



# Inmovilización y almacenamiento de enzimas en materiales 3D para aplicaciones biotecnológicas

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales  
Grado de Biotecnología  
Universidad Miguel Hernández de Elche

Autor: Francisco de la Fuente Martínez  
Tutora: Dra. María José Martínez Tomé  
Cotutora: Dra. Carmen Reyes Mateo Martínez

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología  
Sanitaria de Elche

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química – Física

## Resumen

El presente Trabajo de Fin de Grado examina la inmovilización y almacenamiento de enzimas en materiales 3D, usando para ello la fosfatasa alcalina (ALP) como enzima modelo. La enzima fue inmovilizada mediante diferentes técnicas de atrapamiento en hidrogeles que varían en su composición y preparación. El estudio evalúa los efectos de dicha inmovilización sobre la estabilidad térmica y la actividad catalítica de la enzima. Los resultados muestran que todos los métodos de inmovilización influyen en estas propiedades, además de mejorar su capacidad de conservación a lo largo del tiempo. Los estudios de estabilidad térmica se llevaron a cabo mediante espectroscopía de fluorescencia, siguiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína, mientras que la actividad enzimática se evaluó utilizando espectroscopía de absorción. Este documento proporciona una guía útil para la selección de técnicas de inmovilización en función de las necesidades específicas de cada aplicación biotecnológica y destaca la importancia de optimizar las condiciones de inmovilización para maximizar el rendimiento enzimático en procesos industriales.

Palabras clave: Fosfatasa Alcalina, Inmovilización, Sol-Gel, Hidrogeles, Xerogeles y Ormosils

### Abstract

The Final Degree Project examines the immobilization and storage of enzymes in 3D materials, using alkaline phosphatase (ALP) as a model enzyme. The enzyme was immobilized using different entrapment techniques in hydrogels that vary in their composition and preparation. The study evaluates the effects of this immobilization on the thermal stability and catalytic activity of the enzyme. The results show that all immobilization methods influence these properties, as well as improve their preservation capacity over time. Thermal stability studies were conducted using fluorescence spectroscopy, monitoring the changes in the intrinsic fluorescence of the protein, while enzymatic activity was assessed using absorption spectroscopy. This document provides a useful guide for selecting immobilization techniques based on the specific needs of each biotechnological application and highlights the importance of optimizing immobilization conditions to maximize enzymatic performance in industrial processes.

Keywords: Alkaline Phosphatase, Immobilization, Sol-Gel, Hydrogels, Xerogels and Ormosils

# Índice

1. Introducción
  - 1.1. Inmovilización
  - 1.2. Inmovilización 2D
  - 1.3. Inmovilización 3D
    - 1.3.1. Encapsulación
    - 1.3.2. Atrapamiento
2. Antecedentes
  - 2.1. Hidrogeles orgánicos
    - 2.1.1. Hidrogeles orgánicos sintéticos
    - 2.1.2. Inmovilización de enzimas en hidrogeles basados en acrilatos y acrilamida.
  - 2.2. Hidrogeles inorgánicos
  - 2.3. Enzima ALP
3. Objetivos
4. Materiales y Métodos
  - 4.1. Reactivos y Equipos
  - 4.2. Métodos de preparación y caracterización
    - 4.2.1. Preparación de las disoluciones
    - 4.2.2. Fabricación de los hidrogeles orgánicos
    - 4.2.3. Preparación de matrices Sol-Gel
      - 4.2.3.1. Preparación de matrices *Ormosils*
    - 4.2.4. Inmovilización de la enzima ALP en matrices 3D
      - 4.2.4.1. Inmovilización de la ALP en hidrogeles orgánicos
      - 4.2.4.2. Inmovilización de la ALP en matrices Sol-Gel
    - 4.2.5. Ensayos de actividad enzimática
    - 4.2.6. Estudios conformacionales y de estabilidad térmica
5. Resultados y Discusión
  - 5.1. Estudio de la estabilidad conformacional
    - 5.1.1. Estabilidad de la enzima en Disolución
    - 5.1.2. Estabilidad de la enzima en Sol-Gel
    - 5.1.3. Estabilidad de la enzima en Hidrogeles
      - 5.1.3.1. Inmovilización de la ALP *in situ*
      - 5.1.3.2. Inmovilización de la ALP *ex situ*
      - 5.1.3.3. Inmovilización de la ALP en Xerogel *ex situ*
  - 5.2. Estudio de la actividad enzimática
    - 5.2.1. Actividad enzimática de la ALP en Disolución
    - 5.2.2. Actividad enzimática de la ALP en Sol-Gel
    - 5.2.3. Actividad enzimática de la ALP en Hidrogeles
  - 5.3. Estudio de Almacenamiento de la Enzima
    - 5.3.1. Almacenamiento de la ALP en matrices Sol-Gel
    - 5.3.2. Almacenamiento de la ALP en Hidrogeles
6. Conclusiones y perspectivas futuras
7. Bibliografía

## **1. Introducción**

De unos años a esta parte se han realizado numerosos estudios que investigan los usos y aplicaciones de las enzimas, debido a ser catalizadores biocompatibles, biodegradables y sostenibles, además de ser económicos y energéticamente eficientes (Sheldon and van Pelt 2013). Estos catalizadores biológicos son esenciales para muchas reacciones bioquímicas que pueden ser de gran utilidad tanto en procesos industriales, para la síntesis de numerosos compuestos, como en el campo del diagnóstico y detección, al ser una pieza clave en el desarrollo de biosensores.

Los biosensores se construyen con un componente biológico que funciona como un elemento de reconocimiento, un transductor que convierte la señal biológica en una señal tratable y un sistema que procesa la señal. La inmovilización es un paso crucial en la creación de estos dispositivos, ya que se utiliza para fijar el componente biológico, que en muchas ocasiones es una enzima, al transductor y permitir la transducción de la señal (Nguyen et al. 2019).

La inmovilización de enzimas ha surgido como una solución a la falta de estabilidad y la difícil recuperación de estas proteínas cuando se utilizan en forma libre en procesos industriales. (Sheldon and van Pelt 2013; Singh et al. 2013). Hasta la fecha se han desarrollado numerosas técnicas de inmovilización, que ofrecen ventajas como mayor estabilidad, enantioselectividad, capacidad de reutilización y facilidad de separación de productos (Sheldon and van Pelt, 2013; Datta et al. 2013), pero no hay una regla absoluta para elegir entre ellas. La elección depende de una variedad de factores, que no se limitan a la metodología ni a los materiales de soporte (Singh et al. 2013). Por ello es importante conocer las ventajas y desventajas de diferentes métodos, así como sus características y requerimientos para poder seleccionar el más idóneo para cada estudio o aplicación.

### **1.1. Inmovilización**

La inmovilización de enzimas es una de las tecnologías más prometedoras que se ha estado abriendo paso en varias áreas tanto industriales como de investigación y desarrollo en las últimas décadas (Datta et al. 2013). Se han desarrollado múltiples estrategias de inmovilización que presentan diferentes fortalezas e inconvenientes.

Atendiendo a los métodos de inmovilización de enzimas podemos encontrar metodologías basadas en adsorción, en uniones covalentes, atrapamiento, encapsulación o uso de compuestos bifuncionales (García Sánchez et al. 2003). Las condiciones de inmovilización, el tipo de soporte y la naturaleza de la enzima determinan las propiedades finales de la enzima. Entre los factores que hay que tener en cuenta a la hora de seleccionar el método y el material de inmovilización se encuentran la biocompatibilidad, la separación posterior de los productos, la carga enzimática requerida, la biodegradabilidad, la estabilidad y el costo económico (Meyer et al. 2021).

A continuación, se expone una lista de ventajas y desventajas de la inmovilización que se han descrito a lo largo de diferentes artículos científicos (Tabla 1) (Kumar et al. 2013; (Shen et al. 2022; Datta et al. 2013).

Tabla 1. Ventajas y desventajas generales de la inmovilización de enzimas.

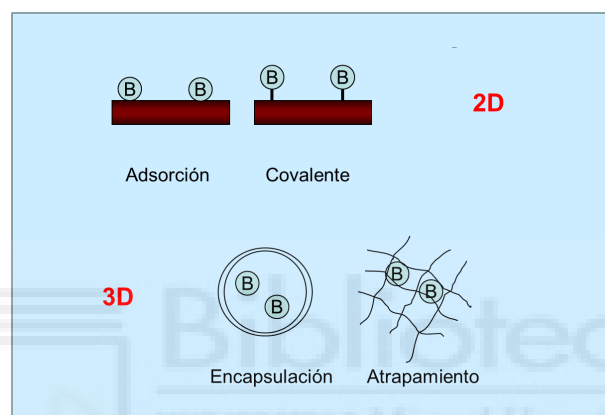
Ventajas	Desventajas
Permite el uso de múltiples enzimas	Actividad enzimática reducida
Permite la recuperación y reutilización de la enzima	Cambios Conformacionales Posible Desnaturalización
Bajos tiempos de reacción	Cambios en sus propiedades
Permite su uso en continuo	Limitación en la transferencia de masas
Fácil separación del producto	Baja eficacia con sustratos insolubles
Económicamente más rentables	Pérdida de afinidad por el sustrato (aumento
Más Seguro	$K_m$ )
Mayor estabilidad y longevidad	

Además, se sabe desde hace mucho tiempo que la inmovilización puede mejorar la actividad enzimática, pero esto depende del microambiente, el efecto de la difusión, la orientación molecular, la flexibilidad conformacional y el modo de unión (Singh et al. 2013). Por ello podemos decir que hay propiedades que mejorarán o empeorarán dependiendo de las condiciones del proceso.

El material, la forma y el tamaño del soporte son cruciales para el funcionamiento de la enzima inmovilizada, ya sea por su interacción con el medio externo (tales como T, pH, viscosidad, etc.) o por la procesabilidad y química de la superficie. A pesar de los numerosos estudios sobre este

tema, aún hay mucho donde trabajar y se sigue buscando formas de mejorar estos procesos. Uno de los retos actuales en el campo de la inmovilización de enzimas es el almacenamiento durante largos periodos de tiempo mientras se mantiene un rango de actividad enzimática óptimo (Alacid et al. 2023).

Los materiales utilizados en los soportes de inmovilización pueden provenir de compuestos orgánicos, inorgánicos o híbridos y se pueden presentar en estructuras de dos dimensiones (2D) o tres dimensiones (3D) (Rehm et al. 2016), como se describe a continuación y se esquematiza en la Figura 1.



**Figura 1.** Métodos de inmovilización de Biomoléculas

## 1.2. Inmovilización 2D

Los soportes 2D son materiales que forman estructuras planas con bajo grosor, formando películas donde se pueden anclar las proteínas. Los métodos de inmovilización 2D son capaces de inmovilizar biomoléculas mediante interacciones físicas o químicas, resultando en un proceso simple y de bajo costo. (Xia et al. 2020; Alacid et al. 2023). Pero, a su vez presentan varias limitaciones como una baja capacidad de carga (Alacid et al. 2023). Además, las interacciones entre las enzimas y el soporte pueden verse significativamente afectadas por altas concentraciones de sal o debido al pH. (Xia et al. 2020).

En estudios previos se ha observado que la unión de una enzima a un soporte preexistente depende de la adsorción física, la unión covalente y/o la unión por afinidad, por lo que es necesaria una interacción entre la enzima y el soporte (Shen et al. 2022). Por ello, en este tipo de técnicas es más importante si cabe la selección de un soporte apropiado. Los estudios

recopilatorios sobre los métodos de inmovilización han descrito las características ideales de un soporte: asequible, resistencia física, estabilidad, regenerabilidad, capacidad para aumentar la especificidad y la actividad de las enzimas y reducir la inhibición, la adsorción no específica y la contaminación microbiana (Datta et al. 2013).

### **1.3. Inmovilización 3D**

La inmovilización de enzimas en soportes 3D es una técnica avanzada y versátil que se ha usado ampliamente en diversas aplicaciones biotecnológicas. Los soportes denominados 3D tienen una estructura tridimensional que proporciona un espacio volumétrico para la inmovilización de enzimas. Hay que tener en cuenta que el mismo método de inmovilización puede tener diferentes propiedades y estabilidad finales dependiendo del soporte utilizado y las condiciones del proceso (Kumar et al. 2013). Las estructuras de soportes 3D son complejas, permitiendo las formas, tamaños y propiedades físicas idóneas para los procesos industriales (Shen et al. 2022).

Factores como la interacción con el soporte, la posición de unión, el número de enlaces, la libertad conformacional, el microambiente, la estructura del soporte, las características del espaciador y las condiciones de inmovilización, determinan la estabilidad de la enzima inmovilizada. (Kumar et al. 2013). Por ello, es importante conocer en profundidad los materiales, las proteínas y la metodología que se van a utilizar en cada caso para poder optimizar el proceso.

Los soportes 3D, a diferencia de los 2D, tienen una estructura volumétrica que permite introducir enzimas en estructuras y formas complejas, facilitando una interacción más extensa y uniforme con los sustratos (Shen et al. 2022). En definitiva, podemos decir que los métodos de inmovilización 3D pueden solventar varios de los problemas encontrados en los materiales 2D, por ejemplo, pueden inmovilizar un mayor número de proteínas (Alacid et al. 2023). Los soportes 3D se centran en materiales porosos que otorgan una gran superficie de interacción donde las enzimas pueden inmovilizarse ya sea por métodos de adsorción física, mediante la formación de enlaces covalentes o atrapando las proteínas en el interior de estos poros. Hay una amplia literatura sobre los soportes porosos, los cuales han sido muy estudiados y usados (Rehm et al. 2016). Como se muestra en la Figura 1, dentro de las estrategias de inmovilización en materiales 3D se encuentra el método de encapsulación y el método de atrapamiento.

### **1.3.1. Encapsulación**

La encapsulación consiste en envolver o rodear las enzimas en una matriz polimérica o un material similar, lo que crea un microambiente cerrado en el que las enzimas pueden funcionar. Este método ha mostrado varias ventajas como prevenir la degradación enzimática, facilitar la reutilización de la enzima y proteger la enzima de situaciones adversas (Bialas et al. 2021). Además, propiedades como la velocidad de reacción y la eficiencia de la reacción se pueden mejorar manipulando las interacciones hidrofóbicas, el área de superficie y la concentración local de los intermedios. (Weng et al. 2023).

### **1.3.2. Atrapamiento**

El método de inmovilización por atrapamiento es un método sencillo y fácil de realizar, ampliamente utilizado en biocatálisis industrial, donde es crucial el acceso rápido y continuo a los sustratos y de los productos. El método consiste básicamente en inmovilizar las enzimas dentro de matrices porosas o en materiales con una red tridimensional donde las proteínas son atrapadas debido a las restricciones físicas impuestas por el soporte. Por lo general, se basa en la creación de soporte en presencia de la enzima, por lo que este proceso debe ser compatible con la estabilidad de la enzima (Rehm et al. 2016; Sheng et al. 2022).

Algunos de los inconvenientes del atrapamiento son los problemas de difusión de los sustratos y la baja capacidad de carga (Nguyen et al. 2019). Además, ofrece menor protección que la encapsulación, pero mantiene cierta estabilidad mecánica y química.

Entre los materiales 3D utilizados para el atrapamiento de enzimas se encuentran los hidrogeles orgánicos e inorgánicos, siendo estos últimos fundamentalmente las matrices de sílice preparadas mediante el proceso Sol-Gel. La inmovilización de enzimas en hidrogeles enfrenta desafíos como optimizar la estabilidad a largo plazo, mejorar la difusión de sustratos y productos e integrar estos sistemas en procesos industriales a gran escala. Es por ello que la capacidad de ambos tipos de hidrogeles para atrapar y almacenar enzimas será estudiada en este trabajo con objeto de seleccionar las condiciones de atrapamiento más adecuadas para su almacenamiento.



## 2. Antecedentes

El grupo de investigación en el que se ha realizado este TFG tiene una larga experiencia en el campo de inmovilización de enzimas y desarrollo de biosensores. El método de inmovilización utilizado en la mayoría de sus trabajos es el de atrapamiento en matrices Sol-Gel. Como se verá más adelante, estos hidrogeles inorgánicos ofrecen numerosas ventajas en términos de versatilidad, control de estructura y estabilidad, además de ser biocompatibles, siendo una muy buena opción para la fabricación de biosensores enzimáticos. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones debido a su alta fragilidad y rigidez. Por ello, el grupo ha comenzado a explorar otras alternativas como son los hidrogeles orgánicos, más flexibles y elásticos y los materiales híbridos orgánico-inorgánicos, conocidos como *ormosils* (organic modified silica), que son matrices de sílice modificadas orgánicamente. A continuación, se describen algunas de las propiedades de estos materiales.

### 2.1. Hidrogeles orgánicos

Los hidrogeles son materiales usados para la inmovilización de enzimas por atrapamiento. Se trata de redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos que tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, lo que crea un entorno acuoso similar al natural para las enzimas inmovilizadas (Alacid et al. 2023; Meyer et al. 2021). Estos materiales pueden formarse a partir de polímeros naturales, sintéticos o una combinación de ambos (Gangadevi et al. 2020).

Al absorber agua, la red polimérica hidrofílica de los hidrogeles se expande y las cadenas poliméricas se extienden, lo que conduce a su hinchamiento. El grado de hinchamiento influye en las características finales del material, siendo un factor clave en la eficacia de la inmovilización (Meyer et al. 2021). Al hincharse, los hidrogeles tienen la capacidad de imitar la flexibilidad del tejido natural (Gangadevi et al. 2020). Sin embargo, los hidrogeles hinchados son más frágiles y difíciles de manipular que los hidrogeles poco hinchados o deshidratados ya que su estabilidad y resistencia mecánica disminuyen (Alacid et al. 2023).

Independientemente del grado de hinchamiento, los hidrogeles presentan beneficios atractivos desde el punto de vista industrial y de desarrollo. Entre estos beneficios podemos mencionar su excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad, sensibilidad a estímulos, capacidad antibacteriana, resistencia mecánica y flexibilidad (Meyer et al. 2021). Además, permiten la correcta difusión de sustrato e inhibidores, junto con un microambiente favorable para los biocatalizadores (Alacid et al. 2023).

Por otro lado, los hidrogeles presentan una serie de limitaciones a la hora de albergar enzimas, ya que la presencia de agua no es deseable para el almacenamiento a largo plazo, dado que las enzimas acaban perdiendo su estabilidad por vías de degradación hidrolítica, Además, el medio acuoso tiende a ser más susceptible a la contaminación bacteriana. (Alacid et al. 2023). También pueden existir limitaciones en la transferencia de masas, lo que puede provocar que las enzimas inmovilizadas en hidrogeles experimenten una disminución en su actividad enzimática.

Los hidrogeles con enzimas inmovilizadas pueden usarse en varias áreas de interés, como en la producción de compuestos químicos, el desarrollo de biosensores, el tratamiento de aguas residuales o en tratamientos médicos. Este último mencionado ha tenido gran interés, usándose hidrogeles para la producción de fármacos de liberación controlada o como andamios para la ingeniería de tejidos (Gangadevi et al. 2020).

### **2.1.1. Hidrogeles orgánicos sintéticos**

Los compuestos que se utilizan en la fabricación de hidrogeles orgánicos pueden ser naturales (agarosa, alginato, quitosano, colágeno), sintéticos (poliacrilamida, polietilenglicol, polihidroxietilmetacrilato) o una combinación de ambos. De unos años a esta parte, los hidrogeles basados en compuestos sintéticos han ganado gran popularidad por sus características mejoradas de biocompatibilidad, longevidad y resistencia.

A su vez, según la naturaleza de las uniones de entrecruzamiento, los hidrogeles se pueden clasificar en hidrogeles físicos (interacciones no covalentes) y químicos (fuerzas de unión permanente, a través de enlaces covalentes). Estos últimos, también conocidos como hidrogeles químicamente reticulados, presentan mejores propiedades mecánicas y una mayor estabilidad que los hidrogeles físicos, además de ser más robustos y tener mayor capacidad de hincharse sin que sus enlaces se rompan. Otra de sus características es que pueden deshidratarse hasta formar xerogeles, y volver a hincharse sin perder, en muchos casos sus propiedades iniciales.

Entre los hidrogeles químicamente reticulados y de naturaleza sintética con mayor capacidad de experimentar ciclos de hinchamiento y secado destacan los basados en acrilatos y acrilamida. Estos hidrogeles son mecánicamente robustos y flexibles, además son biocompatibles, no son tóxicos, cancerígenos o alergénicos y son antimutagénicos y resistentes a la degradación microbiana (Gangadevi et al. 2020). Estos hidrogeles se fabrican generalmente por

polimerización radicalaria a partir de monómeros como la acrilamida, ácido acrílico o derivados de estos, junto con un agente entrecruzante, que también puede ser un derivado de acrilamida, como la N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) y un termo o fotoiniciador.

### **2.1.2. Inmovilización de enzimas en hidrogeles basados en acrilatos y acrilamida.**

Este tipo de hidrogeles se ha utilizado en numerosas ocasiones para inmovilizar enzimas, ya que además de ser biocompatibles, pueden hincharse fácilmente en presencia de una disolución acuosa que contenga la enzima, atrapándola en su interior y, a su vez, pueden ser secados sin que la capa de hidratación que rodea la enzima se vea afectada. En el presente trabajo se va a emplear este material como una de las posibles opciones para inmovilizar la enzima fosfatasa alcalina (ALP). En concreto se va a fabricar el hidrogel AETA-MBA utilizando como precursor el monómero catiónico cloruro de [2-(acrilóiloxi)etil]trimetilamonio (AETA) y como agente entrecruzante la MBA. La combinación de ambos en presencia de un fotoiniciador (LiTPO), en solución acuosa, provoca una reacción de polimerización en cadena que da lugar a la formación del hidrogel AETA-MBA, proceso descrito en Alacid et al. 2023.

## **2.2. Hidrogeles inorgánicos**

Los materiales inorgánicos son materiales 3D hechos de polímeros inorgánicos que pueden absorber y retener grandes cantidades de agua. Están formados a partir de silicatos, fosfatos y otros materiales no carbonatados. El método Sol-Gel es una técnica ampliamente utilizada para su fabricación y consiste en la producción de materiales de vidrio o de cerámica a través de la hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos adecuados. El proceso implica el paso de una solución (sol) a una red sólida (gel), lo que permite la creación de materiales con estructuras y características controladas. Estos materiales presentan sus ventajas y desventajas y aunque se conocen desde hace décadas, se siguen estudiando para poder ampliar sus usos y mejorar la eficiencia de los productos. Esto se refleja en múltiples estudios que exploran las aplicaciones de estos materiales, como biosensores, tratamiento de aguas, biomedicina, etc. (Tseng et al. 2010)

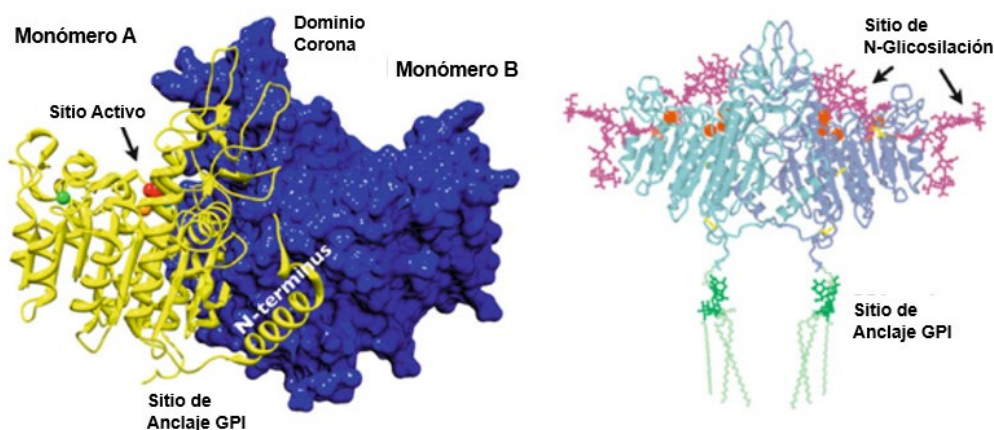
Los hidrogeles inorgánicos basados en sílice formados a partir de este método son económicos, sencillos de realizar y versátiles (Tseng et al. 2010). Presentan la mayoría de las ventajas asociadas a los hidrogeles como una gran biocompatibilidad y biodegradabilidad, aunque no tienen capacidad de hinchamiento. Entre sus limitaciones destaca la baja difusión de sustratos y productos, así como su baja flexibilidad y gran fragilidad (Alacid et. al 2022).

Para la preparación de matrices de sílice los precursores alcóxidos más utilizados son el tetrametoxisilano (TMOS) y el tetraetoxisilano (TEOS), los cuales pueden ser hidrolizados y condensados bajo condiciones suaves. El proceso se lleva a cabo en tres etapas conocidas como hidrólisis, condensación y maduración. Las variables que más influyen en las características del material final (textura, tamaño del poro, viscosidad, etc.) son la temperatura, pH, tipo de precursor y catalizador. En concreto, la porosidad de la matriz puede modularse en función de los precursores iniciales. Así, la introducción junto con el TEOS o el TMOS de grupos funcionales orgánicos (amino, fenilo, hidroxilo, etc.) lleva a estructuras con porosidad modulable, denominadas *ormosils*, que fueron definidas en un apartado previo. La versatilidad del método Sol-Gel ha permitido su rápida evolución y su uso en una variedad de aplicaciones, esto se debe a su capacidad para adaptarse a una variedad de formas, como monolitos o películas delgadas, y de aplicaciones, tales como biosensores o recubrimientos especiales (García Sánchez et al. 2003).

En el presente trabajo se van a emplear estos materiales como otra de las posibles opciones para inmovilizar la enzima ALP. Dicha enzima ya ha sido inmovilizada en otras ocasiones utilizando algunas de estas técnicas, sin embargo, no se ha hecho una caracterización en detalle de su estabilidad y actividad, comparando las diferentes alternativas. (Alacid et. al 2022; Alacid et al. 2023; García Sánchez et al. 2003).

### **2.3. Enzima ALP**

La Fosfatasa Alcalina (ALP) es parte de una superfamilia de metaloenzimas estables y económicas, homodimérica que es capaz de catalizar de forma no específica la hidrólisis de fosfoésteres en medios alcalinos (Alacid et al. 2022; Alacid et. al 2023). Es una enzima ampliamente estudiada y que se conoce muy bien su estructura y composición.

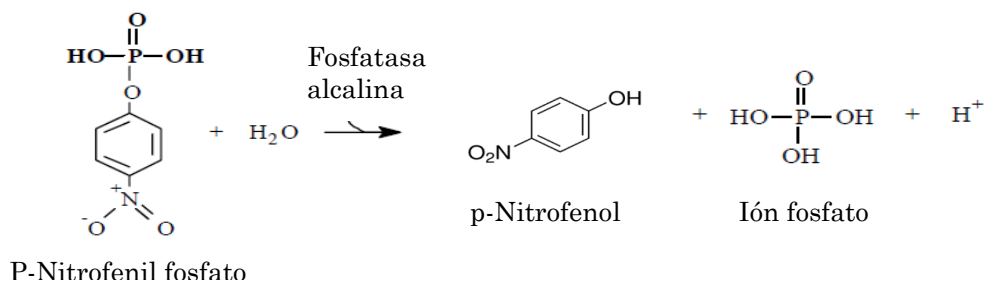


**Figura 2.** Estructura tridimensional del dímero que forma la enzima ALP. El panel izquierdo muestra el monómero A en una representación de cinta y amarillo, y el monómero B en una representación de superficie y azul. La ubicación relativa del sitio activo, el extremo N y el sitio de anclaje GPI también se muestran. El panel derecho representa una estructura modelada de anclaje GPI que se ha adherido a la estructura 3D. Figura extraída de Buchet et al. 2013.

La enzima ALP presenta varias características estructurales destacables, como la presencia de un anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI) para unirse a la membrana plasmática (Figura 2). Consta de dos subunidades similares con 530 residuos de aminoácidos en cada cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 150 KDa. Pero el elemento más relevante es la presencia de iones metálicos de zinc y magnesio en el sitio activo (García Sánchez et al. 2003). Este sitio activo además destaca por su gran flexibilidad y baja selectividad, lo que la convierte en una gran enzima modelo para muchos estudios (Alacid et al. 2022; Buchet et al. 2013). Otro punto destacable es que sus cadenas laterales se encuentran cargadas negativamente a pH alcalino, facilitando su inmovilización en materiales catiónicos gracias a fuerzas electrostáticas (Alacid et al. 2023).

La baja selectividad de su sitio activo hace que la ALP sea una de las pocas enzimas que son sensibles tanto a pesticidas como a metales pesados, lo que la convierte en un buen candidato para biosensores que se basan en la inhibición enzimática (García Sánchez et al. 2003). Esto significa que la ALP se puede usar tanto para la detección directa (de sustrato) como la detección indirecta (de inhibidores), ampliando el rango de usos que esta presenta. En la actualidad existen diversos estudios sobre el uso de la ALP en inmunosensores y biosensores, ya sea mediante detección directa o indirecta (Kahveci et al. 2017; Upadhyay and Verma, 2015).

Para medir su actividad, una de las técnicas más utilizadas es la colorimétrica empleando un sustrato que al ser hidrolizado se transforme en un producto coloreado. Es el caso del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) cuya hidrólisis produce *p*-nitrofenol (PNP) que, en medio alcalino, es de color amarillo y presenta una absorción a 405 nm (Figura 3).



**Figura 3.** Hidrólisis del PNPP catalizada por la ALP

Por lo expuesto anteriormente, la versatilidad, asequibilidad y amplios estudios existentes, se ha seleccionado la enzima ALP como enzima modelo para los presentes estudios sobre inmovilización y almacenamiento de enzimas en soportes 3D.

### 3. Objetivos

El grupo de investigación en el que se ha realizado este TFG ha explorado el uso de diversas metodologías para la inmovilización de enzimas, si bien ya se conocen ventajas y desventajas de cada método surgió la duda de qué método es mejor según las necesidades del experimento. Por ello, el objetivo principal de este trabajo de fin de grado es estudiar las distintas estrategias de inmovilización 3D de la fosfatasa alcalina, utilizando técnicas de espectroscopía de absorción y fluorescencia, para aplicaciones biotecnológicas.

Para cumplir este objetivo se han planteado una serie de objetivos específicos que se muestran a continuación, incluyendo brevemente en cada uno como se pretende abordar:

- Síntesis de hidrogeles orgánicos e inmovilización de la ALP utilizando tres estrategias: *in situ*, *ex situ* y xerogel *ex situ*.
- Síntesis de matrices Sol-Gel y de matrices híbridas orgánico-inorgánicas *Ormosils* modificadas con grupos orgánicos e inmovilización de la ALP.

- Caracterización de la estabilidad térmica de la ALP en distintos medios mediante fluorimetría.

Se determinará la temperatura de desnaturalización a partir de la evolución con la temperatura de los espectros de fluorescencia y se observará el cambio en la termorresistencia de la enzima según el medio donde esté inmovilizada, estableciendo así el rango de temperaturas donde la enzima puede trabajar.

- Determinación de la actividad enzimática de la ALP en distintos medios mediante espectroscopía de absorción.

Se estudiará la actividad catalítica de la enzima en las diferentes estrategias de inmovilización mediante un ensayo colorimétrico y se comparará con los resultados obtenidos en disolución. Se caracterizará la velocidad de reacción y la eficiencia de la enzima en cada medio, propiedades de gran relevancia en la aplicación de la enzima a procesos biotecnológicos.

- Estudios de la capacidad de la ALP de conservar su actividad frente al tiempo en diferentes métodos.

Se realizarán varios estudios de actividad y de estabilidad conformacional a lo largo de un periodo de 6 meses para conocer como varían estos valores transcurrido dicho tiempo. Se determinará que método es más idóneo para el almacenamiento de las enzimas en función de cual permite una mejor conservación de sus propiedades.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Reactivos y Equipos

Enzima fosfatasa alcalina (ALP, E.C. 232-631-4 de mucosa intestinal bovina, polvo liofilizado,  $\geq 10$  unidades DEA  $\text{mg}^{-1}$ , Pm 140 kDa) usada como enzima modelo en los diferentes experimentos; Solución de cloruro de [2-(acrilóiloxi)etil]trimetilamonio (AETA), usada como monómero en la formación de hidrogeles; El N,N'-metileno-bis(acrilamida) (MBA), usado como entrecruzante en la formación de hidrogeles; El fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LiTPO) usado como fotoiniciador en la formación de hidrogeles; P-nitrofenilfosfato (PNPP), usado como sustrato en los ensayos de actividad; Tetraetil ortosilicato (TEOS)( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ), usado en la polimerización de matrices Sol-Gel; Solución HCl 6M para la preparación de los

diferentes materiales; Trioxifenilxilano (TPs)(C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>Si) para la preparación de matrices Sol-Gel modificadas; Se preparó tampón Tris (55 mM, pH 9) mezclando base Tris y ácido clorhídrico con agua dos veces destilada.

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck Life Science, Madrid, España).

En cuanto a los equipos utilizados durante el estudio podemos encontrar: Agitador/Vórtex (Reax top – Heidolph); Lámpara de rayos UV, para la reticulación de los hidrogeles; Equipo Milli-Q (Millipore, Madrid, España); Espectrofluorímetros PTI-QuantaMaster (PTI) y Varian Cary Eclipse, para los estudios conformacionales de la enzima; Espectrofotómetro Shimadzu UV-2700 (Shimadzu), para los estudios de actividad enzimática; pHmetro (CRISON, Basic 20+); Rotavapor (BÜCHI, R-205), para la formación de las matrices Sol-Gel.

## **4.2. Métodos de preparación y caracterización**

### **4.2.1. Preparación de las disoluciones**

Para la preparación de un stock de Tampón Tris 55mM a pH 9 se preparan previamente dos soluciones: la Solución A es una disolución de Tris base (Pm=121,1g/mol) a una concentración de 0,2M (100mL), mientras que la Solución B es una disolución HCl 0,2M a partir del Stock 6M. Estas disoluciones se mezclan, con una proporción de 62,5mL de Solución A y 6,25mL de la Solución B, la mezcla se enrasa hasta los 250mL usando agua destilada y dos veces desionizada utilizando un equipo Milli-Q. La disolución final se ajusta a un pH 9 usando un pHmetro.

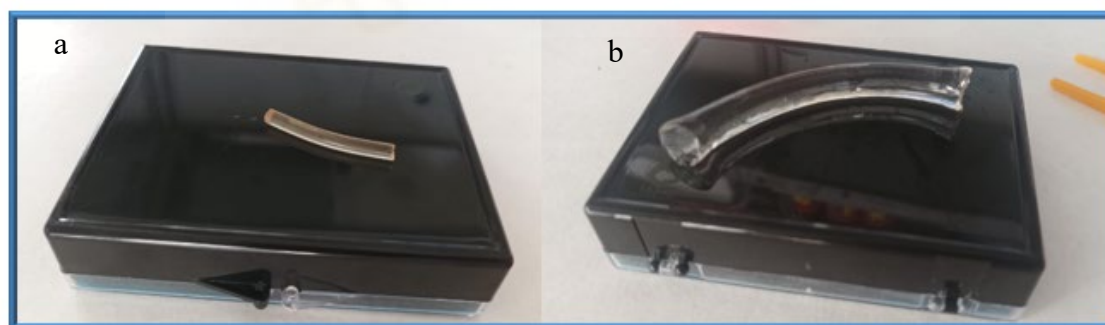
Para la preparación de un Stock de ALP, se pesó la enzima en polvo (Pm = 140000g/mol) y se disolvió en Tampón Tris 55mM pH 9 para obtener una concentración final de 45µM. Este Stock se usará para obtener disoluciones de enzima diluida en función de concentración necesaria.

Para la preparación de la disolución de sustrato de PNPP hay que tener en cuenta que es un compuesto que reacciona con la luz y se transforma de forma lenta pero espontánea en PNP. Por ello hay que preparar soluciones Stock de PNPP 2mM de forma regular. Para ello pesamos una pequeña cantidad de PNPP (Pm 371,14g/mol) que se disolverá en Tampón Tris 55mM pH 9.



#### 4.2.2. Fabricación de los hidrogeles orgánicos

Se ha sintetizado un hidrogel catiónico mediante la polimerización radicalaria del monómero catiónico AETA y el entrecruzante MBA siguiendo el protocolo descrito en Alacid et al. 2023. Dado que el precursor comercial AETA presenta como impureza la hidroquinona, utilizada como estabilizante, antes de iniciar la síntesis del hidrogel fue necesario eliminarla debido a que presenta fluorescencia y puede interferir en las medidas. Para ello, primero se mezcló 1,5 ml de AETA con 1,5 ml de cloroformo para eliminar esta impureza. Se espera hasta que las dos fases se separaran, quedando la hidroquinona en la fase orgánica. A continuación, se retiran 1,132 ml de AETA y se mezclan con 1 ml de agua Milli-Q. Después de agitar durante unos minutos se agregan 2 mg de MBA, luego se agita antes de agregar 4 mg del fotoiniciador (LiTPO). Después de agitar durante un minuto, se toma un mililitro de la mezcla con una jeringa desechable, dejando una pequeña cavidad de aire en el extremo. Finalmente, se coloca durante un minuto bajo una lámpara de rayos UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) para que polimerice. Una vez polimerizado, se retira el hidrogel de la jeringuilla cortando la punta. Antes de poder usarlo, debe pasar por cinco ciclos de lavado y secado consistentes en tres enjuagues con 10 ml de agua Milli-Q, la adición de 5 ml de agua Milli-Q para que absorbiera completamente el hidrogel durante 2-3 horas y un secado posterior en estufa a  $45^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Finalmente se almacenan en estado seco (xerogel) (Figura 4).



**Figura 4.** (a) Imagen de un hidrogel seco (xerogel) y (b) completamente hinchado

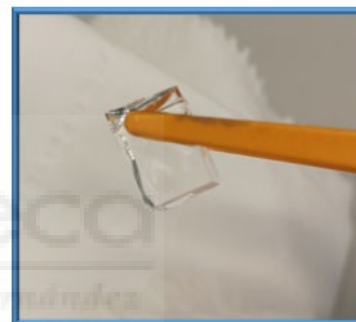
#### 4.2.3. Preparación de matrices Sol-Gel

Para la preparación de las matrices Sol-Gel se ha seguido el protocolo descrito en Kahveci et al. 2017. En un vial de 10mL se añaden 6,69mL de TEOS, 2,16mL de agua destilada y 60 $\mu\text{L}$  de HCL diluido a 0,62M. Luego la mezcla se pone en agitación al menos una hora, hasta que solo se aprecie una sola fase, lo que indica que el TEOS se ha hidrolizado. La hidrólisis transforma los enlaces de etoxisilano en silanol. Esta etapa se produce cuando el oxígeno del agua ataca al

átomo de silicio. Estos procesos pueden llevarse a cabo con o sin catalizador, al igual que la mayoría de los ataques nucleófilos. El ácido clorhídrico es uno de los catalizadores más utilizados.

El siguiente paso es rotar el TEOS hidrolizado para eliminar el etanol, para ello se mezclan en igual volumen TEOS y H<sub>2</sub>O Milli-Q. Se debe perder 0,62g por cada mL de TEOS, y como se usan 2mL de cada, se deben eliminar 1,24g. Al colocar la mezcla en el rotavapor se introduce en un baño de agua a 65°C, se deja que se alcance el vacío y se deja rotando alrededor de 8 minutos. Luego se va eliminando el vacío poco a poco para evitar una pérdida de TEOS junto con el etanol. Al final, si se han eliminado más de los 1,24g necesarios, se añade la diferencia en agua, siempre que la diferencia no sea muy grande, en cuyo caso se deberá repetir el proceso.

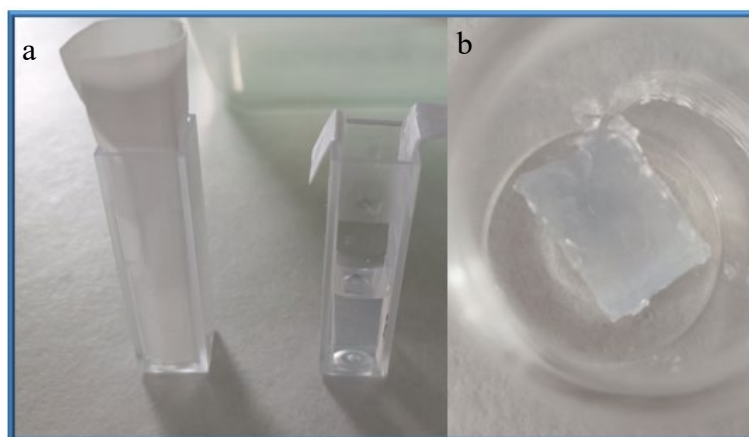
Tras la eliminación del etanol, el producto resultante comienza a condensarse, proceso donde los grupos SiOH se combinan para producir un óxido de silicio (Si–O–Si). La formación de partículas sol es el resultado de estas reacciones que ocurren en áreas separadas. La policondensación sigue ocurriendo lo que provoca el entrecruzamiento de partículas y finalmente producirá un gel poroso. Las matrices resultantes se almacenan hidratadas en Tampón Tris en nevera a 4°C para su posterior uso (Figura 5).



**Figura 5.** Imagen de un monolito Sol-Gel.

#### 4.2.3.1. Preparación de matrices *Ormosils*

Las matrices híbridas orgánico-inorgánicas conocidas como *ormosils* preparadas en este trabajo siguieron un protocolo paralelo a la preparación de matrices Sol-Gel. En este caso la mezcla a hidrolizar se compone de 6mL de TEOS modificado con grupos orgánicos y 6mL de una solución HCl 0,01M. La porción de TEOS se compone en una mezcla de 5,46mL de TEOS y 0,54mL de Trietoxifenilsilano, lo que significa un porcentaje final del 10% de grupos orgánicos. Los monolitos formados por este método se gelifican en poco tiempo y se adhieren fuertemente a las paredes del recipiente, lo que dificulta desmoldar la matriz. Por esto se deben recubrir las paredes con tiras de teflón para facilitar la extracción del material, el cual tienen un aspecto más turbio que el obtenido utilizando únicamente TEOS como precursor (Figura 6).



**Figura 6.** (a) Matrices *ormosils* antes y (b) después de desmoldarse. La imagen a) muestra cómo hay que preparar la cubeta previamente a la gelificación para facilitar el posterior desmolde.

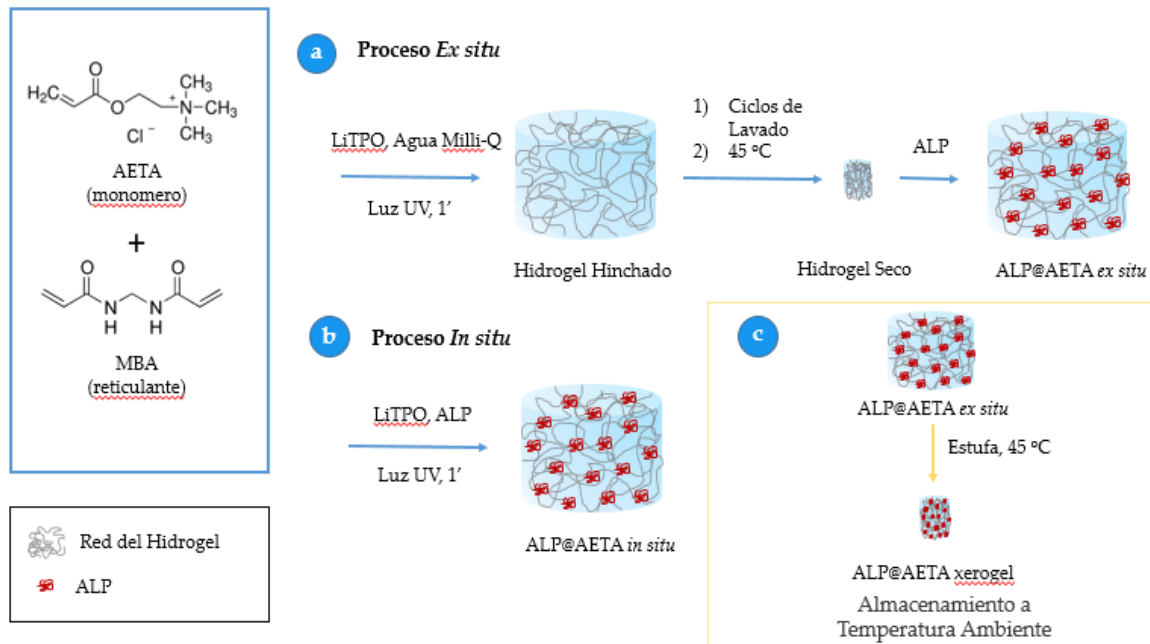
#### 4.2.4. Inmovilización de la enzima ALP en matrices 3D

##### 4.2.4.1. Inmovilización de la ALP en hidrogeles orgánicos

En el presente trabajo se han seguido tres estrategias distintas para la inmovilización de la ALP en hidrogeles orgánicos. Estas son la incorporación de la enzima en hidrogeles de forma *in situ*, en hidrogeles de forma *ex situ* y en xerogeles de forma *ex situ* (Figura 7). En las tres estrategias el método de formación del hidrogel es el descrito en el punto 4.2.2., pero difieren en el momento y forma de introducir la enzima. La enzima ALP, que está cargada negativamente a pH 9, se fijará en el interior de los hidrogeles catiónicos gracias a interacciones electrostáticas (Alacid et al. 2023).

- Hidrogeles *in situ*: En esta estrategia la ALP se introduce durante la formación del hidrogel. Se mezcla una disolución de ALP con el precursor AETA, tras la eliminación de la hidroquinona, y previo a la adición de MBA y LiTPO. De esta manera, tras la polimerización se obtiene un hidrogel con la enzima inmovilizada (Figura 7b)
- Hidrogeles *ex situ*: En esta estrategia, la porción seca de hidrogel polimerizado se corta en trozos de 0,07g. Cada trozo se incorporará a una cubeta de plástico con 0,9mL de ALP 6 $\mu$ M previamente preparada para prehincharlo. Tras un día, la enzima se encuentra completamente atrapada en el interior del hidrogel (Figura 7a)
- Xerogeles *ex situ*: En esta estrategia también partimos de un hidrogel previamente preparado, el cual se prehinchará con 1mL de ALP 6 $\mu$ M por cada 0,07g de hidrogel. Se

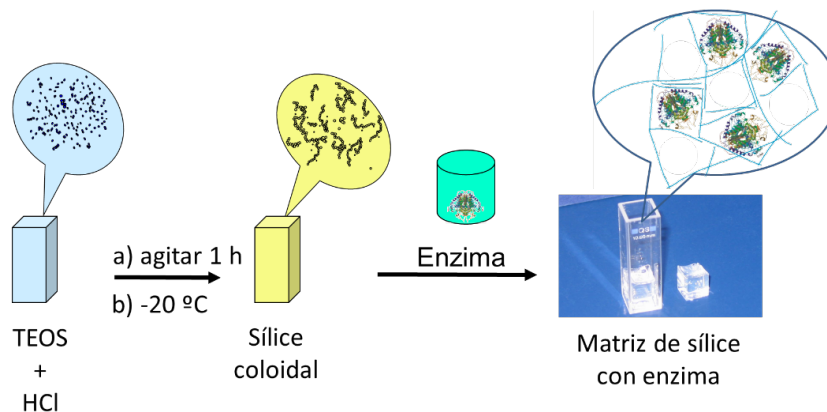
deja durante 2 horas para que se hinche, tras este tiempo se introduce en una estufa para secarlo y convertirlo en un xerogel con la enzima en su interior (Figura 7c)



**Figura 7.** Inmovilización y almacenamiento de ALP en hidrogeles mediante metodología a) *ex situ*, b) *in situ* y c) xerogel *ex situ*

#### 4.2.4.2. Inmovilización de la ALP en matrices Sol-Gel

Para poder formar matrices Sol-Gel con la ALP atrapada en su interior, se mezclan 700 $\mu\text{L}$  de TEOS rotado y 700 $\mu\text{L}$  de disolución de ALP 12 $\mu\text{M}$  en cubetas de plástico, de esta manera el proceso de condensación y maduración se realiza con la enzima en su interior (Figura 8). En el caso de las matrices *ormosils* se mezclan 700 $\mu\text{L}$  de TEOS modificado con grupos fenilo y rotado con 700 $\mu\text{L}$  de disolución de ALP 12 $\mu\text{M}$  en cubetas de plástico, de la misma forma que con las matrices Sol-Gel.



**Figura 8.** Inmovilización de ALP en matrices Sol-Gel

#### 4.2.5. Ensayos de actividad enzimática

En todos los experimentos, la actividad enzimática se midió mediante un método colorimétrico, estudiando la cinética de transformación del PNPP a PNP catalizada por la enzima ALP a temperatura ambiente, proceso ya usado anteriormente en este laboratorio y descrito en la figura 3 del apartado 2.3 (Alacid et al. 2023). El PNP es un compuesto coloreado y que muestra su máximo de absorbancia en torno a los 405nm en medio alcalino. Para la medición se utilizó un espectrofotómetro UV-2700 Shimadzu y cubetas de cuarzo de 1cm x 1cm.

Los primeros ensayos de actividad se realizaron con la enzima ALP en disolución, ensayos que más adelante se usarán como referencia para comparar los distintos métodos de inmovilización. La reacción se realiza en un volumen de 1,8mL (ALP 1 $\mu$ M + PNPP 50 $\mu$ M + Tris). Primero se calcula el volumen necesario de solución PNPP 2mM para obtener una disolución final con concentración 50 $\mu$ M. A continuación, se calcula el volumen de ALP 45 $\mu$ M necesario para que la disolución final tenga concentración 1 $\mu$ M.

A la hora de medir en el espectrofotómetro, se usa un programa para obtener los espectros y se establece un rango de 250-450nm, a una velocidad media y nm a nm. Primero se establece la línea base y para ello se usan dos cubetas con 1800 $\mu$ L de Tampón Tris pH 9. Luego se cambia una de las cubetas por otra a la que se le añaden 39 $\mu$ L de la enzima ALP y se realiza un espectro que será usado como t=0. Posteriormente, se mide la cinética de la ALP en disolución, para lo que se pasa el programa a su modo cinética. Las condiciones usadas son: modo manual, durante 600 segundos y que tome medidas cada 0,2 minutos (51 medidas). La cinética se realiza a 405nm. Finalmente se añaden 45 $\mu$ L de PNPP 2mM a la disolución y se da inicio a la cinética. Al terminar se vuelve a realizar un espectro para ver el PNP formado.

Los ensayos de actividad de la enzima inmovilizada en hidrogeles siguen un protocolo similar. Esta estrategia es la misma para hidrogeles *in situ* y *ex situ*, y muy similar para xerogeles. La única diferencia es que el xerogel debe cortarse (0,07g) y prehincharse con Tampón Tris el día anterior a la medición. Antes de comenzar calculamos el volumen de sustrato 2mM para que la concentración final sea 50 $\mu$ M, para ello establecemos como volumen final 1,8mL, teniendo en cuenta que el hidrogel/xerogel ya está prehinchado con 0,9mL.

El proceso a partir de aquí sigue los siguientes pasos:

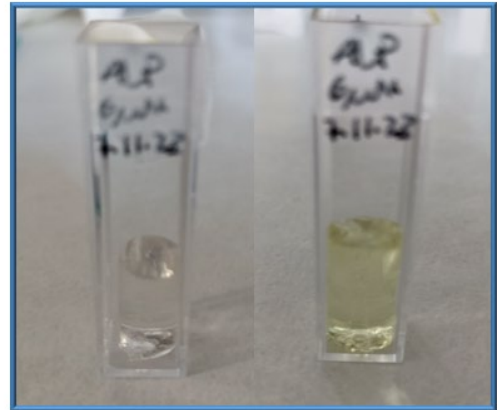
1. Se extrae el hidrogel/xerogel y se mete en una cubeta de cuarzo, se introduce en el espectrofotómetro y se realiza el primer espectro.

2. Se añaden los 855 $\mu$ L de Tampón Tris a la cubeta y se realiza un segundo espectro, que será considerado espectro a  $t=0$ .

3. El programa se establece en cinética y se especifica en modo manual y que tome medidas cada 0,2 minutos hasta 90 minutos.

4. Se añaden los 45 $\mu$ L de PNPP 2mM (concentración final de 50 $\mu$ M) y comenzamos la cinética inmediatamente, ya que en el momento de añadir el sustrato comienza la fase exponencial de la reacción (Figura 9).

5. Al terminar la cinética se registra un último espectro.



**Figura 9.** Ejemplo del cambio de color producido en un hidrogel con la ALP inmovilizada tras ensayo colorimétrico.

Finalmente, en las matrices Sol-Gel el proceso cambia un poco, ya que debido a las características físicas del monolito no se puede meter directamente en la cubeta de cuarzo. En su lugar se realizarán espectros del sobrenadante cada cinco minutos durante 1 hora tras la incorporación del sustrato. Para este procedimiento se preparan 5mL de una disolución de sustrato a 50 $\mu$ M a partir de la solución Stock de PNPP. Realizamos un espectro de esta disolución, especificando un rango de 250-450nm, a velocidad media y nm a nm. Este será el  $t=0$ . Luego el monolito preparado con ALP inmovilizada se desmolda y se sumerge en la solución de sustrato (Figura 10). A partir de este momento se realizan espectros de la solución cada 5 minutos durante 1 hora. Tomando los resultados de cada espectro a 405nm se puede representar la cinética de forma similar a la obtenida con los otros medios.

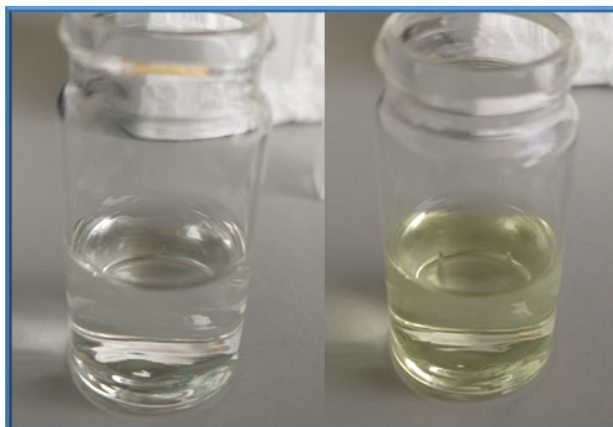


Figura 10. Ejemplo del cambio de color producido en una disolución de PNPP tras introducir un monolito Sol-Gel con ALP inmovilizada durante un ensayo colorimétrico.

#### 4.2.6. Estudios conformacionales y de estabilidad térmica

Para los estudios de estabilidad conformacional de la enzima se utilizó espectroscopía de fluorescencia. Gracias a la presencia de residuos de triptófano en la estructura de la enzima ALP, esta tiene fluorescencia intrínseca y su intensidad se puede asociar con su estado conformacional (Alacid et al. 2023; Royer, 2006). En prácticamente todos los casos se utilizó un espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster (PTI), que tiene un peltier integrado. Para el estudio conformacional se realizaron espectros de emisión desde 300 hasta 450 nm utilizando 290 nm como longitud de onda de excitación, además estos espectros se realizaron a distintas temperaturas, provocando la desnaturalización y posterior renaturalización de la enzima, en el caso del que proceso sea reversible. En la última etapa de la realización del TFG el espectrofluorímetro PTI-QuantaMaster se estropeó. Por ello, las últimas curvas de desnaturalización correspondientes a la enzima inmovilizada en el xerogel *ex situ* y su comparación con la disolución se realizaron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse.

El proceso usado para estas medidas fue descrito en Alacid et al. 2023. La intensidad de fluorescencia de los blancos se comprobó y se restó de las muestras. Para los experimentos sobre la desnaturalización térmica, se utilizaron velocidades de calentamiento de 5°C por minuto y tiempos de estabilización de 30 segundos para cada temperatura, aumentando desde los 16°C hasta los 92°C, para luego bajar hasta los 26°C (Alacid et al. 2023). Además, para calcular la  $T_m$  de la enzima se usó la primera derivada de la curva de desnaturalización.

Esta estrategia se puede aplicar a todas las técnicas de inmovilización empleadas en el presente estudio. Las únicas diferencias que se pueden mencionar se encuentran en la introducción del

soporte en la cubeta de cuarzo, previo a la introducción de la misma en el espectrofluorímetro. Mientras que los monolitos de Sol-Gel y los hidrogeles se pueden desmoldar y pasar directamente a la cubeta, los xerogeles deben prehincharse el día anterior con 1,8mL de Tampón Tris 55mM pH 9.

## **5. Resultados y Discusión**

En este TFG se ha optado por discutir los resultados experimentales al mismo tiempo que se presentan, en vez de hacer dos apartados separados, al considerar que de esta manera se facilita el seguimiento del trabajo.

### **5.1. Estudio de la estabilidad conformacional**

La ALP tiene 4 residuos de triptófano por monómero, la mayoría localizados en regiones hidrofóbicas de la proteína (Bortolato et al. 1999). La fluorescencia intrínseca de la ALP, procedente principalmente de estos residuos de triptófano, se utilizó para evaluar la idoneidad de los procesos de inmovilización. Esta herramienta se utiliza a menudo para monitorizar alteraciones estructurales de proteínas, dada la alta sensibilidad de la fluorescencia del triptófano a la polaridad del microambiente local, por tanto, a los cambios en el entorno implicados en el plegamiento/desplegamiento de proteínas. (Royer, 2006). En el estado nativo plegado, los residuos de triptófano se encuentran generalmente en el interior de la estructura de la proteína, mientras que, en un estado parcialmente plegado o desplegado, están expuestos al disolvente, lo que da lugar a un desplazamiento hacia el rojo de los espectros de emisión. El desplegamiento de la proteína también provoca un ensanchamiento de los espectros, ya que una mayor variedad en el entorno local de los fluoróforos da lugar a diversos desplazamientos en las longitudes de onda de emisión.

Además de para evaluar la idoneidad de los procesos de inmovilización, la fluorescencia intrínseca se utilizó para hacer un seguimiento de la estabilidad térmica en los distintos medios, para lo cual se recogieron los espectros de emisión a diferentes temperaturas. Para representar la estabilidad térmica de la enzima se tomó la relación entre las intensidades de fluorescencia recogidas a 335nm y 375nm y se representó frente a la temperatura. Como un valor representativo de la estabilidad térmica se determinó la temperatura de desnaturalización de la enzima ( $T_m$ ), valor que se obtiene a partir de la primera derivada de la curva anterior. Finalmente, tras la desnaturalización de la enzima se redujo la temperatura hasta los 26°C y se

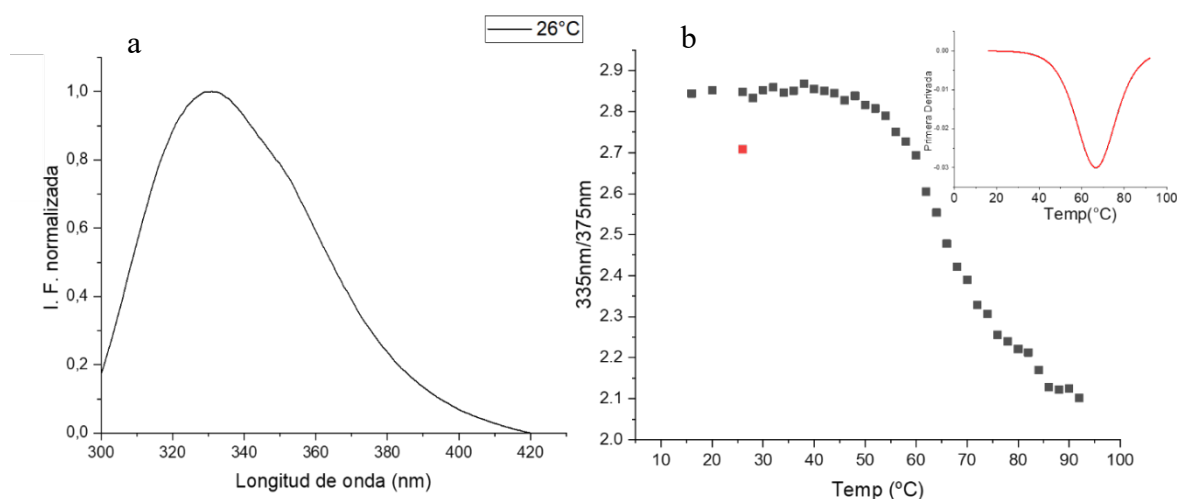


medió de nuevo la relación entre ambas intensidades (335nm/375nm). Este valor nos da una idea de la capacidad de la enzima para renaturalizarse.

### 5.1.1. Estabilidad de la enzima en Disolución

En primer lugar, se recogieron los espectros de fluorescencia y se exploró la estabilidad térmica de la enzima en disolución, para luego poder comparar estos resultados con los obtenidos en los diferentes medios. La Figura 11a muestra el espectro de emisión de la ALP en tampón Tris 55 mM a temperatura ambiente. En dicho espectro se puede apreciar un pico de emisión en torno a los 330 nm característico de la proteína en su estado nativo (triptófanos en entorno hidrofóbico).

En la Figura 11b se muestra la representación del cociente entre las intensidades de emisión a 335nm y 375nm frente a la temperatura y así podemos hacer un seguimiento del desplegamiento térmico de la enzima en disolución. Se observa que la conformación de la enzima se mantiene hasta aproximadamente 50°C y a partir de esta temperatura hay una disminución de la señal más o menos cooperativa, que correspondería a una desnaturalización sin intermedios como ya se había reportado en otros artículos para esta misma enzima (Alacid et al. 2023). Mediante el cálculo de la primera derivada se obtuvo una temperatura de desnaturalización de 67°C (Inset Figura 11b).

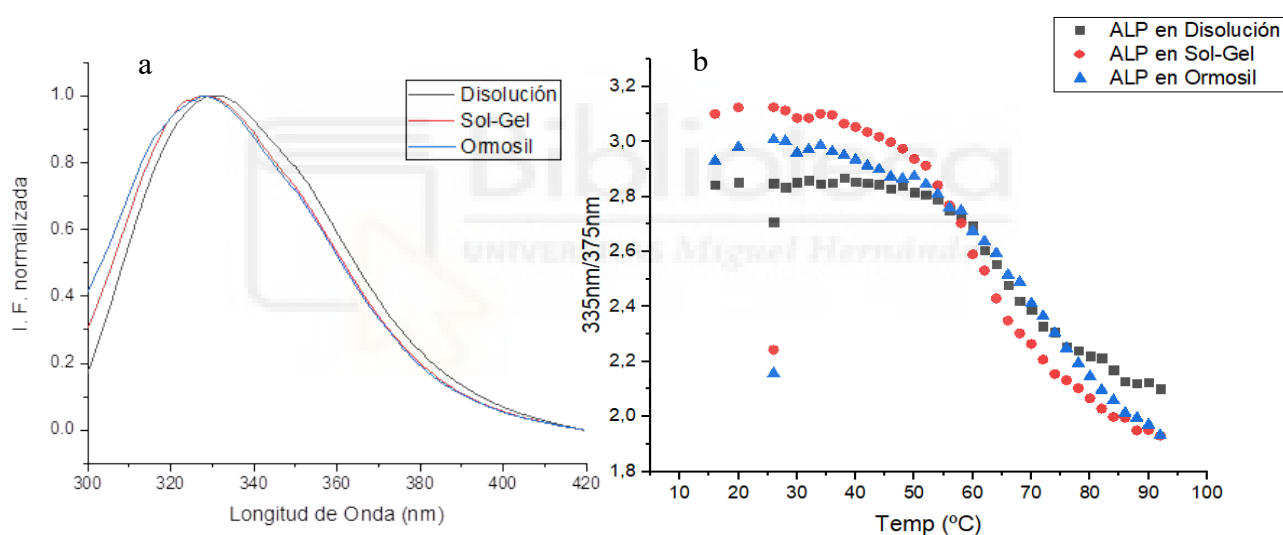


**Figura 11.** (a) Espectro normalizado de emisión de fluorescencia de la ALP en tampón Tris a temperatura ambiente. (b) Relación entre las intensidades de emisión de la ALP a 335nm y 375nm frente a la temperatura. El punto rojo se corresponde con la señal obtenida al volver la temperatura a 26°C. Inseto: Primera derivada.

Tras realizar el barrido de temperaturas se volvió a 26°C, donde se observó que la proteína no se repliega completamente, aunque sí recupera la mayor parte de su conformación original.

### 5.1.2. Estabilidad de la enzima en matrices Sol-Gel

La ALP se inmovilizó en matrices Sol-Gel como se describe en Materiales y Métodos. Tras su inmovilización se recogió el espectro de fluorescencia con el fin de confirmar que durante el proceso de inmovilización la proteína no se había desnaturalizado. Para ello se comparó este espectro con el obtenido en disolución observando un pequeño desplazamiento hacia el azul (Figura 12a). Esto quiere decir que la enzima se encuentra en un entorno más hidrofóbico o ligeramente más compactada pero que no se ha desnaturalizado, al no desplazarse al rojo. Todo ello nos indica que se ha llevado a cabo una correcta inmovilización.



**Figura 12.** (a) Espectros normalizados de emisión de fluorescencia y (b) curvas de desnaturalización de la ALP en disolución (negro), en matrices Sol-Gel (rojo) y en matrices *ormosils* (azul).

Ahora se estudiará la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada al igual que se hizo en disolución. La Figura 12b muestra una ligera desestabilización a partir de 37°C y una temperatura de desnaturalización menor ( $T_m$ ), de alrededor 63°C, lo que muestra una estabilidad más baja frente a la temperatura que la obtenida en disolución.

En la Figura 12b, también se puede observar que, tras terminar el tratamiento térmico y volver a los 26°C, el desplegamiento de la proteína inmovilizada es aún menos reversible que en disolución, al alejarse mucho de la señal inicial. En definitiva, en comparación con la enzima en disolución, la enzima inmovilizada en Sol-Gel es algo más termosensible.

Con objeto de mejorar la estabilidad de la enzima en la matriz Sol-Gel, se fabricaron *ormosils* como se describen en Materiales y Métodos añadiendo al precursor TEOS un 10% de grupos Trioxifenilxilanos (TPs). En principio, este cambio debería mejorar la porosidad de la matriz aumentando el tamaño del poro y probablemente la estabilidad de la enzima.

Una vez inmovilizada en este material, la enzima fue estudiada por los mismos métodos que en el resto de las estrategias. En cuanto al espectro de emisión, este fue idéntico al obtenido en la matriz de TEOS (Figura 12a). Sin embargo, al estudiar la estabilidad térmica se observó un patrón similar, pero con una temperatura de desnaturalización cerca de 71°C mostrando una mejora en su estabilidad incluso con respecto a la encontrada en disolución. Por otro lado, al estudiar la capacidad de recuperación de su estado de plegamiento este siguió siendo irreversible.

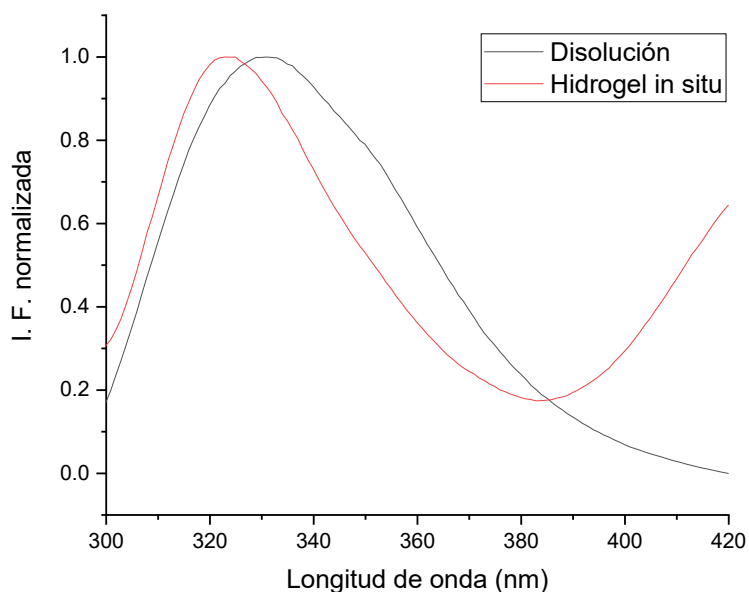
### **5.1.3. Estabilidad de la enzima en Hidrogeles**

Dado que se emplearon tres estrategias distintas para inmovilizar la enzima en los hidrogeles esquematizadas en la Figura 7, se explicará el comportamiento de la enzima en cada uno de ellos por separado.

#### **5.1.3.1. Inmovilización de la ALP *in situ***

El método denominado *in situ* es la estrategia más agresiva de inmovilización al ponerse en contacto la enzima junto a los precursores y el fotoiniciador e iniciarse la polimerización con ella dentro. Una vez inmovilizada la enzima por este método, se obtuvo su espectro de fluorescencia y se comparó con el de la enzima en disolución. Se observó un estrechamiento de la banda, un desplazamiento al azul y un crecimiento de la intensidad de fluorescencia hacia 420 nm, que no pertenece al triptófano (Figura 13). Estos resultados sugieren que de alguna manera la proteína se ve afectada con este procedimiento de inmovilización y que algunos de sus grupos podrían reaccionar durante la polimerización radicalaria, generando especies fluorescentes. Es por ello que no se llevó a cabo el estudio de

estabilidad térmica. Este anormal comportamiento ya fue observado por el grupo de investigación en un estudio anterior (Alacid et al. 2023).

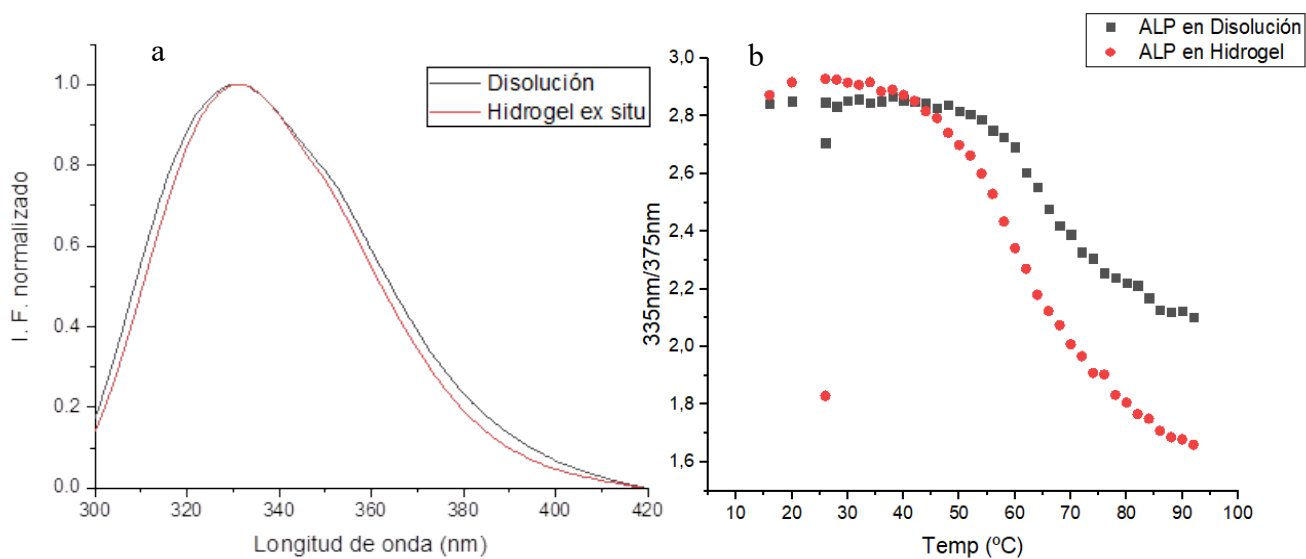


**Figura 13.** Espectros normalizados de emisión de fluorescencia de la ALP en disolución (negro) e inmovilizada en un hidrogel por el método *in situ* (rojo).

### 5.1.3.2. Inmovilización de la ALP *ex situ*

El método *ex situ* es menos agresivo ya que el hidrogel se prepara previamente y se seca y la enzima es absorbida en su interior al rehidratarse. Tras inmovilizar la ALP por este método, se obtuvo su espectro de emisión de fluorescencia y se comparó con el de la enzima en disolución como se muestra en la Figura 14a. En base a estos resultados se puede concluir que la inmovilización por el método *ex situ* es adecuada porque la forma del espectro de fluorescencia de la ALP es muy similar al obtenido en la disolución.

A continuación, se muestra la curva de desnaturalización de la ALP en hidrogel *ex situ* junto con la obtenida en disolución (Figura 14b). Los resultados son similares a los mostrados en Sol-Gel, produciéndose una ligera desestabilización a partir de 40°C y una  $T_m$  de 62,3°C, pero difieren a los obtenidos en disolución presentando esta última una mayor estabilidad. Por otra parte, tras enfriar la muestra, la capacidad de recuperar su estado nativo fue prácticamente nula, lo que puede significar que regiones de la enzima que tras la desnaturalización han quedado expuestas reaccionan electrostáticamente con el soporte impidiendo su replegamiento (Figura 14b).



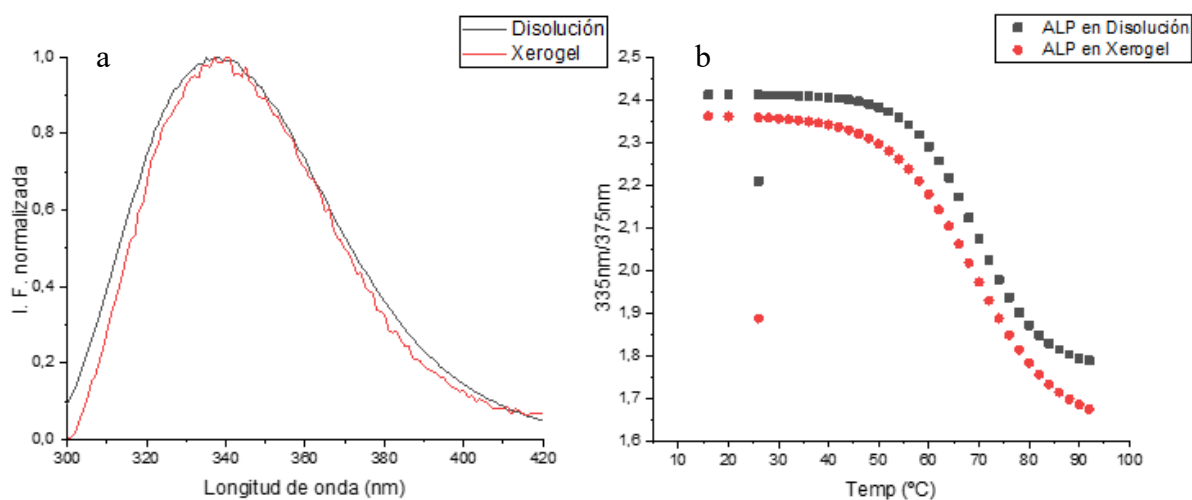
**Figura 14.** (a) Espectros normalizados de emisión de fluorescencia y (b) curvas de desnaturalización de la ALP en disolución (negro) e inmovilizada en un hidrogel *ex situ* (rojo).

### 5.1.3.3. Inmovilización de la ALP en Xerogel *ex situ*

En el método denominado xerogel *ex situ*, se parte de la proteína previamente inmovilizada en el hidrogel de forma *ex situ*, para posteriormente deshidratarlo y almacenarlo en forma de xerogel. Tras rehidratar de nuevo el material se recogió su espectro de fluorescencia y se comparó con el obtenido en disolución. Hay que recordar que estos experimentos se hicieron en otro fluorímetro, por lo que la sensibilidad del detector a las diferentes longitudes de onda de emisión difiere con lo visto anteriormente. La Figura 15a muestra que los espectros fueron similares en ambas muestras confirmando que ha habido una correcta inmovilización de la proteína no habiéndose alterado su conformación a pesar de haberse almacenado en forma deshidratada.

A continuación, se muestra la curva de desnaturalización de la ALP en xerogel *ex situ* junto con la obtenida en disolución (Figura 15b). Los resultados de la ALP en xerogel muestran una curva de desnaturalización cuya forma se asemeja mucho a la curva de la ALP en disolución. No obstante, la pendiente es ligeramente menos pronunciada, resultando en una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) mayor, alcanzando los 69°C, siendo el método más termoestable. Esto significa que la ALP presenta mayor termorresistencia en el interior de hidrogeles secos. Este resultado es similar al obtenido en la inmovilización de la enzima en matrices Sol-Gel fabricadas con *ormosils*. De igual manera que en el hidrogel *ex situ*, tras enfriar la muestra, la

capacidad de recuperar su estado nativo se ve mermada y solo se recupera una pequeña parte de su plegamiento original.



**Figura 15.** (a) Espectros normalizados de emisión de fluorescencia y (b) curvas de desnaturalización de la ALP en disolución (negro) e inmovilizada en xerogel *ex situ* (rojo).

En conclusión, con excepción del método *in situ*, todas las estrategias de inmovilización son apropiadas para el atrapamiento de la ALP, ya que la enzima mantiene a temperatura ambiente su conformación inicial. Los perfiles de desnaturalización son más o menos similares a los observados en disolución, aunque la enzima parece ser menos termorresistente en el hidrogel *ex situ* y en la matriz sol-gel, siendo el xerogel y la matriz *ormosil* donde se observa una mayor temperatura de desnaturalización. Por otro lado, en todas las matrices estudiadas la enzima pierde su capacidad de replegamiento, posiblemente porque al desnaturalizarse las cadenas desplegadas interactúan con las paredes del soporte.

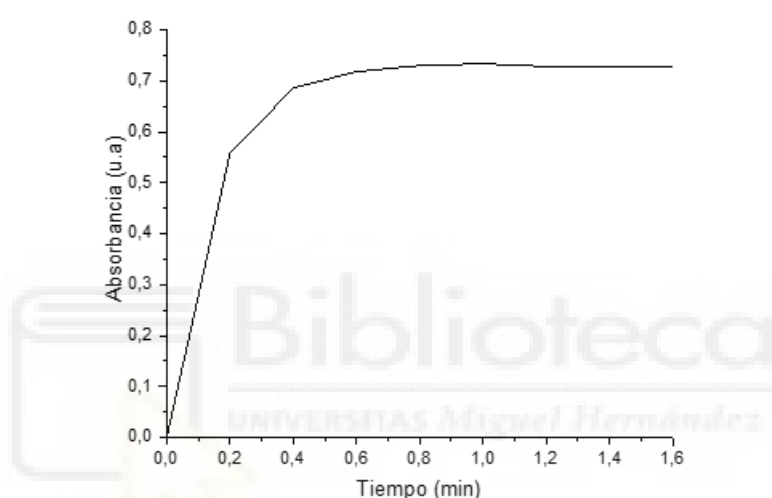
## 5.2. Estudio de la actividad enzimática

Una vez realizados los ensayos de estabilidad conformacional de la ALP en los diferentes medios, se exploró hasta qué punto la inmovilización afectaba a la actividad catalítica de la enzima. Para ello se utilizó un método colorimétrico en el que el PNPP actúa como sustrato de la ALP, hidrolizándose a PNP, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La cinética de formación del PNP se pudo seguir recogiendo los valores de absorbancia en su máximo de absorción (405 nm). A partir de dichas absorbancias se calculó la concentración de PNP usando su coeficiente de extinción molar a dicha longitud de onda ( $18,5\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para

comparar la actividad de la enzima en los diferentes medios se utilizó como parámetro la velocidad inicial, determinada a partir de la pendiente inicial de la curva.

### 5.2.1. Actividad enzimática de la ALP en Disolución

En primer lugar, se realizaron los estudios de actividad de la ALP libre y así los resultados se pudieron comparar posteriormente entre los distintos métodos. A partir de una concentración de proteína  $1,5 \mu\text{M}$  y una concentración de sustrato PNPP  $50 \mu\text{M}$  se siguió el aumento de absorbancia en función del tiempo a una longitud de onda de  $405 \text{ nm}$ , como se ha descrito previamente.

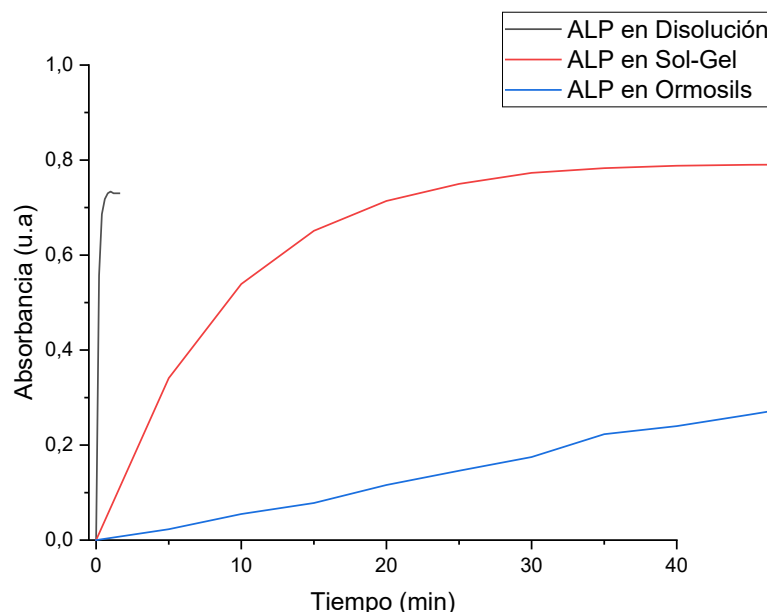


**Figura 16.** Cinética de formación de PNP a partir de la hidrólisis de PNPP  $50 \mu\text{M}$  en presencia de  $1,5 \mu\text{M}$  de ALP en disolución.

En la Figura 16 se puede apreciar que la hidrólisis del PNPP es muy rápida. La cinética alcanza el plató antes de 1 minuto, con una velocidad inicial de  $150 \mu\text{M}/\text{min}$ .

### 5.2.2. Actividad enzimática de la ALP en matrices Sol-Gel

Después de que la ALP fue adecuadamente inmovilizada en la matriz Sol-Gel, se midió la actividad enzimática en presencia de PNPP. En la Figura 17 se observa que la ALP inmovilizada en una matriz Sol-Gel sigue siendo activa, si bien la reacción tarda mucho más en alcanzar su máximo de transformación. Este enlentecimiento de la cinética era predecible debido a las restricciones impuestas en la difusión del sustrato hacia el interior de la matriz. Esta limitación en la difusión ya se ha observado en numerosos estudios (Alacid et al. 2023; Kahveci et al. 2017). La velocidad inicial determinada en este caso fue de  $4,42 \mu\text{M}/\text{min}$ , es decir, 30 veces más lenta de lo observado en disolución.



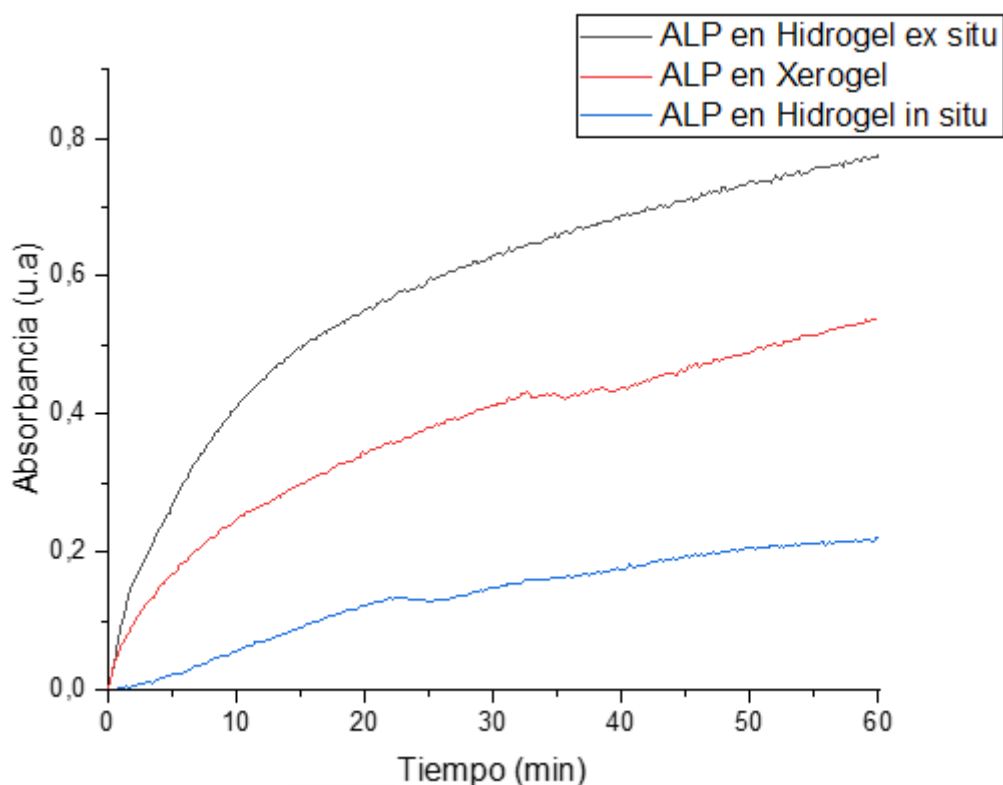
**Figura 17.** Cinéticas de formación del PNP a partir de  $6\mu\text{M}$  de ALP en disolución (negro), matriz Sol-Gel (rojo) y en matriz *ormosil* (azul)

Cuando este estudio se realizó con la ALP inmovilizada en matrices *ormosils* se observó que, si bien en la matriz la enzima se había inmovilizado correctamente, su actividad catalítica decreció enormemente, siendo muchísimo más lenta que en el Sol-Gel convencional. En este caso se obtiene una línea recta, lo que indica una velocidad de formación de PNP constante en los 70 min que duró el experimento, durante los cuales únicamente se transformó un 10% del sustrato (Figura 17). La velocidad inicial determinada en esta ocasión fue de  $0.25\ \mu\text{M}/\text{min}$ , casi 20 veces más lenta que la obtenida en la matriz Sol-Gel.

### 5.2.3. Actividad enzimática de la ALP en Hidrogeles

La cinética de formación de PNP catalizada por la ALP inmovilizada en hidrogeles *ex situ*, *in situ* y en xerogeles *ex situ* fue medida a lo largo de 90 minutos tras añadir el sustrato. Las medidas de absorbancia en los hidrogeles se realizaron a 405nm colocando un hidrogel prehinchado con Tampón Tris dentro de la cubeta y añadiéndole la solución de PNPP que fue completamente absorbida por el hidrogel. Al igual que ocurrió con la enzima inmovilizada en Sol-Gel, los resultados mostraron unas cinéticas lentas, aunque en diferentes grados, debido a las restricciones de difusión impuestas por la red polimérica que limitan el acceso del PNPP al centro activo de la enzima (Figura 18).





**Figura 18.** Cinética de formación de PNP a partir de 6μM de ALP en Hidrogel *ex situ* (negro), en Xerogel (rojo) y en Hidrogel *in situ* (azul).

En el caso del hidrogel *ex situ* se observa un patrón similar al observado en matrices Sol-Gel. En el caso del xerogel *ex situ* se puede apreciar una transformación similar al hidrogel *ex situ* en los primeros minutos, si bien la velocidad se ralentizó posteriormente. Finalmente, el hidrogel *in situ* muestra una velocidad de reacción mucho menor y una baja eficiencia de transformación, esto corrobora los resultados observados en el apartado 5.1.3.1.

Las velocidades iniciales correspondientes a estas tres cinéticas fueron 2,16 μM/min, 1,44 μM/min y 0,027 μM/min, para la ALP en el hidrogel *ex situ*, el xerogel y en el hidrogel *in situ*, respectivamente.

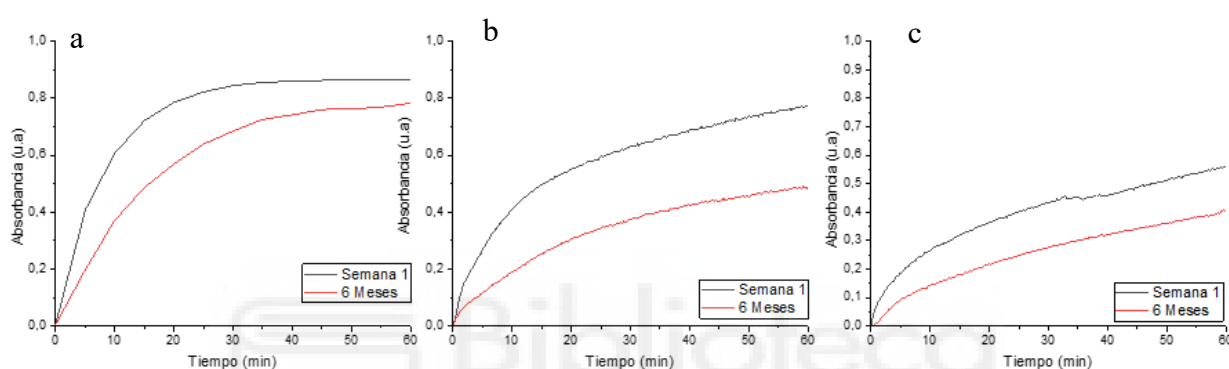
### 5.3. Estudio de Almacenamiento de la Enzima

La capacidad de almacenaje de una enzima es característica determinante en la selección de la estrategia de inmovilización y uso de una enzima. Por ello, los estudios de actividad de los distintos métodos de inmovilización similares a los previamente expuestos se repitieron tras 6 meses para observar la estabilidad de la ALP frente al tiempo. La primera semana se prepararon

los soportes con la ALP inmovilizada y se guardaron en una nevera a 4°C e hidratados con tampón tris 55mM pH 9.

### 5.3.1. Almacenamiento de la ALP en matrices Sol-Gel

Tras 6 meses se realizaron nuevas mediciones de la actividad de la enzima ALP en matrices Sol-Gel. Tras finalizar el periodo del experimento se pudo observar que la actividad de la enzima no solo conserva su capacidad de transformación, sino que mantiene su rendimiento en más de un 90% (Figura 19a).



**Figura 19.** Comparación de las cinéticas de formación de PNP de la enzima ALP inmovilizada en (a) matrices Sol-Gel, (b) hidrogel *ex situ* y (c) xerogel *ex situ* después de 1 semana (negro) y tras 6 meses (rojo) almacenadas a 4°C. Las muestras fueron colocadas en cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico y los valores de absorbancia fueron recogidos en función del tiempo a 405nm.

En todos los ensayos se calculó la temperatura de desnaturalización (Tabla 2) y la velocidad inicial de reacción (Tabla 3). En cuanto a la temperatura de desnaturalización, no se aprecian grandes cambios, por lo que la estabilidad térmica no se ve afectada por el paso del tiempo. Al comparar la velocidad tras una semana y tras seis meses se observa que este valor se ha reducido a menos de la mitad. Aunque como se ha visto en la figura 19a, los valores finales de transformación tras 60 minutos de reacción no difieren en gran medida. Estos hechos muestran que, a pesar de que la velocidad ha disminuido, este método es apto para el almacenamiento de enzimas durante periodos de tiempo relativamente largos.

**Tabla 2.** Temperatura de Desnaturalización de la ALP en disolución y en Sol-Gel en función del tiempo.

	T <sub>m</sub> (°C)
ALP en disolución	66,9
ALP en Sol-Gel Semana 1	62,55
ALP en Sol-Gel 6 meses	61,18

### 5.3.2. Almacenamiento de la ALP en Hidrogeles

Tras 6 meses de inmovilización, la ALP en hidrogel *ex situ* mantiene su capacidad catalítica y muestra una eficacia cercana al 56% de la eficacia original (Figura 19b). Este método es el que muestra una mayor reducción en su eficacia. Además, se observa una evidente bajada de velocidad. En la tabla 3 se puede observar que la velocidad inicial de reacción se reduce casi hasta la mitad.

En el caso de la ALP inmovilizada en xerogeles, los resultados muestran que la actividad enzimática sigue existiendo tras los 6 meses, mostrando un patrón similar al original. También podemos observar una evidente reducción en su eficacia, mostrando unos valores de transformación de alrededor del 72% respecto de los valores originales. En cuanto a la velocidad de reacción, aunque en términos absolutos muestra bajos valores se puede apreciar que la reducción de velocidad es la menos pronunciada (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio de las velocidades de formación iniciales de los métodos de inmovilización de la ALP en diferentes medios.

Velocidad Inicial(μM/min)	Sol-Gel	Hidrogel <i>ex situ</i>	Xerogel
Semana 1	4,42	2,16	1,44
6 Meses	2,15	0,93	1

Durante el estudio se trató de calcular la temperatura de desnaturalización a diferentes tiempos mediante espectrofluorimetría, sin embargo, la presencia de hidroquinona interfirió con los resultados, imposibilitando su cálculo. A pesar de esto, podemos considerar los resultados de Alacid et. 2023 donde se puede comparar la T<sub>m</sub> de la enzima en estos medios tras 1 mes. De esta manera podemos saber que la T<sub>m</sub> de la ALP en hidrogeles *ex situ* no parece variar mientras que la T<sub>m</sub> de la ALP en xerogeles baja alrededor de 2°C.

## 6. Conclusiones y perspectivas futuras

Este trabajo de fin de grado ha permitido examinar de manera sistemática varios métodos de inmovilización de enzimas en materiales 3D, usando como enzima modelo la fosfatasa alcalina (ALP). Los resultados de los diferentes experimentos han permitido cumplir los objetivos perseguidos, esclareciendo las características de cada método evaluado y sus puntos fuertes.

A partir de los espectros de fluorescencia es posible concluir que la enzima ALP se ha inmovilizado de forma correcta, sin perder su conformación inicial en matrices de sílice Sol-Gel convencionales y matrices ormosils. Sin embargo, en la matriz Sol-Gel la enzima es menos estable térmicamente que en el ormosils presentando en este último medio una temperatura de desnaturalización ligeramente más alta que en disolución.

Cuando la enzima se inmovilizó en hidrogeles orgánicos utilizando tres técnicas de inmovilización diferentes: in situ, ex situ y xerogel ex situ, se observó que en el primero de los métodos el espectro de fluorescencia de la enzima estaba alterado. Este resultado sugiere que, la proteína se ve afectada con este procedimiento de inmovilización y que algunos de sus grupos podrían reaccionar durante la polimerización radicalaria, generando nuevas especies.

Las otras dos estrategias de inmovilización (ex situ y xerogel ex situ) son apropiadas para el atrapamiento de la ALP, ya que la enzima mantiene a temperatura ambiente su conformación inicial. Los perfiles de desnaturalización son más o menos similares a los observados en disolución, aunque la enzima parece ser menos termorresistente en el hidrogel ex situ, siendo el xerogel donde se observa una mayor temperatura de desnaturalización.

En todas las matrices estudiadas la enzima pierde su capacidad de replegamiento, posiblemente porque al desnaturalizarse las cadenas desplegadas interaccionan con las paredes del soporte.

Los estudios de actividad enzimática han demostrado que el método de inmovilización afecta la eficiencia y la velocidad de reacción de la ALP. Algunas matrices 3D han demostrado una capacidad superior para mantener la actividad enzimática, destacando las matrices Sol-Gel mostrando una completa transformación en menos de 30 minutos. Por otro lado, los métodos de matrices ormosils e hidrogeles in situ muestran pobres tasas de transformación.

Con respecto a los estudios de almacenamiento de estos sistemas se han comprobado que algunos métodos conservan mejor ciertas propiedades tras un periodo de 6 meses. Por un lado, las matrices Sol-Gel son el método que mejor mantiene la capacidad catalítica de la enzima, mostrando una eficacia del 90% respecto a su capacidad original. Por otro lado, aunque los valores absolutos son menores se puede decir que la ALP en xerogel ex situ conserva mejor su velocidad de reacción. Dependiendo de la aplicación será mejor el almacenamiento en un método u otro.

En conclusión, este estudio proporciona una guía útil para la selección de métodos de inmovilización de enzimas en función de las necesidades particulares de estabilidad, actividad, almacenamiento y reutilización. Los hallazgos no solo amplían el conocimiento sobre las técnicas de inmovilización, sino que también establecen una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en el campo de la biotecnología.

Los próximos objetivos están orientados a, por un lado, optimizar estos métodos de inmovilización con objeto de mejorar la estabilidad y actividad de la enzima y, por otro lado, a estudiar hasta qué punto estos resultados pueden ser extrapolables a otras enzimas.

## 7. Bibliografía

1. Alacid, Y.; Martínez-Tomé, M.J.; Esquembre, R.; Herrero, M.A.; Mateo, C.R. Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2672. [Alacid et al. 2023](#)
2. Alacid, Y.; Quintero Jaime, A.F.; Martínez-Tomé, M.J.; Mateo, C.R.; Montilla, F. Disposable Electrochemical Biosensor Based on the Inhibition of Alkaline Phosphatase Encapsulated in Acrylamide Hydrogels. *Biosensors* 2022, 12, 698. [Alacid et. al 2022](#)
3. Bortolato, M., Besson, F. and Roux, B. (1999), Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins*, 37: 310-318. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19991101\)37:2<310::AID-PROT16>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<310::AID-PROT16>3.0.CO;2-B)
4. Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Phosphatase modulators* 2013; 3: 31-32.

5. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
6. F García Sánchez, A Navas Díaz, M.C Ramos Peinado, C Belledone, Free and sol–gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds, *Analytica Chimica Acta*, Volume 484, Issue 1, 2003, Pages 45-51, ISSN 0003-2670, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00310-6)
7. Friedrich Bialas, Daniela Reichinger, Christian F.W. Becker, Biomimetic and biopolymer-based enzyme encapsulation, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 150, 2021, 109864, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109864>
8. Gangadevi Sennakesavan, Mohammad Mostakhdemin, L.K. Dkhar, Ali Seyfoddin, S.J. Fatihhi, Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review, *Polymer Degradation and Stability*, Volume 180, 2020, 109308, ISSN 0141-3910, [Gangadevi et al. 2020](https://doi.org/10.1016/j.polydegstab.2020.109308)
9. Kahveci, Z., Martínez-Tomé, M. J., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2017). Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene-Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS applied materials & interfaces*, 9(1), 136–144. [Kahveci et al. 2017](https://doi.org/10.1021/acsami.6b10000)
10. Meyer, J., Meyer, L. E., & Kara, S. (2021). Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Engineering in life sciences*, 22(3-4), 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100087>
11. Nguyen, H.H.; Lee, S.H.; Lee, U.J.; Fermin, C.D.; Kim, M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials* 2019, 12, 121. <https://doi.org/10.3390/ma12010121>
12. Rehm, F. B., Chen, S., & Rehm, B. H. (2016). Enzyme Engineering for In Situ Immobilization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1370. <https://doi.org/10.3390/molecules21101370>
13. Royer, C. A. (2006). Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. *Chemical Reviews*, 106(5), 1769-1784. [Royer, 2006](https://doi.org/10.1021/cr050000a)
14. Shen, J.; Zhang, S.; Fang, X.; Salmon, S. Advances in 3D Gel Printing for Enzyme Immobilization. *Gels* 2022, 8, 460. <https://doi.org/10.3390/gels8080460>
15. Singh, R.K.; Tiwari, M.K.; Singh, R.; Lee, J.-K. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 1232-1277. <https://doi.org/10.3390/ijms14011232>

16. Tseng, T. K., Lin, Y. S., Chen, Y. J., & Chu, H. (2010). A review of photocatalysts prepared by sol-gel method for VOCs removal. *International journal of molecular sciences*, 11(6), 2336–2361. <https://doi.org/10.3390/ijms11062336>
17. Upadhyay, L. S., & Verma, N. (2015). Recent advances in phosphate biosensors. *Biotechnology letters*, 37(7), 1335–1345. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1823-3>
18. Xia, H., Li, N., Zhong, X., & Jiang, Y. (2020). Metal-Organic Frameworks: A Potential Platform for Enzyme Immobilization and Related Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 695. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00695>
19. Yilun Weng, Guangze Yang, Yang Li, Letao Xu, Xiaojing Chen, Hao Song, Chun-Xia Zhao, Alginate-based materials for enzyme encapsulation, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 318, 2023, 102957, ISSN 0001-8686, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102957>

