



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INMOVILIZACIÓN DE UNA XILANASA EN UN SOPORTE
MAGNÉTICO DE QUITOSANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA DEL MAR RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. ALDO AMARO REYES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INMOVILIZACIÓN DE UNA XILANASA EN UN SOPORTE
MAGNÉTICO DE QUITOSANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA DEL MAR RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. ALDO AMARO REYES

SINODALES

Dr. ALDO AMARO REYES

DIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODAL

Dr. HARALD NORBERT BÖHNEL

SINODAL

Dra. MIRIAM ROCÍO ESTÉVEZ GONZÁLEZ

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
AGRADECIMIENTOS	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Inmovilización enzimática	1
1.2 Características generales de quitosano	10
1.3 Características generales de genipino	11
1.4 Características generales de xilanas	11
1.5 Justificación	16
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 General	18
3.2 Específicos	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1 Reactivos	19
4.2 Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano	19
4.3 Reticulación de las nanopartículas con genipino	20
4.3.1 Determinación de la cinética de absorción de albúmina de suero bovino (BSA)	21
4.4 Determinación del grado de reticulación	21
4.5 Características de hinchamiento de las nanopartículas magnéticas enzimáticas (NME)	21
4.6 Determinación de la actividad enzimática de la xilanas	22
4.7 Temperatura y pH óptimo de la xilanas	22
4.8 Estabilidad a la temperatura de la enzima inmovilizada	23

4.9 Efecto de diferentes químicos sobre la xilanasa	23
4.10 Capacidad de reutilización de las NME	23
4.11 Caracterización de las NME	23
4.12 Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES	40
7. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño factorial fraccionado $2^{(3-1)}$	20
2	Proteína absorbida por el soporte	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de la preparación de agregados enzimáticos reticulados (CLEA's)	5
2	Estrategias para la inmovilización enzimática	5
3	Conformación de las redes de genipino reticuladas con quitosano en diferentes valores de pH	9
4	Estructura del quitosano	10
5	Estructura de la quitina	11
6	Estructura de genipino	12
7	Estructura de endo-1,4- β -xilanasas I de <i>Aspergillus niger</i>	14
8	Analogía de una xilanasas con una mano derecha	14
9	Estructura de Xilanasas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	15
10	Curvas de histéresis que muestran la saturación magnética del soporte	26
11	Cinética de absorción del BSA	28
12	Porcentaje de hinchamiento de los NME a distintos tiempos	29
13	Actividad de la enzima libre contra la enzima inmovilizada a distintas temperaturas	30
14	Actividad de la enzima libre contra la enzima inmovilizada a distintos valores de pH	31
15	Estabilidad de la enzima inmovilizada a 70 °C durante el tiempo	32
16	Efecto de los químicos sobre la enzima libre	33
17	Efecto de los químicos sobre la enzima inmovilizada	33
18	Ciclos de reuso de la enzima inmovilizada	34
19	Microfotografías del soporte magnético	35
20	Distribución del tamaño de partícula del soporte magnético	36
21	Distribución del tamaño de partícula de la enzima inmovilizada	37
22	Distribución del tamaño de partícula del quitosano	37
23	Termograma de DSC.	39

RESUMEN

La inmovilización puede mejorar la actividad enzimática bajo condiciones extremas de procesos, tales como acidez y temperaturas requeridas en diferentes aplicaciones industriales. En los últimos años, las nanopartículas magnéticas se han convertido en el foco de investigación como soportes de inmovilización para biomoléculas debido a su bajo perfil de toxicidad, carácter magnético, eficiencia como adsorbente con gran área de superficie específica, baja resistencia a la difusión y la estabilidad a cambios de pH, temperatura y presión. El objetivo del presente trabajo fue inmovilizar una xilanasa en un soporte magnético a base de quitosano y sales de hierro, evaluando su capacidad de retención proteica y su actividad expuesta a distintos valores de pH, temperatura, sales y agentes reductores, así como su caracterización estructural parcial. El soporte fue sintetizado en una relación 2:1 (p/p) de sales de hierro con quitosano sin sonicación dando así un soporte potencialmente magnético, con capacidad de absorción de 14 μg de proteína/mg de soporte a los 60 minutos de reacción de entrecruzamiento. La xilanasa fue inmovilizada en el soporte mediante reticulación con genipino, un agente menos tóxico a los usualmente utilizados. Se evaluó el grado de reticulación con el ensayo de ninhidrina, después de 60 minutos de reacción se obtuvo un 45% de reticulación. Mediante dispersión de luz, microscopia electrónica de barrido y DSC se caracterizaron los agregados enzimáticos, observándose que son de forma esférica y forman agregados con tamaño de partícula promedio de 254 nm. La enzima inmovilizada presentó un máximo de actividad a un pH 9 y una temperatura de 70°C además puede ser utilizada hasta en 5 ciclos consecutivos en estas condiciones manteniendo el 70 % de su actividad relativa. La actividad de la xilanasa inmovilizada fue afectada en presencia de algunos detergentes y iones comparada con la enzima libre. La xilanasa fue exitosamente inmovilizada en el soporte magnético de quitosano y la inmovilización le confirió protección en temperaturas y rangos más amplios de pH con posibilidad de reutilizarse, obteniendo así una alternativa eficiente para futuros usos industriales.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Aldo Amaro Reyes, Universidad Autónoma de Querétaro, como mi asesor de tesis, por su esfuerzo, paciencia y dedicación. Sus conocimientos, su orientación, apoyo y motivación fueron indispensables para el desarrollo y término de esta tesis.

A la Dra. Miriam Estévez González (CFATA, UNAM, Campus Juriquilla) por su apoyo en la determinación del tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica y en la interpretación de los resultados.

Al Dr. Harald Böhnell, laboratorio de paleomagnetismo y magnetismo de rocas, (Geociencias, UNAM, Campus Juriquilla) por su ayuda en las determinaciones magnéticas del soporte y su aportación teórica para el entendimiento e interpretación de los resultados.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada, derivada del proyecto CB2014-241208.

Por último, sin ser menos importante, agradezco a todas las personas, amigos y familiares que durante este trayecto han estado siempre a mi lado con una palabra de aliento, sobre todo a mis padres, fuente incondicional de apoyo, que en los momentos difíciles no han dado más que infinita motivación para cumplir mis metas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Inmovilización enzimática

La biotecnología, se define como la aplicación de los organismos vivos y sus componentes, a los productos y procesos industriales, es la tecnología que tiene gran impacto en muchos sectores industriales. La biotecnología ofrece la posibilidad de nuevos procesos industriales que requieren menos energía y están basados en materias primas renovables, se considera actualmente como una alternativa útil a la tecnología de procesos convencionales en los campos industriales y analíticos. La tecnología de inmovilización crea nuevas oportunidades para el desarrollo comercial y los beneficios en una amplia gama de sectores industriales, incluyendo la salud y medicina, la agricultura y la producción de químicos a granel, la tecnología de alimentos, combustible y la producción de energía, control de la contaminación y recuperación de recursos. La tecnología de inmovilización ofrece una gran esperanza para resolver muchos de los problemas que enfrenta el mundo actualmente (Mahmoud y Helmy, 2009).

Los procesos enzimáticos generan menos residuos que las rutas sintéticas convencionales, son más eficientes energéticamente y ofrecen productos de mayor pureza, además de que se pueden producir a gran escala a un precio atractivo, sin embargo las enzimas tienen algunos inconvenientes que han limitado su aplicación generalizada. A menudo carecen de estabilidad operativa. Las enzimas son moléculas complejas, altamente sensibles con estructuras tridimensionales únicas que son esenciales para sus actividades, pero su exposición a ciertas condiciones las pueden conducir a la desnaturalización y pérdida concomitante de la actividad (Sheldon, 2011). La inmovilización puede mejorar la actividad enzimática bajo condiciones extremas de procesos, tales como acidez y temperaturas requeridas en diferentes aplicaciones industriales (Cipolatti y col., 2014). 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 y col., 2012). El término de enzimas inmovilizadas se refiere

a las enzimas físicamente confinadas o localizadas en una determinada región definida del espacio con la retención de sus actividades catalíticas, la inmovilización significa asociar los biocatalizadores con una matriz insoluble de modo que pueda ser retenida (Mahmoud y Helmy, 2009).

Se tienen registrados muchos trabajos que ahondan en la inmovilización de enzimas en soportes orgánicos con la ayuda de agentes reticulantes. Sin embargo muchas aplicaciones analíticas y de bioprocesos requieren acciones coordinadas de múltiples enzimas para catalizar una reacción en específico (Yang Kun y col., 2010).

Las observaciones científicas sobre la inmovilización de enzimas comenzaron en 1916, donde se demostró que la actividad de una invertasa inmovilizada es comparable con una enzima libre. Se han probado una gran cantidad de soportes tales como la gelatina, alginato, poliacrilamida, quitosano, etc.; algunas de las ventajas de estos soportes abarcan desde la baja toxicidad de material, magnetismo y la fácil separación de los reactores industriales donde se utilizan (Sohrabi y col., 2014).

En el año 1969 se plantea la posibilidad de unir enzimas a soportes utilizando glutaraldehído como “facilitador” de la unión de la proteína al soporte, esto permitió detectar antígenos y anticuerpos en preparaciones celulares utilizando la enzima peróxidasa para los ensayos inmunohistoquímicos (Avrameas, 1969).

Posteriormente en el año 1994, se logró inmovilizar la enzima β -galactosidasa en quitosano utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante, esto con el propósito de lograr una mejor incorporación de la lactosa a algunos alimentos (Carrara y col., 1994).

A pesar de la larga historia y ventajas obvias de la inmovilización de la enzima, se estima que solo el 20 % de los procesos biocatalíticos involucran enzimas inmovilizadas. La economía del proceso biocatalítico se puede mejorar mediante la reutilización de la enzima y la mejora en la estabilidad de la enzima conferida por la inmovilización. La capacidad de retener o recuperar enzimas también permite la separación del producto, permitiendo así los procesos continuos. La proliferación de

métodos de inmovilización de enzimas ofrece toda una gama de posibilidades para nuevas técnicas (Brady y Jordaan, 2009).

La inmovilización implica la unión de la enzima a un soporte, tal como una resina de intercambio iónico, o de sílice, o encapsulación a un vehículo inerte, proporcionando un biocatalizador con el rendimiento operativo superior en comparación con la enzima libre (Sheldon, 2011).

La clasificación de los métodos de inmovilización difiere en la literatura y entre autores; se pueden dividir en cuatro tipos: unión no covalente, atrapamiento físico, unión covalente y bioconjugación. Los métodos no covalentes se basan en la inmovilización de la proteína a través de superficies hidrofóbicas o por medio de interacciones electrostáticas con superficies cargadas como una membrana de nitrocelulosa. El atrapamiento físico de las enzimas ofrece una mejor resistencia a las situaciones adversas a las que la enzima puede ser sometida, ya que previene una desnaturalización de la proteína por algún medio agresivo en que sea colocada, algunos de los materiales más utilizados para este atrapamiento son sol-gel y vesículas lipídicas (Homaei y col. 2013).

Por otra parte, los métodos por inmovilización covalente proporcionan una unión muy estable, este tipo de enlaces está generalmente formado por grupos funcionales presentes en la superficie de la proteína, por ejemplo grupos amino, residuos de lisina para la formación de enlaces amida, grupos aldehído y epoxi que ayudan a la formación de uniones secundarias funcionando como un enlace estabilizador de la enzima (Betancor y col., 2008). Estos enlaces son facilitados por grupos carbobamida y carboxilos, ya que pueden ser utilizados como grupos ésteres activos utilizando *n*-hidroxisuccimida que propicia las condiciones adecuadas para la formación de enlaces de tipo amida. Los grupos tiol presentes en los residuos de aminoácidos de lisina crean enlaces disulfuro en las enzimas dándoles mayor estabilidad (Jia y col., 2013). Se ha demostrado que el quitosano promueve la formación de enlaces covalentes tipo amida, por lo tanto es un buen soporte para la inmovilización de diversas enzimas.

Los métodos de inmovilización pueden también dividirse en tres tipos: unión a un portador, encapsulación de un gel polimérico orgánico o inorgánico y por reticulación de las moléculas de proteína. La unión a un portador inevitablemente conduce a la dilución de la actividad catalítica resultante de la introducción de una gran proporción (90-90 % del total) de la masa no catalítica. En contraste, la inmovilización a través de la reticulación de moléculas de una enzima, con un agente de reticulación bifuncional es un método libre de soporte y el biocatalizador resultante comprende esencialmente el 100 % de enzima activa. La técnica de reticulación de proteínas se desarrolló hace más de 40 años, sin embargo las enzimas reticuladas exhiben una actividad de baja retención, mala reproducibilidad y baja estabilidad mecánica, en consecuencia la unión a un portador se convirtió en la metodología más utilizada para la inmovilización de las enzimas. El uso de los cristales de enzima reticulados (CLEC) como biocatalizador industrial se introdujo a principios de 1990, el método es aplicable a una amplia gama de enzimas y resultó significativamente más estable a la desnaturalización por el calor, disolventes orgánicos y la proteólisis de la enzima o liofilizado en polvo. Su estabilidad operativa, tamaño de partícula controlable y facilidad de reciclaje los hizo idealmente adecuados para biotransformaciones industriales. Una desventaja de los CLEC es la necesidad de cristalizar la enzima, un procedimiento laborioso que requiere una enzima de alta pureza. Por otro lado es bien conocido que la adición de sales o disolventes orgánicos miscibles en agua o polímeros no iónicos, a soluciones acuosas de proteínas conduce a su precipitación en forma de agregados, unidos por enlace no covalente sin perturbar la estructura terciaria. Se propuso que la reticulación de estos agregados, se haría permanentemente insoluble mientras mantienen las superestructuras organizadas de los agregados, y por lo tanto su actividad catalítica, esto condujo al desarrollo de una nueva familia de enzimas inmovilizadas: agregados enzimáticos reticulados (CLEA's), esta metodología esencialmente combina la purificación e inmovilización en una sola operación (Sheldon, 2007). Una de las primeras enzimas probadas como CLEA, fue la penicilina G amidasa, enzima industrialmente importante que se utiliza en la síntesis de la penicilina. Sorprendentemente, la productividad de la CLEA fue aún

mayor que la de la enzima libre y sustancialmente mayor que el de la CLEC (Sheldon, 2011).

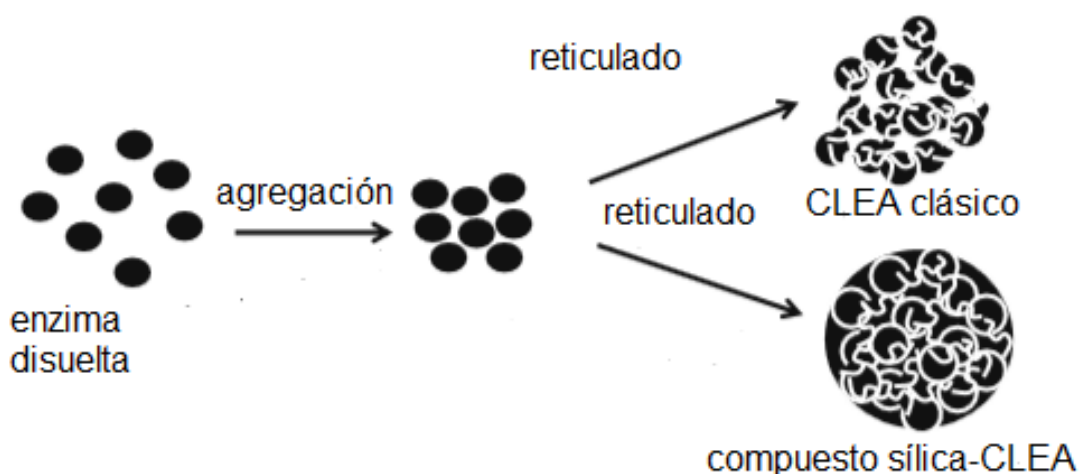


Figura 1. Esquema general de la preparación de CLEA's (Sheldon, 2011).

Los CLEA's tienen muchos beneficios económicos y ambientales para la biocatálisis industrial. Una de las ventajas deriva de la posibilidad de co-inmovilizar dos o más enzimas para proporcionar CLEA's que son capaces de catalizar múltiples biotransformaciones, independientemente o en secuencia como procesos catalíticos en cascada (Sheldon, 2011).

Brady y Jordaan (2009) sugieren otra clasificación para los tipos de inmovilización:

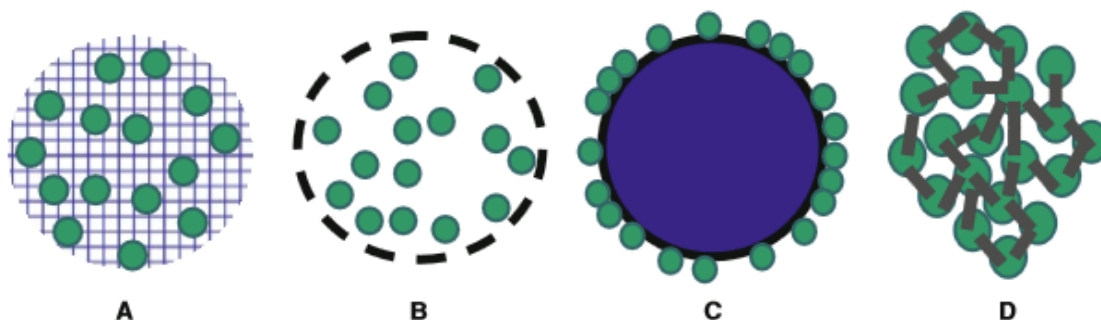


Figura 2. Estrategias para la inmovilización enzimática: (a) atrapamiento, (b) encapsulación, (c) soporte sólido, (d) inmovilización en sí mismo (Brady y Jordaan 2009).

Existen varios métodos que han sido utilizados para inmovilizar las enzimas como la reticulación, adsorción física, unión a metal, la unión covalente, de atrapamiento iónico, atrapamiento de gel, fibra de atrapamiento, micro encapsulación, sin embargo cada método tiene sus ventajas e inconvenientes. Mahmoud y Helmy (2009) sugieren que los componentes principales para la inmovilización son la enzima, la matriz y el modo de interacción de la enzima con el portador, la matriz elegida puede mejorar la estabilidad operativa de la enzima inmovilizada, no hay vehículo universal pero si existen un gran número de características a considerar para el material de inmovilización.

Uno de los grandes retos que las industrias farmacéuticas, químicas y conexas, a los que se enfrentan en el siglo XXI, es la transición a una base más verde y una manufacturación más sostenible, que reduce al mínimo, o evita la generación de residuos y el uso de tóxicos y materiales peligrosos. La biocatálisis tiene mucho que ofrecer en este contexto (Sheldon, 2007).

Los nanomateriales pueden servir como excelentes materiales de apoyo para la inmovilización de enzimas, ya que ofrecen las características ideales para el equilibrio de los factores clave que determinan la eficiencia de biocatalizadores, incluyendo superficie específica, la resistencia a la transferencia de masa y carga efectiva de la enzima (Cipolatti y col., 2014).

Las diferentes propiedades físico-químicas de los nanomateriales los han convertido en candidatos interesantes para su uso en varios campos en los últimos años. Estas propiedades difieren y son fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma del material. Debido a las propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y catalíticas únicas de los óxidos de metales de transición tales como la magnetita (Fe_3O_4) han sido ampliamente utilizados. A temperatura ambiente, los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en los sitios octaédricos del empaque cristalino tipo cúbico centrado en las caras (FCC) y pudiendo mostrar transición electrónica (Shete y col., 2014).

En los últimos años, las nanopartículas magnéticas se han convertido en el foco de investigación como soportes de inmovilización para biomoléculas debido a su bajo perfil de toxicidad, carácter magnético, eficiencia como adsorbente con gran área de superficie específica, baja resistencia a la difusión y la estabilidad a cambios de

pH, temperatura y presión (Cipolatti y col., 2014). El término nanopartículas se refiere en general a las nanocápsulas (una pared polimérica que envuelve una matriz aceitosa) y nanoesferas (una matriz polimérica) (Guterres y col., 2009). Las nanoesferas pueden ser preparadas mediante polimerización y/o síntesis con polímeros preformados con un rango de tamaño que va de 5 a 1000 nm, siendo generalmente el rango medio obtenido de 100 a 500 nm (Mora y col., 2010).

La preparación de soportes magnéticos para inmovilización de enzimas cobró interés a mediados de 1970, uno de los soportes utilizados es el quitosano, el cual proporciona estabilidad coloidal a diversos tipos de partículas, aunque varios trabajos han reportado la unión covalente de quitosano sobre la superficie de nanopartículas de óxidos de hierro, pocos trabajos reportan la síntesis de nanopartículas magnéticas en una matriz de quitosano (Shen y col., 2014).

La aplicación de la tecnología de adsorbentes magnéticos para resolver problemas ambientales ha recibido atención considerable en años recientes, con la rápida industrialización se ha contribuido seriamente a la liberación de metales pesados tóxicos en corrientes de agua, uno de los métodos más económicamente favorable y técnicamente fácil es la adsorción, el quitosano ha resultado un excelente adsorbente de metales pesados. El magnetismo y la alta capacidad de adsorción son dos características importantes para las nanopartículas sintetizadas, que pueden ser ventajosamente utilizadas en el tratamiento de aguas (Thinh y col., 2012).

Se ha estudiado la posibilidad de formar moléculas con carácter magnético, algunas de las características de estos materiales son el área superficial grande, la baja resistencia a la difusión, alta carga enzimática, materiales no contaminantes y una rápida separación de los materiales procesados por medio de un imán; la síntesis de nanomateriales magnéticos biocompatibles ha sido de mucho interés para aplicaciones biomédicas (Zhou y col., 2009).

El quitosano se caracteriza por ser biocompatible, no tóxico, estable, esterilizable y biodegradable, además de que se puede preparar en una variedad de formas tales como polvos, macropartículas y nanofibras (Kaur y Dhillon, 2014; Manickam y col., 2014). En la inmovilización el quitosano puede ser un versátil sorbente para iones

de metales de transición y de sustancias orgánicas a través de complejos de coordinación y/o sitios reactivos compuestos de grupos amino (-NH₂) e hidroxilo (-OH) anclados a su estructura (Alsarra y col., 2002). El quitosano presenta una considerable capacidad de unión de proteínas y una alta recuperación de la actividad enzimática (Su y col., 2013), además puede ser fácilmente reticulado por reactivos bifuncionales tales como el glutaraldehído para formar esferas catalíticas (Mallin y col., 2013; Yewale y col., 2013). Con el fin de mantener las características antes mencionadas del quitosano además de poder modular sus propiedades mecánicas y de hinchazón, el quitosano se ha reticulado por medio de reticuladores naturales, tales como el genipino (Manickam y col., 2014).

El quitosano ha sido ampliamente investigado para aplicaciones biomédicas, como la cicatrización de heridas, administración de fármacos, revestimiento e ingeniería de tejidos, así como en industrias de los alimentos, cosméticos y agricultura. Se ha observado que el quitosano tiene una mejor capacidad cuando se es reticulado con algún agente, el más conocido y ampliamente utilizado es el glutaraldehído, en varios estudios centrados en la administración de fármacos como la hidroquinona y ormeloxifene, se utilizó quitosano reticulado con glutaraldehído, los resultados demostraron que la tasa de liberación de fármacos puede ser fácilmente cambiada no solo por el grado de reticulación de las microesferas, sino también por el tipo de agente reticulante, aunque los resultados parecen prometedores existen preocupaciones sobre la toxicidad del agente reticulante, glutaraldehído (Yuan y col., 2007).

Mi y col. (2002) en un estudio *in vivo* reportaron que microesferas de quitosano reticuladas con genipino exhiben histológicamente mejor biocompatibilidad y una tasa de degradación menor en comparación con las microesferas reticuladas con glutaraldehído, indicando así que la biocompatibilidad de genipino es superior a la del glutaraldehído. El genipino, es un agente natural reticulante, reportado 10 000 veces menos tóxico que el glutaraldehído (Yuan y col., 2007). Chen y col. (2004), sugieren que los hidrogeles son materiales poliméricos que tienen una estructura de red tridimensional con especial interés en el campo biomédico, existe una gran variedad de hidrogeles poliméricos naturales y sintéticos utilizados para la

administración de drogas, el quitosano es uno de los más comúnmente usados, los resultados muestran que el quitosano reticulado con genipino puede ser un portador polimérico adecuado para el suministro de fármacos en sitios específicos por vía oral. Crompton y col. (2005) al igual que los autores anteriormente mencionados, piensan que una de las aplicaciones más explotadas del quitosano es en el área biomédica, en forma de hidrogel es un material polimérico ideal.

En el mecanismo de reticulación del genipino con el quitosano, la condición de pH juega un papel importante (Figura 3). Bajo condiciones ácidas y neutras se da por medio de un ataque nucleofílico por los grupos amino primarios de quitosano sobre el átomo de carbono olefínico C-3, seguido de la apertura del anillo dihidropirano y su ataque por medio del grupo amino secundario en el recién formado grupo aldehído. En otras palabras, el genipino actúa como un dialdehído pero sus productos de condensación son mucho más estables en comparación con el glutaraldehído. Bajo condiciones básicas, la reacción de apertura del anillo del genipino ocurre a través de un ataque nucleofílico por los iones hidroxilo de la solución acuosa para formar grupos aldehído intermediarios, que posteriormente se someten a condensación aldólica. Los grupos aldehído terminales en el genipino polimerizado sufren una reacción de Schiff con los grupos amino del quitosano para formar redes reticuladas (Muzzarelli, 2009).

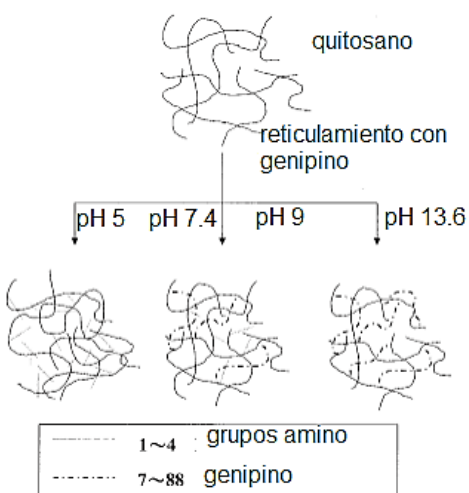


Figura 3. Conformación de las redes de genipino reticuladas con quitosano en diferentes valores de pH (Mi y col., 2004).

1.2 Características generales de quitosano

El quitosano (Figura 4) es un copolímero lineal derivado de la β -(1,4)-glucosamina, es obtenido por deacetilación de la quitina [poli- β -(1,4)-acetil glucosamina] de los residuos de la industria de alimentos marinos (por ejemplo cangrejo, camarón, etc.) y en menor cantidad de los hongos (Figura 5). El producto de la deacetilación de la quitina debe de ser por debajo del 50% para que pueda ser llamado quitosano (Quignard y col., 2010). Se ha sido utilizado como un soporte para la inmovilización enzimática y para procesos de biocatálisis como soporte para la catálisis de la β -galactosidasa (Valerio y col., 2013).

Existen dos polimorfismos de la quitina, uno de ellos se caracteriza por tener una orientación antiparalela de las cadenas de α -quitina lo cual proporciona una mayor capacidad para la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas en comparación con la β -quitina que es caracterizada por una orientación paralela de las cadenas poliméricas. Estas características de la α -quitina confieren mayor rigidez y una menor reactividad a este tipo de cadena encontrado naturalmente (Muzzarelli, 2005).

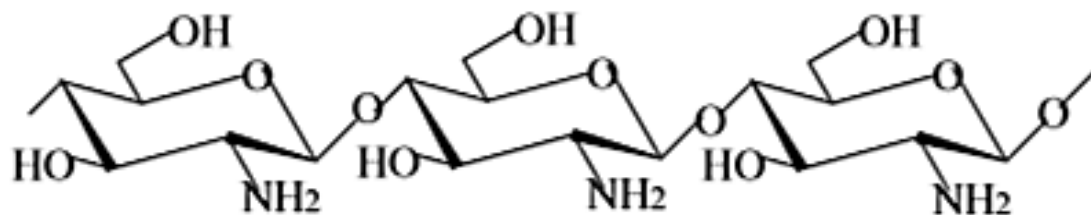


Figura 4. Estructura del quitosano (Krajewska, 2004).

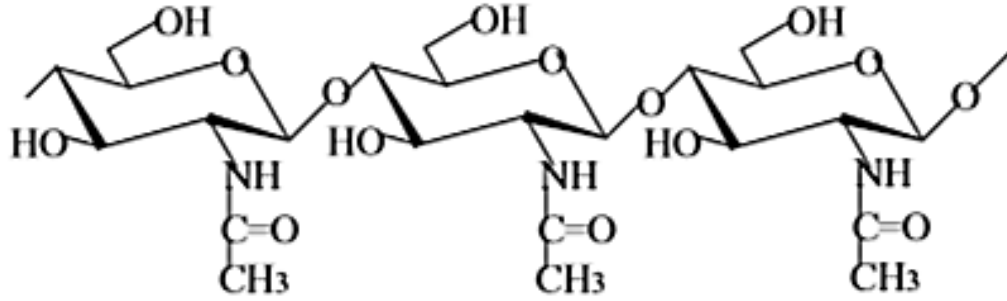


Figura 5. Estructura de la quitina (Krajewska, 2004).

Existen diversos métodos químicos que modifican química o físicamente a las moléculas de quitosano, muchos de estos métodos pueden lograr aumentar la capacidad de absorción para metales, característica conferida por los grupos amino (-NH₂) e hidroxilo (-OH) presentes en la molécula (Quignard y col., 2010) además presenta también una considerable capacidad de unión a proteínas y una alta capacidad de recuperación enzimática.

El quitosano ha sido ampliamente usado como soporte, es barato, no tóxico, y no perjudicial para las enzimas. El quitosano puede proveer muchas ventajas como una excelente hidrofiliidad, alta porosidad, una gran área de adhesión, y por lo tanto pequeña resistencia de transferencia de masa a la enzima (Chang y Juang, 2004).

1.3 Características generales de genipino

El genipino [metil(1*R*,2*R*,6*S*)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato] se obtiene del genipiósido, un glucósido iridoide aislado de los frutos de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides* Ellis (Figura 6), que es capaz de reaccionar espontáneamente con grupos de aminoácidos primarios, péptidos o proteínas, es soluble en agua, alcohol, propilenglicol y presenta estabilidad en el intervalo de pH de 4 a 9 (Ramos de la Peña y col., 2014). Recientemente ha atraído mucha atención por su habilidad de reticular el quitosano y proteínas que contienen residuos de grupos aminos. El genipino ha sido utilizado en estudios de fijación de tejido, productos alimenticios y administración de fármacos, en todas estas

aplicaciones el genipino fue elegido por su baja toxicidad y alta biocompatibilidad, en comparación con otros agentes reticulantes (Cui y col., 2014). Este agente reticulante natural ha sido reportado 10,000 veces menos tóxico que el glutaraldehído (Yuan, y col., 2006; Mi y col., 2005).

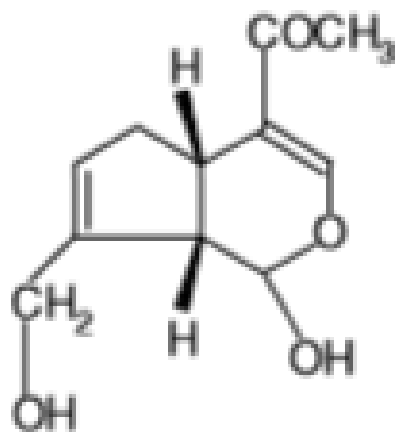


Figura 6. Estructura de genipino (Yuan, y col., 2007).

1.4 Características generales de xilanasas

Las enzimas exhiben una serie de características que hacen que su uso sea más ventajoso en comparación con catalizadores químicos convencionales. La más importante de ellas es el alto nivel catalizador, a menudo superior a los catalizadores químicos, y un alto grado de especificidad que les permite discriminar no solo entre las reacciones, sino también entre los sustratos (Krajewska, 2004). Las enzimas inmovilizadas son catalizadores útiles y reusables en procesos industriales. Tres estructuras tridimensionales y conformaciones juegan un rol importante en la determinación de la eficiencia catalítica, por lo tanto finalmente influenciar su explotación en aplicaciones biotecnológicas (Rana y col., 2014).

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en la hemicelulosa, las xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. El interés por las xilanasas empezó en los años 50 debido a su potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. La

producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación (Ponce y Pérez, 2002).

El xilano es el mayor constituyente de la hemicelulosa, estando presente en un 25-32% en maderas duras y de 15-25% en maderas suaves (Dutta y col., 2007). Los xilanos al degradarse totalmente producen xilosa y arabinosa principalmente.

Las endo- β -D-xilanasas (E.C. 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 xilooligosacáridos (Amaro-Reyes y col., 2011; Polizeli y col., 2011). En general, las endoxilanasas muestran un pico de actividad entre 40 °C y 80 °C, y entre un pH de 4.0 a 6.5, aunque se han reportado condiciones óptimas fuera de estos rangos (Polizeli y col., 2005). Las xilanasas se clasifican principalmente dentro de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas, formalmente denominadas familias F y G, respectivamente (Pastor y col., 2007). 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 tipo rollo de jalea β (Gusakov, 2011). Debido a que existen muchas diferencias entre las xilanasas de la familia 11 se han reportado diferentes sub-clasificaciones incluyendo la separación por clases: A, B, C, D, 1, 2, 3, I, II, III y hasta ahora el estudio más detallado es el reportado por Sapag y col. (2002), quienes dividen la familia 11 de las xilanasas en 10 subfamilias, algunas de las cuales se restringen a hongos (xilanasas Ia, Ib, Ic, II, IIIa, IIIb, IV), y otras a bacterias (A, B, C).

Törrönen y col. (1994), describen la estructura tridimensional de la familia 11 de las xilanasas como estructuras con forma de “mano derecha” (Figura 8). Esta peculiar estructura también denominada “ β -sándwich” consiste en un único dominio compuesto por dos hojas- β y una α -hélice, empacadas una frente a la otra (Hakulinen y col., 2003; Sriprang y col., 2006; Moers y col., 2007).

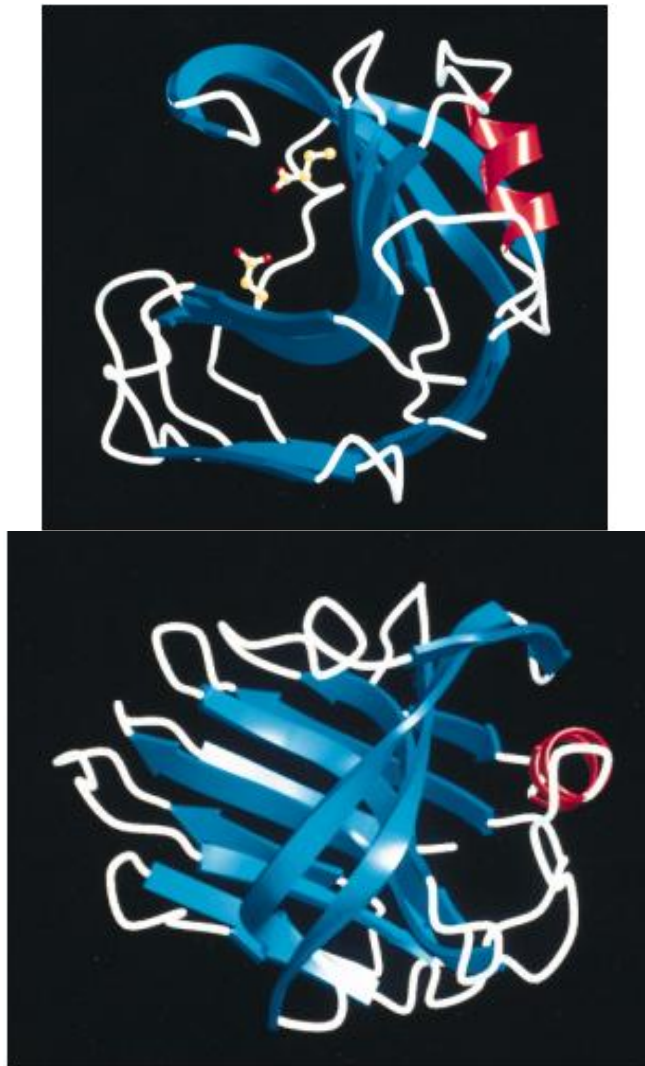


Figura 7. Estructura de endo-1,4- β -xilanasa I de *Aspergillus niger* (Krengel y Dijkstra, 1996).



Figura 8. Analogía de una xilanasa con una mano derecha (Törrönen y col., 1994)

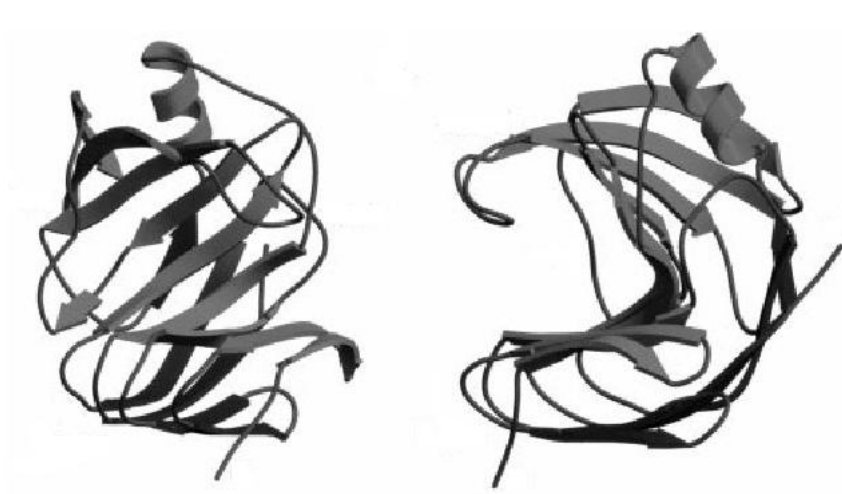


Figura 9. Estructura de Xilanasas de *Thermomyces lanuginosus* (Gruber y col., 1998).

1.5 Justificación

Durante los últimos años con las consecuentes preocupaciones ambientales, los avances en el campo de la biotecnología han podido proporcionar herramientas útiles que pueden ser utilizadas en el desarrollo sostenible de la agricultura, las industrias alimenticias, de bebidas y farmacéuticas.

Actualmente la biotecnología es vista como una alternativa a la tecnología de procesos industriales convencionales en los que se utilizan catalizadores químicos, el uso de sistemas biológicos tienen la ventaja de llevar a cabo conversiones químicas complejas en condiciones ambientales moderadas con alta especificidad y eficiencia. El uso y la sustitución de ingredientes por sistemas biológicos nos llevarán a un proceso más eficiente, con mayor rendimiento de producto y baja producción de productos indeseables. La biocatálisis nos ofrece muchas ventajas en un contexto sostenible y verde, sin embargo la comercialización se ve obstaculizada por la falta de estabilidad en las enzimas y que su precio es considerablemente alto, la respuesta para superar el obstáculo es la inmovilización de enzimas. El uso de una enzima inmovilizada nos traerá consecuencias positivas, así como el uso de un agente reticulante no tóxico como es el genipino, nos permitirá llevar las aplicaciones a un nivel de procesos industriales tanto de consumo humano como de animales tales como es la industria farmacéutica, alimenticia y de bebidas.

2. HIPÓTESIS

La formulación de nanopartículas reticuladas con xilanasas a base de quitosano, genipino y sales de hierro, permitirá mejorar la estabilidad de la actividad catalítica en diferentes condiciones de temperatura y pH, además de que facilitará la separación de la enzima al término del proceso catalítico.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Diseñar nanopartículas de quitosano, sales de hierro y genipino que presenten carácter magnético para ser utilizadas como soporte para la inmovilización de una xilanasa.

3.2 Específicos

- Diseñar nanopartículas magnéticas reticuladas con diferentes concentraciones del agente reticulante, quitosano y tiempo de sonicación de las mezclas.
- Seleccionar las nanopartículas que presenten las mejores propiedades de fijación de proteína y carácter magnético.
- Inmovilizar una xilanasa en el soporte magnético.
- Caracterizar parcialmente la estructura y propiedades catalíticas de las nanopartículas magnéticas reticuladas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos

Quitosano de bajo peso molecular, solución de genipino, xilanas, y todos los demás reactivos grado analítico se obtendrán de manera comercial de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) excepto donde se indique lo contrario.

4.2 Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano

La mezcla del soporte de quitosano de bajo peso molecular y sales de hierro reticulado con genipino, se preparó en dos pasos de acuerdo a lo descrito por Morales y col. (2013) con algunas modificaciones. Una cantidad de hierro proveniente de una mezcla de hierro en relación molar 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) de nitrato férrico y sulfato ferroso con quitosano se mezcló en una solución de ácido acético al 3 % a una temperatura de 60 a 70 °C con agitación suave al vacío por dos horas hasta su disolución según las concentraciones descritas en el diseño factorial fraccionario con una réplica (Cuadro 1). La solución de quitosano se dispersó mediante un procesador ultrasónico a diferentes tiempos y las nanopartículas generadas se precipitaron utilizando una solución de NaOH:Etanol 96 % en proporción 4:1. La mezcla alcalina se homogeneizó rápidamente utilizando un vortex durante 30 segundos. La emulsión resultante se mantuvo en agitación suave (60 rpm) durante 18 horas para la maduración de las nanopartículas. Al cabo del tiempo de maduración se realizaron lavados con agua:etanol 96 % relación 1:1 de la emulsión, centrifugando por 5 minutos a 3000 x g para neutralizar las nanopartículas. La pasta de las nanopartículas lavadas fue secada en un horno de convección a 80 °C durante 5 horas. Finalmente la pasta seca fue pulverizada utilizando un mortero cerámico con el fin de obtener una muestra manejable. Se utilizaron dos reacciones en peso de hierro total y quitosano, siendo 1:1 y 2:1 con y sin sonicación. La relación de hierro y quitosano que presentó carácter magnético significativo fue seleccionada y utilizada en los siguientes experimentos.

4.3 Reticulación de las nanopartículas con genipino

Una determinada cantidad de nanopartículas pulverizadas se mezcló durante 30 minutos con la cantidad necesaria de genipino para tener las concentraciones finales descritas en el diseño experimental y 30 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). Se realizó una cinética de fijación de proteína al soporte mediante la determinación de proteína soluble y genipino residual después de 10 minutos de exposición a las nanoesferas (50 mg). La proteína soluble presente en el sobrenadante se obtuvo mediante el método descrito por Bradford (1976), usando BSA como estándar, luego de centrifugar la mezcla de las nanopartículas con genipino y BSA a 13000 x g durante 3 min y se cuantificó su absorbancia espectrofotométricamente a 595 nm (iMark, Bio Rad).

Cuadro 1. Diseño factorial fraccionado $2^{(3-1)}$

Tratamiento	Quitosano (% p/v)	Genipino (% p/v)
1	0.5	2.5
2	3.0	2.5
3	3.0	0.25
4	0.5	0.25

La formulación de nanopartículas magnéticas reticuladas que presentó significativamente mayor retención de proteína fue ensayada para inmovilizar una xilanasas en las condiciones de mayor retención de proteína. Posteriormente las nanopartículas magnéticas enzimáticas (NME) fueron sometidas a secado para su almacenamiento.

4.3.1 Determinación de la cinética de absorción de BSA

Una vez determinado el mejor diseño de absorción, se realizaron análisis de la cinética de absorción con respecto al tiempo, tomando lecturas cada 10 min durante dos horas y centrifugando las muestras por 3 minutos a 13000 rpm comenzando con una concentración de BSA de 700 µg/mL. La proteína soluble presente en el sobrenadante se obtuvo por medio del método de Bradford (1976). Las lecturas se llevaron a cabo espectrofotométricamente a 595 nm (Bio Rad iMark).

4.4 Determinación del grado de reticulación

El grado de reticulación de las NME se determinó mediante el ensayo de ninhidrina (NHN) (Yuan y col., 2007). EL ensayo determina el porcentaje de grupos amino libres que quedan en los NME después de la reticulación. La absorbancia fue determinada a 570 nm con un espectrofotómetro. La cantidad de los grupos amino libre en la muestra de prueba después de calentar con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia óptica de la solución.

La curva concentración de los grupos NH₂ 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:

$$\text{Grado de reticulación} = \frac{[(\text{NHN amina react.})_i - (\text{NHN amina react})_f]}{(\text{NHN amina reactiva})_i} \times 100$$

Donde “i” corresponde a la fracción molar de NH₂ libre de las muestras no reticuladas y “f” corresponde a la fracción molar de NH₂ libre restante de las muestras reticuladas.

4.5 Características del hinchamiento de las nanopartículas magnéticas enzimáticas (NME)

Las características de hinchazón de las NME fueron analizadas por inmersión de las muestras secas en una solución reguladora 50 mM de acetato (pH 5), a 22 ± 2

°C durante intervalos de tiempo específicos. Posteriormente, las muestras fueron retiradas de la solución y se eliminó el exceso de la solución de superficie con un pedazo de toalla de papel. La relación de hinchamiento (RH) de la muestra se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$RH = \frac{[WH - Wo]}{Wo} \times 100$$

Donde WH representa el peso de la muestra hinchada y Wo es el peso inicial de la muestra seca (Dai y col. 2008).

4.6 Determinación de la actividad enzimática de la xilanasas

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados cuantificando los azúcares reductores liberados de acuerdo al método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), después de hidrolizar el sustrato con la enzima, en las condiciones indicadas de temperatura y pH propuestas. Como sustrato se utilizó una mezcla de 1 g/L de xilano de abedul en amortiguador a temperatura y pH determinado. Se preparó una curva estándar de glucosa (Amaro-Reyes y col., 2011). Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de glucosa equivalente por minuto. La actividad de la enzima libre fue comparada con las nanopartículas siguiendo el mismo procedimiento.

4.7 Temperatura y pH óptimo de la xilanasas

Para determinar la temperatura óptima de la xilanasas, se cuantificó su actividad incubando a diferentes temperaturas de 30 °C hasta 90 °C. El pH se determinó usando una solución reguladora de acetatos 50 mM con valores de pH de 3.6 a 5.0, una solución reguladora de fosfatos 50 mM con valores de pH de 6.0 a 8.0 y una solución reguladora de glicina con pH 9.0 (Amaro-Reyes y col., 2011). La energía de activación (Ea) de la enzima libre e inmovilizada se determinó mediante el análisis de regresión lineal de la ecuación de Arrhenius.

4.8 Estabilidad a la temperatura de la enzima inmovilizada

La estabilidad a la temperatura de las NME fue determinada ensayando la actividad enzimática luego de incubarla a la temperatura óptima, durante un lapso de 60 minutos tomando muestra cada 10 minutos, utilizando un baño seco AccuBlock (Labnet, Edison, NJ, EUA)). La vida media de la enzima se calculó mediante análisis de regresión lineal de la actividad específica a la temperatura deseada en función del tiempo. (Swarnalatha y col., 2013).

4.9 Efecto de diferentes químicos sobre la xilanasa

Se determinó el efecto de diferentes sustancias (metales, detergentes, agentes reductores) sobre la actividad catalítica de las NME y de la enzima libre en condiciones de temperatura y pH óptimos. (Amaro-Reyes y col., 2011).

4.10 Capacidad de reutilización de las NME

La capacidad de reutilización de las NME fue evaluado ensayando la actividad catalítica en sucesivos ciclos. Cada ciclo consistió en la determinación de la actividad de xilanasa en las NME y la inmediata filtración de la mezcla de reacción a través de un papel filtro Whatman #1 para recuperar las NME.

4.11 Caracterización de las NME

Se tomaron microfotografías mediante microscopia electrónica de barrido en alto vacío con una aceleración de electrones con voltaje de 15kV usando un microscopio Carl Zeiss (EVO-50, Zeiss, Jena, Alemania) para observar la morfología de las nanopartículas magnéticas (NPM). Una muestra de NME deshidratada a 80 °C por 8 horas fue montada en el portaobjeto, posteriormente fue recubierta con oro mediante pulverización catódica durante 60 segundos y 30 mA (Desk II, Denton Vacuum, NJ, EUA). Las mediciones de saturación magnética, fueron determinadas por medio de un Micromag 2900 (Applied magnetic laboratory, Baltimore, EUA). El tamaño de partícula del material de quitosano fue medido por dispersión de luz dinámica (Brookhaven Instruments, Modelo B1-200 SM) realizando una dilución de la muestra en etanol agua (1:1) con un sonicación por 5

minutos. Las NME se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un DSC (Perkin Elmer, Massachussets, EUA). Las muestras se limpiaron en una atmosfera de nitrógeno, la tasa del flujo de calor fue de 25 °C a 500°C con un aumento de 10°C por minuto. Como material de referencia estándar para calibrar las escalas de temperatura y energía del instrumento DSC fue utilizado Indio (m.p. = 156.8 °C).

4.12 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos. El diseño experimental y comparación de medidas (con $p < 0.05$ como el nivel mínimo significativo) se realizó mediante el software J.M.P 5.0.1 (2002, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de las nanopartículas de quitosano

Una parte esencial de las nanopartículas, es la capacidad magnética, la cual es conferida por las sales de hierro empleadas en la síntesis. En la Figura 9 se muestran las curvas de histéresis de la mezcla de sales de hierro, en dos campos distintos, ambas muestran el momento magnético de los óxidos de hierro. En la Figura 10A se muestra la gráfica del momento magnético de las sales en un campo de 100 mili Teslas obteniendo una saturación magnética de $16.91 \mu\text{Am}^2/\text{Kg}$, mientras que en la Figura 10B se muestra el momento magnético en un campo de 1 Tesla teniendo una saturación magnética de $11.83 \mu\text{Am}^2/\text{Kg}$, debido al tipo de curva que se forma se puede decir que el soporte se comporta como un material ferromagnético. Los materiales ferromagnéticos muestran fuerza de atracción hacia el campo magnético externo aplicado parecido a los materiales paramagnéticos pero con una intensidad superior, los materiales ferromagnéticos conservan una magnetización, llamada magnetización remanente cuando se retira el campo magnético exterior, solamente el hierro, cobalto y níquel son ferromagnéticos en la temperatura ambiente, esto puede explicar el porqué el soporte tiene este comportamiento. (Bulte y col., 1994). En otros estudios las nanopartículas de quitosano con óxidos de hierro tienen un tamaño de partícula aproximadamente de $40 \mu\text{m}$, reportan una saturación magnética completa de $24 \text{Am}^2/\text{Kg}$ (Hritcu y col., 2011). Li y Col. (2008) proponen que la pérdida de la capacidad magnética del material se debe principalmente a la presencia de un polímero empleado en la síntesis del soporte, que posiblemente genera desorden en la superficie formando una capa magnéticamente muerta. Lo que sugiere que tanto el tamaño de partícula como el uso de moléculas químicas no magnéticas como el quitosano durante la síntesis, tiene relación con la capacidad magnética final del material.

La mezcla de sales de hierro que presentó mayor magnetismo fue con relación 1:2 (quitosano:hierro) sin sonicación, mezcla que fue utilizada para la síntesis del soporte para los ensayos posteriores. La sonicación está relacionada con el tamaño de partícula del soporte, pues en tratamientos con menor tiempo de sonicación se llegan a obtener tamaños de partícula de aproximadamente 300nm , lo que sugiere

que el tiempo de sonicación puede influir en el tamaño de partícula y por lo tanto en el porcentaje de absorción de proteína.

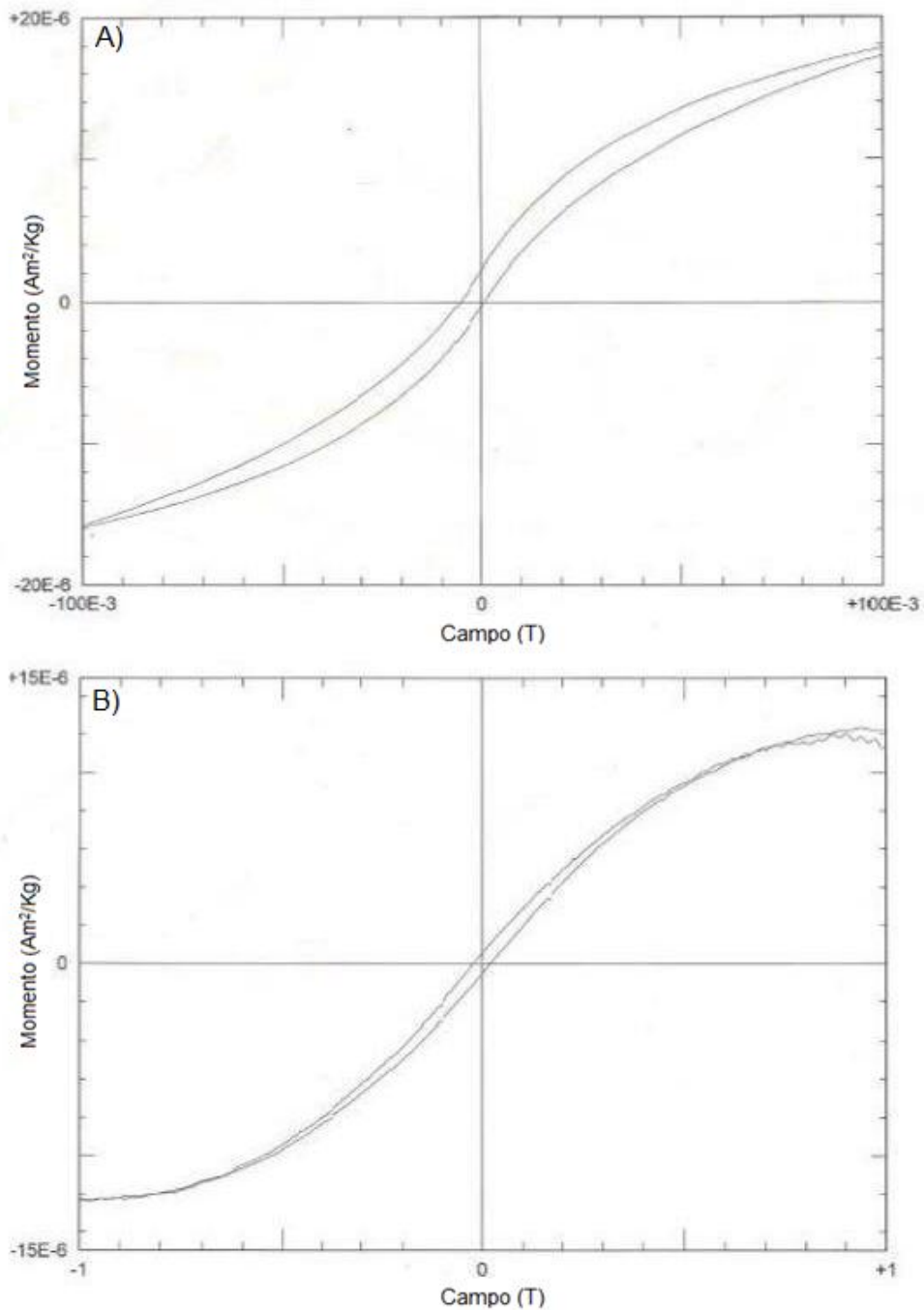


Figura 10. Curvas de histéresis que muestran la saturación magnética del soporte.

A) Momento magnético de las sales de hierro en un campo de 100 mili Teslas.

B) Momento magnético de las sales de hierro en un campo de 1 Tesla.

Reticulación de las partículas con genipino

La síntesis de las NME es un método que logra un buen rendimiento en absorción de proteína. Se probaron todas las combinaciones propuestas por el diseño factorial fraccionado. En el Cuadro 2 se puede observar la cantidad de proteína libre después de haber sido expuesta al soporte magnético. El tratamiento dos con 3 % de quitosano y 2.5 % de genipino fue el que presentó mayor absorción por lo que se utilizó este tratamiento para la síntesis del soporte.

Cuadro 2. Proteína absorbida por el soporte.

Tratamiento	Quitosano (% p/v)	Genipino (% p/v)	Proteína libre (mg/ml)	Desviación estándar
1	0.5	2.5	6.501	2.114
2	3.0	2.5	0.9626*	0.077
3	3.0	0.25	8.615	1.95
4	0.5	0.25	6.804	5.87

*Diferencia estadística significativa con $p > 0.05$.

Los resultados muestran que la absorción de la proteína sí tiene relación con la concentración total de genipino, la unión de la proteína es mayor cuando el genipino se encuentra en concentraciones más elevadas.

Existen diferentes métodos para sintetizar estas partículas, Wang y col. (2013) proponen como método una microemulsión donde se obtiene una absorción de proteína de aproximadamente 110 mg/g de soporte. Por otra parte Morales y col. (2013) proponen la polimerización del quitosano con acrilamida (1:1) teniendo con este método una absorción de BSA de 350 mg/g de soporte. Esto nos indica que la absorción del soporte con quitosano es 5 veces menor que los soportes preparados con acrilamida y 1.5 veces menor que los soportes preparados por microemulsión.

Cinética de absorción de BSA

Después de obtener el tratamiento que muestra la máxima absorción de proteína, se determinó la cinética de absorción con BSA. De acuerdo a los datos obtenidos se logra una absorción total de proteína (14 μg de BSA/ mg de soporte) a partir de los 60 minutos de exposición y hasta las dos horas, como se muestra en la Figura 11, no se muestra un incremento aparente en la proteína libre, deduciendo que el soporte es capaz de retener la proteína sin que la saturación influya en la unión del soporte con esta y suponga un incremento.

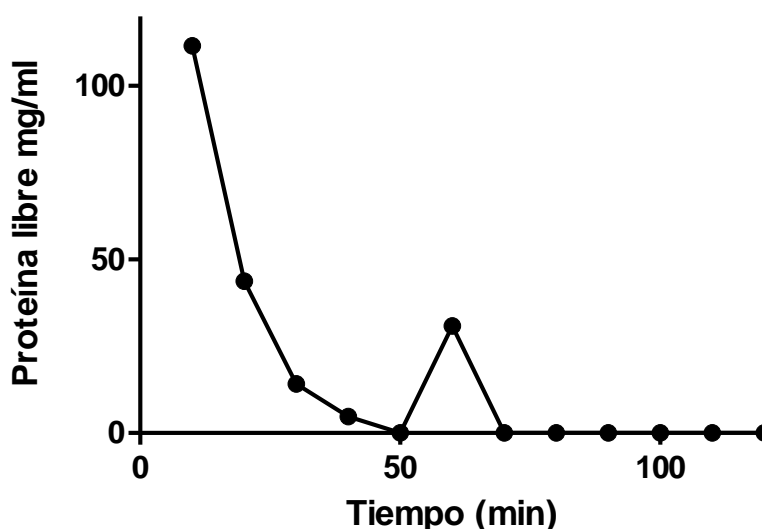


Figura 11. Cinética de absorción de BSA.

Determinación del grado de reticulación

El grado de reticulación se obtuvo mediante el ensayo de ninhidrina, se pudo observar que después de una hora de exposición se logra una reticulación del 45 %, ya que la cantidad de grupos aminos libres que se exhiben después de la reacción son muy pocos. Esto también puede verse en la cinética de absorción donde después de una hora es absorbida toda la proteína y esto se llega con un grado de entrecruzamiento alto. Yuan y col. (2007) sugieren que el grado de entrecruzamiento es dependiente de la concentración del genipino y del tiempo de

reacción obteniendo porcentajes de reticulación de hasta 38 %. Mientras que Mi y col. (2001) obtuvieron solo un 9.9 % de grado de reticulación después de 6 horas de exposición al genipino.

Características del hinchamiento de las nanopartículas

La Figura 12 muestra las características de hinchamiento en 3 intervalos de tiempo, se esperaría que la relación de hinchamiento aumentara al aumentar el tiempo de exposición, sin embargo el soporte presenta una mayor relación de hinchamiento a los 20 minutos de exposición disminuyendo significativamente a los 40 y 60 minutos. Esto puede deberse a que el soporte al llegar a su máximo punto de absorción sufre una saturación que tiene como resultado un efecto negativo sobre la capacidad de retención. Yuan y col. (2007) exponen resultados similares a estos, el porcentaje de la relación de hinchamiento disminuye conforme aumenta el tiempo de reacción de entrecruzamiento. Además la concentración de genipino no tiene un impacto relevante. En contraste Cui y col. (2014), y Mi y col. (2001) reportan que el hinchamiento de nanopartículas disminuye con el aumento de la concentración de genipino.

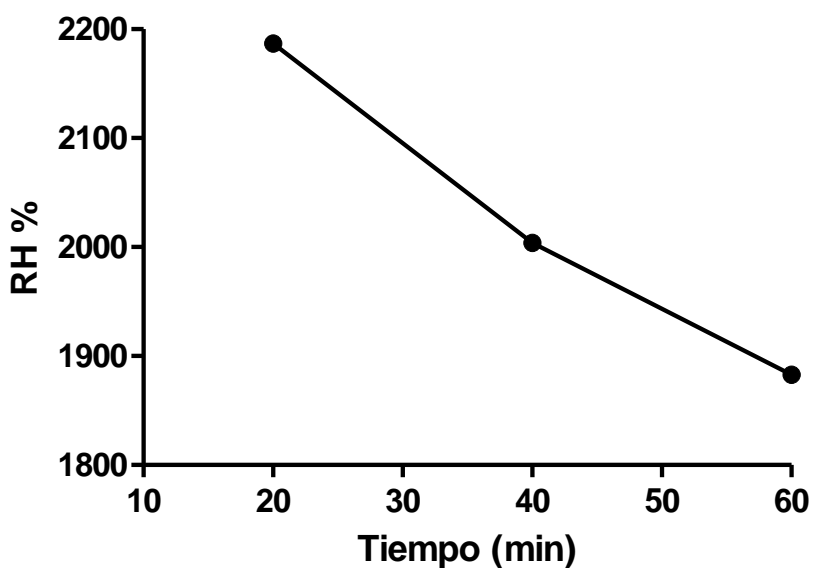


Figura 12. Porcentaje de hinchamiento de las NME a distintos tiempos.

Temperatura y pH óptimo de la xilanasa

Es comúnmente encontrado que la enzima inmovilizada tiene una estabilidad térmica mayor que las enzimas libres debido a la reducción de la flexibilidad conformacional en las enzimas inmóviles (Chang y col., 2004).

En la Figura 13 se muestra la actividad de la enzima libre contra la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas, se puede observar que ambas enzimas tienen mayor actividad en una temperatura de 70 °C. La actividad relativa de la enzima libre se mantiene más o menos lineal (50%) de 30 a 60 °C hasta llegar a su punto máximo a 70 °C. , Mientras que el comportamiento de la actividad de la enzima inmóvil es proporcional al aumento de las temperaturas hasta llegar a su punto máximo de 40 a 70 °C. El 100 % de la enzima libre equivale a 4.45 U/mg de proteína mientras que el 100 % de la enzima inmovilizada es de 0.0635 U/mg de soporte.

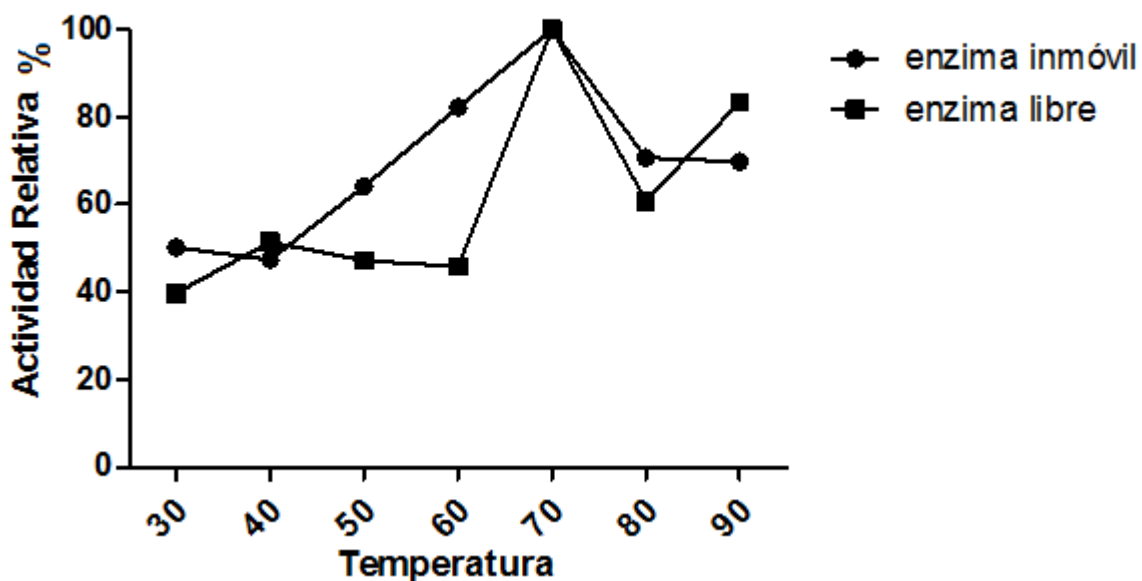


Figura 13. Actividad de la enzima libre contra la enzima inmovilizada a distintas temperaturas.

Ea (energía de activación) se refiere a la mínima energía requerida para que una reacción proceda, para la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas los rangos de Ea van de 2 a 40 Kcal/mol. La energía de activación de la enzima libre es igual a 22.24 KJ/Kmol K y la energía de activación de la enzima inmovilizada es igual a 63.14 KJ/Kmol K.

La selección de un pH óptimo es muy importante para el proceso de absorción, el pH no solo afecta la carga de la superficie del adsorbente si no también el grado de ionización y la especiación del adsorbente durante la reacción (Thinh y col., 2012).

En la Figura 14 se muestra que la actividad enzimática de la enzima libre contra la enzima inmóvil en un rango de pH que va de 3 a 9, al igual que en la temperatura, ambas enzimas presentaron mayor actividad a un pH de 9. Estos resultados contradicen lo anteriormente reportado donde su máxima actividad está en un pH de 7. Para la enzima libre su actividad relativa del 100% equivale a 6.18 U/mg de proteína mientras que en la enzima inmóvil el 100% equivale a 0.075 U/mg de soporte.

Comparando los resultados con la base de datos BRENDA donde la enzima tiene su máxima actividad en un pH de 6 a 7 y a una temperatura que va de 60 a 75 °C, se puede observar que difiere únicamente en el pH óptimo ya que la temperatura óptima esta dentro del rango de la base de datos. (www.brenda-enzymes.org).

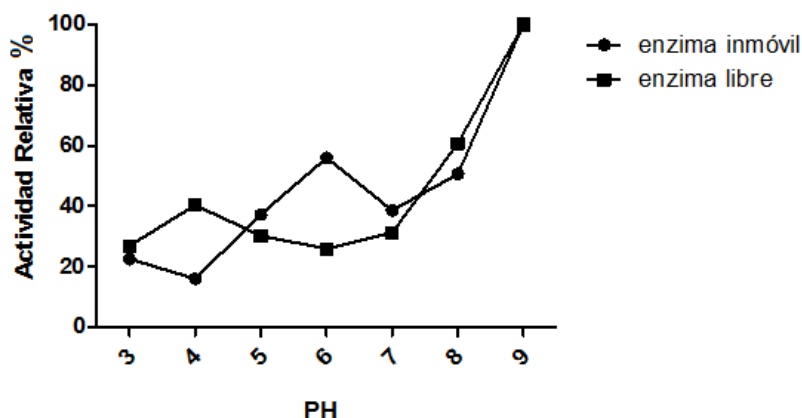


Figura 14. Actividad de la enzima libre contra la enzima inmovilizada a distintos valores de pH.

Estabilidad a la temperatura

En la Figura 15 se puede observar que la estabilidad va disminuyendo con el tiempo, aunque la inmovilización le confiere a la enzima una mayor protección al ser expuesta a cierta temperatura durante tanto tiempo la estructura de la enzima sufre cambios llevándola a una degradación lenta.

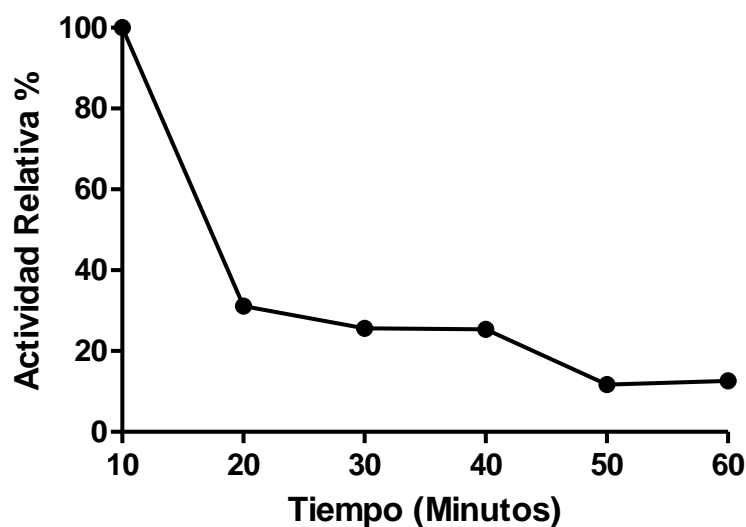


Figura 15. Actividad de la enzima inmovilizada a 70 °C durante el tiempo.

Efecto de diferentes químicos sobre la xilanasa

Según la literatura existen algunos iones metálicos mono y di valentes que tienen actividad inhibitoria o activadora hacia la enzima o bien le proporcionan protección térmica. En la Figura 16 se observa que el DTT aumenta la actividad en la enzima libre, siendo el 100 % equivalente a 6.26 U/mg de proteína mientras que el CuSO_4 presenta carácter inhibitorio con un 51.80% de actividad equivalente a 3.24 U/g de proteína; a diferencia de la enzima inmóvil como se muestra en la Figura 17 la máxima actividad se ve potenciada por el Triton X representando un 100 % de actividad equivalente a 0.19 U/mg de soporte y al igual que la enzima libre, la enzima inmovilizada se ve inhibida por el CuSO_4 . De acuerdo a la base de datos

BRENDA el β -mercaptoetanol y el Cu^{2+} son inhibidores de la enzima, comparando con los resultados el β -mercaptoetanol no tuvo mayor relevancia sin embargo uno de los químicos que tuvo la mayor acción inhibitoria fue el CuSO_4 para ambas enzimas, libre e inmobilizada.

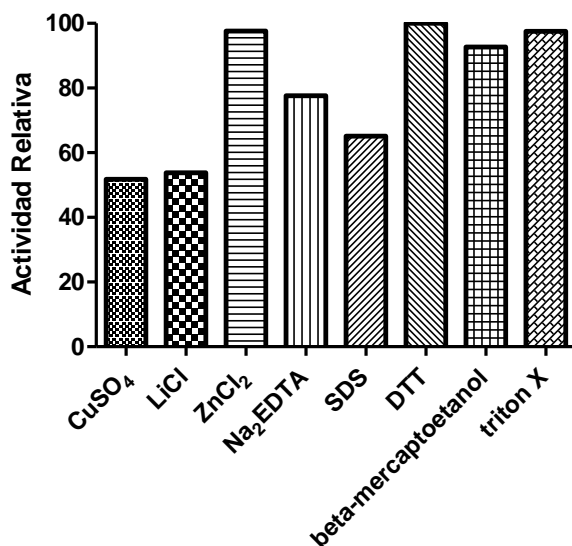


Figura 16. Efecto de los químicos sobre la enzima libre.

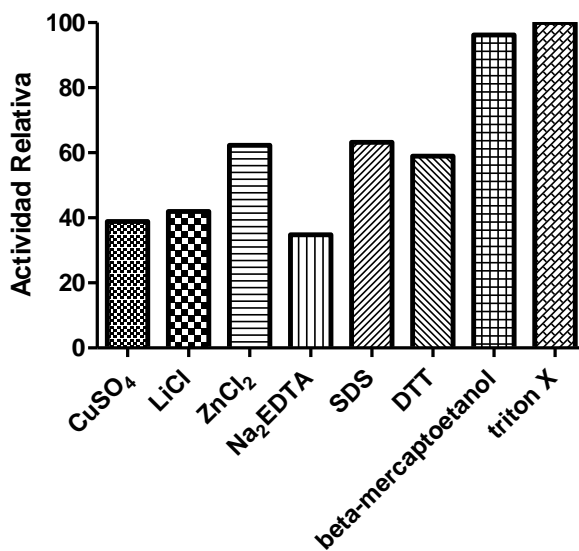


Figura 17. Efecto de los químicos sobre la enzima inmóvil.

Capacidad de la reutilización de las NME

Las enzimas presentan cierta sensibilidad a las condiciones en las que trabajan y pueden presentar una pérdida de actividad enzimática si estas no son favorables. La inmovilización le confiere a la enzima protección y ventajas sobre el desempeño en los cambios de las condiciones. En la figura 18 se observa que en aproximadamente 5 ciclos de reuso de la enzima inmovilizada se logra conservar un 87% de la actividad. Esto confirma que la inmovilización le confiere a la enzima mayor actividad en condiciones de temperatura de 70 °C y de pH 9 y que la desnaturalización de la enzima es más lenta fuera de estas. Demir y col. (2014) sugieren que el quitosano le da suficiente rigidez a la enzima para evitar su desnaturalización en condiciones de temperatura y pH extremas ya que el soporte logra mantener estables los enlaces covalentes restringiendo de esta manera la movilidad de la enzima dándole rigidez y como consecuencia evitando la desnaturalización. A su vez proponen que si la enzima inmóvil en un soporte de quitosano se somete a menores temperaturas con las mismas condiciones de pH se podría ampliar el número de ciclos de uso de la enzima.

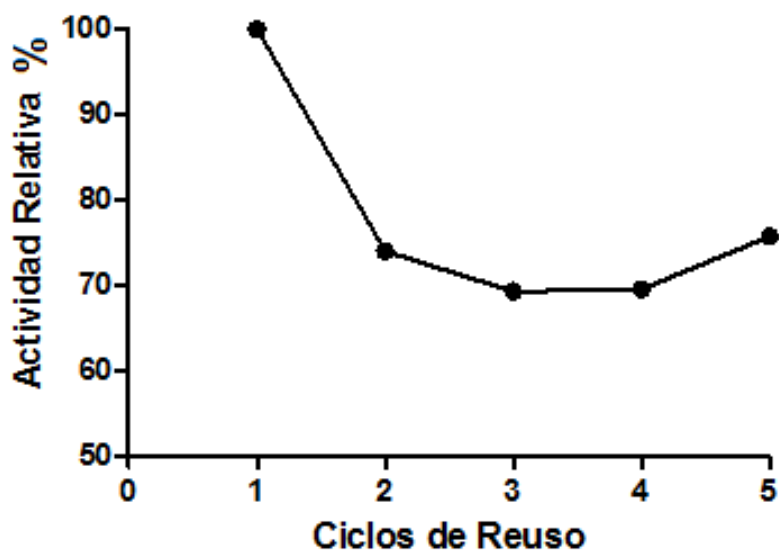


Figura 18. Ciclos de reuso de la enzima inmovilizada.

Caracterización de las nanopartículas

Se tomaron microfotografías del soporte con un microscopio electrónico de barrido recubriendo las muestras con una capa ultra fina de oro para obtener información sobre su morfología.

En la Figura 19 se muestran las distintas fotografías tomadas en varias ampliaciones, se puede observar que principalmente son moléculas esféricas con un amplio rango en diámetros y que forman agregados densos por el tamaño individual de las partículas.

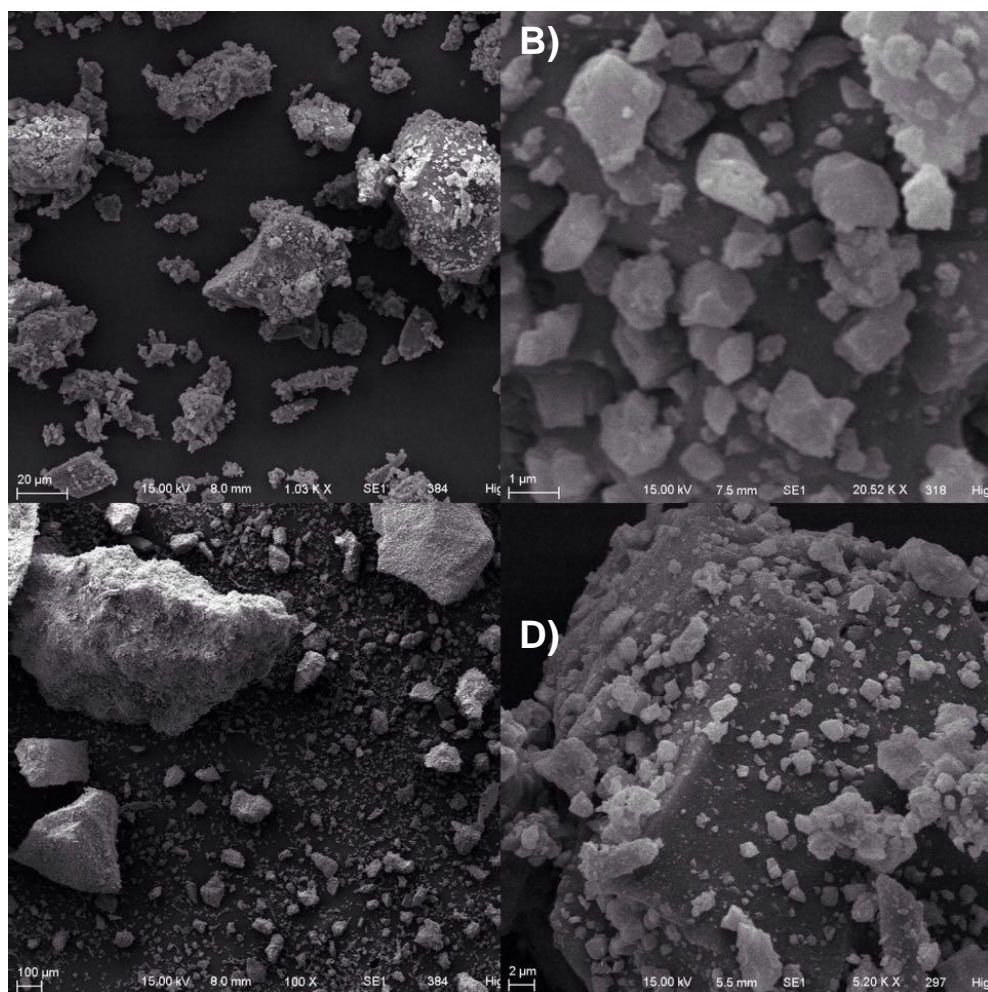


Figura 19. Microfotografías del soporte magnético. A) Microfotografía con 1,000 ampliaciones. B) Microfotografía con 20,000 ampliaciones. C) Microfotografía con 100 ampliaciones. D) Microfotografía con 5,000 ampliaciones.

El tamaño de partícula fue determinado mediante dispersión de luz dinámica, a continuación se observan los resultados de los histogramas de la enzima inmovilizada, del soporte y del quitosano.

El soporte (Figura 20) mostro una distribución de tamaño de partículas muy cerrada con un promedio de 32.5 nm, la enzima inmovilizada (Figura 21) mostró un histograma bimodal, con dos distribuciones de partícula distintos y con un promedio de tamaño de partícula de 254 nm. Esto se le puede atribuir a que las partículas forman agregados como se mostró en las microfotografías. Por último el quitosano (Figura 22) con una distribución más amplia, tiene un promedio de tamaño partícula de 395.5 nm.

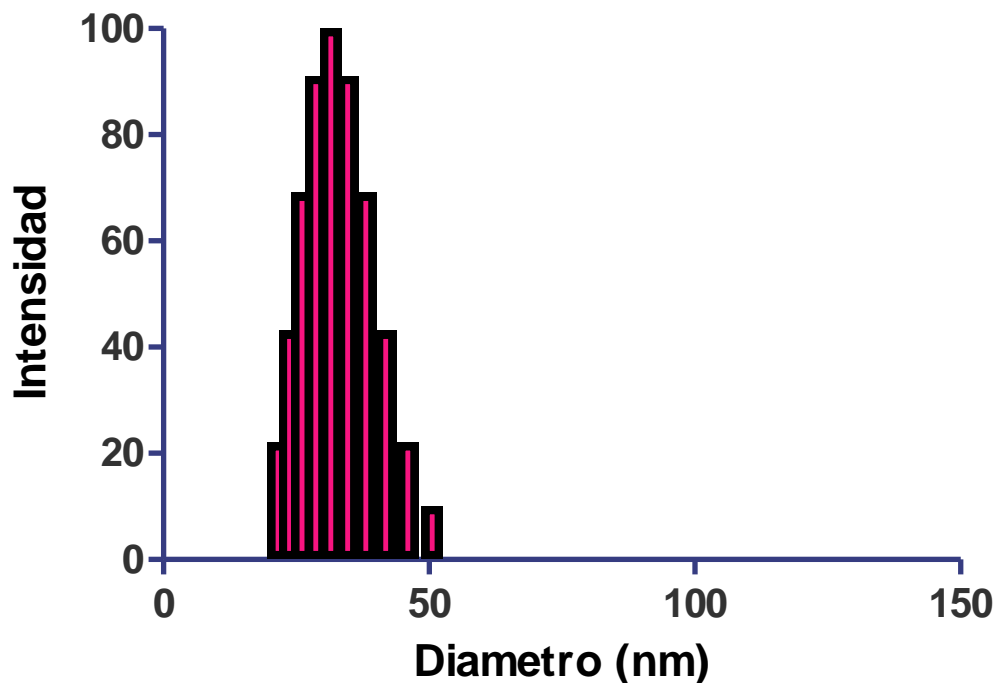


Figura 20. Distribución del tamaño de partícula del soporte magnético.

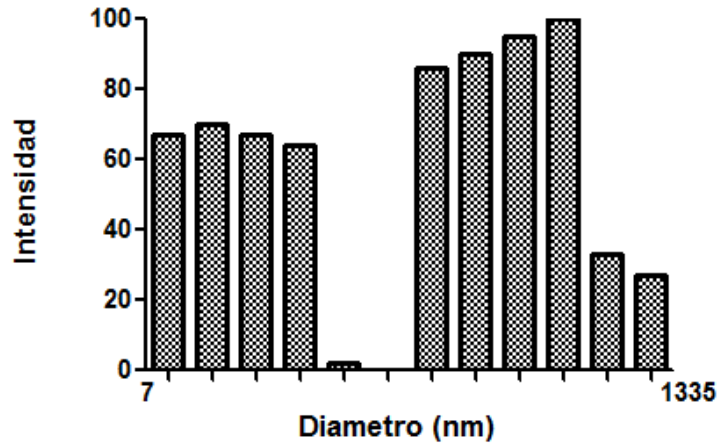


Figura 21. Distribución del tamaño de partícula de la enzima inmovilizada.

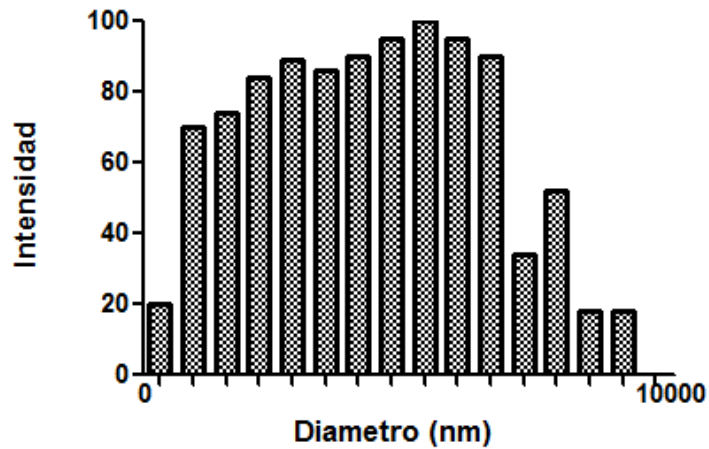


Figura 22. Distribución del tamaño de partícula del quitosano.

Rodríguez y col. (2010) sugieren que tanto el tamaño de partícula como la morfología dependen del método de preparación del quitosano, el agente reticulante y las modificaciones que tenga. Dependiendo de estos factores las partículas pueden ser esféricas o irregulares con diámetros de hasta 500nm.

Wang y col. (2013) proponen que para tener una mejor absorción de proteína, el tamaño de partícula del soporte debe estar entre 10 y 20 nm. Esto se debe a que

se tiene una mayor superficie de exposición de los grupos funcionales NH_2 y OH del soporte, además que la absorción es dependiente del pH. Por lo tanto si se disminuye el tamaño de las NME y se optimiza el pH de la reacción de reticulación se logrará una mayor absorción de proteína.

Para finalizar la caracterización se sometió a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Una técnica de análisis térmico que permite medir cambios energéticos de la muestra en presencia de un material de referencia. Se realizó un perfil de DSC al soporte sin enzima, a la enzima inmovilizada y a la enzima sola en el rango de temperatura de 25 a 500 °C. Sin embargo para este estudio cobran mayor relevancia los cambios de las muestras sufridos hasta los 100 °C ya que hasta esta temperatura es significativo el efecto de la temperatura sobre la enzima. En la Figura 23 se puede observar un cambio estructural debido al aumento de temperatura aproximadamente en 65 °C tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada respectivamente. Siendo congruente este comportamiento con la temperatura óptima de la enzima libre e inmovilizada. Para el caso del soporte, este primer cambio estructural se presenta aproximadamente en los 73 °C. Adicionalmente se aprecia que cuando la enzima esta inmovilizada con el soporte se requiere 1.4 veces más energía para que se lleve a cabo este primer cambio estructural comparada con la enzima libre. Esto puede relacionarse con que el soporte brinda protección térmica durante más tiempo a la enzima inmovilizada, concordando con los resultados de ensayos de estabilidad térmica.

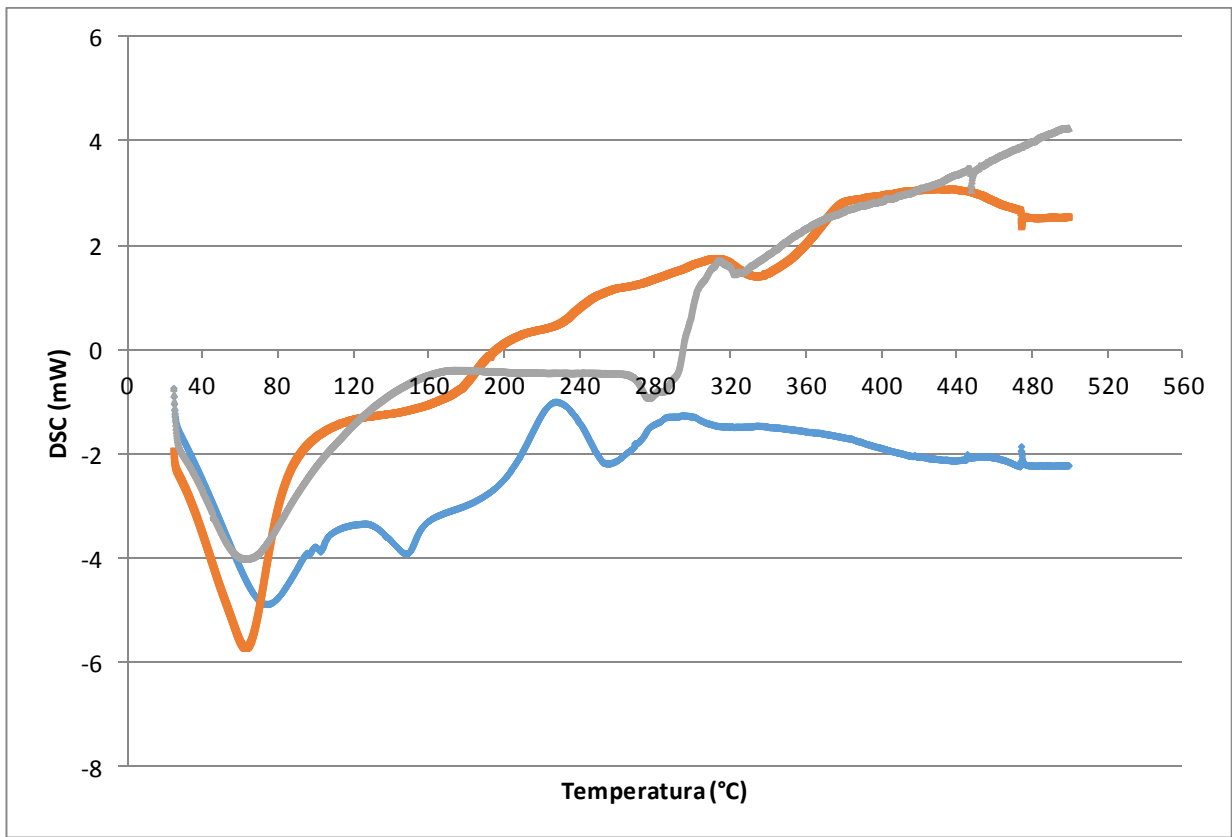


Figura 23. Termograma de DSC. Enzima inmovilizada (naranja), el soporte magnético (azul) y la enzima libre (gris).

6. CONCLUSIONES

Las NME fueron sintetizadas exitosamente con características magnéticas elevadas y con una capacidad de reticulación con genipino alta, sugiriendo que el grado de reticulación del quitosano y la enzima tiene una relación directa con la concentración final de genipino. Se analizó el comportamiento de la actividad enzimática libre e inmovilizada bajo diversas condiciones de pH, temperatura, diferentes químicos y en ciclos de reuso.

Mediante la inmovilización de la xilanasa en el soporte magnético se determinó que la enzima presenta un máximo de actividad en una temperatura de 70 °C y a un pH 9, lo que demuestra que el soporte le confiere a la enzima protección en ambientes de condiciones extremas, evitando la pérdida total de su actividad al mismo tiempo que le da la capacidad de ser utilizada en aproximadamente 5 ciclos de reuso manteniendo el 87% de su actividad, se observó que hay químicos que potencializan la actividad y otros que la inhiben, siendo distintos para cada una de las enzimas, libre e inmovilizada.

A través de la microscopia electrónica de barrido se observó que el material sintetizado tiene unidades esféricas y que a pesar de ser muy pequeñas tienden a formar agregados, mismos resultados que se pudieron corroborar en el tamaño de partícula mediante dispersión de luz, dando histogramas bimodales debido a los aglomerados de partículas.

En general la inmovilización de la xilanasa en el soporte tuvo grandes ventajas en cuanto a su actividad en distintos ambientes además de que presenta una fácil recuperación de la enzima para su reutilización.

Por lo tanto la inmovilización enzimática puede proveer una solución alternativa a los problemas a los que se ven enfrentadas las industrias en estos tiempos, para la elaboración de sus productos a granel, al disminuir los costos debido a la posibilidad de reutilización y al hacer frente a las limitaciones de condiciones en las que trabaja una enzima.

7. REFERENCIAS

Alsarra IA, Betigeri SS, Zhang H, Evans BA, Neaua SH. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*. **2002**;23(17):3637–3644.

Amaro A, García BE, Vázquez DG, Amaya S, Castaño E, Guevara RG, Loera O, Regalado C. Homologue expression of a fungal endo-1,4- β -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations. *Afr J Biotechnol*. **2011**;10(10):1760-1767.

Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: Use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*. **1969**;6:43-52.

Betancor L, López-Gallego F, Alonso- Morales N, Dellamora G, Mateo C, Fernandez-LaFuente R. Glutaraldehyde in protein immobilization. *Methods Biotechnol Immobil Enzym*. **2008**; 2:57-64.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**;72(1-2):248-254.

Brady D, Jordaan J. Review. Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett*. **2009**;31:1639–1650.

Bulte JW, Douglas T, Mann S, Frankel RB, Moskowitz BM, Brooks RA, Baumgarner CD, Vymazal J, Strub MpP, Frank JA. Magnetoferritin: characterization of a novel superparamagnetic MR contrast agent. *Journal of magnetic resonance imaging*. **1994**; 4 (3): 497-505.

Carrara CR, Rubiolo AC. Immobilization of β -Galactosidase on chitosan. *Biotechnol Progress*. **1994**; 10: 220-224.

Chang M, Juang R. Activities, stabilities, and reactions kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb Tech*. **2004**;36:75-82.

Chen S, Wu Y, Mi F, Lin Y, Yu L, Sung H. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J Con Rel*. **2004**;96:285-300.

Cipolatti EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feltes MMC, Oliveira JV, Ninow JL, de Oliveira D. Review: Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J Mol Catal B Enzym*. **2014**;99:56-67.

Crompton KE, Prankerd RJ, Paganin DM, Scott TF, Horne MK, Finkelstein DI, Gross KA, Forsythe JS. Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels. *Biophys Chem*. **2005**;117:47-53.

Cui L, Jia J, Guo Y, Liu Y, Zhu P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydr Polym*. **2014**;99:31-38.

Dai Y-N, Li P, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q. A novel pH sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead for nifedipine delivery. *Biopharm Drug Dispos*. **2008**;29:173-184.

Demir S, Kahraman MV. Immobilization of alpha-amylase on aminated polyimide membrane: preparation, characterization, and properties. *Starch*. **2014**;66:274-280.

Dutta T, Sengupta R, Sahoo R, Sinha Ray S, Bhattacharjee A, Ghosh S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. *Lett Appl Microbiol*. **2007**;44:206–211.

Gruber K, Klintschar G, Hayn M, Schlacher A, Steiner W, Kratky C. Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: High-resolution X-ray structure and modeling studies. *Biochemistry*. **1998**; 37 (39): 13475-13485.

Gusakov AV. Proteinaceous inhibitors of microbial xylanases. *Biochem*. **2010**;75(10):1185-1199.

Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Braz J Phys*. **2009**;39(1A):205-209.

Hakulinen N, Turunen O, Jänis J, Leisola M, Rouvinen J. Three-dimensional structures of thermophilic β -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and

Nonomuraea flexuosa. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. Eur.J.Biochem. **2003**;270:1399–1412.

Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. J Chem Biol. **2013**; 6:185-205.

Hritcu D, Dodi G, Sillion M. Composite magnetic chitosan microspheres: in situ preparation and characterization. Polym Bull. **2011**; 67:177-186.

Jia F, Narasimhan B, Mallapragada S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. Biotechnol Bioeng. **2013**;111(2):209-222.

Kaur S y Dhillon GS. Review article: The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. Crit Rev Microbiol. **2014**;40(2):155-175.

Krajewska B. Application of chitin-and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: a review. Enzyme Microb Tech. **2004**;35:126-139.

Krengel U, Dijkstra BW. Three-dimensional structure of Endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*. Molecular basis for its low pH optimum. J Mol Biol. **1996**;263:70-78.

Li G, Jiang Y, Huang K, Ding P, Chen J. Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄ chitosan nanoparticles. Allow Compd. **2008**;466:451-456.

Mahmoud D, Helmy W. Potential Application of Inmovilization Technology in Enzyme and Biomass Production. J Appl Sci Res. **2009**;5(12):2466-2476.

Mallin H, Menyes U, Vorhaben T, Höhne M, Bornscheuer UT. Immobilization of two (R)-amine transaminases on an optimized chitosan support for the enzymatic synthesis of optically pure amines. Chem Cat Chem. **2013**;5(2):588-593.

Manickam B, Sreedharan R, Elumalai M. 'Genipin' - The natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview. Curr Drug Del. **2014**;11(1):139-145.

Mi FL, Shyu SS, Peng CK. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. Polym Chem. **2005**;43:1985–2000.

Mi FL, Tan YC, Liang HC, Huang RN, Sung HW. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipino. *J Biomat Sci-Polym E*. **2001**;12 (8):835-850.

Mi FL, Tan Y C, Liang HF, Sung HW. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*. **2002**;23:181-191.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. **1959**;31(3):426-428.

Moers K, Bourgois T, Rombouts S, Belien T, Van Campenhout S, Volckaert G, Robben J, Brijs K, Delcour JA, Courtin CM. Alteration of *Bacillus subtilis* XynA endoxylanase substrate selectivity by site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Tech*. **2007**;41:85–91.

Mora CE, Fessi H, Elaissari A. Pharmaceutical nanotechnology polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. **2009**;385:113–142.

Morales MA, de Souza EC, de Amorim ASCM, Soares JM, Galembeck F. Size selected synthesis of magnetite nanoparticles in chitosan matrix. *Appl Surf Sci*. **2013**;275:71-74.

Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr Polym*. **2009**;77:1–9.

Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan Chemistry : Relevance to the Biomedical Sciences. *Adv. Polym Sci*. **2005**;151–209.

Pastor FUJ, Gallardo O, Sanz-Aparicio J, Díaz P. Xylanases: molecular properties and applications. En: Polania J y Maccabe AP, Ed. *Industrial Enzymes*. Dordrecht, Netherlands:Springer, **2007**;65-82.

Polizeli MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jorge JA. Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. En: Buckeridge MS, Goldman GH, Eds. *Routes to Cellulosic Ethanol*. Dordrecht, Netherlands: Springer, **2011**.

Ponce T, Pérez O. Celulasas y xilanasas en la industria. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. *Avance Persp*. **2002**;21: 273-277.

Quignard F, Di Renzo F, Guibal E. From Natural Polysaccharides to Materials for Catalysis, Adsorption, and Remediation. *Top Curr Chem*. **2010**;294:165-197.

Ramos de la Peña AM, Renard CMGC, Wicker L, Montañez JC, García LA, Contreras JC. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrason Sonochem.* **2014**;21(1):43-49.

Rana M, Kumari A, Chauhan G, Chauhan K. Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. *Int J Biol Macromol.* **2014**;66:46-51.

Ranjbakhsh E, Bordbar AK, Abbasi M, Khosropour AR, Shams E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chem Eng J.* **2012**;179:272-276.

Rodriguez N, Valderrama A, Alarcon H, Lopez A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev Soc Quim.* **2010**;76 (4): 336-354.

Sapag A, Wouters J, Lambert C, De Loannes P, Eyzaguirre J, Depiereux E. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J Biotechnol.* **2002**;95(2):109-131.

Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA's): stable and recyclable biocatalysis. *Biochem Soc Trans.* **2007**;35(Pt 6):1583-1587.

Sheldon RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**;92:467-477.

Shen M, Yu Y, Fan G, Chen G, Jin YM, Tang W. The synthesis and characterization of monodispersed chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles via a facile one-step solvothermal process for adsorption of bovine serum albumin. *Nanoscale Res Lett.* **2014**;9 (1): 296.

Shete PB, Patil RM, Thorat ND, Prasad A, Ningthoujam RS, Ghosh SJ, Pawar SH. Magnetic chitosan nanocomposite for hyperthermia therapy application: Preparation, characterization and in vitro experiments. *Appl Surf Sci.* **2014**;288:149-157.

Sohrabi N, Rasouli N, Torkzadeh M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Chem Eng J.* **2014**; 240: 426-433.

Sriprang R, Asano K, Gobsuk J, Tanapongpipat S, Champreda V, Eurwilaichitr L. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. *J. Biotechnol.* **2006**;126:454–462.

Su Z, Yu Y, Liang C, Li L, Yu S. Properties of chitosan-immobilized cellulose in ionic liquid. *Biotechnol Appl Biochem.* **2013**;60(2):231-235.

Swarnalatha V, Aluri ER, Dhamodharan R. Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles an easily recoverable and reusable support. *J Mol Catal B: Enzym.* **2013**;96:6-13.

Thinh NN, Hanh PT, Ha Le TT, Anh Le N, Hoang TV, Hoang VD, Dang le H, Khoi NV, Lam TD. Magnetic chitosan nanoparticles for removal of Cr(VI) from aqueous solution. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **2013**;33(3):1214-1218.

Törrönen A, Harkkil A, Rouvinen J. Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J.* **1994**;11:2501-2493.

Valerio SG, Alves JS, Klein MP, Rodrigues RC, & Hertz PF. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.* **2013**;92(1):462-468.

Wang Z, Yue T, Yuan Y, Cai R, Niu C, Guo C. Kinetics of adsorption of bovine serum albumin on magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* **2013**; 58:57-65.

Yang Kun, Xu Ning-Shou. Co-immobilized enzymes in magnetic chitosan beads for improved hydrolysis of macromolecular substrates under a time- varying magnetic field. *J Biotechnol.* **2010**; 148:120-127.

Yewale T, Singhal RS, Vaidya AA. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2013**;2(2):96-101.

Yuan Y, Chesnutt BM, Utturkar G, Haggard WO, Yang Y, Ong JL, Bumgardner JD. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr Polym.* **2007**;68:561-567.

Zhou Y, Su S, Song M, Branford-White CJ. Improving the stability of cellulose by immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with α -ketoglutaric acid. **2009**:1-4.