

## Aspectos generales sobre inmovilización de enzimas

---

JULIO C. CASTAÑEDA\*  
LILY MONROY\*  
JOSÉ J. MARTÍNEZ\*  
HUGO A. ROJAS\*  
G. BORDA\*

\* Integrantes Grupo de Catálisis, Escuela de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, GC - UPTC.

## Resumen

Los procesos para inmovilizar enzimas han permitido mejorar, significativamente, la estabilidad y hacer posible el uso de estos biocatalizadores en aplicaciones analíticas como biosensores; médicas e industriales como química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos. Esta revisión presenta los diferentes métodos de inmovilización de enzimas, los efectos sobre las propiedades catalíticas y la aplicación de los biocatalizadores.

**Palabras clave:** inmovilización de enzimas, aplicaciones, efectos.

## Abstract

The processes for immobilizing enzymes have significantly improved stability and allow the use of biocatalysts in analytical applications such as biosensors, medical applications and industrial applications in the chemical, pharmaceutical, food and waste treatment. This review presents different methods of immobilization of enzymes, the effects on the catalytic properties and application of biocatalysts.

**Key words:** enzyme immobilization, applications, effects.

## 1. Enzimas

Como es bien conocido, las enzimas muestran alta especificidad hacia el sustrato; cada enzima actúa sobre un sustrato en particular y lo transforma en un producto determinado. Los sitios de enlace de las enzimas al sustrato son sitios activos, los cuales están formados por los grupos R de 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos o por un cofactor enzimático, y su especificidad por el sustrato proviene, principalmente, de la conformación estérica entre los aminoácidos participantes. Esa especificidad del complejo sustrato-enzima hace que las enzimas sean consideradas como los catalizadores heterogéneos ideales, en los que se puede simular el mecanismo de su actividad catalítica; sin embargo, su actividad y especificidad se ve opacada debido a las estrechas condiciones de reacción, en particular por cambios de pH, temperatura y concentración de sustrato [1].

Tres factores esenciales deben ser tenidos en cuenta en las enzimas: (I) la velocidad de reacción (actividad catalítica), (II) la extensión de la reacción (constante de equilibrio) y (III) la duración de la actividad (estabilidad) [1] [2]. La importancia de cada factor depende de la aplicación, pero la estabilidad está ligada a costos operacionales y, como tal, es un factor que determina la aplicabilidad del sistema, siendo necesario diferenciar entre estabilidad de almacenaje y estabilidad de operación [3]. La primera hace referencia a condiciones no críticas, mientras la segunda aplica al proceso en sí, siendo posible abordarse desde distintos enfoques; no obstante la inmovilización en soportes poliméricos resulta ser muy atractiva comparada con otras técnicas (ej. enzimas

estables, adición de estabilizantes, modificación química, ingeniería de proteínas) [1] [4].

Las metodologías convencionales de procesos químicos han sido desarrolladas para la producción, separación y determinación analítica de una gran variedad de nuevos productos. Los procesos alternativos más seguros y eficientes con el medio ambiente y de gran ahorro energético están siendo muy utilizados y solicitados [1] [5].

Recientemente, la biotecnología ha tenido un gran avance en el uso de enzimas con aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, alimentarios y farmacéuticos [6], porque éstas presentan características que hacen más apropiados los catalizadores convencionales no biológicos [5] [6]. Entre estas características se encuentran:

- Presentan una gran actividad y eficiencia catalítica [5] [6] [7].
- Muestran una gran especificidad de sustrato, isomería óptica (estereoselectividad) y regioselectividad [5] [6] [7].
- Son muy activas a temperatura ambiente y presión atmosférica [5] [6] [7].

Estas características pueden garantizar que la reacción catalizada no sea afectada por reacciones paralelas, dando como resultado la obtención del producto final requerido, mientras que la obtención de subproductos no deseados se elimina [7]. Esto proporciona un alto rendimiento en la producción, minimizando costos en el proceso y permitiendo que biotecnológicamente sea rentable [6] [7].

Son indiscutibles estas ventajas, pero también se detectan algunos problemas [5] [6] [7] como:

- Alto costo en el aislamiento y purificación de las enzimas.
- La inestabilidad de sus estructuras una vez que son aisladas de su ambiente natural.
- Sensibilidad a las condiciones no óptimas en el proceso.
- Estrecha variación de rangos.
- Trazas de sustancias que pueden actuar como inhibidores.

Además, las enzimas, generalmente, operan en condiciones suaves de temperatura, presión y pH con velocidades de reacción similares a las logradas por catalizadores químicos en condiciones más extremas [3]. Por otra parte, las enzimas, prácticamente, no presentan problemas de eliminación, ya que la mayoría de las proteínas y los péptidos son biodegradables y fáciles de retirar de los sistemas tratados [6] [7]. Este conjunto de características de las enzimas son una ventaja como catalizadores, que han sido estudiados y explotados desde 1960; varios procesos han sido desarrollados con éxito en la industria, por ejemplo, en la producción de algunos productos alimenticios, farmacéuticos y agroquímicos, pero ahora cada vez más a partir de la síntesis química orgánica [1] [7].

## 2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso por el cual se restringe el movimiento de las enzimas; es decir, se confina a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas en los diferentes procesos [6] [9] [10]. Recientemente, se define como la restricción de los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, por unión a un soporte [6] [9] [10].

Las enzimas pueden ser inmovilizadas por una gran variedad de métodos (figura 1), que

pueden ser clasificados ampliamente en: *retención física*, donde existen interacciones débiles entre la enzima y el soporte, y *unión química*, donde se forman enlaces covalentes con la enzima [1] [10].

En la *retención física* se encuentran [16] [12] [16] [17] [21] métodos como:

- Atrapamiento de la enzima en un reactor de membrana
- Adsorción sobre soportes sólidos
- Inclusión o entrapamiento en gel
- Microencapsulación con membranas sólidas y líquidas
- Formación de películas enzimáticas de Langmuir-Blodgett
- Ensamblamiento capa por capa

En la *unión química* se encuentran [6] [12] [16] [17] [21]:

- Unión covalente a soportes sólidos
- Entrecruzamiento con reactivos multifuncionales de bajo peso molecular
- Co-entrecruzamiento con otras sustancias neutras como proteínas

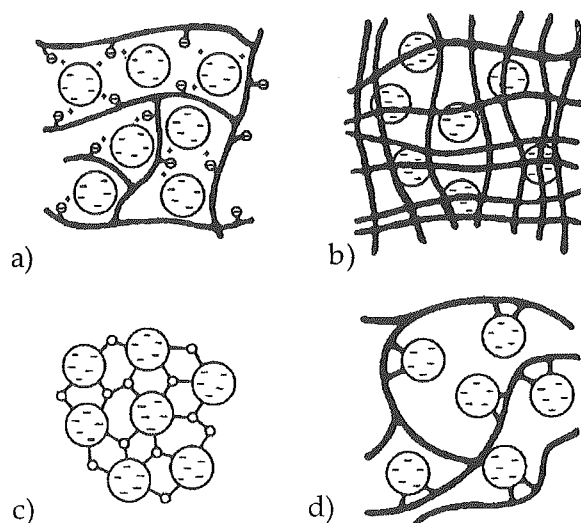


Figura 1. Principales métodos para inmovilizar enzimas. a) Adsorción, b) Atrapamiento, c) Entrecruzamiento, d) Enlace covalente [13] [17].

Se deben tener en cuenta algunas consideraciones para inmovilizar una enzima, así [10] [17]:

- Modo de empleo (continuo o Batch)
- Reutilización
- Disponibilidad y costo de la enzima
- Necesidad de purificación del producto

- Costo del soporte
- Economía del proceso de producción
- Naturaleza del sustrato

A continuación, en la tabla 1, se presenta un resumen de las ventajas y desventajas de los métodos más utilizados para inmovilizar enzimas.

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de métodos de inmovilización [13] [17]

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los centros activos permanecen inalterados</li> <li>• No se requieren reactivos y las etapas de activación son sencillas</li> <li>• Método sencillo y económico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posible desorción de enzimas por cambios en pH, temperatura</li> <li>• Métodos no específicos para cada reacción/enzima</li> </ul>
Enlace covalente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidad de la enzima. No se desliga</li> <li>• Método muy flexible, según se elija el agente portador y método de enlace</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método costoso y complicado</li> <li>• La actividad puede reducirse si los reactivos usados son tóxicos para la enzima</li> <li>• Los centros activos pueden modificarse o dañarse durante el proceso</li> </ul>
Entre-cruzamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima muy estable, fuertemente enlazado</li> <li>• Puede usarse en combinación con la adsorción, para prevenir pérdida de catalizador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede dañar los centros activos</li> <li>• Puede haber problemas difusionales que limiten el rendimiento</li> <li>• Pérdida de la enzima durante preparación</li> </ul>
Membranas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicidad</li> <li>• Posibilidad de uso simultáneo de varias enzimas</li> <li>• Uso de membranas selectivas: control de sustratos/productos en mezclas</li> <li>• Protección de la enzima ante inhibición envenenamiento</li> <li>• No hay pérdidas</li> <li>• Adecuado para sustratos de alto peso molecular, buen contacto enzima-sustrato, altas conversiones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemas difusionales debidos a la membrana</li> <li>• Posible inactivación de enzimas, sometidas a fuerzas de cizalla elevadas</li> <li>• Mal funcionamiento a bajas concentraciones de sustrato (adsorción de este en la membrana)</li> <li>• Estricto control del tiempo de residencia para sustratos de bajo peso molecular</li> </ul>

Por otra parte, con la enzima inmovilizada se deben considerar algunos factores [10] [15] [18]:

- Inactivación térmica por la larga vida media de las enzimas inmovilizadas.
- Vulnerabilidad a niveles bajos de inhibidores irreversibles.
- Contaminación con organismos que ataquen al catalizador, al sustrato o al reactor.

- Mayor control de las enzimas inmovilizadas.
- El proceso de inmovilización debe mantener intacta la estructura de la proteína y no bloquear el sitio activo.
- La unión al soporte debe ser muy estrecha.
- La enzima se debe ligar al soporte por sus grupos periféricos.

En la figura 2 se destaca la selección del método para inmovilizar enzimas, de acuerdo con su naturaleza [10] [15].

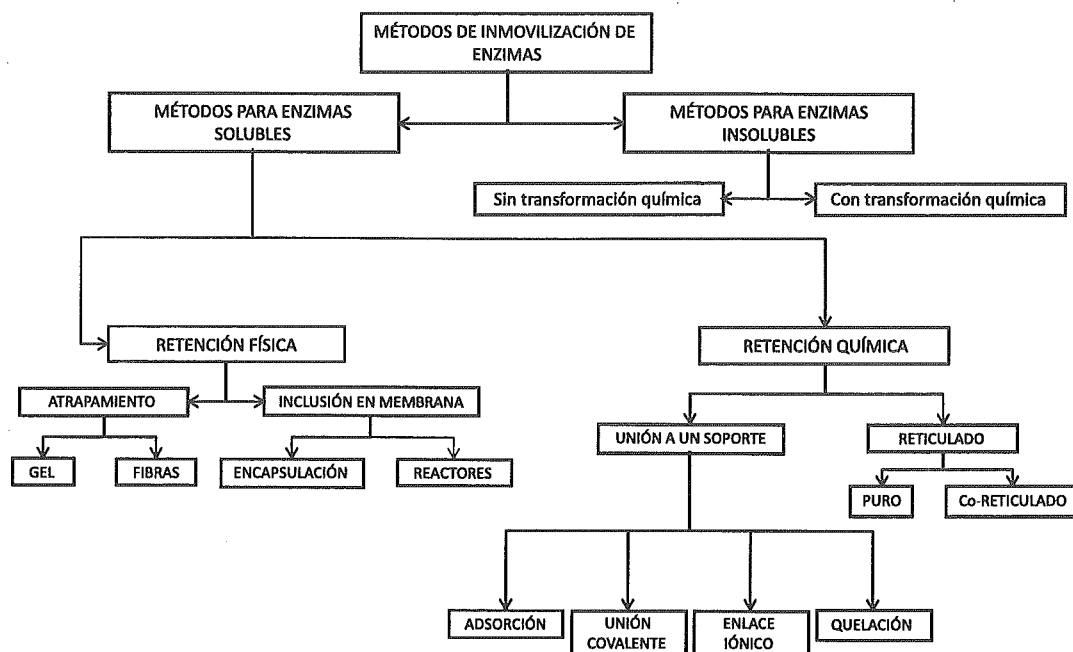


Figura 2. Selección del método para inmovilizar enzimas

Para inmovilizar enzimas se han venido utilizando soportes poliméricos naturales, sintéticos, orgánicos e inorgánicos, pero estos tienen una estabilidad pobre en su estructura; aunque ha existido un gran interés durante largo tiempo en el uso de polímeros orgánicos como soporte para biocatálisis [7] [19] [20]. Estos soportes presentan características, tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad hacia productos inofensivos, no presenta toxicidad, fisiológicamente inerte, hidrofilia, afinidad marcada hacia las proteínas y resistencia mecánica; estas características -biológicas y químicas- hacen de estos unos biomateriales deseados para inmovilizar enzimas, permitiendo que la enzima inmovilizada mantenga relativamente su actividad biológica y estabilidad [19] [20]. Por otra parte, el uso de soportes mejora la velocidad del transporte de la enzima e incrementa el coeficiente de permeabilidad; sin embargo, puede disminuir la capacidad de adsorción de la proteína y la resistencia mecánica del biocatalizador no cambia [22].

Se han inmovilizado algunas enzimas por el método de enlace covalente, utilizando algunos polímeros como: 1-etil-3-(3 propil dimetilamino) carbodiimida clorhidrato [23]; membrana de nylon grafeada con glicidil metacrilato [24], grafeada con ciclohexil metacrilato [25]; polipropileno grafeado con ácido acrílico [26]; gelatina [27]; películas en gel de polidihidroxietil metacrilato [28]; co-acrolein poliestireno [29]; fibras de poliácridonitrilo [30] [31]; polietileno modificado [32] [33]; polipirrol [34]; quitosano [35] [42]; alcoholes poliméricos [43] [44] [45]; acrilamida [46]; caolinita [47]; resinas de intercambio iónico [48]; colágeno [49]. Por el método de adsorción: sílica [50] [52]; titanía [53] [56]; membranas de polianilina [57]; hidroxapatita [58] [59]; vermiculita [60]; alúmina [61]; caolinita [62]. Por el método de encapsulación: alginato [63]; quitosano [64] [65]; nylon [66] [67]; acetato de celulosa [68]; lecitina [69]; carragenina [70]. Por el método de entrapamiento en gel: silicato de sodio por sol-gel [71]; polisiloxano [72] [73]; gel de

poliacrilamida [74]; composites de celulosa-TiO<sub>2</sub> [53] [75]; agar gel [76] [77]; gel de agarosa [78]; fibras de acetato de celulosa-Zr [79].

Además, existe una gran variedad de aditivos como estabilizadores de entrapamiento de proteínas por sol-gel. La adición de osmolitos a las enzimas, durante y después de entrapar, puede tener efectos significativos sobre la estabilidad térmica y sobre la actividad enzimática, por ejemplo, la adición de sorbitol 2,0 M -durante la encapsulación de RNAsa T1 o R- quimotripsina en materiales derivados de TEOS incrementa la estabilidad térmica de las proteínas encapsuladas a 17 °C [80]; estos resultados sugieren que el uso de osmolitos puede ser un buen método para incrementar la estabilidad de las proteínas durante o después del entrapamiento, lo cual puede explicarse debido a la alteración de los efectos de hidratación, como a la interacción proteínas- matriz de silica y cambios en la porosidad de la matriz. Pese a esto, una matriz sol-gel ofrece algunas ventajas para el entrapamiento de biomoléculas y el desarrollo de biosensores; de igual manera, las condiciones de proceso a bajas temperaturas, simplicidad y porosidad controlable hacen de esta metodología una de las más importantes en el desarrollo de matrices adecuadas para el entrapamiento de enzimas [81].

Por otra parte, durante las últimas dos décadas se han hecho considerables esfuerzos en la modificación de materiales renovables que puedan ser usados, entre los que se cuentan: polímeros biodegradables [82], productos de partida de síntesis de alto valor agregado o biocombustibles; entre estos materiales renovables, los polisacáridos son ampliamente estudiados, mostrando qué reacciones de entrecruzamiento proveen de hidrofobicidad a estos materiales, en especial al almidón, y cuáles modificaciones químicas incluyen reacciones de anclaje y sustituciones no degradativas de hidroxilos del almidón o del acetato de celulosa con grupos funcionales como ésteres, éteres, isocianatos y anhídridos [83].

### 3. Aplicaciones de enzimas inmovilizadas

Las enzimas inmovilizadas tienen una gran variedad de aplicaciones industriales, analíticas y médicas [7] [86] [88]. Estos sistemas inmovilizados simplifican los procedimientos químicos, pues reducen el número de etapas en la síntesis, mejorando la pureza de los productos que pueden ser regio-esteroeselectivos, obteniendo así productos con propiedades deseadas [84].

#### 3.1 Aplicaciones industriales

*Farmacéutica.* Trabaja con moléculas lábiles y con moléculas quirales. Las enzimas son unos reactivos quirales estrictos; es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica como fármacos, hormonas o antibióticos [6] [7] [84].

*Alimentaria.* Se utilizan en el procesado, la preparación y la conservación de los alimentos en procesos tales como: hidrólisis de proteínas, hidrólisis de hidratos de carbono en la mejora de las características organolépticas, obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios, interesterificación de aceites y grasas [6] [7] [84].

*Química.* Se utilizan en la obtención de acrilamida, compuesto ampliamente utilizado en la preparación de diferentes polímeros, aditivos y en el tratamiento del petróleo. En la obtención de productos de alto valor agregado, como la síntesis de péptidos, fragancias e insecticidas [6] [7] [84].

*Tratamiento de aguas residuales.* Reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales [89]. El benceno es otro compuesto muy tóxico que puede ser degradado mediante células de pseudomona putida, atrapadas en geles de poliacrilamida [90].

En la tabla 2 se muestran algunas enzimas con aplicaciones industriales.

Tabla 2. Enzimas inmovilizadas utilizadas en aplicaciones industriales [1] [3] [5] [7]

ENZIMA (EC número)	SUSTRATO	PRODUCTO
Glucosa isomerasa (5.3.1.5)	Glucosa	Fructosa (jarabe de maíz)
$\beta$ -Galactosidasa (3.2.1.23)	Lactosa	Glucosa y galactosa (lactosa libre y suero)
Lipasa (3.1.1.3)	Triglicéridos	Sustitutos de manteca de cacao
Nitrilo hidratasa (4.2.1.84)	Acronitrilo 3-Cianopiridina Adiponitrilo	Acrilamida Niconamida 5-Cianovaleramida
Aminoacilasa (3.5.1.14)	D,L-Aminoácidos	L-aminoácido (metionina, alanina, fenilalanina, triptófano, valina)
Rafinasa (3.2.1.22)	Rafinosa	Galactosa y sucrosa (rafinosa libre en solución)
Invertasa (3.2.1.26)	Sucrosa	Mezcla de glucosa y fructosa (azúcar invertido)
Aspartato amonioliasa (4.3.1.1)	Amonio+Acido fumárico	Acido L-aspártico (para fabricar edulcorante aspartamo)
Termolisina (3.4.24.27)	Péptidos	Aspartame
Glucoamilasa (3.2.1.3)	Almidón	D-Glucosa
Papaína (3.4.22.2)	Proteínas	Remueve la "niebla fría" en cervezas
Penicilina amidasa (3.5.1.11)	Penicilinas G y V	Acido 6-aminopenicílico (precursor de la ampicilina)
b-Tirosinasa (4.1.99.2)	Pirocatecol	L-DOPA

Tabla 3. Enzimas inmovilizadas utilizadas en aplicaciones analíticas [3] [7] [88] [91]

ENZIMA (EC número)	SUSTRATO	APLICACIONES
Glucosa oxidasa (1.1.3.4)	Glucosa	Diagnóstico y tratamiento de diabetes. Ciencia de alimentos. biotecnología.
Peroxidasa del rábano picante (1.11.1.7)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inhibición basada en la determinación de iones de metales pesados y pesticidas.
Lactato oxidasa (1.13.12.4)	Lactato	Medicina deportiva, cuidados críticos, ciencia de alimentos, biotecnología.
Tirosinasa (1.14.18.1)	Fenol y polifenoles	Determinación de compuestos fenólicos en alimentos, inhibición basada en la determinación de carbamato en pesticidas.
Glutamato oxidasa (1.4.3.11)	Glutamato	Ciencia de los alimentos, biotecnología.
Ureasa (3.5.1.5)	Urea	Diagnósticos médicos, riñones artificiales, monitoreo ambiental.
Alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1)	Etanol	Ciencia de los alimentos, biotecnología.
Acetilcolinesterasa (3.1.1.7)	Acetilcolina, acetiltiocolina	Inhibición basada en la determinación, organofosforados y carbamato en pesticidas.
Colina oxidasa (1.1.3.17)	Colina	Enzimas usadas en conjunto con acetilcolinesterasa.
Lactato deshidrogenasa (1.1.1.27)	Lactato	Medicina deportiva, cuidado crítico, ciencia de los alimentos, biotecnología.
Colesterol oxidasa (1.1.3.6)	Colesterol	Aplicaciones médicas.
Penicilinas (3.5.2.6)	Penicilina	Aplicaciones farmacéuticas.
Alinasa (4.4.1.4)	Cisteína sulfóxido	Industria de alimentos (productos derivados de ajos, cebollas y puerros).

3.2 *Aplicaciones analíticas.* Las enzimas inmovilizadas son usadas, principalmente, en biosensores, que se han convertido en una herramienta importante en medicina, control de alimentos y del medio ambiente [6] [7]. Un biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada próxima a un traductor, que en contacto con el analito transforma la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica) [85]. Algunas de las enzimas usadas en biosensores se presentan en la tabla 3 [86] [88].

3.3 *Aplicaciones médicas.* La inmovilización de enzimas incluye diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Estas enzimas reemplazan terapias, pueden actuar como células artificiales y órganos, y recubrir materiales artificiales para mejorar biocompatibilidad. La aplicación de enzimas inmovilizadas puede producir problemas de toxicidad en los humanos, alergias y reacciones inmunológicas, así como se afecta su estabilidad in vivo [6] [7] [88]. En la tabla 4 se observan las diferentes enzimas inmovilizadas usadas en aplicaciones médicas [1] [6] [7] [92].

ENZIMA (EC número)	CONDICIÓN
Asparginasa (3.5.1.1)	Leucemia
Arginasa (3.5.3.1)	Cáncer
Ureasa (3.5.1.5)	Riñones artificiales, desórdenes urémicos
Glucosa oxidasa (1.1.3.4)	Páncreas artificial
Carbonato deshidratasa (4.2.1.1) + Catalasa (1.11.1.6)	Pulmones artificiales
Catalasa (1.11.1.6)	Acatasemia
Glucoamilasa (3.2.1.3)	Enfermedad de almacenamiento de glicógeno
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (1.1.1.49)	Deficiencia de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
Xantina oxidasa (1.1.3.22)	Enfermedad de Lesch-Nyhan
Fenilalanina amonio liasa (4.3.1.5)	Fenolcetonuria
Heparinasa (4.2.2.7)	Procedimientos de terapia extracorporal
Urato oxidasa (1.7.3.3)	Hiperuricemia

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bullock, C. (1995). Immobilized Enzymes. *Science Progress*. Vol. 78, pp. 119-34.
- [2] Woodley, J. (1992). Immobilized Biocatalysts. *Solid Supports Catalysis Organic Synthesis*, pp. 254-271.
- [3] Chaplin, M., and Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge University Press.
- [4] Kennedy, J., and Cabral, J. (1983). Immobilized Enzymes. *Solid Phase Biochemistry. Analytical and Synthetic Aspects*. New York: John Wiley and Sons, pp. 253-391.
- [5] Van de Velde, F., Lourenço N., Pinheiro, H., and Bakker, M. (2002). Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilization Techniques. *Synthesis and Catalysis*. Vol. 344, pp. 815-35.
- [6] Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. Vol. 39, pp. 23-39.
- [7] Krajewska, B. (2004). Application of Chitin and Chitosan, Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 35, pp. 126-139.
- [8] Tischer, W., and Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chemistry*, pp. 95-126.
- [9] Wingard, L. (1972). *Enzyme Engineering*. Interscience Publishers.
- [10] Taylor, R. (1991). *Protein Immobilization: Fundaments and Applications*. Merceel Dekker.
- [11] Scouten, W., Luong, T., and Brown, S. (1995). Enzyme or Protein Immobilization. Techniques for Applications in Biosensor Design. *TIBTECH*. Vol. 13, pp.178-85.
- [12] Kennedy, J., and Cabral, J. (1983). *Solid Phase Biochemistry*. New York: Schouten.
- [13] Klei, H., Sundstrom, D., and Shim, D. (1985). *Immobilization of Enzymes by Microencapsulation in Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*. Woodward, IRL Press, pp. 49-54.
- [14] Wong, S., and Wong, J. (1992). Chemical Cross-Linking for the Stabilization of Proteins and Enzymes. *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 14, pp. 866-874.
- [15] Chibata, I. (1991). *Immobilized Bio-Catalysis*. Kodansya Scientific.
- [16] Gaseca, P., and Hubble, J. (1988). *Enzyme Technology*. Open University Press.
- [17] Conlon, H., and Walt, J. (1986). *Chemistry Education*. Vol. 63, p. 368.
- [18] White, C., and Kennedy, J. (1980). *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 2, p. 82.
- [19] Huang, X., Dan, G., and Zhi-Kang, X. (2007). Preparation and Characterization of Stable Chitosan Nanofibrous Membrane for Lipase Immobilization. *European Polymer Journal*. Vol. 43, pp. 3710-3718.
- [20] Dutta, P., and Dutta, J. (2004). Chattopadhyaya MC, Tripathi vs. Chitin and Chitosan. Novel Biomaterials Waiting for Future Developments. *Polymers Materials*. Vol. 21, p. 321.
- [21] Krajewska, B. (2009). Ureases II. Properties and Their Customizing by Enzymes Immobilizations: A Review. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 59, pp. 22-49.
- [22] Yasar, F., and Alsoy, S. (2009). The Effects of Urease Immobilization on the Transport Characteristics and Protein Adsorption Capacity of Cellulose Acetate Based Hemodialysis Membranes. *Material Science: Material Medicine*.
- [23] Unuma, H., and Hiroya, M. (2007). *Material Science: Material Medicine*. Vol. 18, pp. 987-990.
- [24] Teke, A., and Baysal, S. (2007). *Process Biochemistry*. Vol. 42, pp. 439-443.
- [25] Martino, S., et ál. (2003). *Catalysis B: Environment*. Vol. 46, pp. 613-629.

- [26] Yeon, K., and Lueptow, R. (2006). *Chemistry Technology and Biotechnology*. Vol. 81, pp. 940-950.
- [27] Kumar, S., Kansal, A., and Kayastha, A. (2005). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. Vol. 5, pp. 43-47.
- [28] Bayramoğlu, G., Altınok, H., Bulut, A., and Denizli, A. (2003). *Reactive and Functional Polymers*. Vol. 56, pp. 111-121.
- [29] Kayastha, A., Srivastava, P., Miksa, B., and Somkowski, S. (2003). *Bioactive and Compatible Polymers*. Vol. 18, pp. 113-124.
- [30] Lin, C., and Yang, M. (2003). *Biomaterials*. Vol. 24, pp. 1989-1994.
- [31] Lin, C., and Yang, M. (2001). *Biomaterials*. Vol. 22, pp. 891-896.
- [32] Ayhan, F., Ayhan, H., Pis and E., Tanyolac, A. (2002). *BioResource Technology*. Vol. 81, pp. 131-140.
- [33] Ayhan, F., Rad, A., and Ayhan, H. (2003). *Biomedical Materials Research*. Vol. 64, pp. 13-18.
- [34] Gambhir, A., Kumar, A., Malhotra, B., Miksa, B., and Somkowski, S. (2002). *E-Polymers*.
- [35] Chen, J., and Chiu, S. (1999). *Bioprocess Engineering*. Vol. 21, pp. 323-330.
- [36] Chellapandian, M., and Krishnan, M. (1998). *Process Engineering*. Vol. 33, pp. 595-600.
- [37] Krajewska, B., Leszko, M., and Zaborska, W. (1990). *Chemistry Technology and Biotechnology*. Vol. 48, pp. 337-350.
- [38] Krajewska, B. (2000). *Bioactive Compatible Polymers*. Vol. 15, pp. 155-169.
- [39] Krajewska, B., and Piwowarska, Z. (2005). *Biocatalysis and Biotransformation*. Vol. 23, pp. 225-232.
- [40] Krajewska, B. (1991). *Chemistry Technology Biotechnology*. Vol. 52, pp. 157-162.
- [41] Krajewska, B., Zaborska, W., and Leszko, M. (1997). *Molecular Catalysis B: Enzymes*. Vol. 3, pp. 231-238.
- [42] Krajewska, B., Zaborska, W., and Leszko, M. (2001). *Molecular Catalysis B: Enzymes*. Vol. 14, pp. 101-109.
- [43] Rejikumar, S., and Devi, S. (1998). *Molecular Catalysis B: Enzymes*. Vol. 4, pp. 61-66.
- [44] Miyata, T., Jikihara, A., and Nakamae, K. (1997). *Applied Polymer Science*. Vol. 63, pp. 1579-1588.
- [45] Anita, A., Sastry, C., and Haskim, M. (1997). *Bioprocess Engineering*. Vol. 17, pp. 241-245.
- [46] Elc, Y., in Sac, M. (1996). *Applied Biochemistry Biotechnology*. Vol. 60, pp. 19-30.
- [47] Lai, C., and Tabatabai, M. (1992). *Soil Biology Biochemistry*. Vol. 24, pp. 225-228.
- [48] Moynihan, H., Lee, C., Clark, W., and Wang, N. (1989). *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 34, pp. 951-963.
- [49] Raghunath, K., Rao, K., and Joseph, K. (1984). *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 26, pp. 104-109.
- [50] Hossain, K., Monreal, C., and Sayari, A. (2008). *Colloids Surfaces*. Vol. 62, pp. 42-50.
- [51] Subramanian, A., Kennel, S., Oden, P., Bruce, K., Woodward, J., and Doktycz, M. (1999). Comparison of Techniques for Enzyme Immobilization on Silicon Supports. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 24, pp. 26-34.
- [52] Chaudhari, P., Gokarna, A., Kulkarni, A., Karve, M., Bhoraskar, S. (2005). *Sensors and Actuators*. Vol. 107, pp. 258-263.
- [53] Kurokawa, Y., Sano, T., Ohta, T., and Nakagawa, Y. (1993). Immobilization of Enzyme onto Cellulose-Titanium Oxide Composite Fiber. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 42, pp. 394-397.
- [54] Kennedy, J., and Kay, I. (1976). Hydrous TiO<sub>2</sub>. New Supports for the Immobilization of Enzymes. *Chemistry Perkins Transactions. SOC I*, p. 329.
- [55] Kennedy, J., and Pike, V. (1978). Water-Insoluble Papain Conjugates TiO<sub>2</sub> and of Surface-Coating Material Modified to Contain TiO<sub>2</sub>. *Chemistry Perkins Transactions. SOC.I*, p. 1058.
- [56] Kramer, J., and Prud'homme, R. (1986). Formation of Colloidal TiO<sub>2</sub> From Organotitanate Solutions Used to Produce Cross-Linked Polymer Gels. *Colloid and Interface Science*, p. 294.
- [57] Laska, L., Wodarczyk, J., and Zaborska, W. (1999). *Molecular Catalysis B: Enzymes*. Vol. 6, pp. 549-553.
- [58] Marzadori, C., Miletto, S., Gessa, C., and Ciurli, S. (1998). *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 30, pp. 1485-1490.
- [59] Borghetti, C., Gioacchini, P., Marzadori, C., and Gessa, C. (2003). *Biology and Fertility Soil*. Vol. 38, pp. 96-101.
- [60] Anita, A., Sastry, C., and Hashim, M. (1997). *Bioprocess Engineering*. Vol. 17, pp. 375-380.
- [61] Balulescu, M., Cira, O., Iordachescu, D., Panait, I., and Herman, J. (1992). *Programs Catalysis*. Vol. 1, pp. 75-80.
- [62] Sundaram, P., Crook, E., and Can, J. (1971). *Biochemistry*. Vol. 49, pp. 1388-1394.
- [63] Nakarani, M., and Kayastha, A. (2007). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. Vol. 7, pp. 79-84.

- [64] Kara, F., Demirel, G., and Tümtürk, H. (2006). *Bioprocess and Biosystem Engineering*. Vol. 29, pp. 207-211.
- [65] DeGroot, A., and Neufeld, R. (2001). *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 29, pp. 321-327.
- [66] Monshipouri, M., and Neufeld, R. (1992). *Applied Biochemistry Biotechnology*. Vol. 32, pp. 111-126.
- [67] Monshipouri, M., and Neufeld, R. (1991). *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 13, pp. 309-313.
- [68] Cattaneo, M., and Chang, T. (1991). *Asaio Transactions*. Vol. 37, pp. 80-87.
- [69] Madeira, V. (1977). *Biochemistry and Biophysics*. Acta 499, pp. 202-211.
- [70] Baysal, S., and Karagöz, R. (2005). *Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 35, pp. 135-143.
- [71] Rupcich, N., and Brennan, J. (2003). *Analysis Chemistry*. Acta 500, pp. 3-12.
- [72] Venton, D., and Gudipati, E. (1995). *Biochemistry Biophysics*. Acta 1250, pp. 117-125.
- [73] Allcock, H., Pucher, S., and Visscher, K. (1994). *Biomaterials*. Vol. 15, pp. 502-506.
- [74] Shah, Y., Shah, D., Kothari, R., and Trivedi, B. (1994). *Resources and Industry*. Vol. 39, pp. 184-190.
- [75] Hatayama, H., Swabe, T., and Kurokawa, Y. (1996). *Sol-Gel Science Technology*. Vol. 7, pp. 13-17.
- [76] Mulagalapalli, S., Kumar, S., Kalathur, R., and Kayastha, A. (2007). *Applied Biochemistry Biotechnology*. Vol. 142, pp. 291-297.
- [77] Das, N., Kayastha, A., and Malhotra, O. (1998). *Biotechnology Applied Biochemistry*. Vol. 27, pp. 25-29.
- [78] Prakash, O., Puliga, S., and Upadhyay, N. (2007). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol. 12, pp. 131-135.
- [79] Ikeda, Y., Kurokawa, Y., Nakane, K., and Ogata, N. (2002). *Cellulose*. Vol. 9, pp. 369-379.
- [80] Brennan, J., Benjamin, D., Battista, E., and Gulcevc, M. (2003). *Chemistry Material*. Vol. 15, p. 737.
- [81] Besanger, T., Chen, Y., Deisingh, A., Hodgson, R., Jin, W., Mayer, S., Brook, M., and Brennan, J. (2003). *Analysis Chemistry*. Vol. 75, pp. 2382.
- [82] Narayan, R. (1993). Biodegradable plastics. Opportunities for Innovation: Biotechnology. NIST GCR. Gaithersburg, MD. *National Institute for Standards and Technology*. Vol. 135, pp. 93-633.
- [83] Dubois, P., Krishnan, M., and Narayan, R. (1999). *Polymer*. Vol. 40, pp. 3091.
- [84] Carrea, G., and Riva, S. (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*. Vol. 39, p. 2226.
- [85] Griffiths, D., and Hall, G. (1993). Biosensors: What Real Progress is Being Made? *Trends Biotechnology*. Vol. 11, pp. 122-130.
- [86] Chaplin, M., and Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge University Press.
- [87] Guilbault, G. (1983). Immobilized Enzyme Electrode Probes. *Solid Phase Biochemistry. Analytical and Synthetic Aspects*. New York: John Wiley and Sons, pp. 479-505.
- [88] Wilson, G., and Hu, Y. (2000). Enzyme-Based Biosensors for in Vivo Measurements. *Chemistry Revision*. Vol. 100, pp. 704-2693.
- [89] Mellor, R., Ronnenberg, J., Campbell, W., and Diekmann, S. (1992). Reduction of Nitrate and Nitrite in Water by Immobilized Enzymes. *Nature*. Vol. 355, pp. 717-719.
- [90] Chibata, I., and Tosa, T. (1980). Immobilized Microbial Cells and Their Applications. *Trends Biochemistry Science*. Vol. 5, pp. 88-90.
- [91] Guilbault, G. (1983). Immobilized Enzyme Electrode Probes. *Solid Phase Biochemistry. Analytical and Synthetic Aspects*. New York: John Wiley and Sons, pp. 479-505.
- [92] Piskin, A. (1993). *Therapeutic Potential of Immobilized Enzymes*. Nato Asi Series. Vol. 252, pp. 191-200.