



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
**Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos**

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**CO-INMOVILIZACIÓN DE UNA XILANASA Y CELULASA EN UN  
SOPORTE MAGNÉTICO DE QUITOSANO PARA LA OBTENCIÓN  
DE OLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE UN DESECHO  
AGROINDUSTRIAL**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

**I.A.I. Azariel Díaz Hernández**

Dirigido por:

**Dr. Aldo Amaro Reyes**

Santiago de Querétaro, Querétaro.  
Diciembre de 2017



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**CO-INMOVILIZACIÓN DE UNA XILANASA Y CELULASA EN UN SOPORTE  
MAGNÉTICO DE QUITOSANO PARA LA OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS  
A PARTIR DE UN DESECHO AGROINDUSTRIAL**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Ing. Azariel Díaz Hernández

**Dirigido por:**

Dr. Aldo Amaro Reyes

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. María Rosario Núñez Aguilera  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

La agroindustria produce grandes cantidades de residuos durante el procesamiento de productos alimenticios. Las enzimas tienen gran potencial en la industria, pero requieren una mejora que puede proporcionarse con la inmovilización enzimática, tecnología que puede aplicarse en el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para su conversión a productos biológicos de alto valor. El objetivo del presente trabajo fue el diseño y caracterización de un soporte magnético de quitosano ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano) para la inmovilización de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y endo- $\beta$ -glucanasas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas) mediante genipino como agente reticulante, y su evaluación para la producción de oligosacáridos de un residuo agroindustrial. El  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano se sintetizó por el método de coprecipitación química y la caracterización se llevó a cabo mediante análisis de saturación magnética; análisis termogravimétrico (ATG) y calorimetría diferencial de barrido (DSC); difracción de rayos X (DRX); espectroscopía infrarroja (FT-IR); dispersión de luz dinámica (DLS); microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM); dispersión de energía de rayos X (EDAX) y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). Además, se determinó la actividad catalítica a diferentes valores de pH y temperatura, los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) y la reutilización en sucesivos ciclos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas. Se evaluó la actividad catalítica de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas en olote y pericarpio de maíz para determinar la producción de oligosacáridos. Se determinó un magnetismo de 57 y 55 emu/g, siendo el tamaño promedio de los agregados de 230 y 430 nm compuesto de partículas individuales entre 8.5 y 10.8 nm para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, respectivamente. Se identificó la estructura cúbica de la espinela inversa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . El ATG y el DSC muestran que el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano proporciona estabilidad térmica a las enzimas tras la inmovilización. Los resultados FT-IR y EDAX confirman la reticulación de las enzimas con el soporte. La caracterización bioquímica reveló un grado de reticulación del 67 %. Se confirmó la estabilidad térmica y resistencia a valores de pH ácidos, mayor estabilidad en la actividad relativa de xilanasas en comparación con celulasa en los ciclos de reúso. La actividad hidrolítica sobre el olote de maíz fue 2.7 veces mayor que en el pericarpio bajo las mismas condiciones de reacción, y los productos obtenidos corresponden con arabinosa y celobiosa de acuerdo a cromatografía en capa fina.

**Palabras clave:** Quitosano, magnetita, genipino, xilanasas, celulasa, inmovilización enzimática, oligosacáridos, residuos agroindustriales.

## SUMMARY

Agroindustry produces large amounts of waste during processing of food products. With enzymes, lignocellulosic waste can leverage for their conversion to biological products of high value. Enzymes show great potential in the industry, but require an enhancement that can be provided by enzyme immobilization. The objective of the present work was to design and characterize a chitosan magnetic support ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan) for immobilization of endo- $\beta$ -1,4-xylanase and endo- $\beta$ -glucanase ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan@Enzymes) using genipin as cross-linking agent, and its evaluation for the production of oligosaccharides from an agroindustrial by-product.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan was synthesized by the chemical co-precipitation method. The synthesized and crosslinked composites were characterized by magnetic saturation analysis; thermogravimetric (TGA) and differential scanning calorimetry analysis (DSC); X-ray diffraction (XRD); infrared spectroscopy (FT-IR); dynamic light scattering (DLS); transmission (TEM) and scanning electron microscopies (SEM); X-ray energy dispersion (EDAX) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS); The catalytic activity at different pH and temperature values, kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) and the capacity of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan@Enzymes in successive cycles, were also evaluated. The catalytic activity of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan@Enzymes in both corn cob and corn pericarp was evaluated to determine oligosaccharides production. The saturation magnetism was 57-55 emu/g for composites. The size average of aggregates was 230 and 430 nm, which were composed of individual particles between 8.5 and 10.8 nm for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan@Enzymes, respectively. The cubic structure of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  inverse spinel was identified in composites. TGA and DSC showed that  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan provides thermal stability to the enzymes upon immobilization. FT-IR and EDAX confirm the cross-linking of the enzymes with the support, accounting for 67 %. Thermal stability and hydrolytic activity in acid pH values were confirmed. Recycling of xylanase activity was twice that of cellulase activity. Hydrolytic activity over corn cob was 2.7 times higher than the corn pericarp under the same reaction conditions, and products obtained corresponds to arabinose and cellobiose according to thin layer chromatography.

**Keywords:** Chitosan, magnetite, genipin, xylanase, cellulase, enzymatic immobilization, oligosaccharides, agroindustrial waste.

## DEDICATORIAS

A mi padre Cesáreo Díaz†, quien siempre tuvo el sueño de verme triunfar, el que me enseñó a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento, el que me dio todo lo que ahora soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia.

A mi madre Ma. Del Carmen Hernández, la mujer que tiene todo mi amor, cariño, respeto y admiración, por hacer todo lo posible sin condición alguna.

A Nalda Rodríguez, por ese riesgo que decidiste tomar de estar a mi lado aún con la incertidumbre de lo que pudiera suceder, y la confianza de que, cuando se quieren hacer las cosas, siempre se harán posibles.

A mis hermanos, que a pesar de las circunstancias han sido un punto de referencia, por sus muestras de afecto y darme los ánimos para alcanzar esta meta.

Aquello que me enseñaron que en aún es posible encontrar personas buenas en esta vida, compañeros Víctor, Diana V., Astrid, Rodrigo, Monse, Iriana, Angie, Tere, Ángel, Rebeca, Maaya, Irais, Karen, Vicky, aunque algunos fueron pocos los momentos compartidos, pero fueron momentos muy buenos. A cada uno de mis compañeros de grupo. Al igual con los que en algún momento me tocó compartir un hogar, Memo, Karen, Jorge, Laura. Gracias por formar parte de este recorrido y hacer de esos momentos menos difíciles y muy agradables.

Y finalmente a todas aquellas personas que llegaron a mi vida de manera inesperada y que de la misma forma decidieron marcharse pero que sin duda fueron parte fundamental de estos momentos y que siempre aprendí algo de ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han brindado de forma desinteresada.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ofrecerme las facilidades que durante estos dos años fueron fundamentales para fortalecerme profesional y personalmente.

A la Facultad de Química por medio del programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitirme realizar mis estudios de posgrado y concluir satisfactoriamente.

Al CONACYT por la contribución con la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado, por la Beca Mixta, así como el proyecto CB-2014-241208.

También me complace agradecer por la aceptación, apoyo y los medios brindados, al Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC), en especial el Grupo de Investigación “Materiales Inorgánicos y Catálisis”, muy especialmente a la Dra. Rosario Núñez, por ese apoyo incondicional.

A mi director de tesis, al Dr. Aldo Amaro Reyes por el apoyo; dándome la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por permitirme cumplir uno de mis objetivos personales. Por la paciencia, buen humor y sobre todo agradezco su amistad, y todo lo que haya permitido el buen ambiente laboral durante este tiempo.

Al Dr. Carlos Regalado González, al Dr. Jorge N. Gracida, a la Dra. Blanca E. García y a la Dra. Rosario Núñez por las aportaciones, asesoría y orientación brindada, y por aceptar ser parte de este trabajo.

A cada uno de los Doctores que fueron parte importante en mi formación; así como a cada uno del personal administrativo que contribuyó de la mejor manera en cada uno de los procesos.

Sinceramente:

**Azariel Díaz Hernández**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN.....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos .....	4
2.2. Xilanasas y celulasas.....	7
2.3. Inmovilización enzimática.....	10
2.4. Nanopartículas .....	11
2.5. El quitosano como soporte en la inmovilización de enzimas.....	12
2.6. El genipino como agente de reticulación .....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos particulares.....	17
5. MÉTODO.....	18
5.1. Reactivos .....	18
5.2. Preparación de partículas de magnetita revestida con quitosano (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano) .....	18
5.3. Inmovilización enzimática.....	19
5.4. Caracterización magnética, térmica, estructural y química de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano y Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas.....	21
5.5. Determinación del grado de reticulación de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas.....	23
5.6. Determinación de las actividades de xilanasas y celulasas en Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas.....	24
5.7. Determinación del efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática .....	24
5.8. Determinación de parámetros cinéticos.....	25
5.9. Capacidad de reutilización de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas .....	25

5.10. Hidrólisis enzimática de los residuos olote y pericarpio de maíz mediante $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.....	25
5.11. Caracterización de los productos de hidrolisis enzimática .....	26
5.12. Análisis estadístico .....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
6.1. Preparación de partículas de magnetita recubiertas con quitosano e inmovilización enzimática.....	27
6.2. Caracterización magnética, térmica, estructural y química de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.....	30
6.2.1. Magnetismo .....	30
6.2.2. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) .....	32
6.2.3. Análisis Termogravimétrico (ATG) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en ingles).....	34
6.2.4. Difracción de rayos-X.....	36
6.2.5. Tamaño y distribución de tamaño de partícula.....	39
6.2.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	41
6.2.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y análisis composicional.....	42
6.2.8. Análisis químico superficial por Espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS) .....	44
6.3. Grado de reticulación .....	45
6.4. Actividad catalítica de xilanasas y celulasas en $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas .....	46
6.5. Parámetros cinéticos.....	51
6.6. Capacidad de reúso de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas .....	52
6.7. Hidrólisis enzimática de olote y pericarpio de maíz mediante $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.....	54
6.8. Caracterización de los productos de la hidrólisis enzimática .....	55
7. CONCLUSIONES .....	58
8. REFERENCIAS .....	60
ANEXOS .....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		PÁGINA
1	Diseño personalizado de la MSR para sintetizar partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.	20
2	Resultados de la síntesis de partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.	28
3	ANOVA para el diseño personalizado de la MSR para sintetizar partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.	29
4	Composición química en Fe, O, C y N de las muestras a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano y b) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas.	44
5	Parámetros cinéticos de enzimas libres y Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		PÁGINA
1	Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano) e inmovilización enzimática ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas) por reticulación con genipino	30
2	Curvas de magnetización de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas	31
3	Espectros FT-IR de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y enzimas libres.	33
4	ATG de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y enzimas libres.	35
5	Difracción de rayos-X de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.	37
6	Estructura cúbica de la espinela inversa proyectada de acuerdo al parámetro de celda unitaria para $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.	38
7	Patrón de difracción por TEM de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y c) Diámetro de los anillos del patrón de difracción de cada material.	39
8	Histogramas DLS de distribución de tamaño por intensidad de partículas mediante Zetasizer de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.	40
9	Imágenes TEM de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas. El tamaño de partículas individuales que integran a $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.	41
10	Micrografías SEM de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y sus respectivos espectros del análisis químico por EDAX.	43
11	Espectros XPS de alta resolución para a) Fe, b) O, c) N y D) C de las muestras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.	45
12	Efecto del pH sobre la actividad catalítica de xilanasas libre y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con xilano de madera de haya como sustrato.	46
13	Efecto de pH sobre la actividad de celulasa en la enzima libre y en el $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con papel filtro como fuente de celulosa como sustrato.	47
14	Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de xilanasas libre y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas evaluado con xilano de madera de haya como sustrato.	49
15	Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de celulasa libre y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con papel filtro como fuente de celulosa como sustrato.	50
16	Ensayo de reutilización de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas a las condiciones óptimas de pH y temperatura, evaluadas en xilano y celulosa como sustratos.	53

- 17 Actividad catalítica de las enzimas libres y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas sobre los desechos de maíz (olote y pericarpio). La evaluación catalítica se realizó a las condiciones óptimas determinadas previamente. 55
- 18 TLC de xilosa (1), arabinosa (2), ribosa (3), glucosa (4), galactosa (5), fructosa (6), manosa (7), sacarosa (8), celobiosa (9) y maltosa (10) utilizados como estándares. Productos de la hidrólisis de olote (11–13) y pericarpio de maíz (14–16) mediante xilanasa, celulasa y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas, respectivamente. 56

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria produce grandes cantidades de residuos que se derivan de la transformación de las materias primas de vegetales y animales en los productos alimenticios. El aprovechamiento de estos productos generalmente consiste en la extracción o la separación de la porción nutricional de los restos que tienen poco valor nutritivo o componentes no comestibles de las materias primas (Oreopoulou y Russ, 2007). Los desechos de alimentos son producidos por una variedad de fuentes, que van desde las operaciones agrícolas para el consumo doméstico, alrededor del 38 % se produce durante el procesamiento de alimentos (Baiano, 2014).

Una gran cantidad de residuos agroindustriales generados cada año en todo el mundo contienen altos contenidos de lignocelulosa y de almidón. La lignocelulosa es el componente principal de la biomasa, que comprende alrededor de la mitad de la materia de la planta producida por la fotosíntesis y que representa el más abundante de los recursos renovables orgánico en el suelo (Sánchez, 2009). Los residuos vegetales incluyen recortes, peladuras, tallos, semillas, conchas, salvado, residuos que quedan después de la extracción del aceite, almidón, azúcar y jugo (Baiano, 2014).

Los desechos agrícolas podrían ser utilizados como recursos materiales en muchas aplicaciones de ingeniería (Danewalia *et al.*, 2016). A pesar de que estos residuos se utilizan principalmente como alimento para animales y los rellenos sanitarios (Salihu *et al.*, 2012); los residuos de alto valor celulósicos se pueden utilizar para la conversión de productos biológicos mediante procesos de sacarificación y fermentación reduciendo la contaminación ambiental causada por desechos agrícolas (Alrumman, 2016). Incluso en la actualidad, la legislación de la Unión Europea promueve la explotación de los coproductos. Esta valorización puede lograrse a través de la extracción de componentes de alto valor, tales como

proteínas, polisacáridos, fibras, compuestos de sabor y fitoquímicos, que pueden ser reutilizados como ingredientes nutritivos y farmacológicamente funcionales (Baiano, 2014).

## 2. ANTECEDENTES

La elaboración de los productos de la vida diaria, tales como papel, textiles, alimentos, piensos, productos químicos y farmacéuticos consume grandes cantidades de materias primas y energía, además genera grandes cantidades de residuos que tienen efectos adversos sobre el medio ambiente y calidad de vida (OCDE, 2009). Debido a esto, el desarrollo de la biorefinería para la producción de combustibles y productos químicos está ganando cada vez más atractivo en los últimos años. Las principales ventajas de las biorefinerías son la generación de múltiples productos con la utilización completa de la biomasa generando el concepto de residuos cero. Así es que la biorefinería debe ser capaz de utilizar materiales de abastecimiento de amplio rango, incluyendo la silvicultura, la agricultura, la acuicultura así como los residuos procedentes de la industria y los hogares (Abraham *et al.*, 2016).

Los residuos agroindustriales se generan durante el procesamiento industrial de los productos agrícolas. Estos residuos se generan en grandes cantidades durante todo el año, y son los recursos renovables más abundantes en la tierra. Debido a la gran disponibilidad y composición rica en elementos que se podría utilizar en otros procesos, hay un gran interés en la reutilización de estos residuos, tanto desde puntos de vista económico como el medioambiental (Bhatia *et al.*, 2012).

Actualmente, existe un interés en todo el mundo en el uso tecnológico de residuos agroindustriales como fuente renovable de alimentos y biocombustibles. Los materiales lignocelulósicos (LCMS, por sus siglas en inglés) son una fuente rica de la celulosa y hemicelulosa. La hemicelulosa es rica en xilano, un polisacárido utilizado para desarrollar tecnología para la producción de alcohol, xilosa, xilitol y xilooligosacáridos (XOS) (Carvalho *et al.*, 2013). Estas aplicaciones necesitan enzimas que sean capaces de mantener una alta actividad después de haber sido utilizado varias veces en las condiciones de procesos drásticos

(temperatura alta, alta concentración de iones, ambientes ácidos o alcalinos). Además de recuperarlas fácilmente de las mezclas de reacción para su reutilización (Ansari y Husain, 2012). Las materias primas que son ricas en hemicelulosa incluyen bagazo de caña de azúcar, mazorcas de maíz, cáscaras de arroz, semillas de aceituna, paja de cebada, tallo de tabaco, tallo de algodón, tallo del girasol y paja de trigo (Carvalho *et al.*, 2013).

La conversión o la biorefinería de los recursos renovables da tres componentes principales: celulosa, lignina y hemicelulosa. Los xilanos son parte de la fracción de hemicelulosa y de un cierto uso en la alimentación, la tecnología de alimentos, los nuevos materiales y la biotecnología. El xilano es abundante en la naturaleza y se pueden obtener de varias fuentes antes considerados como residuos (efluentes de fábricas de papel, aserrín de madera, residuos de procesamiento de alimentos, desechos agrícolas, etc.). Dependiendo del tipo de sustituyentes (arabinosa, ácidos glucurónicos, grupo acetilo) y el patrón de sustitución, los xilanos aislados de diferentes fuentes pueden encontrar distintas aplicaciones en el futuro en el cuidado de la salud, cosméticos, alimentos y otras industrias (Deutschmann y Dekker, 2012).

## **2.1. Xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos**

El interés mundial en oligosacáridos ha ido en aumento desde que se conocieron sus características prebióticas. Los oligosacáridos de diverso origen como, bacterias, algas, hongos y plantas superiores se han utilizado ampliamente tanto como ingredientes alimentarios y suplementos farmacológicos. Los oligosacáridos no digeribles se han utilizado como fibra dietética, edulcorante, agente de control de peso y humectante en confiterías, panaderías y cervecerías. Los oligosacáridos funcionales, que son de carácter intermedio entre los azúcares simples y polisacáridos, son reivindicados a comportarse como fibra dietética y prebióticos (Kunz y Rudloff, 2006). Se han encontrado eficaces en la proliferación normal de la flora gastrointestinal y la supresión de patógenos, la prevención de la

caries dental, la mejora de la inmunidad, la facilitación de la absorción de minerales, la fuente de antioxidante, los reguladores de glucosa en sangre en diabéticos y los lípidos séricos en hiperlipidémicos. Aparte de su uso las aplicaciones farmacológicas, los oligosacáridos se han encontrado en la administración de fármacos, cosméticos, alimentos para animales, la pesca, la agricultura, etc. (Patel y Goyal, 2011). Además, en aplicaciones como alimentos se pueden utilizar en combinación con otros prebióticos o probióticos (Sedlmeyer, 2011).

Los xilo-oligosacáridos (XOS) son oligómeros de azúcar que constan de unidades de xilosa a través de enlaces  $\beta$ -(1→4)-xilosídicos; es decir, xilobiosa (2 monómeros), xilotriosa (3 monómeros), xilotetrosa (4 monómeros), xilopentosa (5 monómeros), xilohexosa (6 monómeros) y así sucesivamente (Kumar y Satyanarayana, 2011). Como su nombre indica, estos son los productos de hidrólisis de xilano, esencialmente presente en la mayoría de los materiales lignocelulósicos con diversos grados. La fórmula molecular de XOS es  $C_5^nH^{8n+2}O^{4n+1}$ ; donde, n varía entre 2 y 6. Los XOS procedentes de diferentes materias primas puede estar presente con cualquier cadena lateral, tal como acetilo, derivado de metil 4-O, arabinofuranosil y en tal caso podría ser denominado como XOS ramificados (Aachary y Prapulla, 2011). Los XOS no son cancerígenos y regulan la secreción de insulina del páncreas, además de aumentar la absorción de minerales del intestino grueso. Afecta a la función intestinal gracias a su suave capacidad laxante (Samanta *et al.*, 2015).

Generalmente los XOS son comercializados como un polvo blanco, que contienen dos a diez moléculas de xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -1-4 (Mäkeläinen *et al.*, 2009). El sabor dulce de XOS permite que sea utilizado como un edulcorante artificial (Samanta *et al.*, 2015).

Los XOS se consideran oligosacáridos no digeribles debido a que el cuerpo humano carece de las enzimas necesarias para hidrolizar los enlaces  $\beta$ , por lo que

se considera prebióticos y fibra soluble ya que no se degradan en el estómago y llegan al intestino grueso intacto (Carvalho *et al.*, 2013). Promueve el crecimiento de bacterias intestinales benéficas tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, además de esta estimulación de crecimiento selectivo de la microflora intestinal beneficiosa, incluyen la reducción de la glucosa en sangre y colesterol (Samanta *et al.*, 2015). Estos efectos abren una nueva perspectiva sobre las posibles aplicaciones para la producción animal y el consumo humano (Carvalho *et al.*, 2013). Se consideran no cariogénicos en los seres humanos y tienen importantes propiedades biológicas. Se utilizan como edulcorantes dietéticos en alimentos de la dieta baja en calorías y para el consumo por personas con diabetes (Delgado *et al.*, 2011). Además, la adición de XOS a los alimentos le confiere propiedades fisiológicas beneficiosas para el cuerpo, incluyendo la mejora de la función intestinal, la absorción de calcio y el metabolismo de lípidos, la prevención de la caries dental, la protección contra la enfermedad cardiovascular y la reducción en el riesgo de cáncer de colon debido a la formación de ácidos grasos de cadena corta (Wang *et al.*, 2009).

La conversión enzimática del xilano en XOS es la ruta preferida para las industrias de la alimentación debido a los problemas asociados con las tecnologías químicas (por ejemplo, hidrólisis ácida) debido a la liberación de productos tóxicos y no deseadas, tales como furfural (Carvalho *et al.*, 2013).

La producción de oligosacáridos por procesos enzimáticos está influenciada por algunos factores críticos. El rendimiento, la productividad y el tipo de oligosacárido producido dependen del tipo de enzima, su fuente de microorganismo, la estabilidad y la actividad de la enzima a diferentes pH y temperaturas (Carvalho *et al.*, 2013). En la actualidad, se considera a la hidrólisis enzimática como la mejor opción para producir XOS para la industria alimentaria (Aachary y Prapulla, 2009). El tipo de estructura, la química del sustrato y la especificidad de la enzima son los factores importantes en la hidrólisis enzimática de xilano para producir XOS (Carvalho *et al.*, 2013). En este proceso para la

producción de oligosacáridos, la enzima se puede añadir directamente al medio de reacción (Akpinar *et al.*, 2010), o bien, se puede añadir la enzima inmovilizada.

Los celo-oligosacáridos se definen como sacáridos que constan de 2 a 6 unidades de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4-, que contienen principalmente celobiosa (Zhao *et al.*, 2009). Al igual que los XOS, también son significativos en el campo de los alimentos y piensos (Uyeno *et al.*, 2013), esto debido a que es considerado como un oligosacárido funcional derivado de la hidrólisis de la celulosa de las plantas. Se obtienen también de una diversidad de residuos agrícolas (Song *et al.*, 2013).

Los residuos de la fabricación de xilo-oligosacáridos a partir de desechos de mazorca de maíz se consideran ahora como un excelente sustrato para la producción de celo-oligosacáridos debido a la abundancia, alto contenido de celulosa (70 – 80 %) y la estructura disponible después de la extracción de xilano para la producción de xilo-oligosacáridos. Debido a la falta de utilización efectiva, los residuos de maíz después de la extracción de xilano son abandonados en el campo abierto, provocando contaminación ambiental. La utilización de estos materiales no solo resuelve la eliminación adecuada de los desechos, sino también proporciona una oportunidad atractiva para un desarrollo más sostenible de los recursos agrícolas (Chu *et al.*, 2014).

La utilización de enzimas inmovilizadas se considera un método alternativo prometedor debido a la producción de menos subproductos indeseables, la facilidad de recuperación y alta pureza de los xilo-oligosacáridos (Zhao *et al.*, 2012), al igual que podría llegar a ser para los celo-oligosacáridos.

## **2.2. Xilanasas y celulasas**

Históricamente el estudio de las proteínas se ha basado en gran medida en la caracterización de la actividad de una única proteína purificada aislada de otros componentes celulares. Esto ha permitido definir las propiedades cinéticas y

químicas intrínsecas de esa proteína, de cómo la enzima o receptor se comporta dentro de un contexto celular nativo (Lee y Berdis, 2016).

Una enzima es una proteína que actúa en una reacción, disuelta en medio acuoso, por lo que su recuperación para un segundo uso es prácticamente imposible, a menos que se sujete a un soporte sólido. Así, puede emplearse repetidas veces o incluso empacarse en una columna por la que se haga pasar la corriente líquida con el sustrato (Badui, 2013). Uno de los desarrollos recientes más importantes en el uso de enzimas para el procesamiento industrial es la fijación de las enzimas sobre soportes (Karav *et al.*, 2017). El uso de enzimas inmovilizadas permite el procesamiento continuo y gran aumento en el uso de las mismas.

Las endo- $\beta$ -D-xilanasas (EC. 3.2.1.8) rompen al azar los enlaces glucosídicos de la cadena principal de la molécula de xilano produciendo una reducción en el grado de polimerización del sustrato y la formación de una variedad de xilo-oligosacáridos (Amaro-Reyes *et al.*, 2011). Estas enzimas son producidas por hongos bacterias, levaduras, algas marinas, protozoos, caracoles, crustáceos, insectos, semillas, etc., pero la fuente comercial principal son los hongos filamentosos (Polizeli *et al.*, 2005). La familia 11 de las xilanasas se caracteriza por un elevado punto isoeléctrico (pI), un bajo peso molecular, un mecanismo de doble desplazamiento, dos glutamatos actuando como los residuos catalíticos, una estructura del dominio catalítico compuesto por alrededor de 180 a 200 residuos (Gusakov, 2010). En general, las endoxilanasas muestran un pico de actividad entre 40 y 80 °C, y entre un pH de 4.0 a 6.5, aunque se han reportado condiciones óptimas fuera de estos rangos (Polizeli *et al.*, 2005).

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones  $\beta$ -1,4 de los glucanos y se encuentran en la naturaleza en microorganismos que atacan a las plantas (Badui, 2013). Las endoglucanasas pertenecen a familia 12 de las glicosil hidrolasas, presentan actividad óptima a pH

ácido. Las endo  $\beta$ -1,4-glucanasas (EC. 3.2.1.4) hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -glucosídicos internos de la molécula de celulosa preferentemente en las regiones amorfas produciendo glucooligosacáridos (Jabasingh y ValliNachiyar, 2011). Para la hidrólisis completa de celulosa cristalina a unidades de D-glucosa se requiere primero transformarla a estado amorfo con endoglucanasas, luego hidrolizarla a unidades de celulosa con celobiohidrolasas y por último convertir esta última a unidades de D-glucosa con la intervención de  $\beta$ -glucosidasas (Badui, 2013).

Desde el punto de vista bioquímico, en general, las enzimas son proteínas que actúan como aceleradores de las reacciones químicas, de síntesis, transformación y degradación de compuestos. Esto ha orientado a su uso industrial en los diferentes ámbitos industriales como la industria láctea, cárnica, cervecera, vinificación, biocombustibles, entre otras. Dentro de las mismas, ha venido creciendo su importancia por los nuevos descubrimientos a sus funciones en los diferentes procesos. Se puede mencionar el uso como edulcorantes en dietas de bajas calorías y en el consumo de personas diabéticas (Carvalho *et al.*, 2013), así como la industria farmacéutica y cosmética (Cara *et al.*, 2012).

En la naturaleza la celulosa, lignocelulosa y lignina son las principales fuentes de biomasa de la planta; por lo tanto, su reciclado es indispensable para el ciclo del carbono. Además, son materiales altamente disponibles que representan una gran oportunidad para el desarrollo de productos con valor agregado. Cada polímero se descompone por una variedad de microorganismos que producen una batería de enzimas que trabajan de forma sinérgica. Esta actualmente ha venido tomando gran importancia debido a que los procesos que utilizan enzimas lignocelulolíticas o se basan en microorganismos podrían conducir a nuevas tecnologías (Bhatia *et al.*, 2012).

En los últimos años, las xilanasas han dibujado un considerable interés en la investigación debido principalmente a su aplicación conocida y potencial, tales como la producción de xilooligosacáridos (XOS) en la industria de la alimentación

y la conversión de subproductos agrícolas en la reducción de azúcares (Ribeiro *et al.*, 2014, Kocabas *et al.*, 2015).

### **2.3. Inmovilización enzimática**

La inmovilización o restricción de movilidad de una enzima en un espacio fijo, proporciona ventajas importantes como reutilización de las enzimas, estabilidad térmica mejorada, la fácil separación de la mezcla de reacción, además de permitir el desarrollo de procesos continuos (Ranjbakhsh *et al.*, 2012). Enzimas inmovilizadas han mostrado estabilidad a largo plazo sin lixiviación de la enzima desde el soporte y han permitido su uso repetido sin pérdida significativa de su actividad (Pospiskova y Safarik, 2013).

Karav *et al.*, (2017) y Honda *et al.*, (2017) mencionan que los métodos de inmovilización se pueden dividir en aquellos que involucran la interacción de la enzima con una matriz (por lo general a través de un enlace químico) y aquel en los que la enzima está contenida dentro de un espacio restringido. Dentro de estos métodos encuentran los siguientes:

- Atrapamiento en una matriz.
- Atrapamiento en gel.
- Unión covalente a un soporte.
- Agregados enzimáticos reticulados.
- Microencapsulación.
- Adsorción física.

La encapsulación es una tecnología prometedora para llevar sustancias activas naturales, evitando su pérdida y el mantenimiento de su estabilidad hasta su uso (Mascheroni *et al.*, 2014). En comparación con la enzima libre, una enzima inmovilizada exhibe una estabilidad mejorada durante el almacenamiento, el tratamiento térmico y pH (Liu *et al.*, 2015).

Las altas temperaturas normalmente causan degradación de la estructura de la enzima, que se caracteriza por una cierta flexibilidad, lo que significa que su sitio activo sufre cambios conformacionales que son a menudo irreversibles, causando la inactivación. La inmovilización disminuye la flexibilidad de la enzima, ayuda a mantener la estructura del sitio activo, que es importante para su actividad (Osuna *et al.*, 2015). La estabilidad y la actividad de la enzima inmovilizada dependen en gran medida de la densidad superficial del grupo funcional del soporte (Long *et al.*, 2015). La elección de un método adecuado para inmovilizar una enzima dependerá de su propósito. Un requisito importante para la inmovilización es que la matriz debe proporcionar un ambiente inerte y biocompatible, es decir, que no debe interferir en la estructura nativa de la proteína (Cipolatti *et al.*, 2014).

El soporte generalmente tiene un efecto protector a altas temperaturas a las que se produce la desactivación de la enzima. La flexibilidad conformacional de la enzima se ve afectada por la inmovilización. La inmovilización de la enzima provoca un aumento en la rigidez de la enzima, lo que comúnmente se refleja por un aumento en la estabilidad hacia la desnaturalización elevando la temperatura (Chang *et al.*, 2005). Sin embargo, se encuentra a menudo que la enzima inmovilizada tiene una estabilidad térmica más alta que la enzima libre debido a la reducción de la flexibilidad conformacional en la enzima inmovilizada. Por otro lado, a diferencia de las enzimas libres, las enzimas inmovilizadas se pueden separar fácilmente de soluciones de productos y reutilizados.

## **2.4. Nanopartículas**

En general las nanopartículas se definen como partículas coloidales sólidas que incluyen esferas y cápsulas. Pueden ser preparados por los métodos de polimerización y síntesis de polímeros preformados (Wilczewska *et al.*, 2012). Una de sus características fundamentales es su tamaño, generalmente toman un

tamaño en el intervalo de 5 a 10 nm con un límite de tamaño superior de hasta ~ 1  $\mu\text{m}$  (Quintanar–Guerrero *et al.*, 1998).

Las nanopartículas magnéticas pueden ser una mejor opción en la inmovilización de enzimas debido a la separación magnética más fácil y generalmente evita la pérdida de partículas. Las principales ventajas de las nanopartículas magnéticas son alta resistencia mecánica, buena estabilidad térmica, resistencia contra degradación química y microbiana (Ghadi *et al.*, 2015). Las nanoestructuras son muy atractivas para los procesos de inmovilización enzimática, poseen características ideales para equilibrar los factores principales que determinan la eficiencia de biocatalizadores. Así también se incluye el área de superficie específica, resistencia a la transferencia de masa y carga de la enzima efectiva (Cipolatti *et al.*, 2014).

Dentro de los materiales utilizados para la creación de las partículas magnéticas se encuentran el sulfato ferroso y óxido de hierro que han resultado ser precursores en la producción de partículas de quitosano magnéticos (Pospiskova & Safarik, 2013, Castello *et al.*, 2014). Estas partículas podrían ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo, lo que conduce al transporte e inmovilización de nanopartículas magnéticas (Castello *et al.*, 2014). Los tamaños y eficiencia de carga de las nanopartículas magnéticas novedosas pueden ser controlados. Este control se realiza mediante el ajuste de los contenidos de agente de reticulación, tiempos de reacción o relaciones en peso de quitosano del sistema (Ding *et al.*, 2015).

## **2.5. El quitosano como soporte en la inmovilización de enzimas**

El quitosano es un polímero obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina, que es un polisacárido no ramificado a base de glucosa ampliamente distribuido en la naturaleza. Es el principal componente de exoesqueletos de los crustáceos e insectos, así como de las paredes celulares de algunas bacterias y

hongos (Senel y McClure, 2004), es un tipo de copolímero que consiste en dos unidades de repetición, es decir, N-acetil-2-amino-2-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa que se encuentran unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4)-glicosídicos. Debido a este tipo de arreglo, el quitosano muestra una estructura cristalina rígida a través de enlaces de hidrogeno inter a intramolecular (Shukla *et al.*, 2014). La proporción relativa de quitosano determina el grado de acetilación, que controla muchas de las propiedades del polímero tales como la solubilidad, así como el comportamiento ácido base (Shukla *et al.*, 2014).

Cuando el grado de desacetilación de la quitina alcanza aproximadamente 50 % (en función del origen del polímero), se convierte en soluble en medios ácidos acuosos y se llama quitosano (Rinaudo, 2006). Los principales parámetros que influyen en las características de quitosano son el peso molecular y el arreglo de desacetilación, que representa la proporción de unidades desacetiladas. Estos parámetros están determinados por las condiciones establecidas durante la preparación. Por otra parte, se pueden modificar adicionalmente, el grado de acetilación se puede bajar por desacetilación, y el peso molecular se puede reducir mediante despolimerización ácida (Berger, 2004).

El quitosano es un polímero policatiónico que tiene un grupo  $-NH_2$  y dos grupos  $-OH$  en cada residuo glucosídico. Debido a la presencia de estos grupos reactivos, tiene la capacidad para enlazar con diversos iones metálicos, es decir, es quelante. Además, exhibe una variedad de propiedades físico-químicas y biológicas que resultan en numerosas aplicaciones en campos como el tratamiento de residuos y del agua, la agricultura, la tela y los textiles, los cosméticos y procesamiento de alimentos (Senel y McClure, 2004, Shukla *et al.*, 2014). Los grupos amino en la estructura polimérica lo han convertido como un portador biológico de alta capacidad para la inmovilización de enzimas (Ghadi *et al.*, 2014). El quitosano tiene buena propiedad para formar microesferas, es un adsorbente económico y al utilizarlo con la propiedad magnética se puede separar fácilmente con un campo magnético externo en lugar de filtración o centrifugación,

por lo que tiene potencial en la inmovilización de enzimas, así como otros compuestos biológicamente activos (Pospiskova y Safarik, 2013, Zeng *et al.*, 2015). Un estudio determinó que en las enzimas inmovilizadas en perlas de quitosano, la actividad es menor al comienzo y se incrementó cuando las perlas se vuelven a utilizar en repetidas ocasiones (Chang *et al.*, 2005).

## **2.6. El genipino como agente de reticulación**

El genipino, un compuesto químico cristalino y bien definido [metil (1R,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxibiciclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato] que presenta estabilidad en el intervalo de pH 4 a 9 (Ramos de la Peña *et al.*, 2014). Se extrae a partir de los frutos de gardenia, como un reactivo de reticulación bifuncional, reacciona con los grupos amino presentes en el quitosano soluble en agua (así como proteínas y aminos en general) produciendo de este modo hidrogeles fluorescentes de color azul (Liang *et al.*, 2009, Rangel-Rodríguez *et al.*, 2014). Como agente de reticulación natural, es bastante menos tóxico, biocompatible, y ofrece productos reticulados muy estables en comparación con algunos productos químicos específicos, además de que sus funciones se encuentran muy bien establecidas (Manickam *et al.*, 2014). Es aproximadamente 10,000 veces menos citotóxico que el glutaraldehído (Cui *et al.*, 2014) el cual es el agente reticulante más utilizado.

Es de suma importancia considerar la selección del agente reticulante, así como el grado de reticulación requerido y su compatibilidad con diferentes polímeros en el diseño de sistemas de acuerdo a su uso (Manickam *et al.*, 2014). Uno de los agentes de reticulación naturales que se utilizan para controlar la relación de hinchazón y propiedades mecánicas de biopolímeros bajo este sistema, es el genipino. Los complejos reticulados resultantes no son citotóxicos para las células animales y humanos hasta ahora examinados. El genipino podría reemplazar al glutaraldehído (Ge *et al.*, 2016) con las ventajas de estabilidad y biocompatibilidad de los productos reticulados cuya calidad, evaluación y

manipulación serán más fáciles (Liang *et al.*, 2009). En quitosano el fenómeno con genipino se produce por medio de un mecanismo complejo que consiste en dos reacciones que tienen lugar en diferentes sitios en la molécula de genipino. La reacción de mezcla produce una coloración azul oscuro, mostrando un espectro de absorción característico en el rango UV-visibles con una absorción máxima a 605 nm (Rangel-Rodríguez *et al.*, 2014)

La temperatura, los parámetros cinéticos y el reciclaje de soporte pueden optimizar la estabilidad del sistema de inmovilización de enzimas en el soporte de quitosano reticulado con genipino (Rangel-Rodríguez *et al.*, 2014). El grado en que una capa de polímero absorbido puede evitar la agregación y sedimentación de nanopartículas, depende de sus características, en particular: adsorción de masas, el espesor de la capa extendida y la densidad de carga (Castello *et al.*, 2014). Se ha encontrado que las nanopartículas cubiertas de quitosano podrían proporcionar una base excelente para nuevas formulaciones de nanopartículas (Ahmad *et al.*, 2014).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Tomando en cuenta que los xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos son considerados como prebióticos, así como ingredientes de alimentos funcionales con beneficios para la salud humana, se plantea utilizar residuos lignocelulósicos para su producción. Los XOS y celo-oligosacáridos añadirán valor económico a estos residuos, serán una fuente alterna para su obtención sin el incremento de las áreas de producción agrícolas. Existen estudios que plantean el desarrollo de tecnologías viables y económicas en el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos, reduciendo los costos de producción y el aumento de la disponibilidad de los productos por medio de la tecnología enzimática. Por lo que la inmovilización de xilanasas y celulasas en un soporte funcional para producción de XOS y celo-oligosacáridos es una propuesta con potencial.

Considerando la creciente demanda de productos alimenticios novedosos para el bienestar y las cuestiones relacionadas con la edad, se ha atraído la atención mundial en prebióticos. La producción de XOS y celo-oligosacáridos a partir de residuos agrícolas ofrece grandes posibilidades a las industrias nutracéuticas debido a que la materia prima es barata y disponible en abundancia.

Teniendo en cuenta las materias primas baratas, abundantes y proceso de purificación más fácil, la producción de XOS y celo-oligosacáridos y la reducción de azúcar a partir de residuos agrícolas por la acción de la enzima inmovilizada ofrecerá un gran alcance para las industrias biotecnológicas y de los alimentos. Si la utilización de enzimas se considera un método alternativo prometedor debido a la producción de menos subproductos indeseables y la alta pureza de los oligosacáridos, la inmovilización de las mismas le dará la ventaja adicional de la facilidad de recuperación para su reutilización en un determinado número de ciclos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Diseñar y caracterizar las propiedades magnéticas, térmicas, estructurales y químicas de un soporte magnético de quitosano ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano) para la inmovilización de las enzimas endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y endo- $\beta$ -glucanasas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas) por medio de genipino como agente reticulante, y la evaluación bioquímica de esta última para la producción de xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos a partir de un desecho agroindustrial.

### **4.2. Objetivos particulares**

1. Sintetizar un soporte orgánico para co-inmovilizar una endo- $\beta$ -glucanasa y una endo  $\beta$ -1,4-xilanasas que muestre propiedades magnéticas.
2. Caracterizar magnética, térmica, estructural y químicamente tanto el soporte como las enzimas co-inmovilizadas.
3. Determinar las propiedades bioquímicas de las enzimas co-inmovilizadas mediante el estudio de los parámetros cinéticos, actividad, estabilidad enzimática a diferentes temperaturas, pH, así como la capacidad de reutilización.
4. Evaluar la producción de oligosacáridos (xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos) a partir de olote y pericarpio de maíz mediante la utilización de las enzimas co-inmovilizadas, así como la caracterización de los mismos mediante cromatografía de capa fina.

## 5. MÉTODO

### 5.1. Reactivos

Las enzimas xilanasa (EC. 3.2.1.8 endo- $\beta$ -1,4-xilanasa de *Trichoderma longibrachiatum*)  $\geq 2.5$  unidades/mg, celulasa (endo- $\beta$ -glucanasa de *Trichoderma viride*) 3–10 unidades/mg. El quitosano de bajo peso molecular (50,000–190,000 Da, 75–85 % desacetilado), el genipino (90 % p/p de pureza) y todos los demás reactivos grado analítico se obtuvieron de manera comercial de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), excepto donde se indique lo contrario. El pericarpio de maíz se obtuvo de la empresa Ingredion, San Juan del Río, Querétaro, México. El olote de maíz se obtuvo de la Forrajera Elizondo, Apodaca, Nuevo León, México. Ambos residuos agroindustriales fueron lavados con agua destilada, secados en horno de convección forzada (Froilabo, Meyzieu, Francia) a 60 °C hasta peso constante, posteriormente fueron molidos y cribados hasta malla 40.

### 5.2. Preparación de partículas de magnetita revestida con quitosano ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano)

Las partículas de magnetita revestidas con quitosano se prepararon mediante coprecipitación *in situ* de sales de hierro en una plantilla de polímero de acuerdo a lo descrito por Morales *et al* (2013) y Sojitra *et al.*, (2016) con algunas modificaciones. Se mezcló una cantidad de  $3.6 \times 10^{-3}$  moles de hierro a partir de una mezcla en relación molar 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ ) de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) y cloruro ferroso ( $\text{FeCl}_2$ ) con cantidades variables de quitosano a 100 rpm en ácido acético al 3 % (v/v) a 70 °C hasta su disolución. La disolución de quitosano-hierro se dispersó mediante un procesador ultrasónico (VC505, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) con una amplitud del 70 % en diferentes momentos. A continuación, la emulsión generada se precipitó añadiendo una solución de NaOH (20 % p/v): etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 4:1. Posteriormente, la mezcla alcalina se homogenizó usando un vórtex durante 30 s y luego se mantuvo bajo agitación suave (60 rpm) durante 18 h. El precipitado se

recuperó por centrifugación durante 5 min a 7000 x g (Eppendorf, Mod. 5804R, Hamburgo, Alemania), y se lavó con una mezcla de tampón de fosfatos 50 mM pH 7.0 y etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 1:1 hasta neutralización. Los sólidos neutralizados se secaron en horno a 80 °C durante 5 h y se trituraron en mortero hasta obtener un polvo fino. El rendimiento en sólidos (% p/p) de la relación de síntesis se determinó multiplicando por 100 la relación en peso de sólidos finales con los iniciales.

### 5.3. Inmovilización enzimática

Se suspendieron 300 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qitosano en una mezcla de xilanas y celulasa en una relación en peso de 1:0.5, se reticuló con genipino en tampón de fosfato 50 mM pH 4.5. La mezcla de reacción se agitó manualmente cada 10 minutos durante una hora a temperatura ambiente (20 ± 3 °C). A continuación, el Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qitosano reticulado con las enzimas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Qitosano@Enzimas) se separó de la mezcla de reacción mediante magnetismo utilizando un imán de neodimio permanente (1.2 T), se lavó con una mezcla en volumen de etanol al 70 % v/v - agua Mili-Q (1:1) en tres ocasiones y se secó a vacío a 60 °C (Marca, Mdelo). La cantidad de quitosano, genipino y tiempo de sonicación se utilizaron como variables para maximizar la respuesta (Tabla 1), como se describe en un diseño personalizado de la metodología de superficie de respuesta (MSR) (JMP 5.0.1, 2002, SAS Institute, Cary, NC, USA) con un punto central. El contenido de sólidos permaneció constante ajustando el volumen de la solución. El efecto de las variables sobre la respuesta podría describirse como una ecuación polinomial de segundo orden (Ecuación 1):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Donde Y es la respuesta predicha utilizada como variable dependiente,  $x_i$  y  $x_j$  son los niveles de las variables  $\beta_0$  el término constante,  $\beta_i$  el coeficiente de los términos lineales,  $\beta_{ii}$  el coeficiente de los términos cuadráticos y,  $\beta_{ij}$  el coeficiente

de los términos cruzados (Sahu *et al.*, 2016). La cantidad de enzima inmovilizada en el compuesto de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas) se determinó restando la concentración final a la inicial de las enzimas en el medio de inmovilización. El contenido de proteína se midió usando el ensayo de proteína de Bradford (1976) con albumina de suero bovino como estándar. Se midió el peso de la masa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano atraída por un imán férnico permanente (0.39 T) como una medida indirecta de la capacidad de atracción magnética. Se reportó la cantidad de mezclas de enzimas y la masa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano con relación a los valores máximos como carga relativa de proteína (PL, % p/p) y masa relativa atraída (MA, % p/p). El valor medio (PLMA) de estas dos variables respuesta se maximizó utilizando el software JMP versión 5.0.1.2 (SAS Institute, 2002). Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel  $p < 0.05$  de significancia, y el modelo empírico optimizado se confirmó mediante tres repeticiones. El error estándar de regresión (S) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se utilizaron para evaluar la significancia del modelo. Se realizaron experimentos preliminares para evaluar el efecto de la relación molar 1:1, 1:2 y 2:1 de  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ , además se probaron proporciones en peso de xilanasa:celulasa 1:1, 0.5:1 y 1:0.5 (datos no mostrados).

**Tabla 1.** Diseño personalizado de la MSR para sintetizar partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.

Tratamiento	Factores independientes		
	Quitosano (%)	Tiempo de sonicación (min)	Genipino (%)
1	1.0	3.00	0.100
2	0.5	6.50	0.055
3	1.0	10.0	0.010
4	1.0	6.50	0.055
5	0.5	6.50	0.010
6	1.5	3.00	0.055
7	1.5	6.50	0.055
8	0.5	3.00	0.010
9	1.5	3.00	0.010
10	1.0	10.0	0.100
11	1.0	6.50	0.055

La formulación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano que presentaron significativamente mayor retención de proteína y mayor masa atraída por un magneto, fueron las elegidas para la inmovilización de las enzimas.

#### **5.4. Caracterización magnética, térmica, estructural y química de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas**

Todas las caracterizaciones físicas, químicas, y bioquímicas se realizaron para el tratamiento optimizado de la síntesis del soporte magnético y la inmovilización enzimática.

Las propiedades magnéticas de los compuestos se determinaron por medio de saturación magnética a temperatura ambiente (27 °C) con un campo máximo de  $\pm 18$  kOe utilizando un MPSM–XL con un detector SQUID (Quantum Design, San Diego, CA, USA) que es capaz de determinar las señales de magnetización bajas, si es posible que pudieran estar presentes en el material de estudio.

La identificación de los grupos funcionales en la superficie de los compuestos  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas y enzimas libres, fueron investigadas por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT–IR) usando un espectrofotómetro Perkin–Elmer equipado con un accesorio de Reflectancia Total Atenuada Universal (U–ATR, Shelton, CT, USA). Las muestras se escanearon 25 veces en un intervalo de 4000 a 550  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

El análisis termogravimétrico (ATG) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas y las enzimas libres se realizaron mediante un analizador simultáneo TGA–DSC/DTA NETZSCH–STA 449 F1 Júpiter (Burlington, MA, USA) y un calorímetro Perkin Elmer DSC8500 LAB SYS (Waltham, MA, USA). La degradación térmica se realizó a una velocidad de

calentamiento de 10 °C/min de 25 a 900 °C en atmosfera de argón con un flujo de 50 mL/min, trabajando a presión atmosférica.

Para la caracterización estructural, los patrones de difracción de rayos-X (DRX) del compuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano antes y después de la inmovilización enzimática se realizaron en un difractómetro de polvo de rayos-X de ánodo rotatorio a 40 kV, 30 mA (Rotaflex modelo RU-200B de Rigaku, Tokio, Japón) con una fuente de radiación CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). Las muestras se escanearon de 3 a 90 ° ( $2\theta$ ) con una velocidad de escaneo de 3 °/min. Además, estos resultados se indexaron mediante los archivos de difracción de polvo PDF (*power diffraction files*) No. 190-191 para identificar los planos cristalinos correspondientes a la estructura cubica de la magnetita; esto mediante una orientación preferencial para este material. El parámetro de celda unitaria de la estructura cristalina se calculó a partir del pico que tenía la intensidad más alta usando la ecuación (2).

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{a^2} (h^2 + k^2 + l^2) \quad (2)$$

donde  $d$  es la distancia interplanar y se puede obtener de la Ley de Bragg,  $hkl$  son los índices de Miller de los planos cristalográficos y  $a$  es el parámetro de celda.

Se determinó la distribución del tamaño de partícula de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas dispersas en etanol absoluto usando un Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). Para confirmar el tamaño de partícula de los compuestos se caracterizó a 120 kV y 70 mA con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (JEOL 1210, Tokio, Japón). Se utilizó el software DigitalMicrograph (Gtan, Pleasanton, CA, USA) para determinar el tamaño de partículas individuales en las imágenes TEM. Las muestras se prepararon disolviendo 1 mg de compuesto en 1 mL de etanol, sonicando durante 10 min, estos se colocaron en celdas de Cu para hacer el análisis. Para determinar el diámetro medio de las partículas, se midieron 25 partículas

individuales de 5 micrografías TEM. La morfología de compuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano antes y después de la inmovilización enzimática se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en modo de alto vacío (SEM modelo Quanta FEI 200 FEG–ESEM) equipado con un sistema de dispersión de energía de rayos–X (EDX) para medir la composición elemental, se utilizó en modo de alto vacío con un voltaje de aceleración de 200 kV para alta resolución.

La composición química de los materiales compuestos se evaluó mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos–X (XPS), el análisis se realizó a temperatura ambiente con un espectrómetro hemisférico PHOIBOS 150 (SPECS GmbH, Berlín, Alemania) en una presión base de 1 x 10<sup>-10</sup> mbar usando radiación monocromática Al K $\alpha$  (1486.74 eV) como fuente de excitación.

### 5.5. Determinación del grado de reticulación de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas

El grado de reticulación de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas se determinó mediante el ensayo de ninhidrina (NHN) (Yuan *et al.*, 2007). El ensayo determina el porcentaje de grupos amino libres que quedan en los Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas después de la reticulación. La cantidad de los grupos amino libres en la muestra de prueba, después de calentar con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia óptica de la solución a 570 nm leída con un lector de absorbancia de microplacas (iMark BIO-RAD, Hercules, California, E.U.). La concentración de grupos NH<sub>2</sub> libres en la muestra se determinó a partir de una curva estándar de glucosamina.

El grado de reticulación de la muestra se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de reticulación} = \frac{[(\text{NHN amina reactiva})_{\text{inicial}} - (\text{NHN amina reactiva})_{\text{final}}]}{(\text{NHN amina reactiva})_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

donde “inicial” corresponde a la fracción molar de  $\text{NH}_2$  libres de las muestras no reticuladas y “final” corresponde a la fracción molar de  $\text{NH}_2$  libre restante de las muestras reticuladas (Yuan *et al.*, 2007).

### **5.6. Determinación de las actividades de xilanasa y celulasa en $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas**

Los sustratos utilizados para determinar la actividad de la xilanasa fue una suspensión al 1 % (1 g/L) de xilano de madera de haya en amortiguador de citrato–fosfato 0.1 M, pH 5. El sustrato para la actividad de celulasa fue una cantidad de papel filtro Whatman No. 5 en amortiguador de citrato–fosfato 0.1 M pH 5. Cada sustrato se puso en contacto con  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas durante un tiempo determinado (10 min para xilanasa y 30 min para celulasa) y fueron incubadas a 70 y 60 °C para su hidrólisis, respectivamente. Se cuantificó la concentración de azúcares reductores liberados de acuerdo con Miller (1959) usando una curva estándar de xilosa y glucosa. Una unidad de actividad enzimática (U) fue la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de xilosa o glucosa por minuto a 70 y 60 °C, respectivamente.

### **5.7. Determinación del efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática**

Los efectos de la temperatura y el pH de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas fue determinado ensayando la actividad enzimática luego de incubarla en un rango de 30 °C a 90 °C (en intervalos de 10 °C) durante 10 y 30 min para xilanasa y celulasa, respectivamente. Utilizando un baño seco y después de enfriarla a 4 °C. La energía de activación ( $E_a$ ) de las enzimas libres y después de hacer la inmovilización se calculó según lo descrito por Amaro–Reyes *et al.*, (2011) siguiendo el comportamiento de Arrhenius trazando una gráfica de  $\ln$  (actividad relativa) vs (temperatura absoluta, K)<sup>-1</sup>, la pendiente de esta grafica indica ( $-E_a/R$ )

donde R es la constante universal de los gases ideales. El efecto del pH sobre la actividad enzimática de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas se estudió mediante la incubación en amortiguador de citrato–fosfato para valores de pH de 3 – 9, durante 10 y 30 min para xilanasas y celulasas, respectivamente. Los resultados se expresaron como la actividad relativa de cada una de las enzimas.

### **5.8. Determinación de parámetros cinéticos**

Los parámetros cinéticos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y enzimas libres fueron determinados midiendo las velocidades iniciales de reacción de cada una de las enzimas con diferente concentración de sustrato en las condiciones de temperatura y pH óptimos de cada una de estas. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron determinados mediante gráficas de Lineweaver-Burk.

### **5.9. Capacidad de reutilización de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas**

La capacidad de reutilización de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas se evaluó ensayando la actividad catalítica en sucesivos ciclos. Cada ciclo consistió en la determinación de las actividades de xilanasas y celulasas en  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas y la inmediata recuperación de las mismas mediante un magneto comercial de neodimio permanente (1.2 T). Posteriormente fueron lavadas con amortiguador correspondiente para reutilizar las nanopartículas.

### **5.10. Hidrólisis enzimática de los residuos olote y pericarpio de maíz mediante $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas**

La hidrólisis enzimática para la obtención de oligosacáridos (xilo-oligosacáridos y celo-oligosacáridos) a partir del residuo de olote y pericarpio de maíz mediante  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas se realizaron de acuerdo a lo descrito por Makaravicius *et al.*, (2012) con algunas modificaciones. Se suspendieron 40 mg del sustrato en 1 mL de solución tampón a 50 mM de citrato–

fosfato (pH 4) y se incubaron los  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas (concentraciones 0.1 p/v) durante 2 h para el caso del olote y 24 h para el pericarpio a 60 °C. Se recuperó el producto de la hidrólisis enzimática para su análisis.

### 5.11. Caracterización de los productos de hidrólisis enzimática

Los productos de hidrólisis de los desechos de mazorca de maíz (olote y pericarpio) se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cloroformo/ácido acético/ $\text{H}_2\text{O}$  (6:7:1, v/v) como fase móvil. La cromatografía fue teñida mediante la humectación de la fase estacionaria con una solución de ácido sulfúrico/etanol (5:95 v/v) para posteriormente revelar las muestras con 10 min de calentamiento a 110 °C (Huy *et al.*, 2013). Se utilizaron xilosa, arabinosa, ribosa, glucosa, galactosa, fructosa, manosa, maltosa, sacarosa y celobiosa como respectivos estándares, y se calcularon los factores de retención (Rf) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente hasta el frente del eluyente}} \quad (4)$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha.

### 5.12. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportados como la media de los datos  $\pm$  la desviación estándar. El diseño de experimentos y el análisis de los datos (con  $p < 0.05$  como el nivel mínimo de significancia) se realizaron mediante el software JMP versión 5.0.1.2 (SAS Institute, 2002).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Preparación de partículas de magnetita recubiertas con quitosano e inmovilización enzimática

Las nanopartículas superparamagnéticas recubiertas *in situ* con quitosano se prepararon mediante coprecipitación de solución de sales de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  en condiciones alcalinas añadiendo un tratamiento de sonicación.

El rendimiento de sólidos de la reacción de síntesis de compuestos magnéticos después de la reticulación fue de  $57.4 \pm 5.1$  % (p/p). Los coeficientes de regresión estimados para PLMA fueron estadísticamente significativos excepto los términos cuadráticos para sonicación y reticulante ( $p > 0.05$ ) (Tabla 2). El error estándar de regresión ( $S$ ) = 1.5 % indica un buen ajuste del modelo de regresión.  $S$  representa la distancia estándar a la que están situados los valores de los datos con relación a la línea de regresión, o la desviación estándar de los residuos. La predicción de la suma de cuadrados (PRESS) = 58.2 indica la capacidad predictiva del modelo y se utiliza para calcular  $R^2$  predicho. En general, cuanto menor sea el valor PRESS, mejor será la capacidad predictiva del modelo. El valor de  $R^2$  fue de 98.5 %, indicando el porcentaje de variación de la variable respuesta explicado por su relación con una o más variables predichas. El valor de  $R^2$  (predicho) = 96.7 % sugiere una gran capacidad predictiva del modelo. El valor de  $R^2$  (ajustado) = 97.4 % es el porcentaje de variación de la variable respuesta explicado por su relación con una o más variables predictoras, ajustado por el número de predictores en el modelo. En general, cuanto más se acerque  $R^2$  a 100 %, mejor será el ajuste del modelo a los datos.

A partir del ANOVA (Tabla 3), los valores de  $p$  pequeños para las interacciones ( $p = 0.001$ ) y los términos cuadrados de quitosano ( $p = 0.000$ ) sugiere curvatura en la superficie de respuesta (Figura 1). El modelo esperado es representado por la Ecuación 2.

$$\text{PLMA} = 56.23 - 9.60Q + 11.38S - 177.5R + 26.61Q^2 + 0.1077S^2 + 104R^2 - 11.233Q*S + 203.1Q*R - 16.60 S*R$$

donde PLMA corresponde al valor medio de proteína relativa absorbida y masa relativa atraída, Q quitosano, S a sonicación y R al reticulante.

**Tabla 2.** Resultados de la síntesis de partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.

Tratamiento	Factores independientes			Variables respuesta		
	Qitosano (%)	Tiempo de sonicación (min)	Genipino (%)	Proteína relativa absorbida por el soporte (%)	Masa relativa atraída (%)	PLMA* (%)
1	1.0	3.00	0.100	10.40 + 0.34	93.43 + 0.11	73.26 + 0.00
2	0.5	6.50	0.055	69.59 + 0.42	98.18 + 0.18	90.28 + 0.03
3	1.0	10.0	0.010	50.11 + 1.64	96.11 + 0.25	84.05 + 0.22
4	1.0	6.50	0.055	15.50 + 0.23	96.84 + 0.09	74.51 + 3.28
5	0.5	6.50	0.010	100.00 + 5.59	99.07 + 0.38	98.25 + 1.11
6	1.5	3.00	0.055	71.58 + 0.47	98.27 + 0.01	90.82 + 0.13
7	1.5	6.50	0.055	1.55 + 0.24	95.66 + 2.72	72.05 + 2.10
8	0.5	3.00	0.010	0.63 + 0.18	100.00 + 0.12	75.08 + 0.05
9	1.5	3.00	0.010	60.82 + 0.21	96.67 + 0.01	87.04 + 0.06
10	1.0	10.0	0.100	0.69 + 0.05	96.46 + 0.05	72.45 + 0.05
11	1.0	6.50	0.055	15.50 + 0.08	96.24 + 0.22	74.52 + 3.01

\*PLMA: valor medio  $\pm$  desviación estándar (n = 3) de proteína relativa absorbida y masa relativa atraída.

Los experimentos de confirmación dieron un valor de PLMA de  $95.1 \pm 7.6$  % (p/p) usando la solución global predicha de optimización de respuesta con quitosano = 0.5 % (p/p), sonicación = 10 min y reticulante = 0.01 % (v/v) de acuerdo con el valor predicho. La curva mostró el efecto positivo del tiempo de sonicación más largo en el valor de PLMA, mientras las concentraciones más bajas de quitosano y genipino. Mediante la aplicación de una mayor energía sonora a bajas cantidades de quitosano en las muestras, podría producir partículas más pequeñas que poseen mayor área de superficie para interactuar con la proteína y el agente de reticulación. El grado de reticulación entre la proteína y el genipino puede ser alto (alrededor de 80–86 %), incluso en una baja adición de genipino (Ge *et al.*, 2016). Un número limitado de estudios han utilizado enfoques de MSR para optimizar la generación de nanopartículas magnéticas para la inmovilización enzimática. La MRS mantiene el número de experimentos a un mínimo para un número relativamente grande de factores significativos en

comparación con aquellos que implican el simple diseño de "un factor a la vez" (Azari *et al.*, 2017).

**Tabla 3.** ANOVA para el diseño personalizado de la MSR para sintetizar partículas magnéticas maximizando la cantidad de carga relativa de proteínas y la masa atraída.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$F_c$	Valor $p$
Modelo	9	1715.75	190.639	89.45	0.000
Lineal	3	451.64	150.546	70.64	0.000
Quitosano	1	332.10	332.096	155.83	0.000
Sonicación	1	34.66	34.659	16.26	0.002
Reticulante	1	72.28	72.285	33.92	0.000
Cuadrático	3	89.31	29.769	13.97	0.000
Quitosano*Quitosano	1	88.53	88.529	41.54	0.000
Sonicación*Sonicación	1	3.45	3.452	1.62	0.227
Reticulante*Reticulante	1	0.09	0.088	0.04	0.842
Interacción	3	984.29	328.097	153.95	0.000
Quitosano*Sonicación	1	722.13	722.131	338.84	0.000
Quitosano*Reticulante	1	39.02	39.025	18.31	0.001
Sonicación*Reticulante	1	48.61	48.608	22.81	0.000
Error	12	25.57	2.131		
Total	21	1741.33			

El procedimiento descrito en el presente trabajo es rápido, sencillo y no requiere productos químicos nocivos (Kefeni *et al.*, 2017; Shokrollahi 2017). El genipino es un compuesto heterocíclico de origen natural utilizado como producto químico no tóxico para la reticulación de proteínas y polisacáridos (Tokareva *et al.*, 2017). Por lo tanto, el genipino es ampliamente utilizado para reemplazar al glutaraldehído y formaldehído como agente reticulante biológico para las proteínas debido a unas 10,000 veces menos toxicidad (Ge *et al.*, 2016).

Una representación gráfica del sistema después de la síntesis de  $Fe_3O_4@$ Quitosano y la inmovilización enzimática se ejemplifica en la Figura 1. Esto de acuerdo a las posibles interacciones entre el soporte sintetizado, el agente de reticulación y las enzimas.

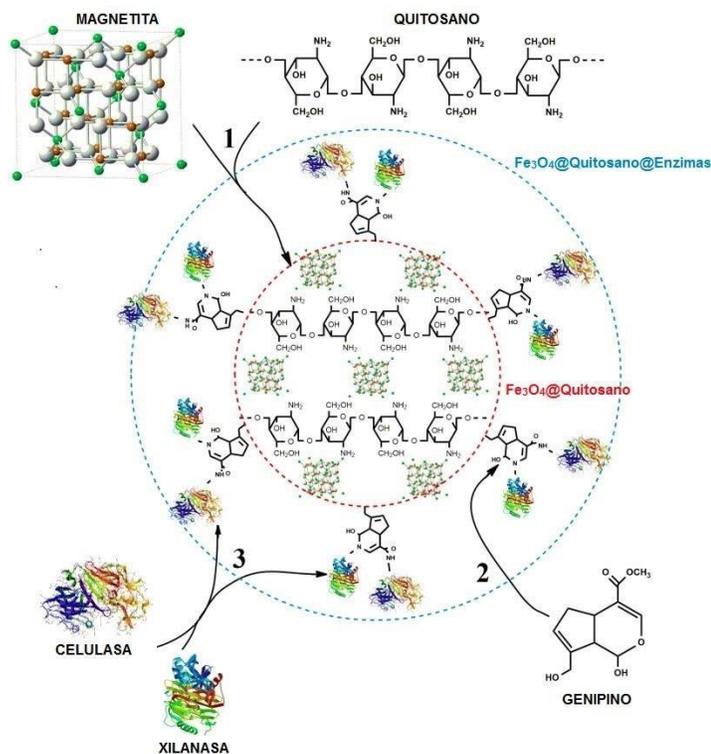


Figura 1. Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano) e inmovilización enzimática (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas) por reticulación con genipino.

## 6.2. Caracterización magnética, térmica, estructural y química de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas

### 6.2.1. Magnetismo

Las propiedades magnéticas de los materiales se midieron a temperatura ambiente (27 °C), la Figura 2 muestra los ciclos de histéresis antes y después de la inmovilización enzimática, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas respectivamente; así como de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, obteniendo los valores de saturación de magnetización de 57 emu/g, 55 emu/g y 59 emu/g, respectivamente. Los valores de magnetización de saturación fueron menores para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas en comparación con Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sin recubrimiento, esto debido a la presencia de quitosano y las enzimas que han quedado inmovilizadas.

Los valores de magnetización de saturación son coherentes con los informados en la literatura para las nanopartículas de magnetita (Kefeni *et al.*, 2017; Al-Qodah *et al.*, 2017; Sánchez–Ramírez *et al.*, 2016).

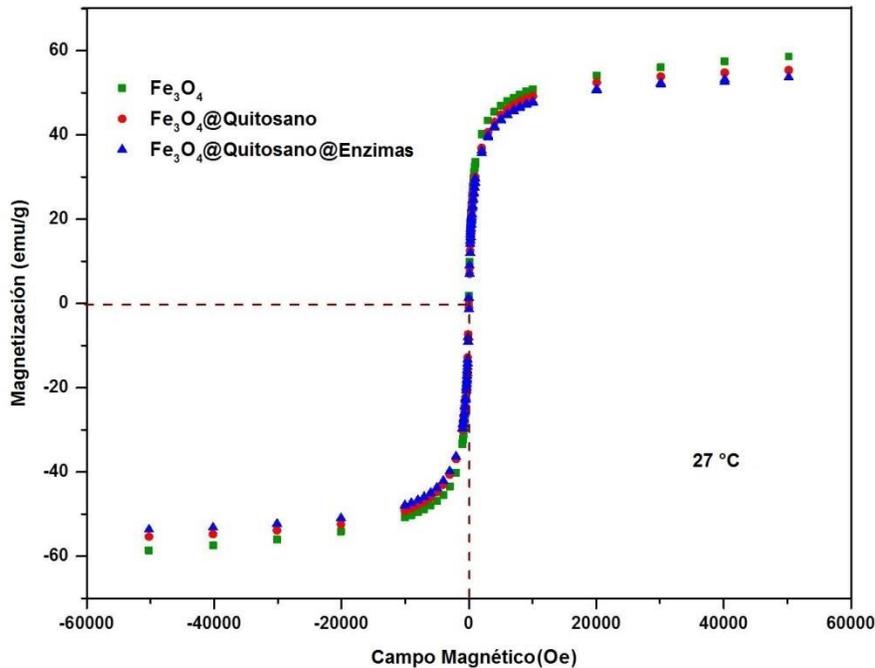


Figura 2. Curvas de magnetización de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$ .

La Figura 2 confirma el comportamiento superparamagnético de cada uno de los materiales evaluados, esto debido a que la coercitividad y la remanencia de las curvas tienden a cero, comportamiento característico de las partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Assa *et al.*, 2016; Shokrollahi, 2017; Li *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2009; Atacan y Özacar, 2015). Las propiedades superparamagnéticas de los materiales pueden atribuirse al pequeño tamaño de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Safari y Javadian 2014). La disminución de magnetización en  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$  se atribuye a la presencia de materiales no magnéticos en la superficie de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Pariona *et al.*, 2016; Sánchez-Ramírez *et al.*, 2016). Esta disminución de magnetización (3.5 %) después de la inmovilización son relativamente pequeños en comparación con los obtenidos por Sánchez-Ramírez *et al.*, (2016), que presenta una reducción

aproximada del 17 % después de realizar la inmovilización de una celulasa en nanopartículas magnéticas revestidas con quitosano.

Las curvas de magnetización tanto de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano como de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas no muestran apertura de histéresis y son completamente reversibles a temperatura ambiente (Mohapatra *et al.*, 2009). Estas curvas de magnetización indican que la magnetización de saturación no se ve afectada cuando se tienen las enzimas inmovilizadas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas) con relación al  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano. Una propiedad magnética con esta magnitud tanto para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano como para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, es suficientemente fuerte para ser rápida y fácilmente separada de la mezcla de reacción por un campo magnético (Safari y Javadian, 2014). La mayoría de los materiales biológicos incluyendo enzimas y quitosano exhiben propiedades diamagnéticas o no magnéticas. Por lo tanto, la separación magnética selectiva puede lograrse utilizando magnéticamente sensibles a las enzimas inmovilizadas a partir de mezclas biológicas (Hyeon *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2016).

### **6.2.2. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)**

Con la finalidad de determinar la presencia de hierro en las nanopartículas de quitosano ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano) y la interacción de las enzimas con el soporte sintetizado ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas), se realizaron las pruebas de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros FT-IR de quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se encuentran bien documentados (Garnica-Palafox y Sánchez-Arévalo, 2016; Soares *et al.*, 2016). La Figura 3 muestra los espectros FT-IR obtenidos tanto para el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas así como las enzimas libres.

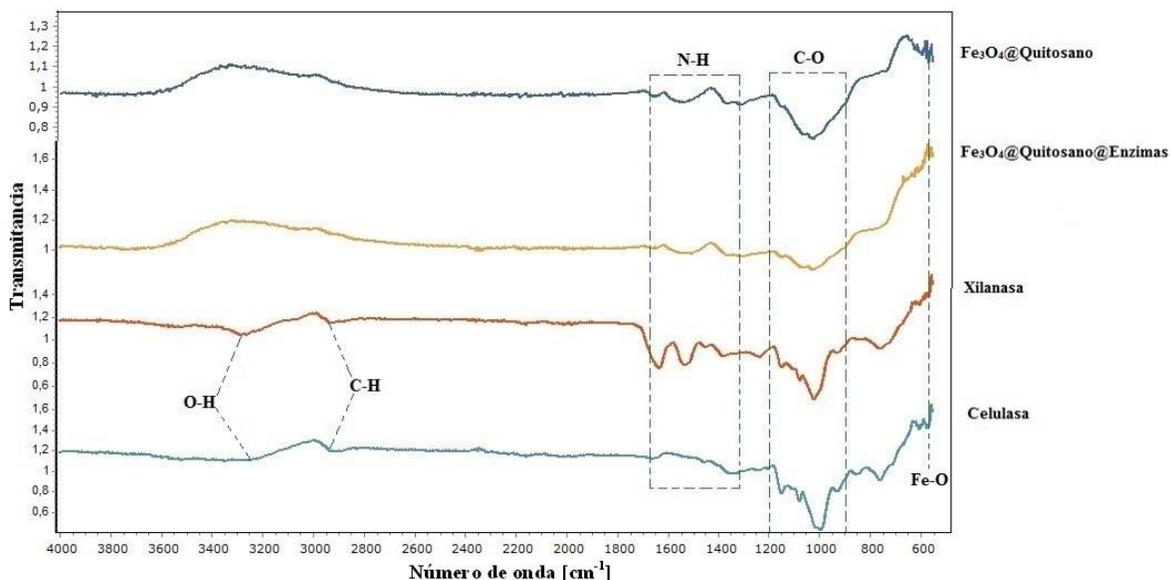


Figura 3. Espectros FT-IR de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas y enzimas libres.

Los espectros de las enzimas libres muestran señales alrededor de  $2940\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a enlaces C-H en grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , así como una señal a  $3300\text{ cm}^{-1}$  asignada a los enlaces -OH (Safari y Javadian, 2014; Zdarta *et al.*, 2016). Las bandas entre aproximadamente  $1350\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$ , se encuentran relacionadas con grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) presentes tanto en el quitosano como en las enzimas. Las señales entre  $1900\text{ cm}^{-1}$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a enlaces C-O en las enzimas disminuyeron después de la reticulación con  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano. Algunas de las señales que se identificaron por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  pueden asignarse a enlaces C-C. Se observaron bandas típicas inferiores a  $700\text{ cm}^{-1}$  identificadas como enlaces Fe-O, características de la magnetita, en todos los espectros alrededor de  $570\text{ cm}^{-1}$  (Mohapatra *et al.*, 2009; Atacan y Özacar, 2015).

Debe tomarse en cuenta la intensidad de la banda procedente de las vibraciones de los grupos funcionales al hacer la incorporación del quitosano con la magnetita y la posterior inmovilización de las enzimas en el soporte magnético. Así como también el desplazamiento hacia un valor de número de onda más alto o

más bajo, que sugieren la formación de enlaces entre las enzimas y el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano. Por esto, el cambio en la intensidad, así como el desplazamiento de las bandas  $\text{NH}_2$ ,  $\text{C}-\text{O}$  y  $\text{Fe}$  después de la reticulación indica la formación de enlaces covalentes entre las enzimas y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano (Sánchez–Ramírez *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2016). Además, Zdarta *et al.*, (2016) lo confirma mencionando que esto es una prueba de la unión efectiva del biocatalizador a la matriz. Por otro lado, los informes sobre la relación molar de quitosano/genipino, o la relación molar entre los grupos amino reaccionados y los grupos amino libres de quitosano que pueden encontrarse en la literatura no son concluyentes, a pesar de la instrumentación analítica disponible (Muzzarelli *et al.*, 2016).

### **6.2.3. Análisis Termogravimétrico (ATG) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en ingles)**

Para los análisis ATG y DSC de las muestras se realizaron en el intervalo de 25–900 °C. En el intervalo de 25–150 °C se puede analizar el efecto del flujo de energía sobre la estabilidad de las enzimas. Las curvas de pérdida de peso de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas y de las enzimas libres se muestran en la Figura 4.

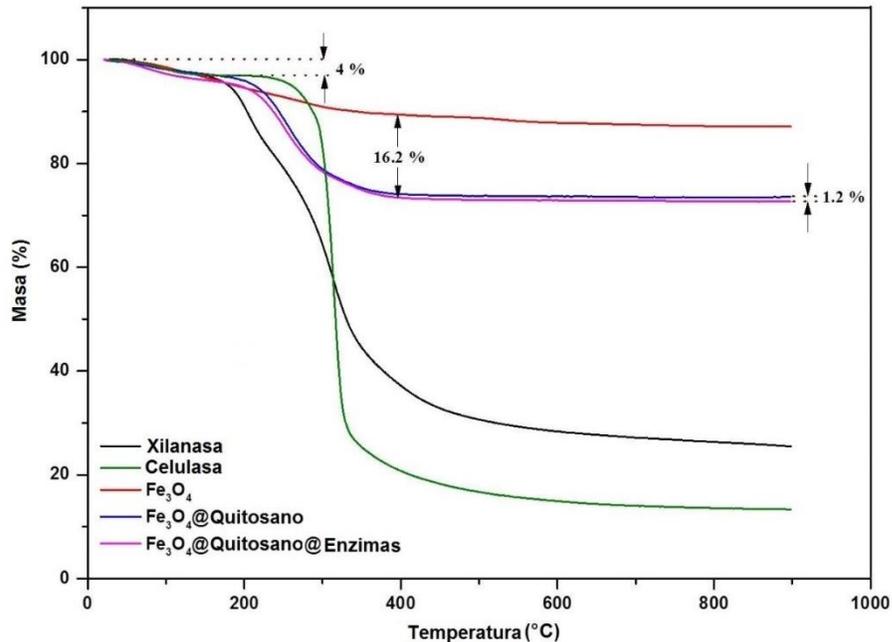


Figura 4. ATG de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$  y enzimas libres.

Los perfiles de los termogramas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$  muestran pérdida de peso similar de aproximadamente 1.4 % a temperaturas que varían desde 65 a 120 °C. Lo anterior debido principalmente a la pérdida de agua adsorbida físicamente y/o débilmente unida al hidrogeno en las moléculas de quitosano (Zdarta *et al.*, 2016). Se observó una pérdida de peso de 2.3 %, 2.5 % y 2.3 % para la xilanasa, celulasa y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en el mismo intervalo de temperaturas. Adicionalmente,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$  muestran un primer cambio en el flujo de calor asociados con las transiciones térmicas a 39 °C y 41°C, ligeramente superior a la xilanasa 38 °C, celulasa 30 °C y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  35 °C. Además, todas las muestras excepto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quitosano@Enzimas$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  muestran una señal exotérmica asociada con cambios estructurales o ruptura de enlaces, mientras que el comportamiento endotérmico está asociado con la absorción de energía probablemente debido a la desnaturalización de proteínas.

Estos resultados sugieren que las enzimas reticuladas al  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano tienen una fuerte interacción que aumenta la estabilidad conformacional de la forma nativa, proporcionando una estabilidad térmica. El aumento adicional de la temperatura a 120–900 °C da lugar a una pérdida de peso total 12.9 %, 40.5 %, 39.6 %, 86.7 % y 96.2 % para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas, celulasa y xilanasas, respectivamente. Este proceso corresponde a la degradación de la matriz del biopolímero. Debido a lo anterior, se infiere que el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano puede proporcionar cierta estabilidad térmica, como puede distinguirse en la Figura 4. Las enzimas inmovilizadas en este soporte podrían tolerar condiciones térmicas superiores comparadas con las enzimas en estado libre.

Además de medir la estabilidad térmica de los compuestos, los resultados del ATG, nos ayudan a estimar la cantidad de enzima que se ha quedado adherido a la superficie de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano utilizando los cambios en el contenido de masa total entre  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y después de haber realizado la inmovilización ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas). En este caso, se puede inferir que el 1.2 % del peso total de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas equivale al peso de las enzimas.

#### **6.2.4. Difracción de rayos-X**

El análisis de difracción de rayos-X se utilizó para investigar la estructura cristalina de los materiales compuestos, para comprobar que el soporte magnético no haya sufrido cambios en su estructura cristalina durante su preparación y en el proceso de inmovilización enzimática. Los patrones de difracción de los compuestos magnéticos se muestran en la Figura 5. Se identificaron señales bien definidas, esto nos indica que la estructura de las partículas magnéticas permanece esencialmente sin cambios durante el recubrimiento con quitosano y la reacción de reticulación con las enzimas.

Las señales representadas en los espectros XDR de los compuestos a  $2\theta = 30.1^\circ, 35.3^\circ, 43.1^\circ, 53.5^\circ, 56.9^\circ$  y  $62.7^\circ$  correspondientes a los planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) respectivamente (Safari y Javadian 2014; Kefeni *et al.*, 2017), estos son característicos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Swarnalatha *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2014; Farjadian *et al.*, 2017). Los patrones podrían estar completamente sincronizados con la estructura cúbica de la espinela inversa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  puro, con un parámetro de celda unitaria  $a = 0.83$  nm y una célula unitaria que comprende 24 átomos de Fe y 32 átomos de O (Figura 6). Como no se detectan otras señales de reflexión más que los de la magnetita, se concluye que se obtuvo alta pureza y buena cristalinidad de los productos exclusivos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Atacan y Özacar 2015) con el método de síntesis propuesto. Las propiedades magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son directamente proporcionales al tipo y distribución de los cationes en los sitios octaédricos y tetraédricos de la estructura de la espinela (Kefeni *et al.*, 2017).

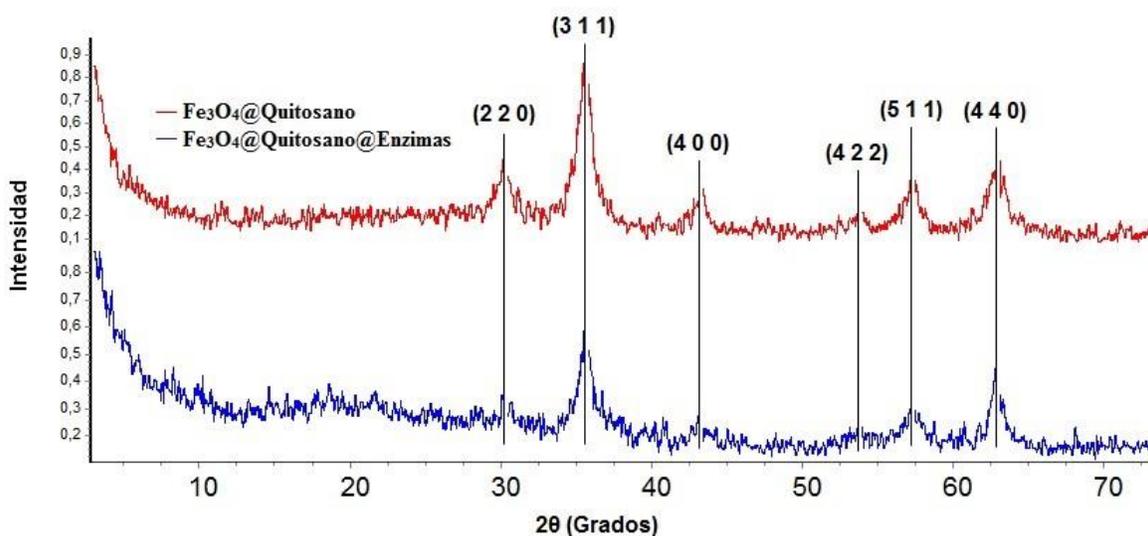


Figura 5. Difracción de rayos-X de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas (las señales de los planos de difracción están indicadas por las líneas continuas).

Retomando otra de las técnicas para determinar el tipo de material, se tomaron también las imágenes de difracción por TEM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas (Figura 7a y 7b, respectivamente). Estas figuras

también muestran el patrón estándar de difracción correspondiente al de espinela inversa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Mohapatra *et al.*, 2009) así como el tamaño de los anillos de difracción de cada uno de ellos (Figura 7c). Con esto, se puede afirmar que la modificación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  al incorporar el quitosano y después de haberse funcionalizado con las enzimas, no condujo a cambio alguno en la estructura cristalina (Safari y Javadian 2014). Esto confirma los resultados de los análisis por DRX.

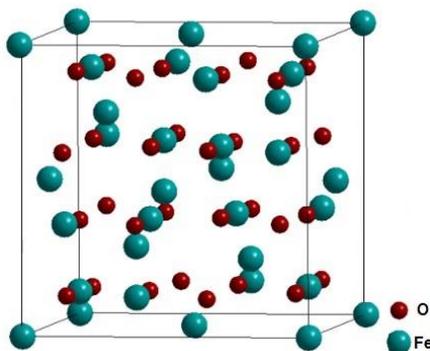


Figura 6. Estructura cúbica de la espinela inversa proyectada de acuerdo al parámetro de celda unitaria para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas (mediante el software Diamond 3.2).

Los valores de los diámetros representados por la Figura 7c, se relacionan con el patrón de DRX. Los diámetros 1 al 6 de cada una de las imágenes de difracción, corresponden a los planos característicos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) respectivamente (PDF No. 190–191). De acuerdo con esto, los valores de los anillos de difracción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas corresponden con los planos característicos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Además, estos últimos coinciden con las señales que aparecen en  $2\theta$  de los análisis por DRX presentados anteriormente, se reafirma que el material sintetizado es  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Aunado a esto, la incorporación del quitosano durante la síntesis del soporte y el entrecruzamiento con las enzimas no induce a ningún cambio en su estructura cristalina como ya se ha mencionado.

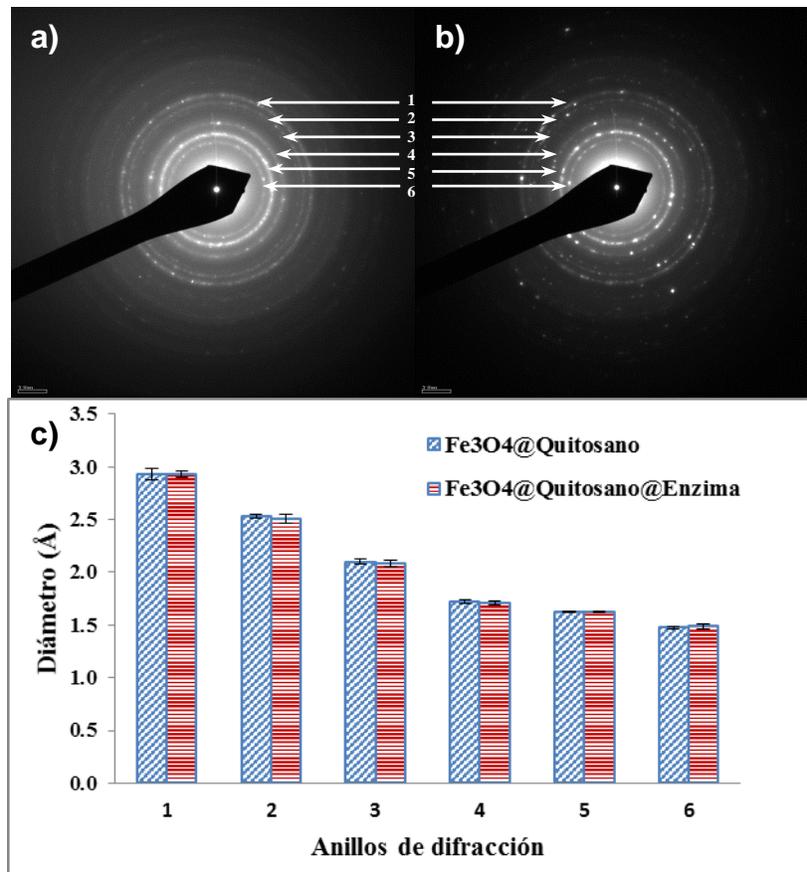


Figura 7. Patrón de difracción por TEM de a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas y c) diámetro de los anillos del patrón de difracción de cada material (Media de tres mediciones ± desviación estándar).

### 6.2.5. Tamaño y distribución de tamaño de partícula

La dispersión de luz dinámica (DLS) se utilizó para obtener la distribución del tamaño de partículas, la Figura 8 muestra los histogramas de la distribución del tamaño de partícula de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas. La Figura 8a indica que las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano tienen una distribución de tamaños de 120–300 nm con un promedio alrededor de 230 nm. La Figura 8b indica que Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas tienen una distribución de tamaños de 150–670 nm con un promedio de 430 nm.

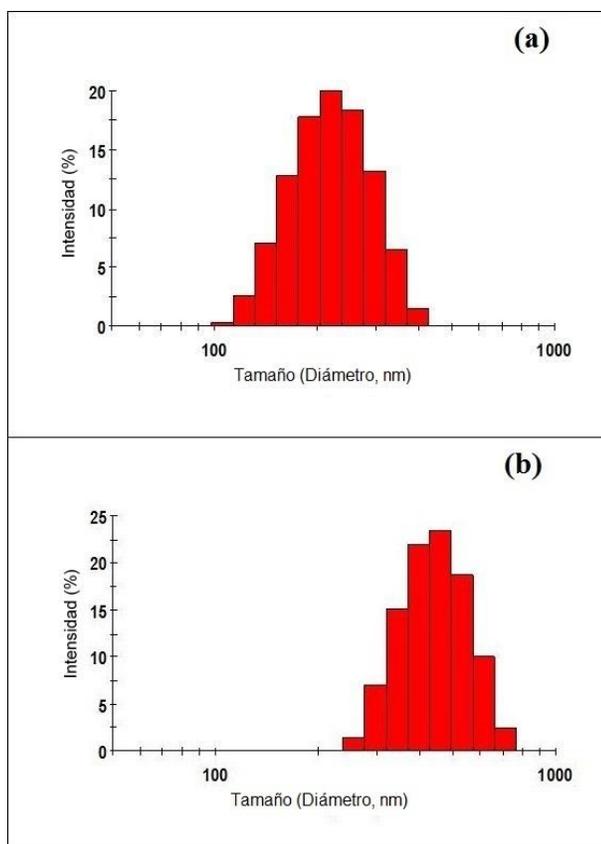


Figura 8. Histogramas DLS de distribución de tamaño por intensidad de partículas mediante Zetasizer de a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano y b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.

El desplazamiento a tamaños mayores después de hacer la inmovilización de las enzimas partiendo de las que tienen el quitosano integrado es evidencia de que estas enzimas se están incorporando al soporte. Debido a que la distribución de tamaño de partícula es mucho mayor de lo que se esperaba, y que los análisis indican presencia de partículas grandes o de sedimentación, así como la presencia de una muestra polidispersa, es preciso realizar la confirmación de los resultados, para ello se realizaron las pruebas de microscopía electrónica de transmisión.

### 6.2.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Considerando que el diámetro de partícula es una característica importante en un soporte para realizar inmovilización (Chen *et al.*, 2013), se realizaron los análisis por TEM de las muestras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas. Con esta técnica se contrastaron los resultados obtenidos por DLS y se realizaron directamente las mediciones del tamaño de partículas individuales.

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran agrupaciones de partículas individuales (Figura 9). El tamaño medio de partícula de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano aumento ligeramente de  $8.5 \pm 0.14$  nm (Figura 9a) a  $10.8 \pm 0.40$  nm (Figura 9b) en  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas después de la reacción de reticulación con genipino. Es preciso mencionar que el diámetro de las nanopartículas individuales antes y después de realizar la inmovilización presenta diferencia significativa, esto posiblemente debido a la presencia de las enzimas en la superficie de las nanopartículas individuales. La distribución de tamaño de partícula obtenido por DLS se refería a aglomeraciones de partículas, siendo estas aglomeraciones las que caracterizaban las muestras como polidispersas y de tamaños mayores a los esperados.

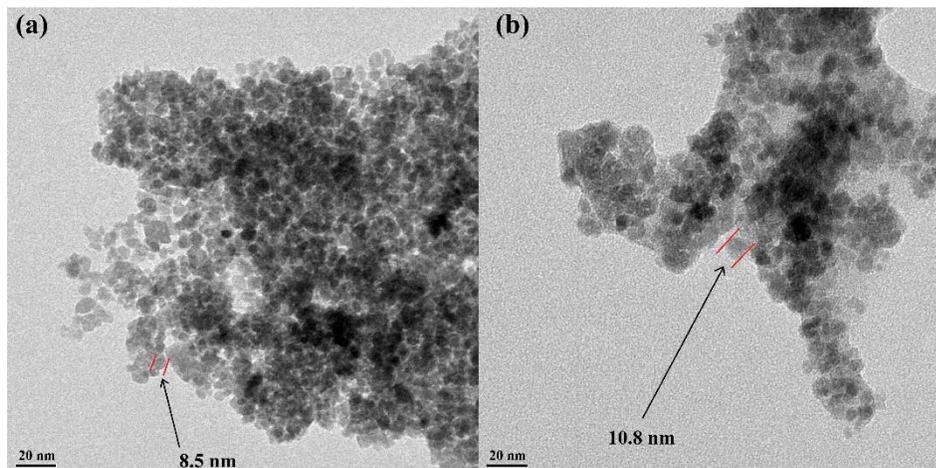


Figura 9. Imágenes TEM de a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano, b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Enzimas. El tamaño de partículas individuales que integran a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Enzimas ( $n = 25$ ; media  $\pm$  desviación estándar. Las mediciones se realizaron con el programa de análisis de imágenes ImageJ 1.32c)

Por otro lado, a partir del parámetro de celda calculado, podemos suponer que cada nanopartícula comprende diez células unitarias. La Figura 9a muestra formas esféricas regulares y definidas, opuestas a la Figura 9b si se observa una capa que cubre la superficie de las MNPs tras la inmovilización de las enzimas. Estas observaciones revelan que después de la inmovilización de las enzimas a partir  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano existe un ligero cambio significativo en el tamaño medio de las nanopartículas magnéticas individuales. El análisis por TEM indica que después de la inmovilización de las enzimas en el compuesto magnético tienen tamaños más grandes que evidencian la reticulación del quitosano con las enzimas, como se ha documentado previamente (Sánchez–Ramírez *et al.*, 2016; Saikia *et al.*, 2016; Yazid *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017). Así también,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  es superparamagnético cuando su tamaño es de alrededor de 10 a 20 nm (Assa *et al.*, 2016; Shokrollahi, 2017), lo que sugiere que nuestras partículas muestran estas propiedades.

#### **6.2.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y análisis composicional**

Se confirmó la morfología heterogénea de las partículas por medio de Microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 10). La interacción entre  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano y las enzimas se confirmó por el análisis EDAX (Tabla 4), donde se observó una disminución en la concentración de Fe. Además, se detectó una mayor concentración de elementos asociados a proteínas tales como oxígeno (O), carbono (C) y nitrógeno (N).

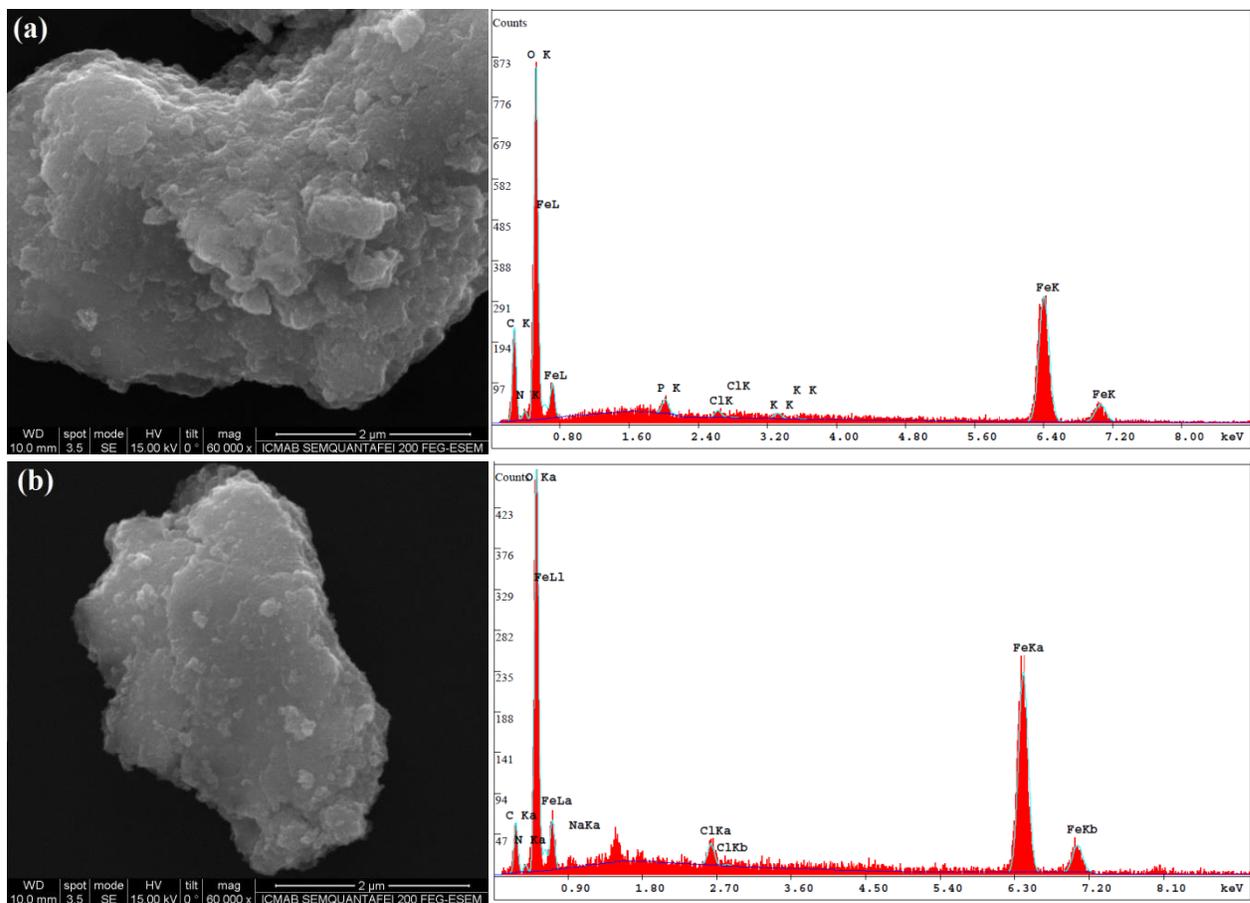


Figura 10. Micrografías SEM (Izquierda) de a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano, b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas y sus respectivos espectros del análisis químico por EDAX (Derecha).

La morfología depende del tamaño que tomen los agregados después de cada etapa del proceso, estos cambios están directamente relacionados con la composición del material que se está incorporando en cada una de estas etapas. Es preciso considerar que los cambios que sufra la morfología de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano serán únicamente por la incorporación de las enzimas sobre la superficie de la misma.

Tabla 4. Composición química en Fe, O, C y N de las muestras a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano y b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas.

Material	Componentes (% peso)			
	Fe	O	C	N
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano	65.88	21.91	9.88	1.06
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Quitosano@Enzimas	51.09	25.23	19.72	1.96

Los resultados de los análisis EDAX que se presentan en la Tabla 4 confirman la incorporación de las enzimas al Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano. Estos resultados y los espectros de la Figura 10 confirman que las enzimas han quedado unidas al soporte magnético al disminuir la concentración de Fe y aumentar las concentraciones de O, C y N que son componentes característicos de la composición de las enzimas.

#### 6.2.8. Análisis químico superficial por Espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS)

Se realizó una estrecha caracterización de la composición elemental de los compuestos magnéticos mediante análisis XPS utilizando Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> como referencia. La Figura 11 muestra los espectros XPS de alta resolución de los componentes Fe, O, N y C de las muestras. La presencia de la magnetita se encuentra en todas las muestras (Figura 11a), se confirma de acuerdo con los picos característicos de Fe2p a 711 y 725 eV y para la línea Fe3p alrededor de 60 eV (Anexo 1), de acuerdo con Martín *et al.*, (2014). En la Figura 11(b) se observaron cambios en las intensidades de señal para los espectros de O1 en todas las muestras. Los picos característicos (entre 530–534 eV) se identificaron a 531,5 eV para C–O y 533 eV para C = O, esto asegura un cambio en la composición química superficial. La presencia de los N1s se identificó a 401 eV (Figura 11c). Además, se observó un aumento de 2 veces en el espectro de N1s presente en Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas, cuando se comparó con Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano. Las ligeras variaciones de las señales correspondientes a C1s (Figura 11d) se

identificaron en un intervalo de aproximadamente 284–290 eV. En este intervalo las señales correspondían a O–C = O (~ 288 eV), C–O–C (~ 287 eV) y C–C (~ 286 eV).

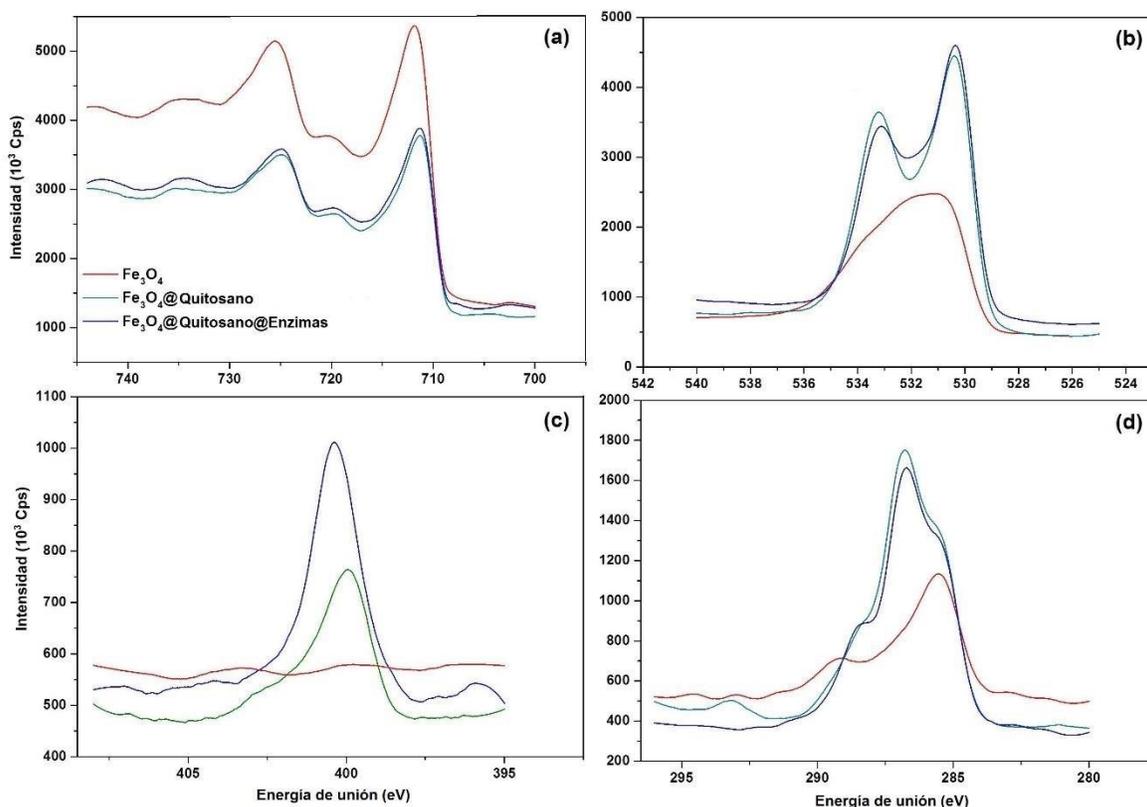


Figura 11. Espectros XPS de alta resolución para a) Fe, b) O, c) N y D) C de las muestras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas.

De acuerdo con los resultados anteriores, y considerando los cambios en las intensidades de las señales de los componentes característicos de las enzimas, se confirma con estos resultados y los observados por EDAX, que las enzimas han quedado adheridas a la superficie de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano.

### 6.3. Grado de reticulación

Se determinó un grado de reticulación del 67 % en el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas después de la reacción de inmovilización. Esto nos indica que alrededor del 67 % de los grupos aminos en

$\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas se encuentran funcionalizados. Por lo tanto, se obtuvo una adecuada eficiencia en la inmovilización enzimática. Este resultado es similar (33–34 %) con los obtenidos por Yuan *et al.*, (2017) quienes evaluaron el grado de reticulación usando microesferas de quitosano y albúmina como una proteína modelo, reticulando estas con genipino.

Se piensa que el grado de reticulación obtenido se debe únicamente a las generadas por las moléculas externas del quitosano, limitando la reticulación de las capas internas que son las que se encuentran unidas a las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

#### 6.4. Actividad catalítica de xilanasas y celulasas en $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas

Los resultados del ensayo de actividad catalítica de las enzimas xilanasas y celulasas libres, así como el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas en diferentes valores de pH se muestran en la Figura 12 y 13. La actividad relativa se calculó considerando su valor máximo como 100 %.

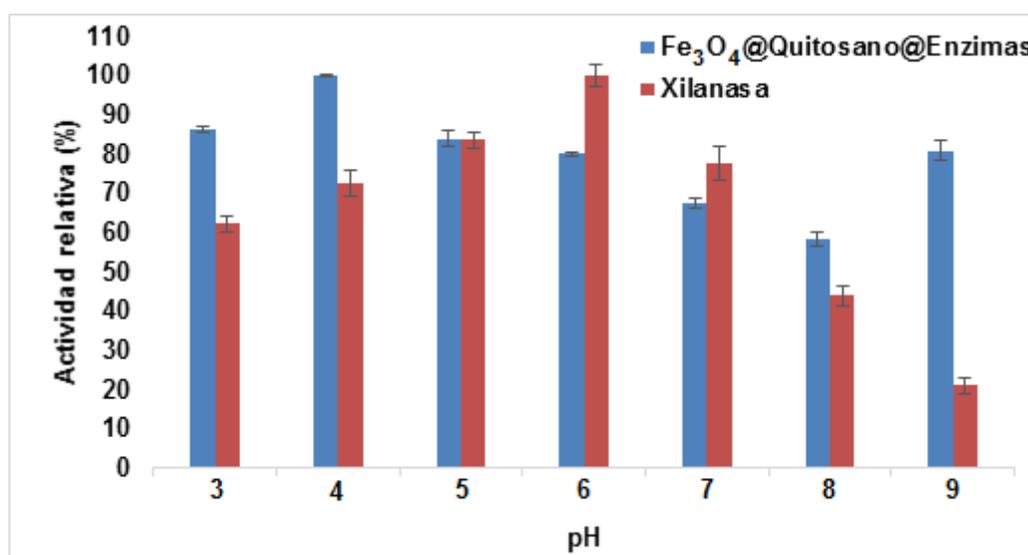


Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad catalítica de xilanasas libres y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con xilano de madera de haya como sustrato.

En la Figura 12 se observa que la mayor actividad de xilanasas es en valores de pH de 6 y 4 para la enzima libre y co-inmovilizada respectivamente. La xilanasas muestra una reducción de más del 50 % de su actividad relativa en valores básicos (8 y 9) de pH. En contraste, la enzima inmovilizada muestra un menor efecto negativo en su actividad en diferentes valores de pH comparada con la enzima libre.

La actividad catalítica de la xilanasas inmovilizada aumenta a valores de pH ácidos en comparación con la enzima libre, teniendo su actividad óptima a valores de pH 4. Estos cambios hacia valores de pH ácidos, según Sánchez-Ramírez *et al.*, (2016) se debe a las fuerzas iónicas entre la enzima y la superficie del soporte. Por lo tanto, se predice que la inmovilización enzimática confiere resistencia a condiciones ácidas.

La actividad catalítica de celulasas libre y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas (Figura 13) se evaluó utilizando papel filtro como fuente de celulosa como sustrato.

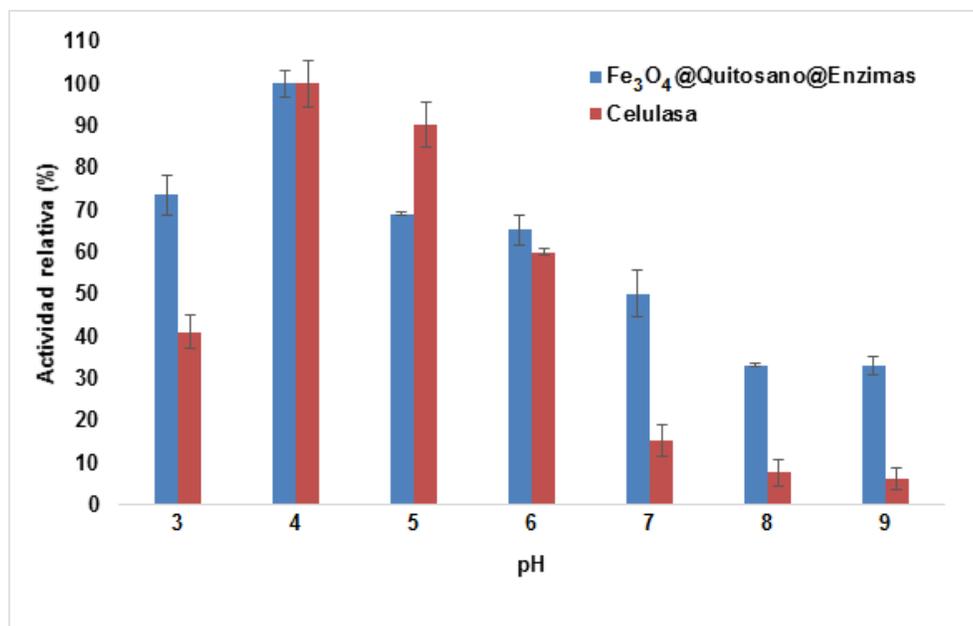


Figura 13. Efecto de pH sobre la actividad de celulasas en la enzima libre y en el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con papel filtro como fuente de celulosa como sustrato.

En la Figura 13 se observa que la actividad óptima de celulasa se mantuvo en los mismos valores de pH, tanto para la enzima libre como para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosano}@Enzimas$ . Caso contrario encontrado con los resultados para celulasa de *Trichoderma viride* reportado por Khoshnevisan, *et al.* (2011), donde se reporta resistencia, pero a valores de pH alcalino. La celulasa libre muestra una reducción del 10 % mientras que estando inmovilizada la reducción alcanza el 30 % a valores de pH 5. Posteriormente, la enzima inmovilizada muestra un menor efecto negativo a pH mayores (6 – 9) comparada con los valores de la celulasa libre que llega a tener reducciones en su actividad superiores al 85 % a partir de valores de pH 6 en adelante.

La Figura 14 muestra el efecto de la temperatura en la actividad de la xilanasas libre y co-inmovilizada. La temperatura óptima de la xilanasas se mantuvo a 70 °C para ambos casos. La enzima libre muestra una reducción del 30 y 50 % de su actividad a temperatura de 60 y 50 °C, respectivamente, mientras que  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosano}@Enzimas$  mantuvo una reducción del 22 % de su actividad a las mismas temperaturas. Posteriormente, la enzima inmovilizada sigue mostrando un menor efecto negativo en su actividad a temperaturas más bajas (40 y 30 °C) comparada con la enzima libre. La temperatura óptima de catálisis para esta enzima es un factor que no es modificado por la inmovilización pero que si mantienen estable los procesos catalíticos a temperaturas inferiores.

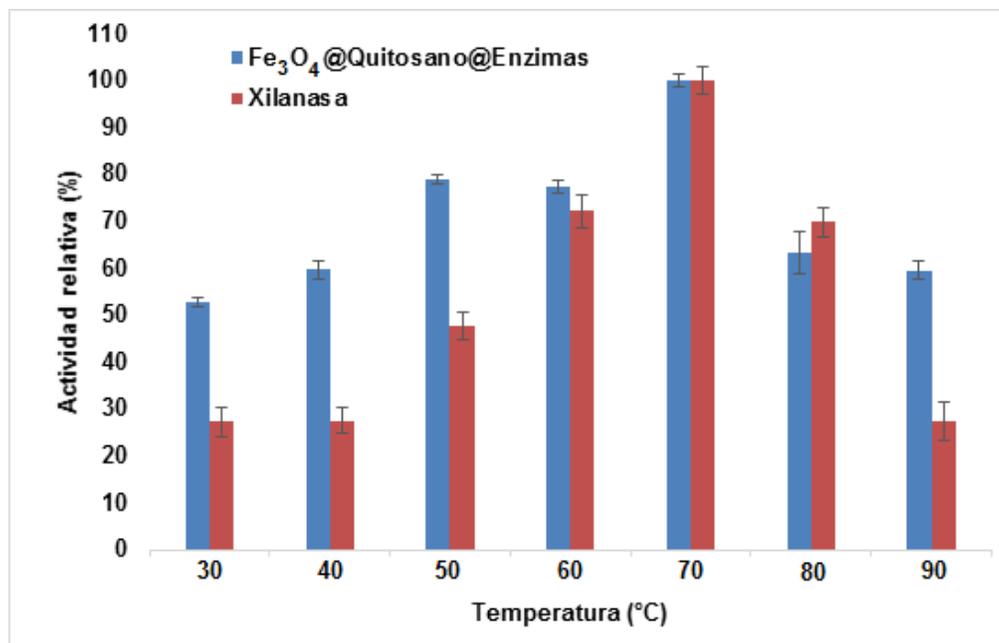


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de xilanasa libre y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas evaluado con xilano de madera de haya como sustrato.

Siguiendo el comportamiento típico de Arrhenius, a partir de la pendiente se observó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.983 y 0.934 para la xilanasa libre y co-inmovilizada, respectivamente, la energía de activación fue de 38.96 kJ/mol y 13.3 kJ/mol en el mismo orden. Por lo tanto, en la xilanasa inmovilizada se necesita una menor cantidad de energía (34 % con relación a lo necesario para la enzima libre) para que el proceso catalítico pueda llevarse a cabo.

La figura 15 muestra el efecto de la temperatura en la actividad catalítica de la celulasa libre y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas. La actividad óptima de celulasa se mantuvo a las mismas condiciones de temperatura (60 °C) tanto para la enzima libre como la inmovilizada. Estos resultados coinciden con los de celulasa de *Trichoderma viride* reportado por Khoshnevisan, *et al.* (2011) debido a que se reporta una temperatura óptima de 60 °C. La actividad catalítica de celulasa libre se ve más afectado a valores superiores (70 °C) que a valores inferiores (50 °C) con referente a su valor óptimo, teniendo una reducción de 38 y 12 %

respectivamente, mientras que para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas la disminución de la actividad se mantiene (35 %) en 50 y 70 °C.

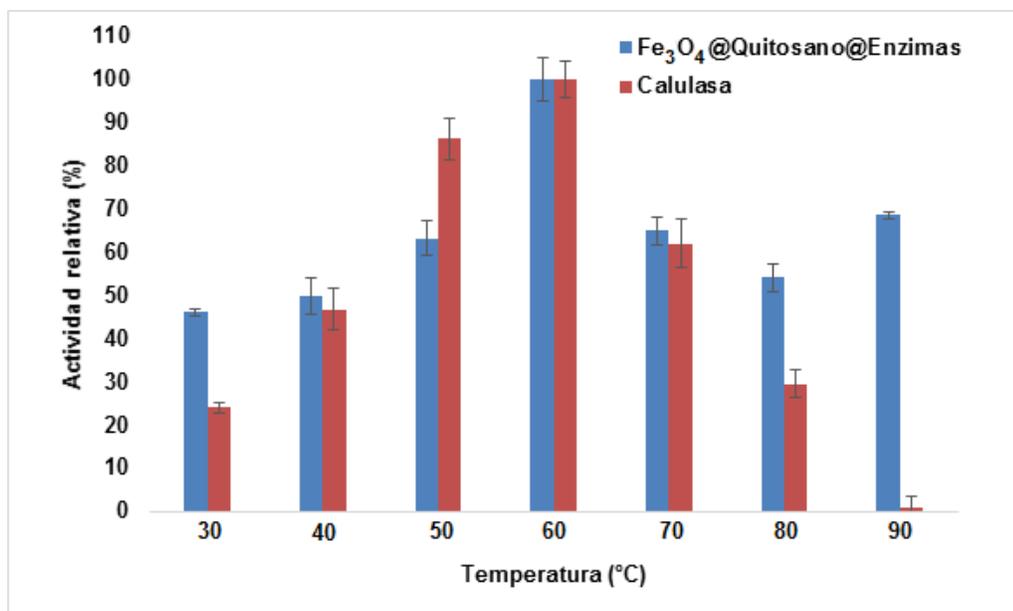


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de celulasa libre y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Enzimas, evaluado con papel filtro como fuente de celulosa como sustrato.

Al igual que sucede con la xilanasas, al seguir el comportamiento a partir de la pendiente, se observó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.95 y 0.96 para la celulasa libre y co-inmovilizada, respectivamente, la energía de activación fue de 41.32 kJ/mol y 30.12 kJ/mol en el mismo orden. Por lo tanto, en la celulasa inmovilizada se necesita una menor cantidad de energía (28 % menos que la enzima libre) para que el proceso catalítico pueda llevarse a cabo.

Estos resultados que se aprecian con el comportamiento de ambas enzimas, se pueden atribuir a los posibles cambios conformacionales en la estructura de las enzimas al hacer la inmovilización, esto debido a los enlaces covalentes que se forman entre el soporte, el agente reticulante y las enzimas. Este aumento de la actividad es atribuido a los mismos cambios conformacionales

al exponer en mayor medida el centro catalítico de las enzimas, y este a su vez tener un mayor contacto con el sustrato.

La reticulación covalente entre los grupos aminos presentes en la superficie tanto de las enzimas como en las nanopartículas magnéticas mediadas por el genipino, ejerce un efecto protector de la actividad en condiciones adversas. Además, se conserva la estabilidad funcional de la misma en forma inmovilizada en comparación con las enzimas libres Talekar *et al.*, (2013). En el mismo sentido, se obtienen enzimas más estables a valores de pH ácidos cuando estas se inmovilizan en nanopartículas magnéticas al formar un gran número de enlaces covalentes entre enzima–enzima y enzima–nanopartícula. Estos enlaces covalentes estabilizan la molécula enzimática y los mantiene en conformaciones activas favorables (Sojitra *et al.*, 2016).

## 6.5. Parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de las enzimas libres y co-inmovilizadas se determinó mediante la representación doble recíproca (representación de Lineweaver–Burk), se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de enzimas libres y  $Fe_3O_4@$ Quitosano@Enzimas.

Parámetros	Enzimas libres		$Fe_3O_4@$ Quitosano@Enzimas	
	Xilanasa	Celulasa	Xilanasa	Celulasa
$K_m$ (mg/mL)	1.84	2747.297	2.669	24.708
$V_{max}$ (mM/mL*min)	5.71	27.027	17.574	9.328

La xilanasa inmovilizada presenta un valor más alto de  $V_{max}$  comparada con la enzima libre, lo que se traduce en una mayor generación de producto de la reacción por unidad de tiempo, velocidad de reacción y eficiencia de la catálisis. Además, presenta mayor afinidad sustrato ( $K_m$ ) que la enzima libre. Esto concuerda con estudios realizados por Liu *et al.*, (2016) donde se evalúa el

genipino como agente de reticulación para la inmovilización de una lipasa. Estas variaciones en los parámetros cinéticos pueden deberse a los posibles cambios conformacionales en la estructura de las enzimas dejando disponibles el sitio activo de las mismas con la reticulación y la unión al soporte; o bien, a la interferencia entre una enzima y otra por cuestiones de espacio de superficie. Resultados similares se han descrito por Wang *et al.*, (2015). Quienes evalúan la inmovilización de una lipasa en nanopartículas magnéticas de quitosano y determinaron que el proceso de inmovilización aumenta o mejora los parámetros de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

Por otro lado, los valores de  $K_m$  de la celulasa inmovilizada disminuyeron con respecto a la enzima libre. Esto significa que la afinidad enzimática al sustrato es aumentada al realizar la inmovilización, por lo que se requiere una menor concentración de sustrato para alcanzar la saturación. Resultados contrarios se ha reportado previamente (Sánchez–Ramírez *et al.*, 2016) al inmovilizar una celulasa covalentemente en nanopartículas magnéticas revestidas con quitosano, utilizando glutaraldehído como agente reticulante. Este efecto fue atribuido a una mayor resistencia del transporte masivo del sustrato hacia los sitios activos.

Comparando los resultados con trabajos similares; en este caso con tres enzimas inmovilizadas en un mismo soporte, los valores de  $V_{max}$  de la co-inmovilización son inferiores a los de las enzimas libres. Lo que nos indica que la velocidad de hidrólisis del sustrato respectivo se reduce después de la inmovilización, esto podría deberse a la formación de una estructura supramolecular compacta debido al reticulante (Sortija *et al.*, 2016).

## **6.6. Capacidad de reúso de $Fe_3O_4@$ Quitosano@Enzimas**

En la Figura 16 se observa la actividad enzimática en condiciones óptimas de actividad cuando se trabaja o se implemente ciclos de reúso. Puesto que es conveniente separar la enzima inmovilizada por un campo magnético externo,

puede ser fácilmente recuperada y reutilizada para ciclos múltiples para disminuir el costo total de los procesos en los que es necesario su utilización (Shahrestani *et al.*, 2016). Según Sánchez–Ramírez (2014), se han reportado inmovilización de celulasas sobre nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que ha permitido aumentar o mantener su actividad y estabilidad por varios ciclos.

La actividad catalítica de xilanasas se mantiene en un 80 % en su tercer ciclo de reacción, reduciendo hasta en un 50 % para el cuarto ciclo. En el caso de la celulasas, en su tercer ciclo de reacción, la actividad relativa se ve reducida hasta por debajo del 50 % haciéndose cada vez menor. Estos resultados son similares a los reportados por Liao, *et al.*, (2010), donde se mantuvo 40 % de su actividad después de 4 ciclos, evaluados también con papel filtro como sustrato. Los resultados para celulasas son similares, si se considera la condición de que en nuestro caso se encuentran dos enzimas inmovilizadas en el mismo soporte.

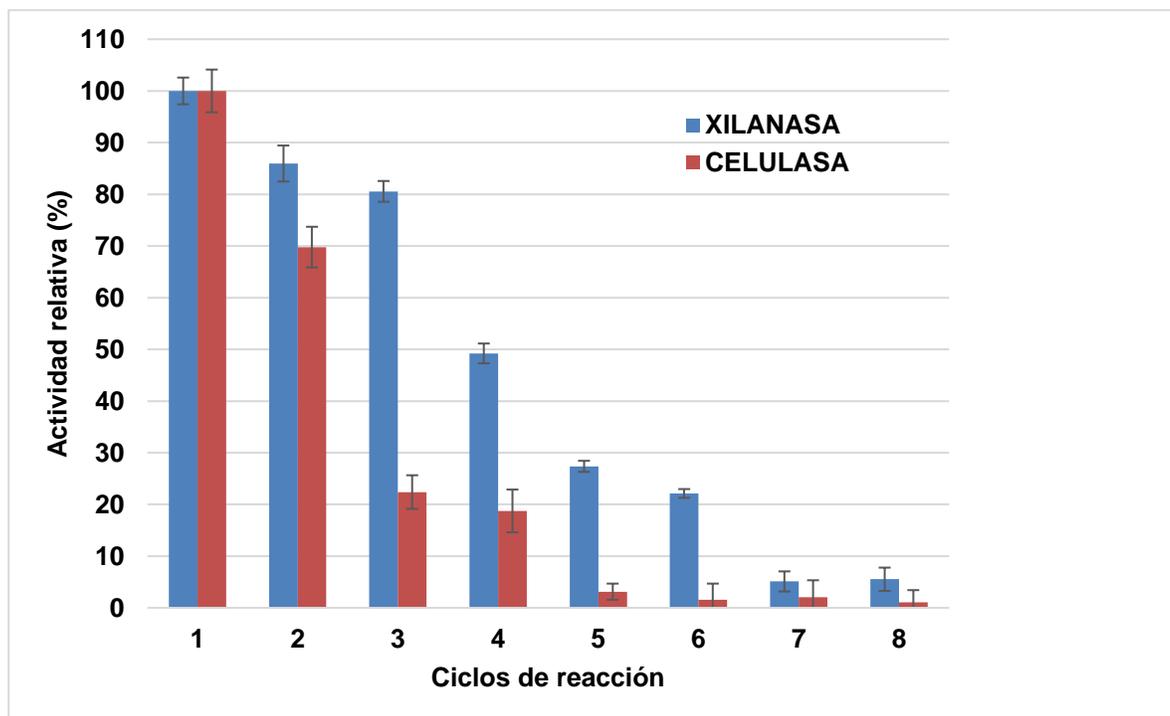


Figura 16. Ensayo de reutilización de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas a las condiciones óptimas de pH y temperatura, evaluadas en xilano y celulosa como sustratos.

De acuerdo con Jordán *et al.*, (2011) en un estudio de inmovilización de celulasa en un soporte magnético, observó una pérdida aparente de actividad después de cada reciclado, para esto, la mayoría (alrededor del 47 %) la perdió después de la reacción inicial. Por lo que, en el presente estudio, la actividad de celulosa fue posible mantenerla hasta después del segundo ciclo de reacción.

Se aprecia una mayor estabilidad en la actividad relativa de xilanasas en comparación de la celulasa, la adherencia de esta última al soporte podría ser menor, o bien, la interferencia entre una enzima y otra puede condicionar la intensidad de las fuerzas de unión de las mismas al soporte, viéndose más afectada la celulasa. La reducción de la actividad residual de las enzimas podría deberse a inhibición por el producto final, daño mecánico, o desactivación de la enzima durante el ensayo de reciclado (Sojitra *et al.*, 2016).

Estos resultados, proporcionan una oportunidad para reducir el consumo de enzimas durante la sacarificación de material lignocelulósico para la producción de oligosacáridos; así como cualquier proceso industrial donde intervenga una acción enzimática.

#### **6.7. Hidrólisis enzimática de olote y pericarpio de maíz mediante Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas**

La hidrólisis enzimática de los desechos de maíz se realizó considerando las condiciones óptimas determinadas con anterioridad, para el caso de xilanasas libres fue a pH 6 y 70 °C, para la celulasa libre a pH 4 y 60 °C y para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas fue a un pH de 4 y una temperatura de 60 °C.

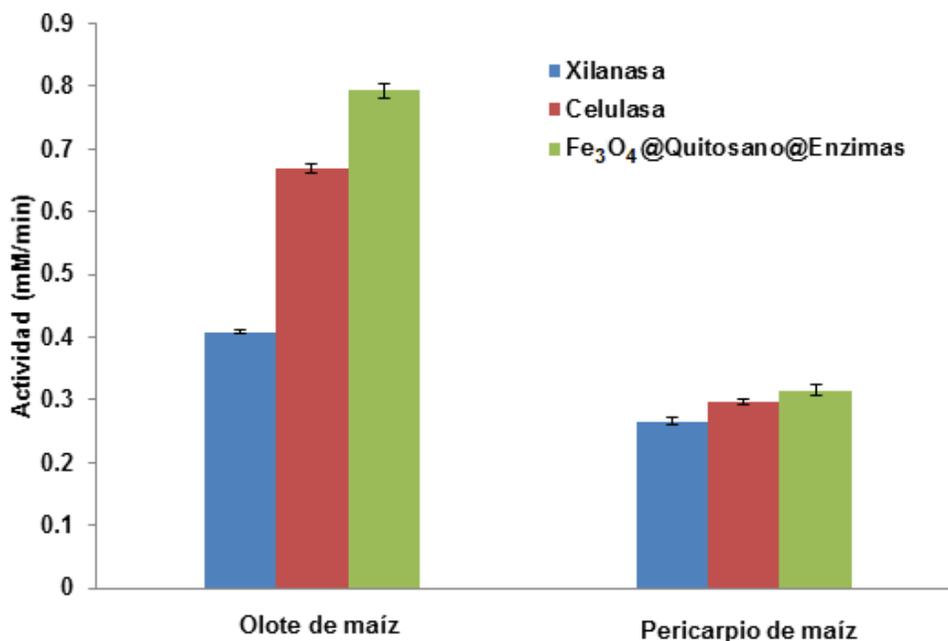


Figura 17. Actividad catalítica de las enzimas libres y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas sobre los desechos de maíz (olote y pericarpio). La evaluación catalítica se realizó a las condiciones óptimas determinadas previamente.

En la Figura 17 se observa la actividad enzimática bajo las mismas condiciones de reacción de las enzimas libres y co-inmovilizadas sobre la hidrólisis de olote y pericarpio de maíz. Se logró la actividad hidrolítica de 2.7 veces mayor sobre el olote de maíz comparado con el pericarpio, tanto para las enzimas libres como Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Quitosano@Enzimas. La diferencia entre los rendimientos de reacción entre los diferentes sustratos, puede estar relacionado con la accesibilidad del sustrato a la hidrólisis que está asociada con las variaciones en ambas estructuras de los sustratos, caso que se ha comprobado previamente (Sánchez–Ramírez *et al.*, 2016) mediante otra fuente lignocelulósica.

## 6.8. Caracterización de los productos de la hidrólisis enzimática

Los productos de hidrólisis con las enzimas libres e inmovilizadas se caracterizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se presentan en la

Figura 18. En los carriles 1 al 10 se aprecian xilosa, arabinosa, ribosa, glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sacarosa, celobiosa y maltosa como estándares (ordenados de izquierda a derecha). Los productos de la hidrólisis de olote (carriles 11 – 13) y pericarpio de maíz (carriles 14 – 16) mediante xilanasas, celulasa y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas, respectivamente.

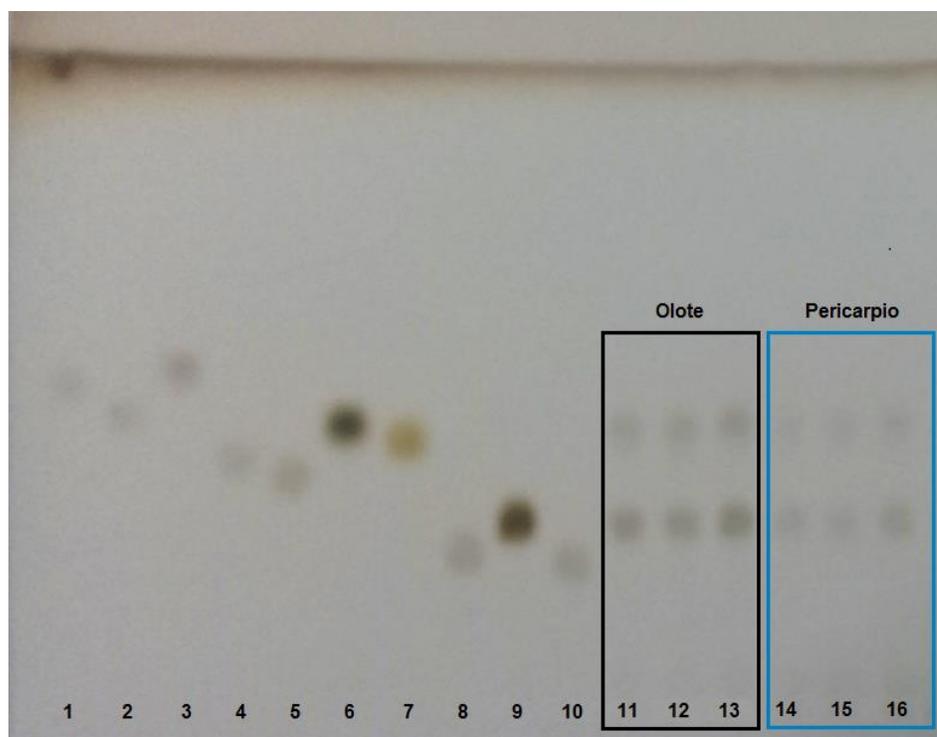


Figura 18. TLC de xilosa (1), arabinosa (2), ribosa (3), glucosa (4), galactosa (5), fructosa (6), manosa (7), sacarosa (8), celobiosa (9) y maltosa (10) utilizados como estándares. Productos de la hidrólisis de olote (11–13) y pericarpio de maíz (14–16) mediante xilanasas, celulasa y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano@Enzimas, respectivamente.

Los resultados de la hidrólisis de los desechos de maíz (Figura 18, carril 11 al 16) revelan la separación de dos componentes que coinciden con la movilidad de la arabinosa (superior) y la celobiosa (inferior). Considerando los datos obtenidos por Córdoba *et al.*, (2013) al caracterizar los componentes del olote, encontraron 45 % de celulosa, 15.8 % de lignina y 33.6 % de hemicelulosa, donde este último se compone de 94 % de xilano, así se puede relacionar la identificación de celobiosa por la hidrólisis de celulosa y la arabinosa por la de

xilano. Por otro lado, la diferencia en la intensidad y tonalidad de las muestras pueden relacionarse con la concentración de estos componentes. Debido a esto, podemos inferir existe una mayor concentración de estos dos azúcares en los productos de la hidrólisis de olote en comparación con los obtenidos a partir de pericarpio. Datos similares fueron obtenidos por Makaraviciuos *et al.*, (2012) donde se encontraron los azúcares ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido urónico después de someter a tratamiento enzimático biomasa extruida de trigo y centeno.

## 7. CONCLUSIONES

Fue posible obtener un biocatalizador magnético co-inmovilizando simultáneamente dos enzimas (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* y endo- $\beta$ -glucanasas de *Trichoderma viride*) en nanopartículas magnéticas de quitosano, funcionalizadas con genipino, como agente de reticulación natural entre el soporte y la enzima; obteniendo así un biocatalizador magnético para la hidrólisis de desechos agroindustriales lignocelulósicos.

El método de preparación juega un papel clave en la determinación del tamaño y forma de las partículas, la distribución del tamaño, la química superficial y, por lo tanto, las aplicaciones de las nanopartículas superparamagnéticas.

La caracterización estructural del soporte sintetizado y reticulado con las enzimas, indica que mantienen su carácter de material superparamagnético formando nanoagregados. La capacidad de separación del sistema de reacción para su reutilización es eficaz, proporcionando ventajas importantes para su uso como catalizador a nivel industrial.

Las enzimas fueron enlazadas covalentemente a la superficie del  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano. Por lo que el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano es un soporte adecuado para la inmovilización enzimática y puede proporcionar ventajas económicas importantes para aplicaciones biotecnológicas a gran escala.

Las enzimas inmovilizadas con genipino en el soporte magnético mantienen su actividad catalítica aun en sucesivos ciclos de uso y en un rango más amplio de temperatura.

Las enzimas inmovilizadas en el soporte magnético de quitosano proporcionan un biocatalizador estable con potencial para hidrólisis de los desechos de maíz, y puede tener aplicaciones potenciales en la producción de

oligosacáridos. El  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Quitosano demostró ser un soporte adecuado para la inmovilización de estas dos enzimas y se podría extender a la inmovilización de muchas más que tengan en su estructura grupos funcionales que permitan su inmovilización.

## 8. REFERENCIAS

- Aachary, A. A., y Prapulla, S. G. 2009. Value addition to corncob: production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresour. Technol.* 100(2), 991-995.
- Aachary, A. A., y Prapulla, S. G. 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.* 10(1), 2-16.
- Abraham, A., Mathew, A. K., Sindhu, R., Pandey, A., y Binod, P. 2016. Potential of rice straw for bio-refining: An overview. *Bioresour. Technol.* 215, 29-36.
- Ahmad, T., Bae H., Iqbal Y., Rhee I., Hong S., Chang Y., Lee J. y Sohn D. 2014. Chitosan-coated nickel-ferrite nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging. *J. Magn. Mater.* 381, 151 – 157.
- Al-Qodah, Z., Al-Shannag, M., Al-Busoul, M., Penchev, I., y Orfali, W. 2017. Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review. *Biochem. Eng. J.* 121, 94–106.
- Alrumman, S. A. 2016. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Braz. J. Microbiol.* 47(1), 110-119.
- Akpınar, O., Erdogan, K., Bakir, U., y Yilmaz, L. 2010. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT-Food Sci. Technol.* 43(1), 119-125.
- Amaro-Reyes, A., García-Almendárez, B. E., Vázquez-Mandujano, D. G., Amaya-Llano, S., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R. G. y Regalado, C. 2011. Homologue expression of a fungal endo-1, 4- $\beta$ -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations. *Afr. J. Biotechnol.* 10(10), 1760-1767.
- Ansari, S. A., y Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* 30(3), 512-523.
- Assa, F., Jafarizadeh-Malmiri, H., Ajamein, H., Anarjan, N., Vaghari, H., Sayyar, Z., y Berenjian, A. 2016. A biotechnological perspective on the application of iron oxide nanoparticles. *Nano Res.* 9(8), 2203-2225.
- Atacan, K., y Özacar, M. 2015. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Colloids Surf., B.* 128, 227-236.
- Azari, A., Gharibi, H., Kakavandi, B., Ghanizadeh, G., Javid, A., Mahvi, A. H., Sharafi k. y Khosravia, T. 2017. Magnetic adsorption separation process: an alternative method of mercury extracting from aqueous solution using modified

- chitosan coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92(1), 188-200.
- Badui, D. S. 2013. *Química de los Alimentos*. 5ta Edición. Ed. Pearson. México. D.F.
- Baiano, A. 2014. Recovery of biomolecules from food wastes—A review. *Molecules*, 19(9), 14821-14842.
- Bhatia, L., Johri, S., y Ahmad, R. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *Amb. Express*, 2(1), 1.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., y Gurny, R. 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57(1), 19-34.
- Bhatia, L., Johri, S., y Ahmad, R. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste. *AMB Express*, 2, 65.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1-2), 248-254.
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., y Gírio, F. 2012. Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 40, 225-231.
- Carvalho, A. F. A., de Oliva Neto, P., Da Silva, D. F. y Pastore, G. M. 2013. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.* 51(1), 75-85.
- Chang, M. Y., y Juang, R. S. 2005. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 36(1), 75-82.
- Chen, Y. Y., Tsai, M. G., Chi, M. C., Wang, T. F., y Lin, L. L. 2013. Covalent immobilization of *Bacillus licheniformis*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 14(3), 4613-4628.
- Chen, J., Leng, J., Yang, X., Liao, L., Liu, L. y Xiao, A. 2017. Enhanced performance of magnetic graphene oxide-immobilized laccase and its application for the decolorization of dyes. *Molecules*. 22(2), 221.
- Chu, Q., Li, X., Xu, Y., Wang, Z., Huang, J., Yu, S., y Yong, Q. 2014. Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. *Process Biochem.* 49(8), 1217-1222.

- Cipolatti, E. P., Silva, M. J. A., Klein, M., Feddern, V., Feltes, M. M. C., Oliveira, J. V. y de Oliveira, D. 2014. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 99, 56-67.
- Córdoba, J. A., Salcedo, E., Rodríguez, R., Zamora, J. F., Manríquez, R., Contreras, H., Robledo, J. y Delgado, E. 2013. Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Rev. Latinoamer. Quím.* 41(3), 171-184.
- Cui, L., Jia, J., Guo, Y., Liu, Y., y Zhu, P. 2014. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydr. Polym.* 99, 31-38.
- Danewalia, S. S., Sharma, G., Thakur, S., y Singh, K. 2016. Agricultural wastes as a resource of raw materials for developing low-dielectric glass-ceramics. *Scientific reports*, 6, 24617.
- Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M. D. S. C., Junior, M. R. M., Moreno, Y. M. F., y Pastore, G. M. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Res. Int.* 44(10), 3167-3173.
- Deutschmann, R., y Dekker, R. F. 2012. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnol. Adv.* 30(6), 1627-1640.
- Ding, Y., Shen, S. Z., Sun, H., Sun, K., Liu, F., Qi, Y., y Yan, J. 2015. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. *Mater. Sci. Eng., C.* 48, 487-498.
- Farjadian, F., Moradi, S., Hosseini, M. 2017. Thin chitosan films containing super-paramagnetic nanoparticles with contrasting capability in magnetic resonance imaging. *J. Mater. Sci. Mater Med.* 28 (3), 47.
- File, P. D. 1989. JCPDS International Center for Powder Diffraction Data. Swarthmore, PA, 11-0065.
- Garnica-Palafox, I. M. y Sánchez-Arévalo, F. M. 2016. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydr. Polym.* 151, 1073-1081.
- Ge, L., Xu, Y., Liang, W., Li, X., Li, D., y Mu, C. 2016. Short-range and long-range cross-linking effects of polygenipin on gelatin-based composite materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 104(11), 2712-2722.
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F. T., y Alavije, R. S. 2015. Fabrication and Characterization of Core-Shell Magnetic Chitosan Nanoparticles as a Novel carrier for Immobilization of *Burkholderia cepacia* Lipase. *J. Oleo Sci.* 64(4), 423-430.

- Gusakov, A. V. 2010. Proteinaceous inhibitors of microbial xylanases. *Biochemistry (Moscow)*, 75(10), 1185-1199.
- Huy ND, Thiyagarajan S, Choi YE, Kim DH, y Park SM. 2013. Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from *Phanerochaete chrysosporium* and its synergistic action with endo-xylanase. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36(6), 677-685.
- Honda, T., Yamaguchi, H. y Miyazaki, M. 2017. Development of enzymatic reactions in miniaturized reactors. *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, 5. 99-166
- Hyeon, J. E., Shin, S. K., y Han, S. O. 2016. Design of nanoscale enzyme complexes based on various scaffolding materials for biomass conversion and immobilization. *Biotechnol J.* 11(11), 1386–1396.
- Illanes, A. 2011. Immobilized biocatalysts, in *Comprehensive Biotechnology*. 2nd Edn, vol. 1 (ed. M. Moo-Young), Elsevier, Boston, USA, pp. 25–39.
- Jabasingh, S. A., y ValliNachiyar, C. 2011. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(1), 85-97.
- Jordan, J., Kumar, C. S., y Theegala, C. 2011. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68(2), 139-146.
- Karav, S., Cohen, J. L., Barile, D., y de Moura Bell, J. M. L. 2017. Recent advances in immobilization strategies for glycosidases. *Biotechnol. Prog.* 33(1), 104-112.
- Kefeni, K. K., Msagati, T. A., y Mamba, B. B. 2017. Ferrite nanoparticles: Synthesis, characterisation and applications in electronic device. *Mater. Sci. Eng., B*, 215, 37-55.
- Khoshnevisan, K., Bordbar, A. K., Zare, D., Davoodi, D., Noruzi, M., Barkhi, M., y Tabatabaei, M. 2011. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chem. Eng. J.* 171(2), 669-673.
- Kocabaş, D. S., Güder, S., y Özben, N. 2015. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 115, 66-75.
- Kumar, V., y Satyanarayana, T. 2011. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus*

- halodurans in producing xylooligosaccharides. *Biotechnol. Lett.* 33(11), 2279-2285.
- Kunz, C., y Rudloff, S. 2006. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 16(11), 1341-1346.
- Lee, I., y Berdis, A. J. 2016. Physiological enzymology: The next frontier in understanding protein structure and function at the cellular level. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 1864(1), 65-69.
- Li, G. Y., Jiang, Y. R., Huang, K. L., Ding, P., y Chen, J. 2008. Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–chitosan nanoparticles. *J. Alloys Comp.* 466(1), 451-456.
- Liang, S., Liu, L., Huang, Q. y Yam, K.L. 2009. Preparation of single or double-network chitosan/poly (vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method. *Carbohydr. Polym.* 77, 718–724.
- Liao, H., Chen, D., Yuan, L., Zheng, M., Zhu, Y., y Liu, X. 2010. Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. *Carbohydr. Polym.* 82(3), 600-604.
- Liu, M. Q., Huo, W. K., Xu, X., y Jin, D. F. 2015. An immobilized bifunctional xylanase on carbon-coated chitosan nanoparticles with a potential application in xylan-rich biomass bioconversion. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 120, 119-126.
- Liu, Y., Zhou, H., Wang, L., y Wang, S. 2016. Stability and catalytic properties of lipase immobilized on chitosan encapsulated magnetic nanoparticles cross-linked with genipin and glutaraldehyde. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91(5), 1359-1367.
- Long, J., Li, X., Wu, Z., Xu, E., Xu, X., Jin, Z., y Jiao, A. 2015. Immobilization of pullulanase onto activated magnetic chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by in situ mineralization and effect of surface functional groups on the stability. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 472, 69-77.
- Long, J., Wu, Z., Li, X., Xu, E., Xu, X., Jin, Z., y Jiao, A. 2015. New Method for the Immobilization of Pullulanase onto Hybrid Magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–κ-Carrageenan) Nanoparticles by Electrostatic Coupling with Pullulanase/Chitosan Complex. *J. Agr. Food Chem.* 63(13), 3534-3542.
- Long, J., Xu, E., Li, X., Wu, Z., Wang, F., Xu, X. y Zhan, X. 2016. Effect of chitosan molecular weight on the formation of chitosan–pullulanase soluble complexes and their application in the immobilization of pullulanase onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–κ-carrageenan nanoparticles. *Food Chem.* 202, 49-58.

- Makaravicius, T., Basinskiene, L., Juodeikiene, G., van Gool, M. P., y Schols, H. A. 2012. Production of oligosaccharides from extruded wheat and rye biomass using enzymatic treatment. *Catal. Today*, 196(1), 16-25.
- Mäkeläinen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., y Ouwehand, A. 2009. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Benef. Microbes*. 1(1), 81-91.
- Manickam B., Sreedharan R. y Elumalai M. 2014. 'Genipin' - The natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview. *Current Drug Delivery*, Vol. 11, No. 1, 139-145.
- Martín, M., González Orive, A., Lorenzo-Luis, P., Hernández Creus, A., González-Mora, J. L. y Salazar, P. 2014. Quinone-rich poly (dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor applications. *Chem. Phys. Chem.* 15(17), 3742-3752
- Mascheroni E., Figoli A., Musatti A., Limbo S., Drioli E., Suevo R., Talarico S. y Rollini M. 2014. An alternative encapsulation approach for production of active chitosan-propolis beads. *Int. J. Food Sci. Technol.* 149, 1401 – 1407.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31(3), 426-428.
- Mohapatra, S., Panda, N., y Pramanik, P. 2009. Boronic acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticle as a novel tool for adsorption of sugar. *Mater. Sci. Eng., C*. 29(7), 2254-2260.
- Morales M. A., de Souza Rodríguez E. C., de Amorim A. S. C. M., Soares J. M., y Galembeck F. 2013. Size selected synthesis of magnetite nanoparticles in chitosan matrix. *Appl. Surf. Sci.* 275, 71-74.
- Muzzarelli, R. A. A., El Mehtedi, M., Bottegoni, C. y Gigante, A. 2016. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1366-1381.
- OCDE, 2009. Metrics to Support Informed Decision-Making for Consumers of Biobased Products Organization. Organisation for Economic Co-operation and Development Publications, France.
- Oreopoulou, V., y Russ, W. (Eds.). 2007. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry (pp. 209-232). New York, NY: Springer.
- Osuna, Y., Sandoval, J., Saade, H., López, R. G., Martínez, J. L., Colunga, E. M. y Fernández, H. 2015. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 1–9.

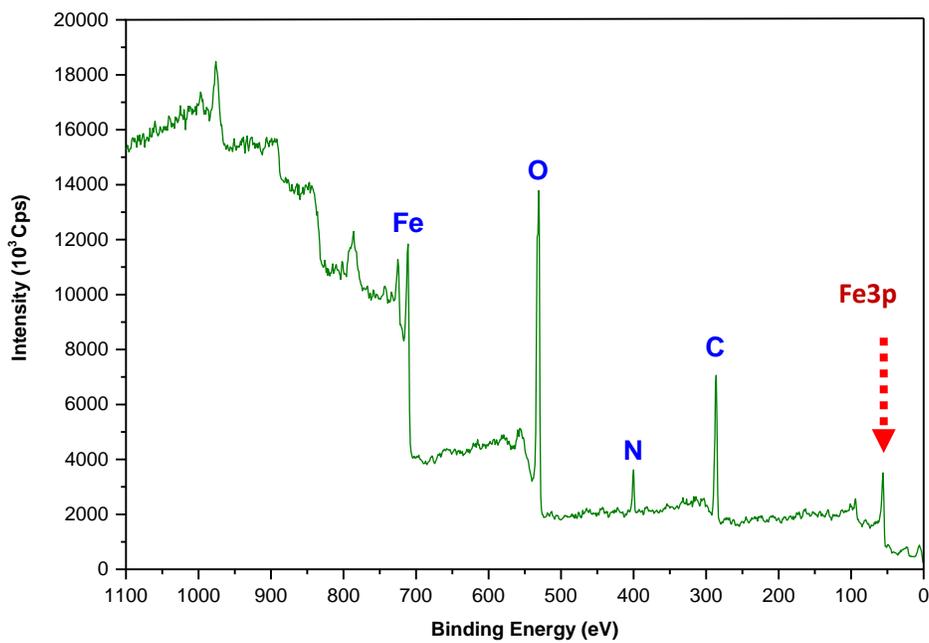
- Pariona, N., Camacho-Aguilar, K. I., Ramos-González, R., Martínez, A. I., Herrera-Trejo, M., y Baggio-Saitovitch, E. 2016. Magnetic and structural properties of ferrihydrite/hematite nanocomposites. *J. Magn. Magn. Mat.* 406, 221-227.
- Patel, S., y Goyal, A. 2011. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(5), 1119-1128.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., y Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(5), 577-591.
- Pospiskova, K., y Safarik, I. 2013. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydr. Polym.* 96(2), 545-548.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., y Doelker, E. 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24(12), 1113-1128.
- Ramos-de-la-Pena, A. M., Renard, C. M., Wicker, L., Montañez, J. C., García-Cerda, L. A., y Contreras-Esquivel, J. C. 2014. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrason. Sonochem.* 21(1), 43-49.
- Rangel-Rodríguez, A. M., Conxita, S., Susana, V., Flores-Gallardo, S. G., Contreras-Esquivel, J. C., y Licea-Jiménez, L. 2014. Immobilization of Pectinesterase in Genipin-Crosslinked Chitosan Membrane for Low Methoxyl Pectin Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 174(8), 2941-2950.
- Ranjbakhsh E, Bordbar AK, Abbasi M, Khosropour AR, y Shams E. 2012. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 179, 272-276.
- Ribeiro, L. F., De Lucas, R. C., Vitcosque, G. L., Ribeiro, L. F., Ward, R. J., Rubio, M. V. y Jorge, J. A. 2014. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnol. Biofuels*, 7(1), 1.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31(7), 603-632.
- Safari, J. y Javadian, L. 2014. Chitosan decorated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a magnetic catalyst in the synthesis of phenytoin derivatives. *RSC Advances*, 4(90), 48973-48979.
- Sahu, A., Badhe, P. S., Adivarekar, R., Ladole, M. R., y Pandit, A. B. 2016. Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Reports*, 12, 13-25.

- Salihi, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., y Salleh, H. M. 2012. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour. Conserv. Recy.* 58, 36-44.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., y Sridhar, M. 2015. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioact. Carbohydr. Diet, Fibre.* 5(1), 62-71.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27(2), 185-194.
- Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, P., López, G., Saade, H., Medina-Morales, M. A., Ramos-González, R., Aguilar, C. N. y Ilyina, A. 2016. Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40(1), 9-22.
- Sedlmeyer, F. B. 2011. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1891-1898.
- Senel, S. y McClure, S.J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1467– 1480.
- Saikia, C., Das, M. K., Ramteke, A., y Maji, T. K. 2016. Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1121-1132.
- Shahrestani, H., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., y Tavakoli, O. 2016. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1, 3, 5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. *Biochem. Eng. J.* 109, 51-58.
- Shokrollahi, H. 2017. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. *J. Magn Magn Mater*, 426, 74-81.
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., y Mamba, B. B. 2014. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromolec.* 59, 46-58.
- Soares, P. I. P., Sousa, A. I., Ferreira, I. M. M., Novo, C. M. M. y Borges, J. P. 2016. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. *Carbohydr. Polym.* 153, 212-221.
- Sojitra, U. V., Nadar, S. S., y Rathod, V. K. 2016. A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chem.* 213, 296-305.

- Song, J., Jiao, L. F., Xiao, K., Luan, Z. S., Hu, C. H., Shi, B., y Zhan, X. A. 2013. Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 185(3), 175-181.
- Swarnalatha, V., Esther, R. A., y Dhamodharan, R. 2013. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *J. Mol Catal B: Enzymatic*, 96, 6-13.
- Talekar, S., Desai, S., Pillai, M., Nagavekar, N., Ambarkar, S., Surnis, S., y Mulla, M. 2013. Carrier free co-immobilization of glucoamylase and pullulanase as combi-cross linked enzyme aggregates (combi-CLEAs). *RSC Advances*, 3(7), 2265-2271.
- Tokareva, M. I., Ivantsova, M. N., y Mironov, M. A. 2017. Heterocycles of Natural Origin as Non-Toxic Reagents for Cross-Linking of Proteins and Polysaccharides. *Chem Heterocycl Comp*, 53(1), 21-35.
- Uyeno, Y., Kawashima, K., Hasunuma, T., Wakimoto, W., Noda, M., Nagashima, S. y Kushibiki, S. 2013. Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livest. Sci.* 153(1), 88-93.
- Vaz, R. P.; de Souza Moreira, L. R. y Ferreira Filho, E. X. 2016. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. *J. Mol. Catal. B Enzym*, 133, 127-135.
- Wang, J., Yuan, X., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., y Wang, C. 2009. On-line separation and structural characterisation of feruloylated oligosaccharides from wheat bran using HPLC-ESI-MSn. *Food Chem.* 115(4), 1529-1541.
- Wang, X. Y., Jiang, X. P., Li, Y., Zeng, S., y Zhang, Y. W. 2015. Preparation Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 75, 44-50.
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., y Car, H. 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep.* 64(5), 1020-1037.
- Yazid, N. A., Barrena, R. y Sánchez, A. 2017. The immobilisation of proteases produced by SSF onto functionalized magnetic nanoparticles: Application in the hydrolysis of different protein sources. *J. Mol. Catal. B Enzym.* In press, DOI: 10.1016/j.molcatb.2017.01.009.

- Yuan Y, Chesnutt BM, Utturkar G, Haggard WO, Yang Y, Ong JL, y Bumgardner JD. 2007. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym*, 68, 561-567.
- Zdarta, J., Wysokowski, M., Norman, M., Kołodziejczak–Radzimska, A., Moszyński, D., Maciejewski, H., y Jesionowski, T. 2016. *Candida antarctica* lipase B immobilized onto chitin conjugated with POSS® compounds: Useful tool for rapeseed oil conversion. *Int. J. Mol. Sci.* 17(9), 1581.
- Zeng L., Xie M., Zhang Q., Kang Y., Guo X., Xiao H., Peng Y. y Luo J. 2015. Chitosan/organic rectorite composite for the magnetic uptake of methylene blue and methyl orange. *Carbohydr. Polym.* 123, 89–98.
- Zhao, L. C., Wang, Y., Lin, J. F., y Guo, L. Q. 2012. Adsorption and kinetic behavior of recombinant multifunctional xylanase in hydrolysis of pineapple stem and bagasse and their hemicellulose for Xylo-oligosaccharide production. *Bioresour. Technol.* 110, 343-348.
- Zhao, Y., Lu, W. J., y Wang, H. T. 2009. Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. *Chem. Eng. J.* 150(2), 411-417.

## ANEXOS



Anexo 1. Barrido del análisis por **XPS** (identificación de la línea Fe3p)