide composite as gel matrix. *J. Biotechnol.* **33**, 305-209.
- Oliveira, P.C., Alves, G.M. y Castro, H.F. (2000) Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem. Eng. J.* **5**, 63-71.
- Olofsson, L. y Soderberg, P. (2006) Influence of water miscible organic solvents on  $\alpha$ -chymotrypsin in solution and immobilized on Eupergit CM. *Biotechnol. Lett.* **28**, 929-935.
- Omprakash, Y. y Toyoko, I. (2005) Covalent-bonded immobilization of lipase on poly(phenylene sulfide) dendrimers and their hydrolysis ability. *Biomacromolecules* **6**, 2809-2814.
- Onsa, G.H., bin Saari, N., Selamat, J. y Bakar, J. (2000) Latent polyphenol oxidases from sago log (Metroxylon sagu): partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5041-5045.
- Oriero, D.A., Jabal, J.M.F., Deobald, L., Weakley, A.T. y Aston, D.E. (2011) A potential enzyme-encapsulating, ultrafine fiber for phenol detection. *React. Funct. Polym.* **71**, 870-880.
- Ortega, N., Busto, M.D. y Perez-Mateos, M. (1998) Stabilisation of  $\beta$ -glucosidase entrapped in alginate and polyacrylamide gels towards thermal and proteolytic deactivation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **73**, 7-12.
- Ovsejevi, K., Cuadra, K. y Batista-Viera, F. (2009) Development of a continuous solid phase process for reduction and thiol-dependent immobilization of yeast  $\beta$ -galactosidase. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **57**, 188-193.
- Padrón, M.P., Lozano, J.A. y Gonzalez, A.G. (1975) Properties of *o*-diphenol: O<sub>2</sub> oxidoreductase from *Musa cavendishii*. *Phytochemistry* **14**, 1959-1963.
- Pahujani, S., Kanwar, S., Chauhan, G. y Gupta, R. (2008) Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Bioresour. Technol.* **99**, 2566-2570.
- Palocci, C., Chronopoulou, L., Venditti, L., Cernia, E., Diociaiuti, M., Fratoddi, I. y Russo, M.V. (2007) Lypolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules* **8**, 3047-3053.
- Palomo, J.M. (2009) Modulation of enzymes selectivity *via* immobilization. *Curr. Org. Synth.* **6**, 1-14.
- Park, B.W, Kim, D.S y Yoon, D.Y. (2011) Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. *Korean J. Chem. Eng.* **28**, 64-70.
- Parker, K. y Colby, J. (1995) Immobilization of the D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *Biodegradation* **6**, 191-201.
- Parkinson, N., Smith, I., Weaver, R. y Edwards, J.P. (2001) A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 57-63.
- Parthasarathy, R.V., y Martin, C.R. (1996) Enzyme and chemical encapsulation in polymeric microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.* **62**, 875-886.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Cho, C., Hong, M.C., Shin, M.K. y Bae, H. (2006) Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **20**, 921-934.

- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S. y Bae, H. (2007) Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* **21**, 805-816.
- Peiffer, R.W. (1997) Applications of photopolymer technology. *Photopolymerization* **1**, 1-14.
- Peñalver-Jara, M.J. (2006) *Caracterización cinética del mecanismo de reacción en las actividades enzimáticas monofenolasa y difenolasa de tirosinasa*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Peñalver, M.J., Hiner, A.N., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2002) Mechanistic implications of variable stoichiometrics of oxygen consumption during tyrosinase catalyzed oxidation of monphenols and *o*-diphenols. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 140-148.
- Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2003) Solvent deuterium isotope effect on the oxidation of *o*-diphenols by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 128-135.
- Peñalver, M.J., Rodríguez-Lopez, J.N., Fenoll, L.G., García-Ruiz, P.A., García-Molina, F., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2005) Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. *J. Mol. Catal. B- Enzymatic* **33**, 35-42.
- Pereira-Goulart, P.F., Donizeti-Alves, J., Murad-Magalhaes, M., Oliveira-Lima, L.C. y Meyer, L.E. (2003) Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. *Food Chem.* **83**, 7-11.
- Pessela, B.C., Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Torres, R., Dellamora-Ortiz, G.M., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. y Mateo, C. (2005) Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 295-299.
- Pessela, B.C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A.V., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J.M. (2008) Stabilization of the quaternary structure of a hexameric alpha-galactosidase from *Thermus sp. T2*. *Process Biochem.* **43**, 193-198.
- Pierpoint, W.S., Ireland, R.J. y Carpenter, J.M. (1977) Modification of proteins during the oxidation of leaf phenols: reaction of potato virus X with chlorogenoquinone. *Phytochemistry* **16**, 29-34.
- Piquemal, J.P., Maddaluno, J., Silvi, B. y Giessner-Prettre, C. (2003) Theoretical study of phenol and 2-aminophenol docking at a model of the tyrosinase active site. *New J. Chem.* **27**, 909-913.
- Pittalis, F., Bartoli, F. y Morisi, F. (1979) Properties of fibre-entrapped aspartase. *Enzyme Microb. Technol.* **1**, 189-192. polyphenol oxidase? *J. Sci. Food Agric.* **82**, 899-903.
- Pomerantz, S.H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241**, 161-168.
- Przybyt, M., Miller, E. y Szreder, T. (2011) Thermostability of glucose oxidase in silica gel obtained by sol-gel method and in solution studied by fluorimetric method. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **103**, 22-28.
- Pundir, C.S. y Chauhan, N. (2012) Coimmobilization of detergent enzymes onto a plastic bucket and brush for their application in cloth washing. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**, 3556-3563.
- Qiu, L., Chen, Q.X., Wang, Q., Huang, H. y Song, K.K. (2005) Irreversibly inhibitory kinetics of 3,5-dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 6206-6211.
- Quiocho, F.A. y Richards, F.M. (1992) Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. *Proc. Nat. Acad. Soc.* **114**, 7314-7316.
- Raghavan, V., Ramanathan, K., Sundaram, P.V. y Danielsson, B. (1999) An enzyme thermistor-based assay for total and free cholesterol. *Clin. Chim. Acta* **289**, 145-158.

- Rajesh, K., Ram, M.K., Jain, S.C., Samanta, S.B. y Narliker, A.V. (1998) Morphological investigation of polyvinyl-4-methoxy cinnamate photopolymer thin and ultrathin films under linear photopolymerization. *Thin Solid Films* **325**, 251-253.
- Ramanavicius, A., Kausaite, A. y Ramanaviciene, A. (2005) Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1962-1967.
- Ranby, B. (1998) Photochemical modification of polymers-photocrosslinking, surface photografting, and lamination. *Polym. Eng. Sci.* **38**, 1229-1243.
- Rehab, A. y Salahuddin, N. (1999) Photocrosslinked polymers based on pendant extended chalcone as photoreactive moieties. *Polymer* **40**, 2197-2207.
- Reinhold, D.F., Utne, T. y Abrason, N.L. (1987) *Process for L-dopa*. Patente US4716246.
- Reiser, A. (1980) The physical-chemistry of crosslinking photopolymers. *J. Chim. Phys.* **77**, 469-481.
- Reiser, A. (1989) *Photoreactive polymers: The science and technology of resists*. John Wiley & Sons, New York.
- Reiser, A., Terry, G.C. y Willets, F.W. (1966) Observation of the nitrene in the flash-photolysis of 1-azidoanthracene. *Nature* **211**, 410.
- Rescigno, A., Bruyneel, F., Padiglia, A., Sollai, F., Salis, A., Marchand-Brynaert, J. y Sanjust, E. (2011a) Structure-activity relationships of various amino-hydroxy-benzenesulfonic acids and sulfonamides as tyrosinase substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 799-807.
- Rescigno, A., Casañola-Martin, G.M., Sanjust, E., Zucca, P. y Marrero-Ponce, Y. (2011b) Vanilloid derivatives as tyrosinase inhibitors driven by virtual screening-based QSAR models. *Drug Test Anal.* **3**, 176-181.
- Riesel, E. y Ktchalski, E. (1964) Preparation and properties of water-insoluble derivatives of urease. *J. Biol. Chem.* **23**, 1521-1524.
- Riley, P.A. (2000) Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *J. Theor. Biol.* **203**, 1-12.
- Rijiravanich, P., Aoki, K., Chen, J., Surareungchai, W. y Somasudrum, M. (2004) Electrode reactions of catechol and tyrosinase immobilized latex suspensions. *Electroanalysis* **16**, 605-611.
- Riley, P.A. (2000) Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *J. Theor. Biol.* **203**, 1-12.
- Rocha, A. y Morais, A. (2002) Polyphenoloxidase activity and total phenolic content as related to browning of minimally processed 'Jonagored' apple. *J. Sci. Food Agric.* **82**, 120-26.
- Rodrigues, D.S., Mendesa, A.A., Wellington, S.A., Goncalves, L.R.B. y Giordano, R.L.C. (2008) Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **51**, 100-109.
- Rodriguez, R.C., Godoy, C.S., Filice, M., Bolivar, J.M., Palau-Ors, A., Garcia-Vargas, J.M., Romero, O., Wilson, L., Ayub, M.A.Z., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J.M. (2009) Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.* **44**, 641-646.
- Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F. y García-Cánovas, F. (1992) Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 3801-3810.
- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Devece, C., Sánchez-Hernández, D., Reyes, E. y García-Cánovas, F. (1999) Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz microwave radiation. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3028-3035.
- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., García-Ruiz, P.A., Varon, R., Tudela, J., Thorneley, R.N. y García-Canovas, F. (2000) Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry* **39**, 10497-10506.

- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., García-Ruiz, P.A., Varon, R., Martínez-Ortiz, F., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2001) Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *Biochim. Biophys. Acta* **1548**, 238-256.
- Roig, M.G., Bello, J.F., Velasco, F.G., Celis, C. y Cachaza, J.M. (1987) Applications of immobilized enzymes. *Biochem. Ed.* **15**, 198-208.
- Rojas-Melgarejo, F. (2002) *Inmovilización de enzimas en ésteres cinámicos de carbohidratos: nuevos soportes fotoentrecruzables*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Rojas-Melgarejo, F., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2004a.) Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. *Process Biochem.* **39**, 1455-1464.
- Rojas-Melgarejo, F., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2004b) Stability of horseradish peroxidase immobilized on different cinnamic carbohydrate esters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1148-1154.
- Rojas-Melgarejo, F., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Ruiz, P.A. (2004c) Cinnamic carbohydrate esters: new polymeric supports for the immobilization of horseradish peroxidase. *Carbohydr. Polym.* **58**, 79-88.
- Rojas-Melgarejo, F., Rodríguez-Lopez, J.N., Marín-Iniesta, F., Garcia-Canovas, F. y Garcia-Ruiz, P.A. (2006) Cinnamic carbohydrate esters show great versatility as supports for the immobilization of different enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 748-755.
- Rojas-Melgarejo, F., Soler-Romera, M.J. y García-Ruiz, P.A. (2007) Photocuring of cinnamic carbohydrate esters: Controlling the reaction by monocinnmoylated derivatives. *Carbohydr. Polym.* **68**, 424-432.
- Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S., Hellmann, N., Decker, H., Weidenbach, T. y Mozzarelli, A. (2007) Hemocyanin from *E. Californicum* encapsulated in silica gels: oxygen binding and conformational states. *Gene* **398**, 202-207.
- Roomi, M.W. y Tsao, C.S. (1998) Thin-layer chromatographic separation of isomers of ascorbic acid and dehydroascorbic acid as sodium borate complexes on silica gel and cellulose plates. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1406-1409.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (1993a) Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* **295**, 309-312.
- Ros, J.R., Rodríguez-Lopez, J.N. y García-Canovas, F. (1993b) Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 303-308.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (1994) Tyrosinase: Kinetic analysis of the transient phase and the steadystate. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 33-42.
- Ros, J.R., Rodríguez-Lopez, J.N., Varón, R. y Garcia-Cánovas, F. (1995) Mushroom tyrosinase has an ascorbate oxidase activity. *Biochem. Mol. Biol.* **36**, 301-309.
- Ros, P.C.M., Silva, G.A.M., Mendes, A.A., Santos, J.C. y Castro, H.F. (2010) Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **101**, 5508-5516.
- Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., Gomez, B.L., Edens, W.A., Henson, J.M. y Casadevall, A. (2000) Isolation and serological analyses of fungal melanins. *J. Immunol. Methods* **244**, 69-80.
- Rosli, W.D.W, Kumar, R.N., Zah, S.M. y Hilmi, M.M. (2003) UV radiation curing of epoxidized palm oil-cycloaliphatic diepoxide system induced by cationic photoinitiators for surface coatings. *Eur. Polym. J.* **39**, 593-600.
- Rubio-Retama, J., Marino, F.T. y Lopez-Cabarcos, E. (2007) Enzymatic biodegradable micro-reactors for therapeutic applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **83**, 145-152.

- Russo, G.L., Nisco, E., Fiore, G., Donato, P., Ischia, M. y Palumbo, A. (2003) Toxicity of melanin-free ink of *Sepia officinalis* to transformed cell lines: identification of the active factor as tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 293-299.
- Ryu, Y.B., Ha, T.J., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Gal, S.W. y Park, K.H. (2008) Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* (S.)Koidz. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **23**, 922-930.
- Sabudak, T., Tareq-Hassan-Khan, M., Iqbal-Choudhary, M. y Oksuz, S. (2006) Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. *Nat. Prod. Res.* **20**, 665-670.
- Sahoo, B., Sahu, S.K. y Pramanik, P. (2011) A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **69**, 95-102.
- Saito, H., Nakazato, T., Ishii, N. y Kudo, H. (2008) An optical flow injection analysis system for measurement of glucose in tomato. *Eur. Food Res. Technol.* **227**, 473-478.
- Sakai, S., Antoku, K., Yamaguchi, T. y Kawakami, K. (2008) Transesterification by lipase entrapped in electrospun poly(vinyl alcohol) fibers and its application to a flow-through reactor. *J. Biosci. Bioeng.* **105**, 687-689.
- Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1-11.
- Sánchez-Paniagua, M.L., Charmantray, F., Helaine, V., Hecquet, L. y Mousty, C. (2010) Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens Bioelectron* **26**, 139-143.
- Sánchez-Paniagua, M.L. y López-Ruiz, B. (2011) Inhibition biosensor based on calcium phosphate materials for detection of benzoic acid in aqueous and organic media. *Electroanalysis* **23**, 264-271.
- Sangeetha, K. y Abraham, T E. (2008) Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**, 314-319.
- Santos, J.C., Mijone, P.D., Nunes, G.F.M., Perez, V.H. y Castro, H.F. (2008) Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds. *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **61**, 229-236.
- Sanz, V., Marcos, S. y Galban, J. (2009) A blood-assisted optical biosensor for automatic glucose determination. *Talanta* **78**, 846-851.
- Schelleberg, W. y Bayer, O. (1962) *Light sensitive compounds and their use in the reproduction technic*. Patente US3030208.
- Schmid, R.D. y Kunnecke, W. (1990) Flow injection analysis (FIA) based on enzymes or antibodies applications in the life sciences. *J. Biotechnol.* **14**, 3-31.
- Secundo, F., Miehé-Brendlé, J., Chelaru, C., Ferrandi, E. y Dumitriu, E. (2008) Adsorption and activities of lipases on synthetic clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mat.* **109**, 350-361.
- Seetharam, G. y Saville, B.A. (2002) L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 747-753.
- Seiffert, S., Oppermann, W. y Saalwachter, K. (2007) Hydrogel formation by photocrosslinking of dimethylmaleimide functionalized polyacrylamide. *Polymer* **48**, 5599-5611.
- Seiji, M., Sasaki, M. y Tomita, Y. (1978) Nature of tyrosinase inactivation in melanosomes. *Tohoku J. Exp. Med.* **125**, 233-245.
- Selinheimo, E., Nieidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaoui, S., Record, E., O'Beirne, D., Buchert, J. y Kruus, K. (2007) Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotechnol.* **130**, 471-480.

- Selvam, P. y Nanjundan, S. (2005) Synthesis and characterization of new photoresponsive acrylamide polymers having pendant chalcone moieties. *React. Funct. Polym.* **62**, 179-193.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V.S., Adir, N. y Fishman, A. (2010) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 1101-1103.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V.S., Adir, N. y Fishman, A. (2011) First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227-237.
- Seo, D.K., Sung, O.H., Cho, S.H., Lee, J.Y., Kim, W.G. y Song, K.G. (2007) Novel photocrosslinking polymers for liquid crystal alignment. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* **463**, 475-481.
- Seo, S.Y., Sharma, V.K. y Sharma, N. (2003) Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2837-2853.
- Seppala, J., Korhonen, H., Hakala, R y Malin, M. (2012) Photocrosslinkable polyesters and poly(ester anhydride)s for biomedical applications. *Macromol. Biosci.* **11**, 1647-1652.
- Serrat, J.M., Caminal, G., Godia, F., López, A. y Santín, J. (1992) A novel application of immobilized enzymes: Affinity chromatography separations using enzymes depending of a cofactor. *Biotechnol. Techniques* **6**, 451-454.
- Shah, S., Sharma, A. y Gupta, M.N. (2006) Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochem.* **351**, 207-213.
- Shao, J., Ge, H.L. y Yang, Y.M. (2007) Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO<sub>2</sub> gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Lett.* **29**, 901-905
- Shao, J., Huang, L.L. y Yang, Y.M. (2009) Immobilization of polyphenol oxidase on alginate-SiO<sub>2</sub> hybrid gel: stability and preliminary applications in the removal of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 633-635.
- Sharma, K., Bari, S.S. y Singh, H.P. (2009) Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **56**, 253-258.
- Sharma, N.M, Kumar, S. y Sawhney, S.K. (2003) A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **38**, 137-141.
- Sheldon, R. (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289-1307.
- Sheldon, R.A., Schoeva, R. y Langen, L.M. (2005) Cross-linked enzyme aggregates (CLEASs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal. Biotransform.* **23**, 141-147.
- Shewale, S.D. y Pandit, A.B. (2007) Hydrolysis of soluble starch using *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase immobilized on superporous celbeads. *Carbohydr. Res.* **342**, 997-1008.
- Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y. y Liu, Q. (2002) The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Exp. Pur.* **24**, 51-55.
- Shie, C.J., Liao, H.F. y Lee, C.C. (2003) Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **88**, 103-106.
- Shin, N.H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R. y Kim, Y. (1998) Oxysresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803.
- Shipovskov, S. y Levashov, A. (2003) Tyrosinase: Polybrene noncovalent complexes in water-ethanol mixtures. *Biotech. Bioeng.* **84**, 258-263.
- Si, Z.K., Zhang, Q., Xue, M.Z., Sheng, Q.R. y Liu, Y.G. (2011) Novel UV-sensitive bis-chalcone derivatives: synthesis and photocrosslinking properties in solution and solid PMMA film. *Res. Chem. Intermed.* **37**, 635-646.

- Silva, J.A., Macedo, G.P., Rodrigues, D.S., Giordanoc, R.L.C. y Gonçalves, L.R.B. (2012) Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem. Eng. J.* **60**, 16-24.
- Sima, V.H., Patris, S., Aydogmus, Z., Sarakbi, A., Sandulescu, R. y Kauffmann, J.M. (2011) Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents. *Talanta* **83**, 980-987.
- Singh, R.P. (2011) A catechol biosensor based on a gold nanoparticles encapsulated-dendrimer. *Analyst* **136**, 1216-1221.
- Sobolov, S.B., Bartoszko-Malik, A., Oeschger, T.R. y Montalbano, M.M. (1994) Cross-linked enzyme crystals of fructose diphosphate aldolase: Development as a biocatalyst for synthesis. *Tetrahedron Lett.* **35**, 7751-7754.
- Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorstein, S. y Martin-Belloso, O. (2001) Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3685-3690.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2606.
- Song, W., Li, D.W., Li, Y.T., Li, Y. y Longa, Y.T. (2011) Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3181-3186.
- Sorrell, T.N., Beltramini, M. y Lerch, K. (1988) Luminescence of deoxyhemocyanin and deoxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* **263**, 9576-9577.
- Soumanou, M.M., Djenontin, S.T., Tchobo, F.P., Sohounhloue, D.C.K. y Bornscheuer, U.T. (2012) Lipase-catalysed biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Lipid Technol.* **24**, 158-160.
- Spritz, R.A., Chiang, P.W., Oiso, N. y Alkhateeb, A. (2003) Human and mouse disorders of pigmentation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 284-289.
- Strack, D., Vogt, T. y Schlieman, W. (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247-269.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L. y Mason, H.S. (1976) Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **70**, 519-524.
- Sugumaran, M. (2001) Control mechanisms of the prophenoloxidase cascade. *Adv. Exp. Med. Biol.* **484**, 289-298.
- Sumner, J.B. 1948. Denaturation of urease without inactivation. *Science* **108**, 410-413.
- Sun, S. y Zhao, X. (2011) Macroporous poly(Glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) polymer particles for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus Oryzae*. *J. Chem. Pharm. Res.* **3**, 1118-1124.
- Sung, S.J., Cho, K.Y., Hah, H., Lee, J., Shim, H.K. y Park, J.K. (2006) Two different reaction mechanisms of cinnamate side groups attaches to the various polymer backbones. *Polymer* **47**, 2314-2321.
- Surwase, S.N. y Jadhav, J.P. (2011) Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. JPJ. *Amino Ac.* **41**, 495-506.
- Surwase, S.N., Patil, S.A., Apine, O.A. y Jadhav, J.P. (2012) Efficient microbial conversion of L-tyrosine to L-DOPA by *Brevundimonas* sp. SGJ. *Appl Biochem Biotechnol* **167**, 1015-1028.
- Sweely, C.C., Bently, R., Makita, M. y Wells, W.W. (1963) Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497-2507.

- Tai, Y., Wang, L., Gao, J., Tao, W., Huo, J. y Yang, L. (2012) Synthesis of core/shell magnetic porous microspheres for lipase immobilization. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **22**, 213-222.
- Tamalampudi, S., Hama, S., Tanino, T., Talukder, M.R., Kondo, A. y Fukuda, H. (2007) Immobilized recombinant *Aspergillus oryzae* expressing heterologous lipase: An efficient whole-cell biocatalyst for enantioselective transesterification in non-aqueous médium. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **48**, 33-37.
- Tamura, A., Stoh, E., kashiwada, A., Matsuda, K. y Yamada, K. (2010) Removal of alkylphenols by the combined use of tyrosinase immobilized on ion-exchange resins and chitosan beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **115**, 137-145.
- Tareq, M. y Khan, H. (2007) Molecular design of tyrosinase inhibitors: a critical review of promising novel inhibitors from syntethic origins. *Pure Appl. Chem.* **79**, 2277-2295.
- Tembe, S., Karve, M., Inadamar, S., Haram, S., Melo, J. y D'Souza, S.F.D. (2006) Development of electrochemical biosensor bases on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Anal. Biochem.* **349**, 72-76.
- Tembe, S., Kubalb, B.S., Karvea, M. y D'Souza, S.F. (2008) Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. *Anal. Chim. Acta* **612**, 212-217.
- Tembe, S., Kubalb, B.S., Karvea, M. y D'Souza, S.F. (2009) Epinephrine biosensor using tyrosinase immobilized eggshell membrane. *Sens. Transd. J.* **107**, 111-118.
- Teramoto, N. y Shibata, M. (2007) Synthesis and photocuring of cinnamoyl trehallose esters. *Polym. Adv. Technol.* **18**, 971-977.
- Thipyapong, P, Hunt, M.D. y Steffens, J .C (2004) Antisense downrwgulation of poluphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* **220**, 105-107.
- Thipyapong, P., Stout, M. y Attajarusit, J. (2007) Functional analysis of plyphenol oxidases by antisense/sense technology. *Molecules* **12**, 1569-1595.
- Tischer, W. y Wedekind, F. (1999) Immobilized enzymes: Methods and applications. *Topics Curr. Chem.* **200**, 95-126.
- Toivonen, P.M.A. y Brummell, D.A. (2008) Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **48**, 1-14.
- Tolbert, N.E. (1973) Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant. Physiol.* **51**, 234-244.
- Tosa, T., Mori, T, Fuse, N. y Chibata, I. (1966) Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of Carriers for preparation of Water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia* **31**, 214-224.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. y Chibata, I. (1969) Studies on continuous enzyme reactions 6. Enzymatic properties of DEAE-sepharose aminoacylase complex. *Agr. Biol. Chem.* **33**, 1047-1056.
- Toyama, T. y Sakamoto, A. (1994) Method for processing photosensitive copying material. Patente JP6138661
- Tsuda, M. (1964) Some aspects of photosensitivity of poly(vinyl cinnamate). *J. Polym. Sci.: Part A 2*, 2907-2916.
- Tudela, J., García-Cánovas, F., Varón, R., Jimenez, M., García-Carmona, F. y Lozano, J.A. (1987) Kinetic characterization of dopamine as suicide substrate of tyrosinase. *J. Enzyme. Inhib.* **2**, 47-56.
- Tükel, S.S y Alagöz, D. (2008) Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. *Food Chem.* **111**, 658-662.

- Tutar, H., Yilmaz, E., Pehlivan, E. y Yilmaz, A. (2009) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 315-320.
- Tuzmen, N., Kalburcu, T. y Denizli, A. (2012) Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochem.* **47**, 26-33.
- Urban, P.L., Goodall, D.M. y Bruce, N.C. (2006) Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnol. Adv.* **24**, 42-57.
- Urso, E.M. y Fortier, G. (1996) Albumin-poly(ethylene glycol) hydrogel as matrix for enzyme immobilization: Biochemical characterization of crosslinked acid phosphatase. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 482-488.
- Vallejo-Becerra, V., Marín-Zamora, M.E., Vásquez-Bahena, J.M., Rojas-Melgarejo, F., Hidalgo-Lara, M.E. y García-Ruiz, P.A. (2008) Immobilization of recombinant invertase (re-INVB) from *Zymomonas mobilis* on D-sorbitol cinnamic ester for production of invert sugar. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1392-1397.
- Vámos-Vigyázó, L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**, 49-127.
- Van Cleve, J.W. (1963) Direct benzylation of D-fructose. En Whistler, R.L y Wolfrom, M.L. (Eds). *Methods in Carbohydrate Chemistry*, II. Academic Press Inc, London, 237-238.
- Vidal, J.C., Esteban, S., Gil, J. y Castillo, J.R. (2006) A comparative study of immobilization of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. *Talanta* **68**, 791-799.
- Viña, I., Karsakevich, A. y Bekers, M. (2001) Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **11**, 551-558.
- Vinoth-Kumar, V., Prem-Kumar, M.P., Thiruvankadaravi, K.V., Baskaralingam, P., Senthil-Kumar, P. y Sivanesan, S. (2012) Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. *Bioresour. Technol.* **119**, 28-34.
- Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A. y Whitaker, J.R. (2010a) Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1189-1201.
- Virador, V.M., Reyes-Grajeda, J.P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A. y Whitaker, J.R. (2010b) Correction to cloning, sequencing, purification and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3687.
- Vitti, M.C.D., Sasaki, F.F., Miguel, P., Kluge, R.A. y Moretti, C.L. (2011) Activity of enzymes associated with the enzymatic browning of minimally processed potatoes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **54**, 983-990.
- Volbeda, A., Gaykema, W.P.J. y Hol, W.G.J. (1984) The structure of *Panulirus interruptus* hemocyanin at 3.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. (A)* **40**, C13-C13.
- Waite, J.H. (1984) Determination of (catecholato) borate complexes using difference spectrophotometry. *Anal. Chem.* **56**, 1935-1939.
- Wang, B., Zhang, J. y Dong, S. (2000) Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 397-402.
- Wang, F., Hua, Y, Guo, C., Huang, W. y Liu, C-Z. (2012) Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed. *Bioresour. Technol.* **110**, 120-124.
- Wang, J. y Constabel, C.P. (2003) Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry* **64**, 115-121.

- Wang, J., Nayaka, B.R., Creed, D., Hoylea, C.E. y Mathiasa, L.J. (2005) Photocrosslinking of poly(ethylene terephthalate) copolymers containing photoreactive comonomers. *Polymer* **46**, 6897-6909.
- Wang, L., Ran, Q., Tian, Y., Ye, S., Xu, J., Xian, Y., Peng, R. y Jin, L. (2010) Covalent grafting tyrosinase and its application in phenolic compounds detection. *Microchim. Acta* **171**, 217-223.
- Wang, X., Chen-Guo, L., Hui-Zhou, L. y Chun-Zhao, L. (2008a) Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 97-104.
- Wang, X., Imber, S.B. y Schreiber, S.L. (2008b) Small-molecule reagents for cellular pull-down experiments. *Bioconjugate Chem.* **19**, 585-587.
- Wang, Y. y Hasebe, Y. (2009) Carbon felt-based biocatalytic enzymatic flow-through detectors: Chemical modification of tyrosinase onto amino-functionalized carbon felt using various coupling reagents. *Talanta* **79**, 1135-1141.
- Wang, Y. y Hasebe, Y. (2011) Acridine orange-induced signal enhancement effect of tyrosinase-immobilized carbon-felt-based flow biosensor for highly sensitive detection of monophenolic compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1151-1162.
- Wellner, A., Huettl, C. y Henle, T. (2011) Formation of maillard reaction products during heat treatment of carrots. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7992-7998.
- Wen, P., Wang, L., Zhang, A., Li, X-D. y Lee, M-H. (2011) Synthesis and properties of novel photosensitive poly(arylene ether sulfone) containing chalcone moiety in the main chain. *Mater. Chem. Phys.* **126**, 832-835.
- Wendell, L.D. (1983) Organic photochemistry. XVII. Polymerization of unsaturated compounds by photocycloaddition reactions. *Chem. Rev.* **83**, 1-45.
- Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. y Solomon, E.I. (1985) Substrate-analog binding to the coupled binuclear copper active-site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4015-4027.
- Wilson, L., Betancor, L., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Hidalgo, A., Guisán, J.M., Pessela, B. y Fernández-Lafuente, R. (2004) Cross-Linked Aggregates of multimeric enzymes: a simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules* **5**, 814-817.
- Wititsuwannakul, D., Chareonthiphakorn, N., Pace, M. y Wititsuwannakul, R. (2002) Polyphenol oxidases from latex *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry* **61**, 115-121.
- Wolf, M., Wirth, M., Pittner, F. y Gabor, F. (2003) Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. *Int. J. Pharm.* **256**, 141-152.
- Wu, J., Luan, M. y Zhao, J. (2006) Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **39**, 185-191.
- Wu, L., Den, D., Jin, J., Lu, X. y Chen, J. (2012) Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 193-199.
- Xu, D.Y., Chen, J.Y. y Yang, Z. (2012) Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L-DOPA. *Biochem. Eng. J.* **63**, 88-94.
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K. y Hirata, M. (2005) Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemicals adsorption by chitosan beads. *Biotechnol. Progr.* **21**, 823-829.
- Yamashita, T., Kasai, C., Sumida, T. y Horie, K. (1995) Synthesis of a photosensitive polyimide containing a diazo group and its photocrosslinking reactions via a long-lived active intermediate. *Acta Polym. Sin.* **46**, 407-415.

- Yamazaki, I. y Itoh, S. (2003) Kinetic evaluation of phenolase activity of tyrosinase using simplified catalytic reaction system. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13034-13035.
- Yang, L., Xiong, H., Zhang, X. y Wang, S. (2012) A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film. *Bioelectrochemistry* **84**, 44-48.
- Yaropolov, A.I., Kharybin, A.N., Emneus, J, Marko-Varga, G y Gorton, L. (1995) Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilized laccase and tyrosinase. *Anal. Chim. Acta* **308**, 137-144.
- Yashi, A., Sahin, F., Demirel, G. y Tümtürk, H. (2005) Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid )hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 253-258.
- Yi, C., Nirmala, R., Navamathavan, R., Li, X.D. y Kim, H.Y. (2011) Preparation of photocrosslinkable polystyrene methylene cinnamate nanofibers via electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 8474-8480.
- Yildiz, H.B., Kiralp, S., Toppare, L. y Yagci, Y. (2005) Immobilization of tyrosinase in poly(ethyleneoxide) electrodes and determination of phenolics in red wines. *React. Funct. Polym.* **63**, 155-161.
- Yildiz, H.B., Topare, L., Castillo, J., Gushin, D.A. y Schuhmann, W. (2007) Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer. *Microchim. Acta* **159**, 27-34.
- Yoon, J., Fujii, S. y Solomon, E.I. (2009) Geometric and electronic structure differences between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6585-6590.
- Yoshiki, C., Kazuki, S. y Takeo, S. (1990) Polyoxazoline having a coumarin moiety as a pendant group. Synthesis and photogelation. *Macromolecules* **23**, 2693-2697.
- Yota, T., Takeshi, N. y Youhei, Y. (2008) Acid activation of protyrosinase from *Aspergillus oryzae*: homo-tetrameric protyrosinase is converted to active dimers with an essential disulfide bond at acidic pH. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 89-96.
- Young-Seok, O., Hye-Jin, L., Minji, Y., Hyoung-Juhn, K., Jonghee, H. y Tae-Hyun, K. (2008) Synthesis of novel crosslinked sulfonated poly(ether sulfone)s using bisazide and their properties for fuel cell application. *J. Membr. Sci.* **323**, 309-315.
- Yu, B. y Chang, T.M.S. (2002) In vitro enzyme kinetics of microencapsulated tyrosinase. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **30**, 533-546.
- Yu, J., Liu, S. y Ju, H. (2003) Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 509-514.
- Yu, Z., Zhao, G., Liu, M., Lei, I. y Li, M. (2010) Fabrication of a novel atrazine biosensor and its subpart-per-trillion levels sensitive performance. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7878-7883.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., y Michael Eskin, N.A. (1991) Polyphenol oxidase. En Robinson, D.S y Eskin, N.A.M. (Eds). *Oxidative enzymes in foods*. Elsevier Science, London, 217-273.
- Zejli, H., Hidalgo, J.L., Naranjo-Rodriguez, I., Liu, B., Temsamani, K.R. y Marty, J.L. (2008) Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization. *Anal. Chim. Acta* **612**, 198-203.
- Zhang, F., Wang, X., Ai, S., Suna, Z., Wan, Q. y Zhub, Z. (2004) Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Anal. Chim. Acta* **519**, 155-160.
- Zhang, J., Lei, J., Liu, Y., Zhao, J. y Yu, H. (2009) Highly sensitive amperometric biosensors for phenols based on polyaniline-ionic liquid-carbon nanofiber composite. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1858-1863.

- Zhang, L., Peng, Z., Yao, L., Fei, C., Fengzhen, L. y Xuan, L. (2007) Photoalignment of liquid crystals by cinnamate polyelectrolyte layer-by-layer ultrathin film. *Appl. Surf. Sci.* **253**, 3372-3377.
- Zhang, X., Hu, X., Hou, A. y Wang, H. (2009) Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 86-90.
- Zhang, Y.W., Jeya, M. y Lee, J.K. (2011) Enhanced activity and stability of L-arabinose isomerase by immobilization on aminopropyl glass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1435-1442.
- Zhang, Y.Y. y Liu, J.H. (2011) Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R, S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochem. Eng. J.* **54**, 40-46.
- Zhao, J., Zhi, J., Zhou, Y. y Yan, W. (2009) A tyrosinase biosensor on ZnO nanorod clusters/nanocrystalline diamond electrodes for biosensing of phenolic compounds. *Anal. Sciences* **25**, 1083-1088.
- Zheng, Z.P., Cheng, K.W., To, J.T., Li, H. y Wang, M. (2008) Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 1530-1538.
- Zhou, G., Chen, Y. y Yang, S. (2009) Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* lipase in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. *Microporous Mesoporous Mat.* **119**, 223-229.
- Zhou, Y.L., Tian, R.H. y Zhi, J.F. (2007) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 822-828.
- Zynek, K., Bryjak, J., Szymanska, K. y Jarzebski, A.B. (2011) Screening of porous and cellular materials for covalent immobilisation of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 180-189.

