

**Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Agrícolas
Centro de Estudios Biotecnológicos**



**ESTABILIZACIÓN FUNCIONAL Y OPERACIONAL
DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERÉS
INDUSTRIAL**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Técnicas
Especialidad Ingeniería Química**

MSc. LEISSY GÓMEZ BRIZUELA

**Matanzas
2015**

**Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Agrícolas
Centro de Estudios Biotecnológicos**



**ESTABILIZACIÓN FUNCIONAL Y OPERACIONAL
DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERÉS
INDUSTRIAL**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Técnicas
Especialidad Ingeniería Química**

Autora: Lic. LEISSY GÓMEZ BRIZUELA, MSc.

Tutores Ing. Georgina Michelena Álvarez, Dra. C.
Lic. Héctor Luis Ramírez Pérez, Dr. C.

Asesor: Ing. Julio Cesar Dustet Mendoza, Dr. C.

**Matanzas
2015**

A Hector,
Por su constante apoyo e insistencia en la realización de este
trabajo

A Luis Javier y Lissel,
Por haber sido los más sacrificados durante todos estos años

A mi tía,
Por estar siempre presente

A mis padres, A mis suegros,
Por todo cuanto me han apoyado.....

AGRADECIMIENTOS

Un trabajo que involucra la vida de una persona durante prácticamente 10 años, tiene necesariamente que transitar por varias etapas, en las cuales es fundamental el apoyo de muchas personas. En cada etapa es decisiva la participación de algunas de ellas, las cuales son imposibles de no mencionar.

.....Muchas Gracias a todos aquellos compañeros del CEBIO y del laboratorio que prestaron su ayuda desinteresadamente en la primera fase de este trabajo y que hoy no están con nosotros: Yunior, Karel, Yanet, Yudith, Gustavo, entre otros. Es imposible no agradecer también a Villalonga, por el tiempo dedicado en estos primeros años y por mostrarnos a todos el camino de la investigación. Y ¿por qué no? agradecer también porque con su inesperada partida y su desentendimiento con los compromisos contraídos, nos hizo ver que éramos capaces de transitar solos el camino de la ciencia y salir adelante.

En la segunda parte de este trabajo pusieron su granito de arena infinidad de personas a las que tengo mucho que agradecer.....

.....A mi tutora: Georgina Michelena, por prácticamente sin conocerme haber aceptado como suyo este trabajo y en conjunto con el Dr. Julio Dustet ayudarme y apoyarme en todo momento para llevar adelante esta difícil empresa, a ambos y sus familias Mil Gracias.....

A mis "Ángeles de la Guarda": Mayito, Orozco y Santiago, sin su inestimable tiempo y ayuda saben que no hubiese podido lograr este objetivo, Gracias por Siempre.....

A "mis" compañeros del ICIDCA: Almazán (especiales.....), Fidel, Bell, Alfredo, Marianela, Acela, Cary..., a ustedes y los demás que no he mencionado, muchas gracias por estar dispuestos a ayudarme en todo momento y encontrar siempre una solución correcta.

A mis oponentes de pre-defensa: Dr. Marcelo Marcet y Dr. José A. Rodríguez León, primeramente por haber aceptado este trabajo en el mes más ingrato del año, y porque con sus opiniones y señalamientos hicieron posible que este trabajo se encauzara por un sendero más correcto.

A mis compañeros de la Facultad de Agronomía y en especial a Aymara y Amaury, Camacho, Madyu, Leticia, Yunel, Marlen, Ana Julia, Grether, Sonita, saben lo importante que han sido en todo momento.....Muchas Gracias.

A los profesores Ana I. Briones y Juan Ubeda de la Universidad de Castilla La Mancha, España quienes de manera desinteresada brindaron sus laboratorios y permitieron desarrollar parte de este trabajo.

A Jorgito e Idania, trabajadores de la Planta de Glucosa y Fructosa de la Empresa Azucarera Chiquitico Fabregat, por su cooperación y ayuda en la obtención de los resultados que conforman este trabajo.

A los profesores de Ingeniería Química, Ariel, Agustín, Yamilet, Ena, Yoney, por ayudarme siempre que los he requerido.

A los amigos de siempre, en especial Ofelita, Martín, Mario, Caridad y otros que tanto ayudaron para la terminación de este trabajo.

A mis niños, por ser lo más valioso que nos concede la vida, por la alegría que nos proporcionan y por saber esperar a que mamá termine la "Tesis". A Héctor por todos estos años de apoyo, dedicación y contribución a la realización de este trabajo, por sus regaños unas veces y otras aliento, a su cariño y amor debo en gran medida el ver materializado este objetivo. A mis suegros, por su cariño, apoyo y ayuda en todos mis años en Matanzas.

A mis padres, por su amor, apoyo y ayuda de siempre en todas las etapas de mi vida. A mi hermano y Ahiled, A Rodolfo, por siempre tenderme la mano cuando lo

he necesitado. A mi tía, por estar siempre dispuesta a acudir a todos los problemas de la niña, por sus regaños y apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Finalmente, pido disculpas de antemano si por olvido involuntario, dejo de mencionar a alguien, no obstante, lo más importante es que llevo grabada en mi corazón la ayuda brindada por todos.

Muchas Gracias.....

SÍNTESIS

Se logró la inmovilización del conjugado invertasa-quitosana y las enzimas pectinasa y celulasa en soportes sólidos que tienen como polímero base la quitina. Para ello, se sintetizaron cuatro soportes quitina-polímero aniónico (carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio y ácido hialurónico) y se estudiaron las mejores condiciones para la inmovilización del conjugado invertasa-quitosana en los soportes preparados, a través de la formación de complejos polielectrolitos. Como resultado, se incrementó la estabilidad funcional de la enzima y se evaluó la estabilidad operacional de la misma. Los biocatalizadores formados aumentaron la estabilidad durante el almacenaje y posibilitaron su reuso en procesos continuos y discontinuos. Los mejores resultados se obtuvieron para el complejo invertasa-quitosana-quitina-carboximetilcelulosa. Se realizó una valoración de su posible implementación industrial en la hidrólisis enzimática de la sacarosa para la obtención de glucosa y fructosa y se constató no solo la superioridad técnica, sino también económica de la propuesta analizada.

Se sintetizó además un soporte quitina-polímero catiónico (quitosana). El mismo se utilizó en la inmovilización de las enzimas pectinasa y celulasa, empleando dos métodos diferentes: adsorción y formación de enlace covalente. Se obtuvieron las mejores condiciones para la inmovilización y se determinaron las propiedades catalíticas de las nuevas formas inmovilizadas. Los conjugados obtenidos presentaron mejores propiedades funcionales y operacionales que la contraparte nativa, lo que incrementa la aplicación práctica de las mismas. Los mejores resultados se obtuvieron en los biocatalizadores sintetizados por el método de unión covalente.

ABREVIATURAS

CMC: Carboximetilcelulosa de sódio.

Pc: Pectina.

Alg: Alginato de Sódio.

HyA: Ácido Hialurónico.

Quit: Quitina.

QSA: Quitosana.

Quit-QSA: Quitina-quitosana.

Quit-CMC: Quitina-carboximetilcelulosa de sodio.

Quit-Pc: Quitina-pectina.

Quit-Alg: Quitina-alginato de sodio.

Quit-HyA: Quitina-ácido hialurónico.

K_M : Constante de Michaelis-Menten

$V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima

INV: Invertasa

PNSA: Pectinasa

CLSA: Celulasa

INV-QSA: Conjugado invertasa-quitosana

DEAE-celulosa: Dietilaminoetil celulosa

DEAHP-celulosa: Dietilaminohidroxipropil celulosa

PEI: Polietilenamina

EDAC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

m-NaIO₄: meta-Peryodato de sodio

NaBH₄: Borohidruro de sodio

FT-IR: Espectroscopía Infrarroja

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HAc: Ácido acético

RMN-H¹: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Protónica

NaAc: Acetato de sodio

INV-QSA:Quit-CMC: Complejo polielectrolito formado entre el conjugado INV-QSA y el soporte Quit-CMC.

INV-QSA:Quit-Pc: Complejo polielectrolito formado entre el conjugado INV-QSA y el soporte Quit-Pc.

INV-QSA:Quit-Alg: Complejo polielectrolito formado entre el conjugado INV-QSA y el soporte Quit-Alg.

INV-QSA:Quit-HyA: Complejo polielectrolito formado entre el conjugado INV-QSA y el soporte Quit-HyA.

Quit-QSA-PNSA-A: Enzima PNSA inmovilizada en el soporte Quit-QSA por el método de adsorción no específica.

Quit-QSA-PNSA-E: Enzima PNSA inmovilizada en el soporte Quit-QSA por el método de formación de enlace covalente.

Quit-QSA-CLSA-A: Enzima CLSA inmovilizada en el soporte Quit-QSA por el método de adsorción no específica

Quit-QSA-CLSA-E: Enzima CLSA inmovilizada en el soporte Quit-QSA por el método de formación de enlace covalente.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	5
1.1 Las enzimas.....	5
1.2 Inmovilización de enzimas en fase sólida.....	7
1.2.1 Métodos de inmovilización.....	11
1.3 Soportes naturales. Polisacáridos. Propiedades y aplicaciones.....	14
1.3.1 Quitina.....	14
1.3.2 Quitosana.....	16
1.3.3 Carboximetilcelulosa.....	17
1.3.4 Alginato de Sodio.....	18
1.3.5 Pectina.....	19
1.3.6 Ácido Hialurónico.....	21
1.4 Invertasa	22
1.5 Inmovilización de Invertasa	24
1.6 Pectinasa y Celulasa.....	29
1.6.1 Pectinasa.....	29
1.6.2 Celulasa.....	29
1.7 Inmovilización de las enzimas Pectinasa y Celulasa.....	30
1.7.1 Inmovilización de Pectinasa.....	30

1.7.2 Inmovilización de Celulasa.....	31
1.8 Reactores enzimáticos.....	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 Materiales y reactivos empleados en el trabajo experimental.....	34
2.2 Caracterización de la quitina, preparación y caracterización de su derivado desacetilado.....	35
2.2.1 Caracterización de la quitina.....	35
2.2.2 Preparación y caracterización de la quitosana.....	35
2.3 Caracterización de los polímeros aniónicos utilizados en la preparación de los soportes.....	37
2.4 Preparación de los soportes.....	38
2.4.1 Soporte quitina-polímero aniónico.....	38
2.4.2 Soporte quitina-polímero catiónico.....	39
2.5 Preparación del conjugado invertasa-quitosana (INV-QSA).....	40
2.6 Determinación de parámetros para la inmovilización de las enzimas.....	40
2.6.1 El pH de formación.....	41
2.6.2 Tiempo de incubación.....	41
2.6.3 Concentración de proteína.....	42
2.6.4 Porcentaje de glutaraldehído.....	43
2.7 Inmovilización del conjugado INV-QSA en los soportes de quitina-polímero aniónico por formación de complejos polielectrolitos.....	44
2.8 Inmovilización de las enzimas pectinasa y celulasa en el soporte de quitina-polímero catiónico.....	44

2.8.1 Método de adsorción.....	44
2.8.2 Método de formación de enlace covalente.....	45
2.9 Caracterización estructural de las enzimas nativas, inmovilizadas y del conjugado INV-QSA.....	45
2.9.1 Determinación de la concentración de proteína.....	45
2.9.2 Determinación de la actividad enzimática.....	45
2.10 Determinación de las propiedades catalíticas de los complejos polielectrolitos.....	46
2.10.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática.....	46
2.10.2 El pH óptimo.....	47
2.10.3 Temperatura óptima.....	47
2.11 Determinación de la estabilidad funcional de las enzimas inmovilizadas.....	47
2.11.1 Perfil de termoestabilidad.....	48
2.11.2 Cinética de inactivación térmica.....	48
2.12 Determinación de las propiedades operacionales de las enzimas inmovilizadas.....	49
2.12.1 Ciclos de reuso de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado.....	49
2.12.2 Ciclos de reuso de la pectinasa y la celulasa inmovilizada.....	49
2.12.3 Estabilidad en el tiempo.....	50
2.12.4 Estabilidad bajo régimen operacional continuo de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado.....	50
2.13 Análisis estadístico.....	50
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
3.1 Caracterización de la quitina y la quitosana.....	51
3.1.1 Determinación del grado de acetilación de la quitina.....	51

3.1.2 Caracterización de la quitosana.....	51
3.2 Obtención de los soportes.....	52
3.2.1 Síntesis del soporte quitina-polímero aniónico.....	52
3.2.2 Síntesis del soporte quitina-polímero catiónico (Quit-QSA).....	54
3.3 Síntesis y caracterización del conjugado invertasa-quitosana (INV-QSA).....	55
3.4 Formación de los complejos polielectrolitos.....	56
3.5 Propiedades catalíticas de los complejos polielectrolitos.....	60
3.5.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática del conjugado INV-QSA inmovilizado en los soportes sintetizados.....	60
3.5.2 El pH óptimo.....	62
3.5.3 Temperatura óptima.....	63
3.6 Inmovilización de pectinasa y celulasa en el soporte de quitina-quitosana.....	66
3.7 Propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas.....	69
3.7.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática.....	70
3.7.2 pH y temperatura óptimos.....	72
3.8 Evaluación de la estabilidad funcional de las enzimas inmovilizadas.....	76
3.8.1 Determinación de la estabilidad térmica del conjugado INV-QSA inmovilizado.....	76
3.8.1.1 Perfil de termoestabilidad.....	76
3.8.1.2 Cinética de inactivación térmica.....	77
3.8.2 Determinación de la estabilidad térmica de la pectinasa y la celulasa inmovilizada.....	80
3.8.2.1 Perfil de termoestabilidad.....	80

3.8.2.2 Cinética de inactivación térmica.....	81
3.9 Evaluación de las propiedades operacionales de las enzimas inmovilizadas.....	83
3.9.1 Ciclos de reuso de la INV-QSA inmovilizada en un reactor empacado.....	83
3.9.2 Ciclos de reuso de la pectinasa y celulasa inmovilizadas en el soporte de Quit-QSA.....	84
3.9.3 Estabilidad en el tiempo a 4 y a 37°C de la INV-QSA inmovilizada en los soportes quitina-polímero aniónico.....	87
3.9.4 Estabilidad en el tiempo de PNSA y CLSA inmovilizadas en un soporte de Quit-QSA.....	88
3.9.5 Estabilidad operacional del conjugado INV-QSA inmovilizado en un reactor empacado bajo régimen operacional continuo.....	90
3.10 Valoración económica de la aplicación de la INV-QSA inmovilizada para la obtención de glucosa.....	93
3.10.1 Descripción del proceso tecnológico de producción de glucosa y sirope de fructosa mediante hidrólisis ácida.....	93
3.10.2 Modificación de la operación de inversión.....	94
3.10.3 Valoración económica preliminar.....	95
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	130

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de que la humanidad tenga acceso a alimentos mejores y más abundantes, a una agricultura más eficiente, a sistemas analíticos más precisos y a nuevos y mejores fármacos de bajo costo entre otros, es una necesidad cada día más acuciante. Para lograr estas aspiraciones es imprescindible la puesta a punto de tecnologías sencillas y de menor costo, donde se puedan llevar a cabo transformaciones químicas complejas en condiciones medioambientales amigables (Chitunda, 2012).

Las enzimas son catalizadores de origen biológico que cumplen muchos de los requisitos necesarios para impulsar esta nueva industria química (Chávez *et al.*, 1990). Su utilización en estos procesos constituye una solución a la necesidad planteada, ya que han demostrado sus excelentes potencialidades como biocatalizadores eficientes y de gran especificidad respecto a los catalizadores químicos convencionales. Es por ello que en los últimos años se ha producido un incremento significativo en el uso de las mismas en muchos sectores de la industria, en la agricultura, en la medicina, así como en la química analítica y preparativa (Vega-Paulino y Zúniga-Hansen, 2012; Rai *et al.*, 2012).

A pesar de esas excelentes propiedades catalíticas y sus enormes y variadas posibilidades de aplicación, la utilización de las enzimas en procesos químicos industriales se ha visto limitada. Las enzimas son solubles, difíciles de reutilizar, generalmente muy inestables ante condiciones desnaturizantes y sufren inhibiciones por sustratos y productos (Chitunda, 2012, Datta *et al.*,

2012). Pueden presentar altos costos de producción y baja estabilidad durante el almacenaje, factores los cuales han limitado su aplicación (Tran y Balkus, 2011). Estas razones han motivado que el desarrollo de nuevos métodos orientados a estabilizar dichos biocatalizadores y con ello incrementar la aplicación industrial de los mismos, constituya un tema de investigación de gran actualidad e importancia socioeconómica.

Una de las estrategias más efectivas que se ha venido trabajando para dar solución a estos inconvenientes es la inmovilización de enzimas en un soporte, permitiendo la reutilización de las mismas, y por consiguiente incorporarlas a procesos industriales económicamente rentables (Chávez *et al.*, 1990).

La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. La unión de la enzima al soporte puede llevarse a cabo a través de la formación de enlaces covalentes o mediante interacciones iónicas (Arroyo, 1998). Generalmente la formación de enlaces covalentes da lugar a derivados estables, mientras que el proceso de inmovilización en resinas de intercambio iónico frecuentemente no es muy fuerte y la mayoría de las proteínas son totalmente desasorbidas del soporte. Por esta razón el desarrollo de nuevos procedimientos para inmovilizar enzimas en soportes sólidos cargados, continúa siendo un área de prioridad investigativa dentro de la tecnología enzimática.

Los soportes empleados para la inmovilización han sido diversos: inorgánicos, orgánicos naturales o sintéticos, sin embargo la comunidad científica continua trabajando en la búsqueda de otros nuevos, debido entre otras razones a que frecuentemente el costo del biocatalizador en fase sólida es un factor primario en el costo de un proceso industrial (Illanes y Wilson, 2004).

La quitina, polisacárido lineal de gran interés industrial y farmacológico, es considerado el segundo polisacárido más importante de la tierra (Kasaai, 2008). Ha sido empleado en la

inmovilización de enzimas y células, en la preparación de materiales para aplicaciones médicas e industriales, en la agricultura y en la industria alimenticia, entre otras (Kasaai, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011, Ramírez *et al.*, 2013). Es un polímero biocompatible, biodegradable, no-tóxico, con actividad antimicrobial, que puede ser modificado por reacciones químicas sencillas (Zhao *et al.*, 2008; Kumirska *et al.*, 2010). En Cuba se produce a partir de una fuente renovable, los desechos de la industria pesquera, los cuales de no ser procesados contaminan el medio ambiente debido a su eliminación problemática y costosa (Mármol *et al.*, 2011). Por todas estas razones, la quitina continua siendo un material de partida de gran interés para la síntesis de nuevos soportes poliméricos.

Tomando en consideración lo antes expuesto, *la síntesis de nuevos soportes y el desarrollo de métodos de inmovilización orientados a incrementar la estabilidad operacional de las enzimas, para su utilización en procesos biotecnológicos económicamente rentables, es un tema primordial dentro de la tecnología enzimática y la biotecnología industrial.*

Por lo que, el presente trabajo se propone como ***Problema científico*** a resolver:

Aumentar la baja estabilidad funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial.

Para dar solución a este problema se plantea la siguiente ***Hipótesis científica:***

La inmovilización de enzimas hidrolíticas de aplicación industrial sobre soportes de quitina, modificada químicamente con polímeros iónicos, incrementa la estabilidad funcional y operacional de las mismas.

Para validar la hipótesis, se propone el siguiente *Objetivo general*:

Incrementar la estabilidad funcional y operacional de las enzimas invertasa, celulasa y pectinasa mediante su inmovilización en soportes de quitina modificada químicamente con polímeros iónicos.

Para darle cumplimiento al objetivo propuesto se desarrollarán los siguientes *Objetivos específicos*:

- ✓ Obtener nuevos soportes de quitina modificada químicamente con polímeros iónicos.
- ✓ Demostrar el incremento de la estabilidad funcional de las enzimas inmovilizadas.
- ✓ Evaluar operacionalmente las nuevas formas enzimáticas.

La *Novedad científica* de la investigación consiste en:

Se proponen nuevos soportes para la inmovilización constituidos a partir de quitina (obtenida en Cuba como subproducto de la industria procesadora de mariscos) que permiten obtener enzimas inmovilizadas, con mejores propiedades que las informadas en la literatura e interesantes para la aplicación industrial de estos biocatalizadores.

Aportes de la investigación:

- La obtención de nuevos soportes sólidos poliméricos que tienen la quitina como polímero base, para su aplicación en la inmovilización de enzimas.
- La utilización del método de inmovilización por formación de complejos polielectrolitos para incrementar la estabilidad funcional y operacional de la invertasa, posibilitando el reuso de la misma y su aplicación práctica.
- La aplicación del soporte quitina-quitosana para la inmovilización de enzimas de aplicación industrial como pectinasa y celulasa.

1. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

1. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

En la actualidad la industria biotecnológica relacionada con el empleo de enzimas puede dividirse en dos grandes campos: el que se ocupa principalmente de la producción de grandes cantidades de enzimas con bajo costo y el de los biocatalizadores. El primero ocupa un mercado mundial de más de 1000 millones de dólares anuales y en estos casos la enzima es generalmente empleada en forma soluble por lo que el proceso de reacción que predomina es intermitente o por lote. Por otra parte, los biocatalizadores son enzimas procesadas para emplearse de manera racional, generalmente inmovilizadas para permitir una mayor productividad y flexibilidad en la selección del sistema de operación (López-Munguía, 2004).

1.1 Las enzimas

El término “**enzima**” proviene del griego *en* y *zyme* que significa “en la levadura”, fue utilizado por primera vez en 1878 por Friedrich Wilhelm Kuhne. Bajo esta denominación intentó unificar toda la terminología hasta entonces utilizada, para referirse a las sustancias catalíticamente activas existentes en los organismos vivos (Bohinski, 1987).

Las enzimas son sustancias macromoleculares de naturaleza proteica, constituidas por largas cadenas de α -L-aminoácidos unidos covalentemente entre sí, por medio de enlaces tipo amida denominados enlaces peptídicos (Eisenhaber y Bork, 1999). Estas cadenas polipeptídicas no son polímeros al azar de longitud indefinida. Cada cadena posee una composición química específica, una masa molar y una secuencia ordenada de aminoácidos estructurales; con una forma

tridimensional característica, necesaria para su función biológica específica o para su actividad (Lehninger *et al.*, 2006).

Las enzimas son capaces de incrementar la velocidad de las reacciones químicas que por su naturaleza nunca se verificarían en las condiciones existentes en el medio celular. Poseen además, características en cuya magnitud superan considerablemente a las de cualquier otro catalizador preparado por el hombre. Entre estas se pueden señalar su eficiencia catalítica, su especificidad, el rendimiento de la transformación, la regulación y la versatilidad. Se pueden considerar como proteínas capaces de catalizar con extraordinaria eficiencia y especificidad todo el amplio espectro de reacciones químicas que constituyen la base dinámica de la vida (Chávez *et al.*, 1990).

Los primeros pasos en el estudio de su naturaleza y acción comenzaron en los siglos XVIII y XIX, pero no fue hasta la década del 60 del pasado siglo que se extendió la producción microbiológica de enzimas a gran escala. La aplicación industrial de las mismas ha continuado creciendo debido al mejoramiento de las tecnologías de producción, de las propiedades de las enzimas modificadas y a la aparición de nuevos campos de aplicación. El alto desarrollo alcanzado por la biotecnología y las técnicas de recombinación del ADN, ha permitido incrementar de manera considerable su producción industrial a escala mundial. En la actualidad se han identificado más de 3000 enzimas diferentes, de modo que la tecnología enzimática está en plena expansión, y es de esperar que en años venideros su implantación sea aún más importante de lo que es hoy (Aguilera y Estévez, 2014). Las enzimas son ampliamente utilizadas como catalizadores en numerosos procesos industriales (Tran y Balkus, 2011; Vega-Paulino y Zúniga-Hansen, 2012), en el análisis químico y clínico (Figueira *et al.*, 2011; Moehlenbrock y Minter, 2011), en el procesamiento de alimentos (Fernández, 2010; Cadena *et al.*, 2011; Rai *et al.* 2012); en la agricultura (Bagal-Kestwal *et al.*, 2011; Salihu *et al.*, 2012) y en la biotecnología

(Sánchez y Demain, 2011). Otra aplicación importante de estas biomoléculas lo constituye su uso como fármacos para la enzimoterapia de numerosas enfermedades (Montoro-García *et al.*, 2010, Khan y Alzohairy, 2010, Horovitz *et al.*, 2013). En algunas de estas, en especial en enfermedades genéticas hereditarias, se ha comprobado que pueden estar causadas por una deficiencia o ausencia total de una o más enzimas (Weidemann *et al.*, 2013).

Sin embargo, la utilización de las enzimas como catalizadores en procesos industriales, a gran escala, se ha visto limitada por los altos costos de producción y su baja estabilidad al almacenaje. Durante su uso, la estabilidad de las mismas decrece debido a cambios en el pH, temperatura, cambios conformacionales, como resultado de la fricción, la presión osmótica impuesta por el ambiente que la rodea y el efecto acumulativo de todos estos factores como función del tiempo de duración de utilización de las mismas. En segundo lugar, como son solubles su recuperación de la mezcla de sustrato y producto, para el reuso, no es económicamente viable, por lo que los procesos donde ellas intervienen son costosos (Kotwal y Shankar, 2009; Tran y Balkus, 2011). Por todas estas razones la inmovilización de enzimas juega un papel fundamental en el incremento del atractivo de la aplicación de los procesos enzimáticos en las tecnologías productivas, junto a la eficacia y alta especificidad de estas proteínas.

1.2 Inmovilización de enzimas en fase sólida

En 1916, Nelson y Griffin encontraron que una enzima, en su forma insoluble en agua, mostraba actividad catalítica. Sin embargo, el primer informe de enzimas inmovilizadas, para una aplicación en particular, no fue realizado hasta 1953 cuando Grubhofer y Schleith inmovilizaron carboxipeptidasa, diastasa, pepsina y ribonucleasa utilizando resinas de poliaminopoliestireno diazotizado como soporte (Gasesa y Hubble, 1990).

En 1971, en la primera conferencia de Ingeniería de las Enzimas, fue recomendado el término de *Inmovilización de Enzimas* para agrupar todos los términos anteriormente utilizados como enzimas insolubles en agua, enzima atrapada o enzima soportada en una matriz (Gasesa y Hubble, 1990). La inmovilización de enzimas se define como un proceso en el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles, que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas. Posteriormente, esta definición ha sido ampliada a aquel proceso por el cual se restringen completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos, células, etc., por su unión a un soporte (Arroyo, 1998). La inmovilización es, generalmente, un requisito para la utilización de la enzima como biocatalizador industrial y una solución al problema de la solubilidad de estos biocatalizadores (Mateo *et al.*, 2007).

Desde la segunda mitad del siglo XX se han venido desarrollado numerosas técnicas para la inmovilización de enzimas y su posible aplicación. Las enzimas inmovilizadas presentan una serie de ventajas en comparación con su contraparte soluble, entre las que se pueden señalar:

- ✓ La reusabilidad del biocatalizador heterogéneo, reduciendo el costo de producción por el eficiente reciclaje y control del proceso.
- ✓ Constituyen un dispositivo estable y reutilizable con fines médicos y analíticos.
- ✓ Se pueden emplear como absorbentes selectivos para la purificación de proteínas y otras enzimas.
- ✓ Resulta una herramienta fundamental para la química de proteínas de fase sólida.
- ✓ Constituyen microdispositivos efectivos para la liberación controlada de drogas proteicas (Cao, 2005; Betancor y Luckarift, 2008).

La inmovilización permite el desarrollo de reacciones enzimáticas en medioambientes no fisiológicos como temperaturas extremas, solventes no acuosos y fluidos iónicos. Las enzimas inmovilizadas pueden superar algunos inconvenientes que presentan las formas solubles: productos contaminantes, dificultades de la separación de una mezcla de reacción y pobre estabilidad. Además, durante este proceso puede cambiar la especificidad hacia el sustrato y ser reducido el efecto de los inhibidores (Betancor y Luckarift, 2008).

El proceso de inmovilización brinda la posibilidad de diseñar reactores de fácil manejo y control, adaptados a la aplicación del catalizador inmovilizado. Los reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de la misma, la cual es capaz de mantener su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, obteniéndose productos con mayor grado de pureza (Arroyo, 1998).

La inmovilización es una metodología viable para la estabilización de enzimas siempre que se tengan en cuenta algunas consideraciones. Los grupos lábiles o esenciales pueden ser protegidos con reactivos o ligandos adecuados. Las condiciones de reacción pueden ser cambiadas por la formación de múltiples enlaces entre la enzima y el soporte sólido. Sin embargo, se pueden presentar alteraciones en propiedades del biocatalizador como su actividad, el enlace al sustrato y el pH óptimo de los derivados inmovilizados (Fagain y O'Kennedy, 1991; Brady y Jordaan, 2009).

No obstante a las ventajas que ofrece la utilización de enzimas inmovilizadas, estos procesos presentan algunos inconvenientes, entre los que se señalan: la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, la pérdida parcial de actividad durante la inmovilización y el biocatalizador es más caro que la enzima nativa (Arroyo, 1998; Bayramoglu *et al.*, 2003)

Muchas han sido las técnicas estudiadas para la inmovilización de enzimas, con una gran variedad de soportes naturales y sintéticos. La superficie del soporte juega un importante papel en la retención de la estructura terciaria de la enzima, lo que influye en su estabilidad térmica y actividad catalítica. Generalmente el proceso de inmovilización cambia las propiedades cinéticas, pudiendo modificarse la constante de Michaelis-Menten (K_M), la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y/o causar el corrimiento de los perfiles de actividad vs pH y temperatura (Girelli y Mattei, 2005).

Un paso fundamental en el proceso de inmovilización es la selección del portador adecuado (definido como la parte no catalítica de la enzima inmovilizada, sobre la cual la parte catalítica es construida), las condiciones (pH, temperatura y naturaleza del medio), y las características de la enzima (naturaleza, fuente y pureza). El método seleccionado debe cumplir con ambos requisitos: el catalítico (expresado en productividad, rendimiento espacio-tiempo, estabilidad y selectividad) y el no catalítico (ejemplo: separación, control), en dependencia de la aplicación para la cual se requiere la enzima (Cao, 2005).

La elección del soporte, así como del proceso de inmovilización a utilizar, dependen de la naturaleza de la enzima, de la del soporte y de la aplicación final de la enzima. La toxicidad del reactivo utilizado es un aspecto a tener en cuenta siempre que la aplicación final esté relacionada con el procesamiento de alimentos o con la industria médico-farmacéutica (Girelli y Mattei, 2005).

El autor considera que el análisis de la literatura consultada permite plantear que no existe un método universal de inmovilización de enzimas, y a pesar de las desventajas que ofrece esta técnica, continúa siendo la opción más atractiva para la utilización de enzimas a nivel industrial. Para cada aplicación de una enzima inmovilizada es preciso encontrar un procedimiento sencillo y económico que conduzca a un producto con buena retención de actividad y alta estabilidad

operacional, lo que hace necesario continuar desarrollando nuevas técnicas en dependencia del fin a lograr.

1.2.1 Métodos de inmovilización

El desarrollo de métodos para la inmovilización de enzimas se ha incrementado en el transcurso de las últimas décadas. Los mismos han sido clasificados de diferentes formas, una de las más utilizadas se basa en combinar la naturaleza de la interacción responsable de la inmovilización con la del soporte (Kennedy y Cabral, 1983). La **Figura 1.1** resume las formas fundamentales de enzimas inmovilizadas agrupadas en tres categorías.

La unión a soportes ha sido el método de inmovilización más ampliamente conocido y aplicado, el cual consiste en la unión de la enzima a un portador insoluble en agua. En este caso la elección del soporte y del tipo de enlace resulta determinante en el comportamiento posterior del biocatalizador. El proceso de inmovilización debe incrementar la afinidad de la enzima por el sustrato, disminuir la inhibición, ampliar el intervalo de pH óptimo y reducir las posibles contaminaciones microbianas.

El portador debe presentar una resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Con este fin se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización, los cuales han sido agrupados en: inorgánicos y orgánicos (Ye *et al.*, 2005). Entre los soportes orgánicos se encuentran los polímeros naturales y sintéticos. Dentro de los polímeros naturales los polisacáridos han sido los más utilizados por presentar muchos de ellos características como alta solubilidad en agua, baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Rebros *et al.*, 2007; Sankalia *et al.*, 2007).

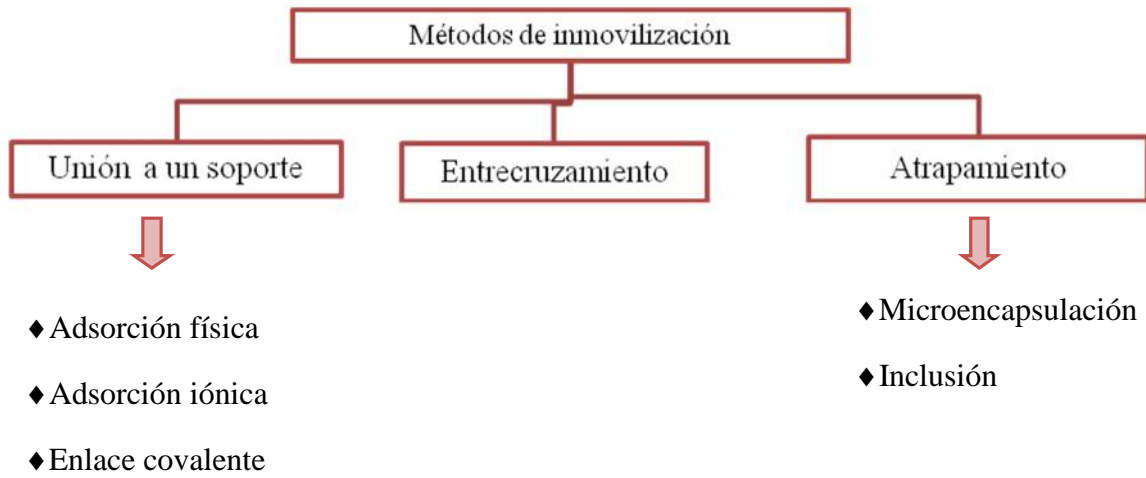


Figura 1.1 Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas

Las enzimas pueden ser unidas a los soportes mediante adsorción física o iónica o por unión covalente. Tanto en la unión física como en la iónica predominan interacciones del tipo electrostáticas, hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. La diferencia fundamental entre ambos métodos reside en la fortaleza de la interacción. La adsorción iónica se basa en interacciones electrostáticas entre la enzima y los soportes sólidos, a los que se les ha introducido grupos intercambiadores de iones. Estas interacciones son más fuertes que las que se producen durante la inmovilización por adsorción física. Este método de inmovilización presenta entre sus principales ventajas su sencilla preparación, bajo costo, no aparición de cambios en la especificidad de la enzima y los derivados preparados son estables en medios de trabajo con bajo contenido de agua (Wang y Hsieh, 2008; Tran y Balkus, 2011).

La principal desventaja de estos métodos es la baja estabilidad de los preparados enzimáticos que se obtienen (Kharrat *et al.*, 2011). Las causas están relacionadas con la poca fortaleza de las interacciones que unen a la enzima y el soporte, lo que trae como consecuencia la desorción de la misma durante su utilización. Esto se puede producir fácilmente cuando se cambian algunas condiciones como el pH, la fuerza iónica, la naturaleza del solvente, entre otros. Todo ello trae consigo una limitación en la aplicación práctica real de los mismos (Labus *et al.*, 2012).

La inmovilización por unión covalente se basa en la formación de enlaces covalentes entre los grupos químicamente reactivos de las proteínas y los del soporte. Las interacciones que aquí se establecen son más fuertes que las formadas en adsorciones de otro tipo (Girelli y Mattei, 2005). Este método presenta como sus principales ventajas una manipulación sencilla de los derivados inmovilizados y la posibilidad de utilizar los derivados en reactores operados en modo continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tipo tanque agitado. Sin embargo, este método en muchas ocasiones resulta caro y difícil de llevar a cabo pues los aminoácidos del centro activo pueden

verse también implicados. Es necesario señalar además la necesidad de conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie (Nagar *et al.*, 2012; Sassolas *et al.*, 2012; Celebi *et al.*, 2013).

El segundo método se basa en la formación de entrecruzamientos intermoleculares entre las moléculas de enzimas por medios de agentes bi o multifuncionales como el glutaraldehído. Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. Su principal ventaja reside en la formación de enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Arroyo, 1998).

El tercer método, atrapamiento, se basa en la localización de la enzima dentro de la red tridimensional de un polímero o en membranas semipermeables, de manera que las moléculas de enzima no puedan liberarse pero permitan la difusión libre de sustratos y productos a través de la barrera. Este método puede ocasionar pérdida de actividad de la enzima si se emplean condiciones severas durante la polimerización. La desventaja fundamental de este tipo de inmovilización es que se acentúan las limitaciones difusionales de sustratos y producto (Lin *et al.*, 2007).

Después de analizadas las ventajas y desventajas de los diferentes métodos descritos en la literatura para la inmovilización de enzimas, se considera necesario continuar desarrollando nuevos procedimientos que permitan incrementar la eficiencia de las enzimas como biocatalizadores. De las estrategias analizadas la unión a soportes sólidos es un método muy utilizado, sencillo, que presenta como principal inconveniente la poca fortaleza de las interacciones que se establecen entre la enzima y el soporte. Partiendo del conocimiento que la unión de macromoléculas con cargas opuestas se produce a través de fuerzas de atracción electrostáticas, lo que da lugar a la

formación de enlaces iónicos y por tanto, a los complejos polielectrolitos (Smid y Fish, 1988), se puede plantear que la inmovilización de enzimas por formación de complejos polielectrolitos pudiera mantener todas las ventajas que trae consigo la inmovilización por adsorción, y además incrementar la estabilidad de los preparados enzimáticos minimizando así la desorción de la enzima durante su aplicación.

1.3 Soportes naturales. Polisacáridos. Propiedades y aplicaciones

Los polisacáridos son los soportes naturales de mayor utilización en la inmovilización de enzimas. Su importancia y amplia aplicación viene dada por su disponibilidad en la naturaleza, hidrofiliidad y presencia de grupos funcionales reactivos (o susceptibles de modificación) que les permite intervenir fácilmente en reacciones químicas diversas, favoreciendo además la activación y conjugación multipuntual con las proteínas (Marshall *et al.*, 1975; Marshall, 1978). Su desventaja fundamental está relacionada en muchos casos con su poca estabilidad, particularmente frente a la degradación por microorganismos. De los polisacáridos conocidos los de mayor aplicación en la inmovilización de enzimas han sido: celulosa, dextrana, quitina, alginato de sodio y sus derivados, entre otros (Girelli y Mattei, 2005).

1.3.1 Quitina

La quitina (Quit) es un polisacárido lineal compuesto por residuos de $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (**Figura 1.2**). Es una macromolécula ampliamente distribuida en la naturaleza como material estructural en crustáceos, insectos, hongos y levaduras, considerada el segundo polisacárido más abundante de la tierra, después de la celulosa (Kasaai, 2008).

La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de la industria pesquera, una fuente renovable, no tóxica y no alergénica (Abdou *et al.*, 2008; Mármol *et al.*, 2011). Es un polímero biocompatible, biodegradable, no-tóxico, insoluble en los más comunes solventes

orgánicos, capaz de interactuar con iones metálicos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Zhao *et al.*, 2008; Kumirska *et al.*, 2010). Posee actividad antimicrobiana y puede ser utilizado en capas o películas para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias durante el almacenamiento de frutas y vegetales (Raimunda de Abreu y Campana-Filho, 2009).

La principal aplicación histórica de la quitina ha sido como material de partida para la obtención de quitosana. Es un polímero de gran interés industrial y farmacológico, aplicable en campos como la biomedicina, el tratamiento de agua, la industria alimenticia, la de cosméticos y la agricultura (Krajewska, 2005; Jayakumar *et al.*, 2007; Kasai, 2010). Ha sido empleada además en la inmovilización de enzimas y células (Krajewska, 2004) y para la preparación de materiales con quitina como base, para aplicaciones médicas e industriales (Songkroah *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011, Ramírez *et al.*, 2013).

Tomando en consideración lo planteado anteriormente se propone la selección de la quitina como polímero base para la preparación de los nuevos soportes a evaluar en este estudio, basado fundamentalmente en las excelentes propiedades que presenta este polímero, la posibilidad de ser modificado por reacciones químicas sencillas, la baja solubilidad en la mayoría de los disolventes que favorece su aplicación como soporte, la alta estabilidad química que presenta el polvo de quitina obtenido en Cuba (Henriques y Nieto, 1980) y no por último menos importante, a que la misma se obtiene a gran escala a partir de los desechos de la industria procesadora de mariscos, lo que permitiría valorizar un residuo altamente contaminante de la industria pesquera. Sin embargo, en nuestro país la quitina ha sido poco empleada, lo que no ha favorecido su producción a una escala que permita la eliminación de estos desechos contaminantes (Chico, 2005). Esta situación de por sí justifica la realización de investigaciones orientadas a desarrollar nuevas aplicaciones para la quitina y la quitosana.

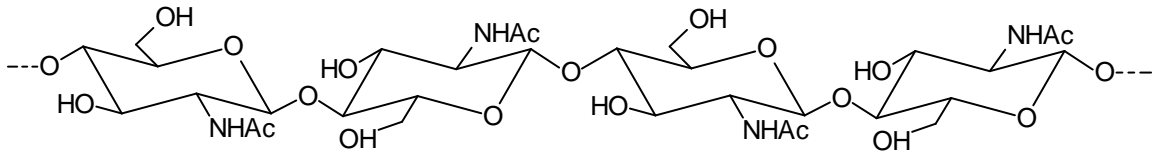


Figura 1.2. Fórmula estructural de la quitina.

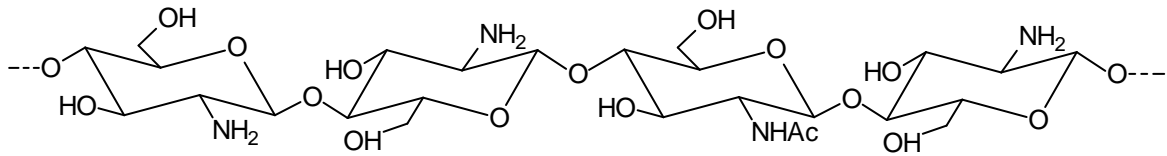


Figura 1.3 Fórmula estructural de la quitosana.

1.3.2 Quitosana

Bajo la denominación genérica de quitosana (QSA) se agrupa a la familia de compuestos derivados de la quitina, en los cuales el grado de desacetilación de sus unidades estructurales constituyentes permite la disolución del polímero en soluciones ácidas diluidas (Kasaai, 2010).

La quitosana es un copolímero lineal formado por unidades de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (**Figura 1.3**). La relación entre ambas unidades estructurales, así como la distribución de estas a través de la cadena polimérica dependen de los métodos empleados para la preparación del polisacárido (Kasaai, 2008). Es un polímero catiónico pseudonatural, moderadamente soluble en medio ácido acuoso a $\text{pH} < 6,5$. Por su estructura puede formar complejos polielectrolitos con otros polianiones debido a la presencia de grupos amino en su estructura. Ha sido aplicado en diferentes formas físicas como soluciones, geles, películas o fibras (Rinaudo, 2006; Raimunda de Abreu y Campana-Filho, 2009).

Presenta al igual que la quitina excelentes propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, características adsorbentes y no-toxicidad. Además, presenta actividad biológica como inmunológico, antibacterial, antimicótico, favoreciendo su aplicación en la curación de las heridas y en la liberación de drogas (Jayakumar *et al.*, 2007; Jayakumar *et al.*, 2011). Es un polímero inerte e hidrofílico. Inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aisladas de productos del mar (Kasaai, 2010). Todas estas propiedades han hecho posible que la quitosana sea utilizada en diversos campos como la biomedicina, biotecnología, en procesos industriales, la agricultura, la industria alimenticia, entre otras (Alves y Mano, 2008; Mourya y Inamdar, 2008).

Este polímero ha sido empleado además en la modificación e inmovilización de enzimas por disponer de grupos reactivos que permiten su conjugación (Gómez *et al.*, 2000; Darías y

Villalonga, 2001). En este sentido se han informado en la literatura varios trabajos sobre su aplicación como matriz cromatográfica para la purificación de enzimas (Junde *et al.*, 1994; Harsa y Furusaki, 1995), su combinación con otros polímeros como CMC para la formación de cápsulas y la inclusión de enzimas como sacarasa (Ting *et al.*, 2011) y en la preparación de nanopartículas magnéticas para la inmovilización de lacasa (Kalkan *et al.*, 2012).

1.3.3 Carboximetilcelulosa

La celulosa constituye el polisacárido más abundante en la naturaleza. Es un biopolímero formado por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces $\beta(1-4)$ formando una cadena lineal (**Figura 1.4**).

Su abundancia natural, así como sus propiedades de polifuncionalidad, multiquiralidad, hidrofiliidad y biocompatibilidad, hacen de la celulosa un compuesto de gran importancia en la industria y la investigación (Ogushi *et al.*, 2007). Posee en su estructura tres grupos hidroxilos disponibles en cada unidad de glucosa de la cadena. Estos hidroxilos han permitido sintetizar numerosos derivados fundamentalmente esteres y éteres, con el objetivo de conferirle nuevas características (Ludwig, 2005).

La O-carboximetilcelulosa, comúnmente llamada carboximetilcelulosa (CMC), es el éter iónico más importante de la celulosa (Liu *et al.*, 1997). Se obtiene comercialmente por tratamiento de la celulosa con hidróxido de sodio para formar álcalis de celulosa, que al reaccionar con el monocloroacetato de sodio forma la sal sódica de la CMC (**Figura 1.5**) (Franco y Ramalho Merce, 2006).

Generalmente, la carboximetilcelulosa es obtenida con un grado de sustitución menor que 3, por lo cual se considera un copolímero formado por unidades de D-glucosa no sustituidas, monosustituidas (2-, 3- y 6-mono-O-carboximetil-D-glucosa), disustituidas (2,3-, 2,6-, y 3,6-di-

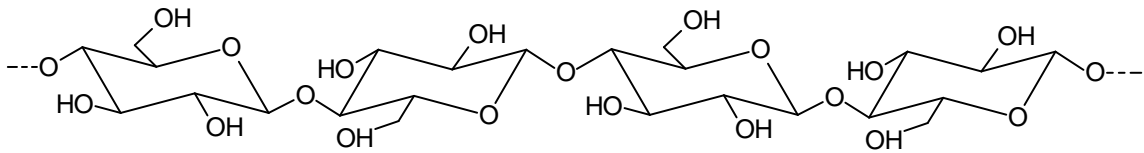


Figura 1.4 Fórmula estructural de la celulosa.

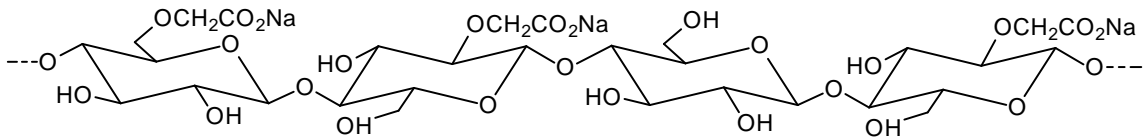


Figura 1.5 Fórmula estructural de la carboximetilcelulosa.

O-carboximetil-D-glucosa), y trisustituidas (2,3,6-tri-O-carboximetil-D-glucosa) (Heinze *et al.*, 1994).

La CMC es un polímero lineal, aniónico, biodegradable, no inmunogénico, resistente al calor y la oxidación, no tóxico, compatible con la piel y las mucosas y fisiológicamente inocuo (Capitani *et al.*, 2007; Barbucci *et al.*, 2004). Se ha informado su utilización en la producción de adhesivos, cosméticos, detergentes, alimentos, pintura, papel, productos farmacéuticos y en la industria textil (Paljevac *et al.*, 2007; Kika *et al.*, 2007; Yandri *et al.*, 2012).

Este polímero ha sido una sustancia de gran aplicación histórica en la enzimología básica y aplicada como matriz cromatográfica para la purificación de estas biomoléculas mediante intercambio catiónico (Hajós. *et al.*, 1998). Se ha empleado en la obtención de conjugados enzimáticos de α -amilasa, invertasa y tripsina, los cuales resultaron mucho más estables que sus contrapartes nativas frente a condiciones desnaturalizantes para las proteínas (Villalonga *et al.*, 1999; Villalonga *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2002). Se ha utilizado además en la inmovilización de enzimas y células entre otros. Se puede citar como ejemplo su empleo como matriz para la α -amilasa (Yandri *et al.*, 2012), en la encapsulación de bacterias productoras de metano para la producción de biogás (Youngsukkasem *et al.*, 2012) y en la preparación de matrices nanohíbridas con derivados de silicio para la inmovilización de α -amilasa (Singh y Kumar, 2011).

1.3.4 Alginato de Sodio

Alginato (Alg), comúnmente llamado alginato de sodio, es un polisacárido lineal aislado fundamentalmente de algas marinas de la clase *Phaeophyceae* (Sattarahmady *et al.*, 2007). La estructura de este copolímero consiste en dos ácidos urónicos: ácido α -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), unidos a través de enlaces (1-4), formando bloques con un patrón irregular donde varían las proporciones de GG, MG y MM (Tam *et al.*, 2011) (Figura 1.6). Los polímeros

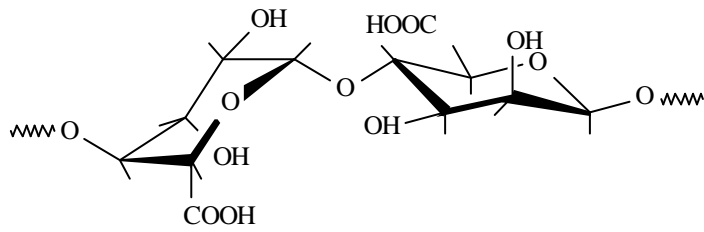


Figura 1.6 Fórmula estructural del alginato de sodio.

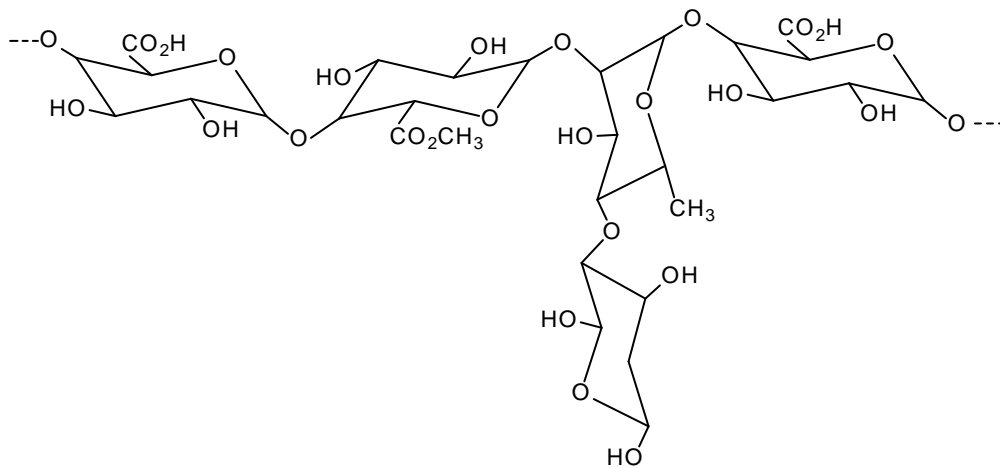


Figura 1.7 Fórmula estructural de la pectina.

de alginato aislados de diferentes fuentes varían en composición y disposición de los monómeros y por lo tanto en sus propiedades fisicoquímicas y sus funciones (Yang *et al.*, 2011).

Es un polímero aniónico, soluble en agua, biocompatible, biodegradable, no tóxico y no inmunogénico, con una gran habilidad para formar geles en condiciones muy similares al entorno celular (Mi *et al.*, 2002; Davidovich-Pinhas y Bianco-Peled, 2011). Es capaz de formar soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones y posee acción como agente suspensor, gelificante, emulsificante y formador de películas. Ha sido ampliamente utilizado en las industrias farmacéutica, biotecnológica, alimenticia y textil (West *et al.*, 2007; Selimoglu y Elibol, 2010; Li *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Se ha empleado también para la modificación química de enzimas como la α -amilasa, incrementando su estabilidad frente a condiciones desnaturizantes para las proteínas (Gómez *et al.*, 2001), en la inmovilización de la enzima superóxido dismutasa al formar parte de un biosensor para la detección del radical superóxido (Wang *et al.*, 2012) y en la preparación de matrices de alginato de sodio-alcohol polivinílico para la inmovilización (Mohd Zain *et al.*, 2011).

1.3.5 Pectina

El término pectina (Pc) es la denominación genérica de un complejo grupo de polisacáridos estructurales de masa molar entre 20 000 y 400 000, que se localizan en las paredes celulares de las plantas superiores (Villanueva *et al.*, 1990).

La pectina es una de las biomacromoléculas más compleja y diversa de la naturaleza (Fraeye *et al.*, 2010). Su estructura básica está constituida por una cadena lineal y helicoidal formada por moléculas de ácido D-galacturónico y su éster metílico, unidas mediante enlaces $\alpha(1-4)$. Ambas formas del ácido urónico se presentan en secuencias de bloques alternos, entre las cuales se insertan algunas moléculas de L-ramnosa unidas mediante enlaces $\alpha(1-2)$ (**Figura 1.7**) (Fishman,

1988; Urias-Orona *et al.*, 2010). Unidos a la estructura principal se encuentran otros azúcares neutros como arabinosa, xilosa, galactosa, fucosa y manosa (Mohnen, 2008). La composición estructural de las pectinas y sus propiedades fisicoquímicas dependen de las fuentes vegetales de las cuales son obtenidas, así como de los métodos de extracción y purificación empleados (D'Souza *et al.*, 2009).

Los mayores volúmenes de estos polisacáridos son obtenidos como subproductos de las industrias procesadoras de jugos de manzanas y cítricos. Estas producciones de pectinas son empleadas fundamentalmente en la preparación de jaleas, mermeladas, jamones, en la estabilización y acidificación de leches y yogures y como espesante en las salsas (Ele-Ekouna *et al.*, 2010). Unido a la variedad de usos en la industria alimenticia, las pectinas son también aplicadas en la industria farmacéutica (Wattanakorn *et al.*, 2010; Munarin *et al.*, 2011; Das y Ng, 2010) y en la descontaminación de efluentes industriales (Mata *et al.*, 2009).

La pectina es un polisacárido aniónico natural, no tóxico, no digerido por enzimas gástricas o intestinales, con importantes propiedades como agente formador de gel, estabilizante y emulsificante (Zhang *et al.*, 2011; D'Souza *et al.*, 2009). Existen pocos informes acerca de su aplicación para la modificación e inmovilización de enzimas. La primera información de su utilización para estos fines, fue en la modificación química de la invertasa para obtener un conjugado hidrosoluble que incrementó la estabilidad de la enzima frente a condiciones desnaturalizantes (Gómez y Villalonga, 2000). Se considera que este campo de aplicación de la pectina está poco estudiado, por lo que sin lugar a dudas se encuentra abierto a la investigación.

1.3.6 Ácido Hialurónico

El ácido hialurónico (HyA), conocido también como hialuronato, es un polisacárido natural abundante en tejidos humanos y de animales, componente mayoritario de matrices extracelulares (colágeno, elastina), principalmente en fluidos sinoviales y en el cuerpo vítreo de los ojos (Ohya *et al.*, 2001). Es producido además por la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* con buen rendimiento y un alto grado de pureza (Gatej *et al.*, 2005). Este glucosaminoglucano no sulfatado está compuesto por repetidas unidades de disacárido de ácido D-glucurónico (1-3) y de N-acetil-D-glucosamina (1-4) (Cen *et al.*, 2004) (**Figura 1.8**). La abundancia de grupos carboxílicos que posee este compuesto en su estructura le confiere características físico-químicas y biológicas únicas como propiedades reológicas, lisura e hidrofiliidad (Liu *et al.*, 2007).

El ácido hialurónico es un polímero aniónico, biocompatible, biodegradable, susceptible a una gran variedad de modificaciones químicas, que han permitido obtener nuevos derivados con mejores propiedades químicas y mecánicas. Sus propiedades viscoelásticas, así como las funciones biológicas que presenta han hecho que este polímero sea muy empleado para la liberación de drogas y la ingeniería de los tejidos (Maleki *et al.*, 2007; Markowska *et al.*, 2011). Se ha aplicado como agente liberador de drogas, en la cirugía estética, nanomedicina (Alijotas-Reig *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011) y en el tratamiento intra-articular de la artritis reumatoidea (Kim *et al.*, 2011). Se ha empleado además en el desarrollo de complejos polielectrolitos biocompatibles (Hahn y Hoffman, 2005) y en la preparación de conjugados unido a proteínas (Ferguson *et al.*, 2010), pero el estudio de su empleo como polímero para la inmovilización de enzimas ha estado muy limitado.

A partir de la revisión y el análisis realizado, se considera que una vez seleccionada la quitina como polímero base para la preparación de los nuevos soportes sólidos, se pueden utilizar para

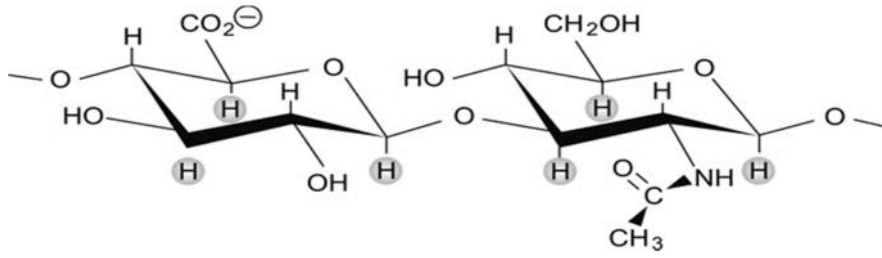


Figura 1.8 Fórmula estructural del ácido hialurónico

modificar la misma polímeros aniónicos y/o catiónicos, que permitan obtener diferentes soportes que abran nuevas perspectivas a la obtención de conjugados enzimáticos más eficientes para su aplicación en el sector industrial.

Con este fin fue seleccionado el polímero catiónico quitosana, tomando en consideración importantes propiedades que presenta como su capacidad de unirse a otras macromoléculas formando complejos polielectrolitos, su disponibilidad, su poder adsorbente, su aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica, y otras, además de haber sido empleada por otros autores en la inmovilización de enzimas con buenos resultados.

Dentro de los polímeros aniónicos fueron seleccionados CMC, Alg, Pc y HyA, los cuales presentan en su estructura grupos funcionales que permiten la formación de complejos polielectrolitos, condición indispensable para llevar a cabo el proceso de inmovilización. Todos estos polímeros son de fácil adquisición, se obtienen a partir de fuentes naturales y presentan características adecuadas para ser utilizados en una amplia gama de aplicaciones.

1.4 Invertasa

La enzima β -D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) fue descubierta en 1860 por Bertholet, recibiendo el nombre de invertasa, sacarasa o invertina (Williams *et al.*, 1985). Su función es catalizar la hidrólisis de la sacarosa en la naturaleza, produciendo glucosa y fructosa (Naumov y Doroshenko, 1998; Bagal y Karve, 2006).

La principal fuente de obtención de la enzima es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Milovanovic *et al.*, 2007), aunque también puede encontrarse en invertebrados, vertebrados, algas verdes, bacterias, hongos y en algunas especies vegetales (Isik *et al.* 2003; Bagal y Karve, 2006; Márquez *et al.*, 2008).

La invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* existe en dos formas, una no glicosidada llamada interna y otra glicosidada llamada externa (Reddy y Maley, 1990). La invertasa externa (INV) es una proteína globular, homodimérica constituida por 513 residuos de aminoácidos por cada subunidad (Chu *et al.*, 1983). La masa molar para cada subunidad ha sido calculada en 120 kDa, atendiendo a la composición aminoacídica y monosacarídica (Reddy *et al.*, 1988).

La utilización de la invertasa en la producción de sirope de azúcar invertida constituye la principal aplicación de este biocatalizador. El proceso de hidrólisis enzimática de la sacarosa es superior a la hidrólisis ácida, porque durante el mismo no se forman impurezas coloreadas ni agentes saborizantes indeseables (Kotwal y Shankar, 2009; Albertini *et al.*, 2012). Los siropes de azúcar invertido son productos con un alto valor comercial, especialmente en países como Brasil y la India que liderean la producción mundial de caña de azúcar o en países de la Unión Europea, los Estados Unidos y Rusia donde la principal fuente de azúcar es la remolacha (Tomotani y Vitolo, 2004; Szyman´ska *et al.*, 2013).

La invertasa también ha sido utilizada en la producción de cremas no cristalizadas, dulces, mermeladas, miel artificial y en menor medida en la producción industrial de azúcares líquidos (Awad *et al.*, 2013). Se ha empleado además en la fermentación de sustratos que contienen sacarosa para la obtención de bebidas alcohólicas, ácido láctico, glicerol, entre otras (Bhatti *et al.*, 2006; Valerio *et al.*, 2013). Esta enzima presenta asociada actividad inulinasa, por lo que puede ser utilizada para la hidrólisis de inulina a fructosa (Kotwal y Shankar, 2009). Otra aplicación de la enzima es como agente plastificante utilizado en cosméticos, drogas y en la industria del papel. Además, como electrodo enzimático para la detección de sacarosa (Milovanovic *et al.*, 2007; Cadena *et al.*, 2011).

Los procesos de hidrólisis enzimática de sacarosa pueden emplear invertasa en su forma libre o inmovilizada. La solubilidad de la enzima libre hace que su uso a gran escala sea relativamente costoso y el proceso de hidrólisis poco atractivo económicamente (Kotwal y Shankar, 2009). Sin embargo, la utilización de la enzima en forma inmovilizada posibilita la reutilización del biocatalizador heterogéneo, reduce los costos del proceso, facilita un mejor control y un régimen de operación continuo (Márquez *et al.*, 2008).

Las propiedades que presenta la invertasa así como su aplicación comercial, en especial en la hidrólisis de la sacarosa, condujeron a seleccionar esta enzima para realizar estudios de inmovilización. Conjuntamente a esto es de señalar que la inmovilización de la enzima facilitaría la aplicación práctica de la misma, la cual pudiera emplearse en la obtención de glucosa enzimática. Estos resultados tributarían al proceso de redimensionamiento que ha sufrido la agroindustria azucarera cubana a partir del año 2002 (Córdovez-Herrera *et al.*, 2013) y en especial en la producción de derivados de la caña de azúcar.

1.5 Inmovilización de Invertasa

La invertasa fue la primera enzima inmovilizada. En 1916 se realizó el primer informe de su enlace a hidróxido de aluminio, demostrando los autores que la misma mantenía su actividad después de su unión al soporte insoluble (Nelson y Griffin, 1916). En 1966, 50 años después, la invertasa fue enlazada a la dietilaminoetil celulosa (DEAE-celulosa) y el sistema inmovilizado fue utilizado para el estudio de la hidrólisis continua de la sacarosa (Suzuki *et al.*, 1966).

Posterior a este trabajo esta enzima ha sido inmovilizada en diferentes soportes utilizando métodos como el entrapamiento (Bagal y Karve, 2006, Yildiz *et al.*, 2013), la microencapsulación y la inmovilización covalente (Akgo'lu *et al.*, 2001; Amaya-Delgado *et al.*, 2006; Cadena *et al.*, 2010;

Albertini *et al.*, 2013), el entrecruzamiento (Emregul *et al.*, 2006; Hamerska-Dudra *et al.*, 2006) y la adsorción (Gopinath y Sugunan, 2007).

De las técnicas de inmovilización utilizadas la adsorción se presenta como el candidato más atractivo para la inmovilización de esta enzima, al compararlo con el resto de los métodos utilizados, teniendo en cuenta que el proceso en general presenta importantes ventajas como su bajo costo, sencillez, la reutilización del soporte y la retención de la actividad catalítica (Arika y Bayramoglu, 2006).

Empleando este método la invertasa ha sido inmovilizada en diversos soportes. Maeda *et al.*, (1973) inmovilizaron invertasa en dietilaminoacetil celulosa (DEAA-celulosa) pero la enzima enlazada perdió entre el 55-70 % de su actividad inicial. La invertasa de *Candida utilis* fue enlazada a capas de celulosa porosa y cambió su intervalo de pH óptimo entre 4,0-5,4, al compararla con la enzima soluble (pH 4,1). Ambas preparaciones mostraron inhibición a altas concentraciones de sustrato (Dickensheets *et al.*, 1977).

Hradil y Svec (1981) estudiaron la inversión de la sacarosa utilizando invertasa enlazada a dietilaminohidroxipropil celulosa (DEAHP-celulosa). Los autores demostraron que la cantidad de enzima enlazada era proporcional a la porosidad y a la capacidad de intercambio de la matriz y que la concentración de sustrato, la velocidad del flujo y la temperatura de reacción afectan el proceso de hidrólisis. La invertasa extracelular de *Aspergillus atchecius* fue enlazada a DEAE-celulosa mostrando un incremento de aproximadamente el 45 % de la actividad, en los experimentos de perfil de termoestabilidad y estabilidad al almacenaje, al compararlo con la enzima soluble (Madyastha *et al.*, 1987).

Yamasaki *et al.*, (1984) desarrollaron un método para la inmovilización de invertasa en capas de franela de algodón con polietilenamina (PEI). La enzima después de la absorción en PEI fue

fijada a la tela con glutaraldehído. La retención de la actividad enzimática aumentó con el incremento del tiempo de incubación y la actividad específica máxima fue determinada después de 16 horas de incubación.

Posteriormente D'Souza y Godbole (2002) utilizaron invertasa enlazada a PEI con capas de cáscara de arroz para evaluar la aplicación de materiales lignocelulósicos en la inmovilización de enzimas. Bajo condiciones óptimas, la enzima inmovilizada mostró una discreta retención de la actividad (56 %) y un corrimiento del pH hacia valores ácidos (4,5) mientras que para la enzima libre el valor es 5,0. Los autores refieren que el proceso de inmovilización no afectó la temperatura óptima de la enzima (50°C).

La invertasa ha sido adsorbida además en celita y poliacrilamida mostrando un 92 % y 81% de retención de la actividad respectivamente. Ambas preparaciones enzimáticas mostraron buenos valores de pH, temperatura, almacenaje y estabilidad operacional sugiriendo que los soportes utilizados poseen un buen potencial industrial (Mansour y Dawoud, 2003). En un esfuerzo por incrementar la estabilidad al almacenaje y la reusabilidad de la enzima, Tumturk y Tufan (2004) acoplaron la invertasa a 1,2-diamino etano y al 1,3-diamino propano activado con el dímero de alquilpoliamina ácida y estudiaron sus propiedades. La inmovilización no afectó el pH óptimo, pero aumentó la temperatura óptima en 5°C. Incrementos en los valores de K_M y $V_{máx}$ fueron encontrados para los dos biocatalizadores sintetizados y fueron explicados sobre la base de cambios estructurales que provocó el proceso de inmovilización, lo que redujo la accesibilidad de la enzima al sustrato.

Para el aislamiento e inmovilización simultánea de invertasa de levadura Melo y D'Souza (2000) desarrollaron un procedimiento simple donde el extracto de levadura crudo con actividad invertasa fue mezclado con un extracto de frijoles y el precipitado que contenía la enzima

absorbida fue entrecruzado con glutaraldehído. La invertasa enlazada retuvo aproximadamente el 60% de la actividad inicial. El proceso de inmovilización no afectó el pH óptimo de la enzima pero incrementó la temperatura óptima en 10°C.

Los intercambiadores aniónicos Dowex® fueron empleados también para la inmovilización de la invertasa. Para esto se emplearon varios tamaños de poros (50-400) y entrecruzamientos entre 1-8%. Los autores determinaron que la máxima retención de la actividad fue en el complejo invertasa-Dowex® 1X4-200. La caracterización del mismo mostró un decrecimiento significativo de la temperatura óptima (10°C) lo que se relacionó con una menor cantidad de energía requerida para la reacción (Tomotani y Vitolo, 2004, 2006, 2007).

Albertini *et al.*, (2012, 2013) inmovilizaron la invertasa en un soporte de vidrio-cerámica. Estudiaron las propiedades de la forma inmovilizada en comparación con la enzima libre y determinaron que transcurrido el proceso de inmovilización el pH óptimo no variaba y su temperatura óptima se incrementaba en 5°C. Al evaluar la estabilidad operacional encontraron que después de diez ciclos de reuso a 60°C la invertasa inmovilizada solo retenía el 30% de su actividad inicial.

La revisión y análisis de la literatura sobre inmovilización de la invertasa, evidencia que en el transcurso de estos años esta enzima ha sido inmovilizada en varios soportes, empleando para ello diferentes métodos con resultados disímiles. Sin embargo, hasta el momento no existe un soporte ni un único método que permita obtener la enzima con las propiedades requeridas para la amplia gama de aplicaciones que ella presenta. El incremento de su estabilidad funcional y operacional continúa siendo un tema fundamental en la investigación, por lo que se hace necesario trabajar en la búsqueda de nuevos soportes y/o métodos de inmovilización que permitan cumplir con estas expectativas.

Los trabajos analizados hasta el momento informan procesos de inmovilización llevados a cabo con enzima nativa. Sin embargo, existen métodos de estabilización de invertasa que involucran la modificación química con polímeros hidrosolubles como quitosana, carboximetilcelulosa y pectina donde los autores notificaron un incremento en las propiedades funcionales de la enzima (Gómez *et al.*, 2000; Gómez y Villalonga, 2000; Ramírez *et al.*, 2002). Los resultados más interesantes los exhibió el conjugado hidrosoluble invertasa-quitosana, al mostrar un incremento de 10°C en la termoestabilidad de la enzima modificada. Asimismo el tiempo de vida medio de la invertasa se incrementó de 5 minutos a 5 horas después de la modificación, a 65°C. A valores de pH inferiores a tres la estabilidad del conjugado preparado se incrementó en un 20 %. No obstante, la estabilización funcional alcanzada por el conjugado hidrosoluble invertasa-quitosana su imposibilidad de reuso sigue constituyendo una limitación para su aplicación industrial.

Considerando lo planteado anteriormente y conociendo la facilidad que presenta la quitosana para formar complejos polielectrolitos con polímeros aniónicos (CMC, Pc; Alg, HyA) se propone en esta tesis llevar a cabo la inmovilización del conjugado invertasa-quitosana sobre nuevos soportes de quitina modificada químicamente con polímeros aniónicos, a través de la formación de complejos polielectrolitos. Las interacciones iónicas que se establecerían entre las macromoléculas serían fuertes y difíciles de romper, por lo que de esta manera se podrían utilizar los beneficios que trae consigo la modificación de la invertasa con la quitosana al inmovilizarla en un soporte sólido, aprovechando las ventajas del método de adsorción y evitando los procesos de desorción de la enzima, lo que potenciaría su posibilidad de reuso en procesos industriales.

1.6 Pectinasa y Celulasa

1.6.1 Pectinasa

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas (PNSA) son capaces de hidrolizar las sustancias pécticas. El término pectinasa incluye la poligalacturonasa, pectina estearasa, pectina liasa y pectato liasa, agrupadas así teniendo en cuenta el ataque que ellas realizan sobre la molécula de pectina (Kaur *et al.*, 2004, Sharma *et al.*, 2013). Estas enzimas son producidas fundamentalmente por bacterias y hongos y en algunos casos por levaduras y plantas superiores (Tuoping *et al.*, 2008).

El sistema enzimático pectinasas ha sido aplicado en muchos procesos industriales convencionales. Una de sus aplicaciones fundamentales se encuentra en el procesamiento de las frutas y en la extracción y clarificación del jugo de las mismas, eliminando la viscosidad y turbidez (Wang *et al.*, 2013). Se han empleado además en los procesos textiles, en el procesamiento de las fibras de plantas como té y café, en la extracción de aceite y en el tratamiento de aguas residuales industriales (Rina *et al.*, 2013; Esawy *et al.*, 2013). En la industria de la pulpa y la fabricación de papel (Combo *et al.*, 2012), en combinación con celulasas y hemicelulasas puede ser utilizada para la destrucción de la pared celular de algunos frutos y vegetales (Kaur *et al.*, 2004).

1.6.2 Celulasa

Las celulasas (CLSA) son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces β -(1-4) de la celulosa, principal fuente de carbono encontrada en la pared celular de los vegetales. Es un sistema compuesto por tres enzimas fundamentalmente: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), exoglucanasas (E.C. 3.2.1.91) y β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21), las cuales actúan sinérgicamente liberando glucosa como producto final de la hidrólisis de la celulosa (Karmakar y Ray, 2011). Estas enzimas han sido obtenidas a partir de una gran variedad de bacterias y hongos aeróbicos y

anaeróbicos, mesófilos y termófilos, siendo las celulasas microbiales las más utilizadas por su gran aplicación industrial y menor costo de producción (Bhat y Bhat, 1997, Karmakar y Ray, 2011).

Las celulasas poseen un amplio espectro de aplicación en la biotecnología. En mucho de los casos ellas son utilizadas conjuntamente con hemicelulasas, pectinasas, y ligninasas (Karmakar y Ray, 2010). Algunas de sus aplicaciones más importantes se encuentran en la industria de los alimentos, vinos y bebidas, de alimento animal, textil y de detergentes, en la industria del papel y la pulpa (Dincer y Telefoncu, 2007, Tomohisa *et al.*, 2013), así como en la agricultura (Ham y He, 2010).

Se han empleado además en el tratamiento de residuales generados por los bosques, la agricultura, la agroindustria y en la producción de etanol utilizando biomasa lignocelulósica (Ghosh y Ray, 2010, Chen y Qiu, 2010, Peng *et al.*, 2013). Sin embargo, las sub-unidades multiméricas de las celulasas tienden a disociarse trayendo consigo la inactivación de la enzima. Por esta razón se han llevado a cabo diversos estudios para la estabilización de la enzima por inmovilización o ingeniería de proteína (Rodríguez *et al.*, 2011; Bayramoglu *et al.*, 2013).

1.7 Inmovilización de las enzimas Pectinasa y Celulasa

1.7.1 Inmovilización de Pectinasa

Desde finales de la década del 80 la pectinasa ha sido inmovilizada en diferentes soportes como nylon, resinas de intercambio iónico, seda, alúmina, entre otros, sin embargo, la eficiencia y la estabilidad de la enzima no ha sido suficientemente incrementada (Li *et al.*, 2008). Li T. *et al.*, (2007) inmovilizaron la pectinasa en un soporte de alginato utilizando glutaraldehído como agente acoplante, reteniendo un 66 % de la actividad inicial y manteniendo su temperatura óptima en 40°C. En otros trabajos al inmovilizar covalentemente la PNSA en un soporte de agar, los

autores determinaron que la temperatura óptima se incrementaba en 10°C después del proceso de inmovilización y que la misma mostraba el 100 % de actividad después de estar expuesta a 4°C por 30 días (Li *et al.*, 2008).

1.7.2 Inmovilización de Celulasa

La biotecnología de la celulasa tuvo sus inicios aplicándola primeramente al alimento animal y posteriormente en la industria alimenticia. Durante estos años la aplicación de la celulasa se ha incrementado considerablemente y con ello la búsqueda de métodos para estabilizar la enzima. La dificultad en el recobrado de la misma ha traído como resultado que la hidrólisis enzimática de la biomasa celulósica sea muy costosa (Liu y Cao, 2013). Varios autores han trabajado en la inmovilización de esta enzima tanto en soportes solubles como insolubles y han empleado para ello diferentes métodos. Daoud *et al.*, (2010) propusieron la aplicación de carbón activado comercial para la adsorción de la enzima y estudiaron el efecto que ejerce la temperatura en estos procesos de adsorción. Determinaron que la CLSA inmovilizada podía ser aplicada para la producción continua de glucosa a partir de derivados de celulosa.

La N-succinyl-quitosana ha sido acoplada a la celulasa empleando el método de la carbodiimida. El conjugado obtenido mostró características solubles o insolubles en dependencia de las variaciones del pH del medio (Zhou, 2010). Dincer y Tefoncu (2007) estudiaron el incremento de la estabilidad de la enzima en el intervalo de pH neutro, aunque la temperatura óptima de la misma no varió. En este caso la celulasa fue inmovilizada en quitosana modificada con alcohol polivinílico.

La celulasa fue enlazada covalentemente a liposomas y mostró una mayor reusabilidad frente a la hidrólisis de celulosa, determinándose que la enzima tratada tenía una mayor actividad celulasa remanente que la convencional (Li C. *et al.*, 2007). Cheng y Chang (2013) la inmovilizaron en

nanopartículas de oro funcionalizadas con L-cisteína para hidrolizar palillos de bambú y obtener glucosa. Como resultado del trabajo obtuvieron que la enzima pudiera ser recuperada por filtración y reutilizada 6 veces en un período de 90 días

La pectinasa y la celulasa son enzimas con un amplio campo de aplicación, pero presentan los mismos inconvenientes que el resto de las enzimas para su reutilización. Han sido inmovilizadas en varios soportes y se han empleado diferentes técnicas de inmovilización con estos fines, pero al igual que ocurre con la invertasa no existe un método o un soporte único donde al inmovilizarlas se pueda emplear para todas las aplicaciones industriales.

Por todo lo anterior se seleccionaron estas enzimas para estudiar el efecto del nuevo soporte de quitina modificado con quitosana en su inmovilización, utilizando para ello las técnicas de adsorción y formación de enlace covalente.

1.8 Reactores enzimáticos

La definición y el diseño de un reactor en un proceso donde el elemento catalítico está constituido por una enzima se ve influenciado por una gran diversidad de factores estrechamente relacionados en su funcionamiento (López-Munguía, 2004, Prieto *et al.*, 2008). Dentro de ellos se destacan:

- a) Naturaleza del biocatalizador: la enzima puede estar disponible en forma de producto comercial soluble en agua o en un biocatalizador donde la enzima ha sido transformada en insolubles en medio acuoso que puede ser utilizadas en suspensión o empacadas.
- b) Características físico-químicas del proceso: para el diseño debe considerarse la temperatura, el pH y la presencia de varias fases cuando hay generación de gases, se emplea solvente orgánico o en el caso de sustratos y productos insolubles.
- c) Estabilidad de la enzima.

- d) Características cinéticas del proceso: es frecuente asumir para el diseño de reactores industriales que la enzima observa un comportamiento con modelo de orden cero para enzimas que funciones según el modelo de Michaelis-Menten.
- e) Tamaño del mercado y valor agregado del producto: estrechamente relacionado con el impacto del biocatalizador en los costos de producción.

La mayor parte de las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en reactores intermitentes, donde se carga el reactor con sustrato y enzima y la reacción procede hasta un cierto nivel de conversión. Si la enzima es soluble, se pierde disuelta en el efluente después de recuperar el producto, mientras que si se emplea en forma inmovilizada está puede reciclarse mientras la actividad y la estabilidad del catalizador lo permitan (*Vasie-Racki et al., 2011*).

Los biocatalizadores industriales han sido diseñados con enzimas inmovilizadas por atrapamiento en gel, adsorción o entrecruzamiento químico. Los reactores que responden a este comportamiento son reactores de enzima inmovilizada en lecho fijo, en lecho fluidizado y los reactores enzimáticos de membrana (*López y Flores, 2004, Hernández, 2013*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental llevado a cabo en la realización de esta tesis consiste primeramente en la caracterización química de los polímeros empleados en la preparación de los soportes. Posteriormente, en una primera etapa se sintetizan cuatro soportes quitina-polímero aniónico (Quit-CMC, Quit-Pc, Quit-Alg, Quit-HyA), los cuales se emplean en la inmovilización del conjugado invertasa-quitosana (INV-QSA) a través de la formación de un complejo polielectrolito. Se determinan las mejores condiciones para su formación y se estudian las propiedades catalíticas de los complejos formados. Asimismo se sintetiza el soporte quitina-polímero catiónico (Quit-QSA), el cual se utiliza para la inmovilización de dos enzimas de gran aplicación industrial, pectinasa y celulasa, empleando los métodos de adsorción física y formación de enlaces covalentes. En este caso se determinan igualmente las mejores condiciones de trabajo y se estudian las propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas.

La segunda etapa consiste en la realización de estudios de estabilidad funcional y operacional de todas las formas inmovilizadas en los soportes sintetizados. Se lleva a cabo además una valoración económica preliminar de la posible implementación industrial de uno de los complejos de invertasa inmovilizada para la hidrólisis enzimática de la sacarosa.

2.1 Materiales y reactivos empleados en el trabajo experimental

Se emplean los siguientes reactivos y materiales:

- Carboximetilcelulosa de baja viscosidad (sal sódica), alginato de sodio de *Laminaria hyperborean*, sacarosa y ácido 3,5-dinitrosalicílico. BDH (Poole, UK)

- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) y ácido galacturónico. Merck (Darmstadt, Alemania)
- meta-Peryodato de sodio ($m\text{-NaIO}_4$), borohidruro de sodio (NaBH_4) y celulasa de *Aspergillus niger*. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Invertasa de *S. cerevisiae* y pectina de cítricos. Fluka (Buchs, Suiza)
- Pectinasa de *Aspergillus niger*. Agrovin. SA (Ciudad Real, España)
- Quitina de carapacho de langosta con tamaño promedio de partículas de 30 μm . Empresa Mario Muñoz (Habana, Cuba).
- Ácido hialurónico. Prof. Rolando Barbucci (Universidad de Siena, Siena, Italia)

Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y provenían de las mismas fuentes citadas anteriormente.

2.2 Caracterización de la quitina, preparación y caracterización de su derivado desacetilado

2.2.1 Caracterización de la quitina

Para la caracterización de la quitina (Quit) se determina su grado de acetilación mediante espectroscopia FT-IR según el método propuesto por Baxter *et al.*, (1992). Las muestras sólidas fueron finamente trituradas y mezcladas con KBr grado i.r. y los espectros registrados en un espectrómetro FT-IR 1600 (Perkin Elmer, UK).

2.2.2 Preparación y caracterización de la quitosana

Se suspendieron diez gramos de quitina en 800 mL de una solución de NaOH al 40 % (m/v) previamente calentada a 100°C. La mezcla se mantuvo bajo agitación mecánica a 110°C en un baño de aceite durante dos horas. El sólido resultante fue colectado en frita de vidrio bajo presión reducida y lavado repetidamente con agua destilada hasta la neutralidad. La quitosana (QSA) obtenida fue disuelta mediante agitación mecánica en 640 mL de HAc al 0,7 % (v/v) durante toda

la noche. La solución resultante se adicionó suavemente bajo agitación mecánica a 160 mL de una solución acuosa que contenía 320 g de NaOH, previamente calentada a 100°C. La reacción de desacetilación se mantuvo bajo agitación mecánica a 110°C en un baño de aceite durante dos horas. El sólido resultante fue colectado en frita de vidrio bajo presión reducida y lavado repetidamente con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad. La QSA preparada fue lavada dos veces con etanol al 60 % y posteriormente sometida a lavados consecutivos con etanol al 80 %, 90 % y 100 %. El polisacárido preparado se secó al aire y se pulverizó finalmente en un molino de bolas (Kurita *et al.*, 1977).

La masa molar de la QSA fue determinada mediante un sistema de HPLC consistente en una bomba de alta presión Waters 515 (Waters, USA) y un detector de índice de refracción (Differential Refractometer R 401, Waters, USA). Para ello se emplearon cuatro columnas TESSEK Hema-bio 40, 100, 300 y 1000 (4 x 30cm) en serie (Tosohass, USA), las cuales fueron calibradas con los siguientes patrones de masas molares de pululano (P) (Shodex, Showa Denko K. K., Japón): P-5 (5,9 kDa), P-10 (11,8 kDa), P-20 (22,8 kDa), P-50 (47,3 kDa), P-100 (112 kDa), P-200 (212 kDa) y P-400 (404 kDa).

La QSA se disolvió en una solución de CH₃CO₂H 0,5 mol/L/CH₃CO₂Na 0,2 mol/L (Terbojevich *et al.*, 1993) y los patrones de masas molares en solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7,0; NaCl 0,15 mol/L. Se aplicaron 50 µg de todos los polímeros a una velocidad de flujo de 3,34 cm/h y se detectó la diferencia en el índice de refracción de las muestras aplicadas durante la elución de las fracciones. Los datos obtenidos fueron procesados con el empleo del programa de cómputo Refractive Index Data Manager Millennium Quick Set Control Ver. 2.15.01 (Waters Corp., 1994, USA).

El grado de acetilación de la QSA se determinó mediante espectrometría de RMN- H^1 (Rinaudo *et al.*, 1992). El espectro de RMN- H^1 se registró a 298 K y a 500 MHz en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Brüker AVANTE 500 (Alemania). La muestra fue preparada a una concentración aproximada de 30 mg/mL en DCI al 3 % (v/v) en D_2O .

2.3 Caracterización de los polímeros aniónicos utilizados en la preparación de los soportes

En la caracterización de los polímeros aniónicos utilizados en la preparación de los soportes se emplearon los mismos sistemas de HPLC y espectrometría RMN- H^1 que los informados en el **Epígrafe 2.2**, con la diferencia que las muestras de los polímeros se prepararon en D_2O .

Las masas molares de la carboximetilcelulosa (CMC), pectina (Pc), alginato de sodio (Alg) y ácido hialurónico (HyA) se determinaron en un sistema de HPLC, utilizando solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7,0; NaCl 0,15 mol/L como solvente. Los resultados de esta determinación se muestran en el **Anexo I**.

El grado de sustitución de la CMC fue determinado mediante espectroscopía RMN- H^1 . En el **Anexo II** se puede apreciar el espectro RMN- H^1 registrado a la CMC así como la tabla de asignación de las señales obtenidas, las cuales coinciden con los resultados informados en la literatura por Ho y Klosiewicz (1980) y Kulicke *et al.*, (1996). El grado de sustitución se calculó aplicando el método propuesto por Ho y Klosiewicz (1980) y se obtuvo un valor de 67 % de carboximetilación. Este resultado evidencia una densidad de grupos carboximetilos presentes en el polímero que favorece la formación de interacciones electrostáticas con otros grupos ionizables.

El grado de esterificación de la pectina fue determinado por el método propuesto por Grasdalen *et al.*, (1988) empleando la espectrometría RMN- H^1 (Winning *et al.*, 2007). El espectro de este polímero, así como la tabla de asignación de las bandas se puede apreciar en el **Anexo III**. La

asignación de las señales del polímero se corresponde con los resultados presentados anteriormente por Grasdalen *et al.*, (1988) y Spiro (1996). La Pc empleada en este trabajo presentó un 53 % de esterificación, resultado que concuerda con los informados por Souza *et al.*, (2009) y Coenen *et al.*, (2007) para muestras de pectina de cítricos. El grado de esterificación determinado muestra que esta Pc presenta características adecuadas para la formación de complejos polielectrolitos con polímeros catiónicos como la quitosana. Gonzáles (2000) demostró la formación del complejo polielectrolito pectina-quitosana a partir de una pectina de cítrico con similar porcentaje de esterificación.

La composición de uronatos del alginato de sodio fue estimada también mediante el método propuesto por Grasdalen *et al.*, (1979) empleando para ello la espectroscopía RMN-H¹. El espectro obtenido para este polímero, así como la tabla de asignación de las señales se muestran en el **Anexo IV**. La asignación de las bandas del espectro RMN-H¹ del Alg coincide con lo informado para este compuesto por otros autores (Holtan *et al.*, 2006 y Grasdalen 1983). La composición en ácidos urónicos determinada por RMN-H¹ fue de 37,5 % de ácido gulurónico y 62,5 % de ácido manurónico.

Asimismo, el ácido hialurónico utilizado fue caracterizado mediante la espectroscopía RMN-H¹. El espectro registrado para este polímero, así como la tabla de asignación de las señales se muestran en el **Anexo V**, coincidiendo la asignación de las bandas con lo planteado en la literatura para este polímero (Toffanin *et al.*, 1993, Heatley *et al.*, 1979).

2.4 Preparación de los soportes

2.4.1 Soporte quitina-polímero aniónico

Se disolvieron 600 mg del polímero aniónico (Alg, Pc, CMC o HyA) en 60 mL de solución tampón de fosfato de potasio pH 6,0, 30 mmol/L y se le añadieron 150 mg de EDAC. La solución

fue agitada por 60 minutos a temperatura ambiente y mezclada con una suspensión de tres gramos de quitina dispersa en 30 mL de agua destilada. La reacción se mantuvo en agitación continua por 16 horas a 25°C. El sólido fue obtenido por centrifugación, lavado varias veces con agua destilada hasta comprobar que en el agua de lavado no había presencia de carbohidratos, y finalmente suspendido en 90 mL de una solución tampón de NaAc pH 4,5; 50 mmol/L (Alg y Pc), solución tampón de NaAc pH 5,0; 50 mmol/L (CMC) y solución tampón de NaAc pH 5,5; 200 mmol/L (HyA). El contenido de carbohidratos de los soportes fue determinado colorimétricamente por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) con el empleo de D (+)-glucosa como patrón.

Todas las mediciones espectrofotométricas descritas en el trabajo se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia). Los datos obtenidos fueron procesados con el empleo del paquete de programas de cómputo SWIFT II (Biochrom Ltd., 1999, Suecia).

2.4.2 Soporte quitina-polímero catiónico (Quit-QSA)

Un gramo de quitina fue dispersado en 10 mL de agua destilada y se le añadió glutaraldehído hasta una concentración final de un 5 % (v/v). Se mantuvo la reacción a 25°C por cuatro horas bajo agitación y oscuridad. El sólido fue lavado con agua destilada hasta eliminar el aldehído en las aguas de lavado y resuspendido en 20 mL de agua destilada. La Quit así activada se mezcló con una solución de QSA al 1 % (m/v) y se mantuvo en agitación magnética entre cuatro y seis horas. Se añadió NaBH₄ al medio de reacción hasta una concentración de 200 mmol/L y se mantuvo la agitación por 16 horas más. El sólido fue recuperado por filtración, lavado abundantemente con agua destilada y suspendido en 20 mL de la misma. El contenido de carbohidratos se determinó colorimétricamente según el procedimiento descrito por Muzzarelli

(1997) empleando una curva patrón de glucosamina para la determinación del contenido de hexosaminas.

2.5 Preparación del conjugado invertasa-quitosana (INV-QSA)

Se disolvieron 10 mg de invertasa en 25 mL de solución tampón de NaAc 50 mmol/L, pH 5,0 y se añadieron 213 mg de m-NaIO₄ con agitación magnética en oscuridad y refrigeración. A los 30 minutos se le adicionaron 800 µL de etilenglicol a la mezcla de reacción y se mantuvo la agitación magnética por dos horas. A continuación el producto obtenido se dializó exhaustivamente contra una solución tampón de NaAc 20 mmol/L, pH 5,0 en la oscuridad. Posteriormente se disolvieron 40 mg de QSA en 2 mL de HAc al 3 % (v/v) y se le adicionaron a la enzima, manteniéndose esta mezcla durante cuatro horas con agitación magnética en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadieron gota a gota, 80 mg de NaBH₄ disuelto en 1 mL de agua destilada y se mantuvo la agitación magnética durante cuatro horas. El producto obtenido se dializó contra una solución tampón de NaAc 200 mmol/L pH 5,0 y el conjugado enzimático se purificó mediante la precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 75 % (m/v) de saturación. Todos los procesos descritos fueron realizados a 4°C (Gómez *et al.*, 2000). El contenido de carbohidratos del conjugado se determinó, al igual que en el soporte Quit-QSA, mediante el método descrito por Muzzarelli (1997) empleando una curva patrón de glucosamina para la determinación del contenido de hexosaminas.

2.6 Determinación de parámetros para la inmovilización de las enzimas

Para llevar a cabo la inmovilización de las enzimas en los nuevos soportes fue necesario determinar primeramente las mejores condiciones en cuanto a pH de formación, tiempo de incubación, concentración de proteína y porcentaje de glutaraldehído adicionado (en los casos necesarios), bajo las cuales la enzima retuviera su mayor actividad.

2.6.1 El pH de formación

El efecto del pH en la formación de los complejos polielectrolitos con el conjugado INV-QSA se estudió experimentalmente mezclando 20 mg de cada soporte con una cantidad de conjugado equivalente a 50 µg de enzima presente en el mismo y completando a un volumen final de 10 mL con las soluciones tampones siguientes:

Glicina/HCl 20 mmol/L; pH 1,0-1,5;

Ácido cítrico/Na₂HPO₄ 20 mmol/L; pH 2,0-6,0.

La mezcla de reacción fue agitada durante 24 horas en zaranda a 4°C. Posteriormente los preparados fueron lavados tres veces con las diferentes soluciones tampones hasta completar 10 mL. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de solución tampón de NaAc pH 4,5; 50 mmol/L y se evaluó la actividad enzimática.

El efecto del pH en la inmovilización de las enzimas PNSA y CLSA se estudió experimentalmente mezclando 65 mg de soporte con 86 µg de PNSA o 710 µg de CLSA completando a un volumen final de 4 mL con las soluciones tampones correspondientes:

Ácido cítrico/Na₂HPO₄, pH 2,0-2,5; 20 mmol (PNSA), 50 mmol (CLSA)

NaAc/HAc, pH 3,0-6,0; 20 mmol (PNSA), 50 mmol (CLSA)

En todos los casos la mezcla de reacción fue agitada durante 16 horas en zaranda a 4°C. Posteriormente los preparados fueron lavados tres veces con las diferentes soluciones tampones hasta completar 10 mL. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de solución tampón de NaAc pH 4,5, 20 mmol/L (PNSA), pH 5,5, 50 mmol/L (CLSA) y se evaluó la actividad enzimática.

2.6.2 Tiempo de incubación

El tiempo de incubación para la formación de los complejos polielectrolitos con el conjugado INV-QSA se estudió experimentalmente incubando 20 mg de soporte con una cantidad de

conjugado equivalente a 50 μg de enzima presente en el mismo y completado a un volumen final de 10 mL con las soluciones tampones de NaAc: pH 5,5; 20 mmol/L (HyA), pH 5,0; 20 mmol/L (CMC) y pH 4,5; 20 mmol/L (Pc y Alg). La mezcla de reacción fue agitada durante intervalos de tiempos entre 0-4 horas (20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minutos) en zaranda a 4°C. Posteriormente los preparados fueron lavados tres veces con las soluciones tampones de NaAc hasta completar 10 mL. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de la solución tampón de acetato de sodio pH 4,5; 50 mmol/L y se evaluó la actividad enzimática.

Para la inmovilización de las enzimas PNSA y CLSA el tiempo de incubación se estudió experimentalmente incubando 65 mg de soporte con 86 μg de cada enzima y completando a un volumen final de 4 mL con las soluciones tampones correspondientes: NaAc pH 4,5; 20 mmol/L (PNSA), pH 4,5; 50 mmol/L (CLSA). La mezcla de reacción fue agitada durante diferentes intervalos de tiempos entre 0-5 horas (20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 minutos) en zaranda a 4°C. Posteriormente los preparados fueron lavados con 10 mL de las soluciones tampones de NaAc. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de la solución tampón de NaAc pH 4,2; 20 mmol/L (PNSA), pH 5,5; 50 mmol/L (CLSA) y se evaluó la actividad enzimática.

2.6.3 Concentración de proteína

La concentración de proteína óptima para la formación de los complejos polielectrolitos con el conjugado INV-QSA se estudió experimentalmente incubando 5 mg de soporte con diferentes concentraciones de enzima (1,7, 8,5, 17, 42,5, 85, 127,5, 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y completando a un volumen final de 2 mL con las soluciones tampones de NaAc: pH 5,5; 20 mmol/L (HyA), pH 5,0; 20 mmol/L (CMC) y pH 4,5; 20 mmol/L (Pc y Alg). La mezcla de reacción fue agitada durante dos horas (CMC, Pc y HyA) y tres horas (Alg) en zaranda. Posteriormente los preparados fueron

centrifugados y lavados dos veces con 1,5 mL de soluciones tampones para eliminar la proteína que no estuviera incluida en el soporte. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de solución tampón de NaAc pH 4,5; 50 mmol/L y se evaluó la concentración de proteína enlazada al soporte y la actividad enzimática.

Para la inmovilización de las enzimas PNSA y CLSA se evaluó experimentalmente la concentración de proteína óptima incubando 30 mg de soporte con diferentes concentraciones de enzima (1,7, 8,5, 17, 42,5, 85, 127,5, 170, 340 y 680 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y completando a un volumen final de 4 mL con las siguientes soluciones tampones de NaAc: pH 4,5; 20 mmol/L (PNSA), pH 4,5; 50 mmol/L (CLSA). La mezcla de reacción fue agitada durante cuatro horas en zaranda. Posteriormente los preparados fueron lavados con 10 mL de las soluciones tampones de NaAc correspondientes para eliminar la proteína que no estuviera incluida en el soporte. A continuación se resuspendió cada complejo en 1 mL de la solución tampón de NaAc pH 4,2; 20 mmol/L (PNSA), pH 5,5; 50 mmol/L (CLSA) y se evaluó la concentración de proteína enlazada al soporte y la actividad enzimática.

2.6.4. Porcentaje de glutaraldehído

El porcentaje de glutaraldehído a añadir para las inmovilizaciones covalentes de la PNSA y la CLSA sobre el soporte de Quit-QSA se estudió incubando el soporte con la enzima (50 mg de soporte con 2,3 mg de PNSA, 100 mg de soporte con 1,1 mg de CLSA) y completando a un volumen final de 5 mL con las siguientes soluciones tampones: NaAc pH 4,5; 20 mmol/L (PNSA), pH 4,5; 50 mmol/L (CLSA). La mezcla de reacción fue agitada durante tres horas (Quit-QSA-PNSA) y 3,5 horas (Quit-QSA-CLSA) en zaranda a 4°C. A continuación se añadió glutaraldehído a concentraciones finales en el medio de reacción de (0,5; 1; 2; 3 % para PNSA y 0,25; 0,5; 1; 2; 3 % para CLSA) manteniéndose la agitación durante una hora (Quit-QSA-PNSA)

y 30 minutos (Quit-QSA-CLSA) en las mismas condiciones. Posteriormente los preparados fueron lavados con 25 mL de las soluciones tampones de NaAc. Seguidamente se resuspendió cada complejo en 1 mL de la solución tampón de NaAc pH 4,2 20 mmol/L (PNSA), pH 5,5 50 mmol/L (CLSA) y se evaluó la concentración de proteína enlazada al soporte y la actividad enzimática.

2.7 Inmovilización del conjugado INV-QSA en los soportes de quitina-polímero aniónico por formación de complejos polielectrolitos

Para la preparación de la forma inmovilizada de la enzima se tomó una solución del conjugado INV-QSA (8,5 mg de conjugado, 10 mL de solución tampón de NaAc 200 mmol/L pH 5,0) y fue adicionada sobre 90 mL de una solución de cada soporte de polisacárido aniónico preparado. La mezcla de reacción fue agitada durante dos horas (CMC, Pc y HyA) y tres horas (Alg) en zaranda a 4°C. Posteriormente los complejos fueron lavados cuatro veces con solución tampón de NaAc pH 5,0 20 mmol/L (CMC y HyA) y pH 4,5 20 mmol/L (Pc y Alg) para eliminar la proteína que no estuviera incluida en el soporte. A continuación se resuspendió cada complejo en 300 mL de la solución tampón correspondiente.

2.8 Inmovilización de las enzimas pectinasa y celulasa en el soporte de quitina-polímero catiónico

2.8.1 Método de adsorción

Se dispersaron 200 mg del soporte Quit-QSA en 10 mL de una solución tampón de NaAc pH 4,5, 100 mmol (CLSA), 20 mmol (PNSA) y se mezclaron con la enzima (2,4 mg de CLSA, 10 mg de PNSA) durante cuatro horas a 4°C. Transcurrido este tiempo el conjugado formado fue centrifugado y lavado repetidas veces con tampón de NaAc pH 4,5, 100 mmol para CLSA y 20 mmol para PNSA con el objetivo de eliminar del medio de reacción la proteína no adsorbida.

2.8.2 Método de formación de enlace covalente

Se dispersaron 200 mg del soporte Quit-QSA en 10 mL de solución tampón de NaAc pH 4,5, 100 mmol (CLSA), 20 mmol (PNSA) y se mezclaron con la enzima (2,4 mg de CLSA durante 3,5 horas, 10 mg de PNSA por tres horas) a 4°C. Posteriormente la solución fue incubada con glutaraldehído 0,25 % (v/v) durante media hora para CLSA, y 1 % (v/v) durante una hora para PNSA a 4°C. Transcurrido este tiempo el conjugado formado fue centrifugado y lavado con una solución tampón NaAc pH 4,5, 100 mmol (CLSA), 20 mmol (PNSA) para eliminar del medio de reacción el exceso de proteína no adsorbida y de glutaraldehído.

2.9 Caracterización estructural de las enzimas nativas, inmovilizadas y del conjugado INV-QSA

2.9.1 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en las soluciones de invertasa nativa, modificada e inmovilizada fue determinada espectrofotométricamente a 280 nm atendiendo a los siguientes parámetros:

Invertasa: $A_{280\text{nm}} (1 \text{ mg/mL}) = 2,25$ (Trimble y Maley, 1977).

La concentración de proteína en las soluciones de las enzimas pectinasa y celulasa nativas e inmovilizadas fue determinada empleando el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.9.2 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada mediante la adición de 100 μL de la solución enzimática a 400 μL de sustrato. Los 100 μL de solución enzimática de los conjugados obtenidos contenía la misma cantidad de proteína que los 100 μL de la enzima nativa utilizada en el ensayo. Después del tiempo de incubación requerido a 37°C la reacción fue detenida y la concentración de azúcares reductores fue determinada usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (Bernfeld, 1955). Una

unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1,0 μmol de sustrato por minuto a 37°C.

Para la invertasa nativa, modificada e inmovilizada se empleó como sustrato una solución de sacarosa 200 mmol/L en solución tampón de NaAc 50 mmol/L, pH 4,6. El tiempo de incubación fue de 10 minutos.

Para la celulasa nativa e inmovilizada se empleó como sustrato carboximetilcelulosa al 1 % en solución tampón de NaAc 50 mmol pH 5,5. El tiempo de incubación fue de 30 minutos.

Para la pectinasa nativa e inmovilizada se empleó como sustrato ácido poligalacturónico al 0,5 % en solución tampón de NaAc 20 mmol pH 4,2. El tiempo de incubación fue de 30 minutos.

2.10 Determinación de las propiedades catalíticas de los complejos polielectrolitos

2.10.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática

Las constantes cinéticas aparentes de la catálisis enzimática fueron calculadas a partir de las relaciones de Michaelis-Menten, utilizando el método de la doble recíproca de Lineweaver y Burk,

$$V_o = \frac{V_{\text{máx}} * c(S)}{K_M + c(S)}$$

donde: K_M = constante de Michaelis (aparente), V_o y $V_{\text{máx}}$ = velocidades inicial y máxima (aparentes), $c(S)$ = concentración de sustrato. Para ello se determinó la velocidad inicial de las reacciones catalizadas por la enzima en estudio a 37°C en los intervalos de concentraciones del sustrato correspondiente.

Para la invertasa nativa, modificada e inmovilizada se empleó como sustrato sacarosa en un intervalo de concentraciones entre 10 $\mu\text{mol/L}$ y 10 mmol/L.

Para la pectinasa nativa e inmovilizada se empleó como sustrato ácido poligalacturónico en un intervalo de concentraciones entre 0,025 y 0,25 % (m/v)

Para la celulasa nativa e inmovilizada el sustrato empleado fue carboximetilcelulosa en un intervalo de concentraciones entre 2 mmol/L y 50 mmol/L.

2.10.2 Perfil de pH

El efecto del pH sobre la actividad catalítica de las preparaciones enzimáticas (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos) fue determinado efectuando las reacciones de hidrólisis en las soluciones tampones correspondientes a una temperatura de 37°C durante 30 minutos.

En las preparaciones de invertasa las soluciones tampones empleadas fueron: Glicina/HCl 50 mmol/L, pH 1,0-1,8 y ácido cítrico/Na₂HPO₄ 50 mmol/L, pH 2,2-6,2. En las preparaciones de pectinasa y celulasa las soluciones tampones fueron: ácido cítrico/Na₂HPO₄ 100 mmol/L, pH 2,0-2,5, NaAc/HAc 100 mmol/L pH 3,0-6,0 y Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100 mmol/L, pH 6,5-7,0 (CLSA) y ácido cítrico/Na₂HPO₄ 50 mmol/L, pH 2,0-2,5; NaAc/HAc 50 mmol/L, pH 3,0-6,0 y Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mmol/L, pH 6,5 (PNSA).

2.10.3 Perfil de temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas nativas y las preparaciones enzimáticas (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos) fue determinado en un intervalo de temperaturas entre 20 y 80°C.

2.11 Determinación de la estabilidad funcional de las enzimas inmovilizadas

En todos los experimentos se emplearon como control soluciones de las enzimas no modificadas en presencia de los polisacáridos respectivos para evitar cualquier contribución que sobre la estabilidad de la enzima pudiera ejercer la presencia física de los polímeros no enlazados. Todos

los ensayos de estabilidad fueron realizados al menos por triplicado, informándose los valores promedios de estas determinaciones.

2.11.1 Perfil de termoestabilidad

Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas a diferentes temperaturas entre 30°C y 100°C en las soluciones tampones correspondientes (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos). Después de 10 min de incubación se tomaron alícuotas de estas soluciones, se enfriaron rápidamente en un baño de hielo y se evaluó la actividad enzimática. Se define como T_{50} el valor de temperatura a la cual cada preparación enzimática retiene el 50 % de su actividad inicial bajo las condiciones antes descritas. Este parámetro es determinado mediante el ajuste lineal de la fase descendente de la curva de porcentaje de actividad residual vs temperatura.

2.11.2 Cinética de inactivación térmica

Las enzimas nativas e inmovilizadas fueron incubadas durante 60 minutos a la temperatura de trabajo en las soluciones tampones correspondientes (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos). A determinados intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de estas soluciones, se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se evaluó la actividad enzimática.

Las constantes de velocidad correspondientes a los procesos de inactivación térmica (k_i) fueron obtenidas mediante regresión lineal en coordenadas logarítmicas. Los valores de tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los procesos de inactivación fueron determinados según la siguiente ecuación (Rajalakshmi y Sundaram 1995):

$$t_{1/2} = (1/k_i) \ln 2$$

donde: k_i es la constante de inactivación (h^{-1})

Para la realización de este experimento se tomó como temperatura de trabajo 50°C para la pectinasa, 65°C para la invertasa y 75°C para la celulasa.

Todos los ensayos de inactivación térmica se realizaron con un mínimo de cinco réplicas para cada temperatura en estudio.

2.12 Determinación de las propiedades operacionales de las enzimas inmovilizadas

2.12.1 Ciclos de reuso de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado

Una solución de sacarosa (200 mmol/L) en solución tampón de NaAc, pH 4,6, 50 mmol/L se hizo pasar por un reactor de columna (largo 10 cm, diámetro 1,2 cm) empacado con INV inmovilizada en los distintos soportes de quitina a una velocidad de flujo de 20 mL/h a través de la parte superior del mismo. El reactor fue operado durante 1 hora a 30°C.

Al término de este tiempo la solución resultante fue colectada y determinada la actividad enzimática de la misma. El reactor fue lavado con solución tampón de NaAc y mantenido a 4°C hasta el próximo reuso. La actividad de la enzima inmovilizada fue expresada como porcentaje de la actividad residual comparada con la actividad inicial en el primer ciclo.

2.12.2 Ciclos de reuso de la pectinasa y la celulasa inmovilizada

La capacidad de reuso de las enzimas inmovilizadas fue determinada mediante la hidrólisis del sustrato (CMC al 1 % disuelta en tampón NaAc 50 mmol/L pH 4,5 para CLSA, pectina de manzana al 0,25 % disuelta en tampón de NaAc 20 mmol/L pH 4,5 para PNSA). Un volumen de 25 mL de sustrato fue puesto en contacto con las preparaciones enzimáticas durante: una hora a 40°C (CLSA), 0,5 hora a 30°C (PNSA) con una agitación de 120 rpm. Transcurrido este tiempo se separó el sustrato hidrolizado por centrifugación y se añadió un nuevo volumen de sustrato sin hidrolizar para realizar un nuevo ciclo. La actividad de la enzima se expresó en porcentaje de actividad residual comparada contra la actividad inicial en el primer ciclo.

2.12.3 Estabilidad en el tiempo

La estabilidad en el tiempo de la INV nativa e inmovilizada en los diferentes soportes de quitina, así como de la PNSA y CLSA nativas e inmovilizadas en el soporte Quit-QSA fue estudiada durante 50 días a temperaturas de 4 y 37°C (INV), 4 y 30°C (PNSA y CLSA) (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondiente al 100 % en los gráficos). A determinados intervalos de tiempo se tomaron muestras de estas soluciones y se evaluó la actividad enzimática de las mismas.

2.12.4 Estabilidad bajo régimen operacional continuo de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado

Una solución de sacarosa (200 mmol/L) en una solución tampón de NaAc, pH 4,6 50 mmol/L se hizo pasar por un reactor de columna (largo 10 cm, diámetro 1,2 cm) empacado con invertasa inmovilizada en los distintos soportes de quitina a una velocidad de flujo de 20 mL/h a través de la parte superior del mismo. El reactor fue operado bajo un régimen continuo de 70 horas a 30°C. La solución resultante fue colectada a diferentes intervalos de tiempo y analizada la actividad enzimática. La **Figura 2.1.** muestra el esquema del reactor enzimático continuo con el biocatalizador inmovilizado a escala de laboratorio.

2.13 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó a través del paquete estadístico Origin Pro 7.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA). Los datos experimentales se analizaron mediante el test Kolmogorov Sminov para determinar la existencia de normalidad. Una vez determinado el cumplimiento de este requisito se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey.

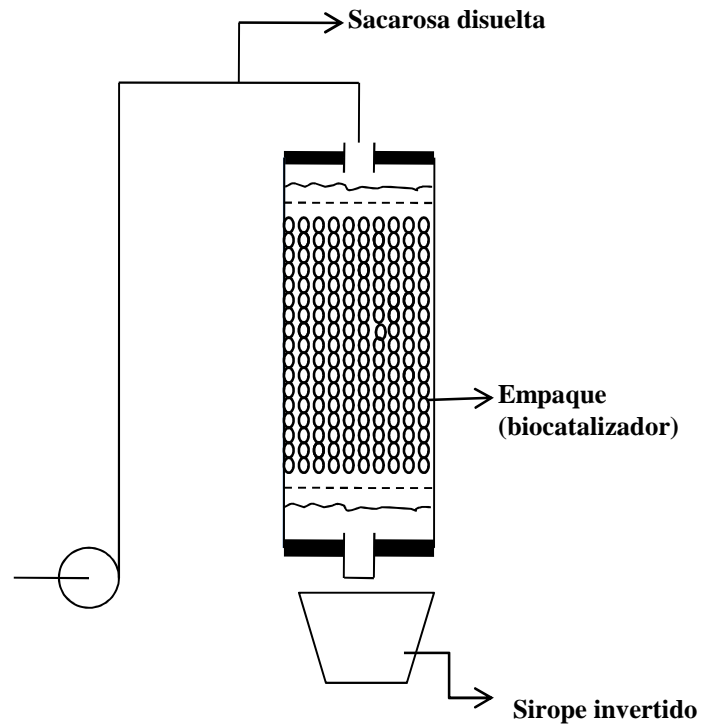


Figura 2.1 Esquema del reactor enzimático continuo con el biocatalizador inmovilizado a escala de laboratorio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la quitina y la quitosana

3.1.1 Determinación del grado de acetilación de la quitina

La quitina utilizada en la preparación de los soportes fue adquirida en la Empresa Mario Muñoz (Habana, Cuba) sin embargo, la información suministrada por el fabricante no contenía el grado de acetilación que presentaba la misma. Esto motivó la necesidad de su determinación para lo cual se empleó el método propuesto por Baxter *et al.*, (1992) basado en la espectroscopía infrarroja. El espectro FT-IR registrado para este compuesto, así como la asignación de sus bandas fundamentales se pueden apreciar en la **Figura 3.1** y **Tabla 3.1** respectivamente. Las señales asignadas coinciden con los resultados informados en la literatura por otros autores para este compuesto (Peniche 2006, Kassai 2008). La quitina presentó un 90 % de acetilación (el 90 % de las unidades de D-glucosa del polímero se encuentran acetiladas), no obstante al valor determinado, los grupos aminos disponibles permiten la reacción con los grupos carboxilos de los polisacáridos para la formación de los soportes.

3.1.2 Caracterización de la quitosana

La desacetilación alcalina de la quitina realizada según el método propuesto por Kurita *et al.*, (1977) permitió obtener la quitosana utilizada en este estudio. La determinación de su masa molar, indicó un valor de $2,5 \times 10^4$. El espectro RMN- H^1 registrado para el polímero se muestra en la **Figura 3.2**, mientras que la **Tabla 3.2** informa los valores de los corrimientos químicos e integración de las señales de las bandas del espectro. Las asignaciones realizadas coinciden con

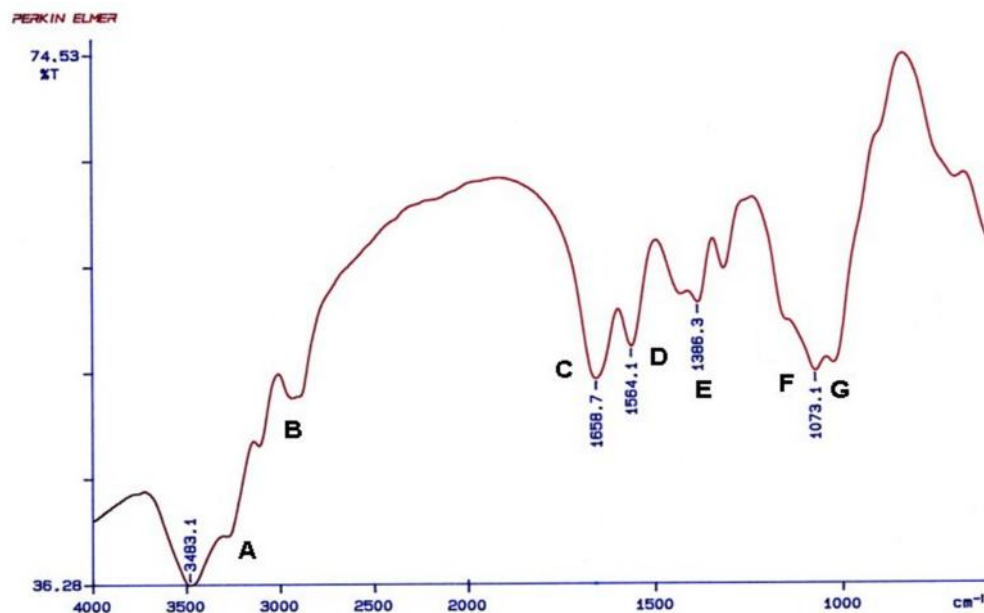


Figura 3.1. Espectro de FT-IR de la quitina de carapachos de langostas

Tabla 3.1. Asignaciones de las bandas del espectro FT-IR de la quitina

Banda	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	
A	3483,1	$\nu^{\text{asoc}}(\text{OH})$	
B	2913,0	$\nu^{\text{as}}(\text{CH}_2)$	
C	1658,7	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Banda amida I
D	1564,1	$\delta(\text{NH})$	Banda amida II
E	1386,3	$\delta(\text{OH})$	
F	1073,1	$\nu(\text{C}-\text{O})$	Hemiacetal del anillo piranósico
G	1021,7	$\nu^{\text{as}}(\text{C}-\text{O})$	Alcohol 2 ^º cíclico en anillo de 6 átomos

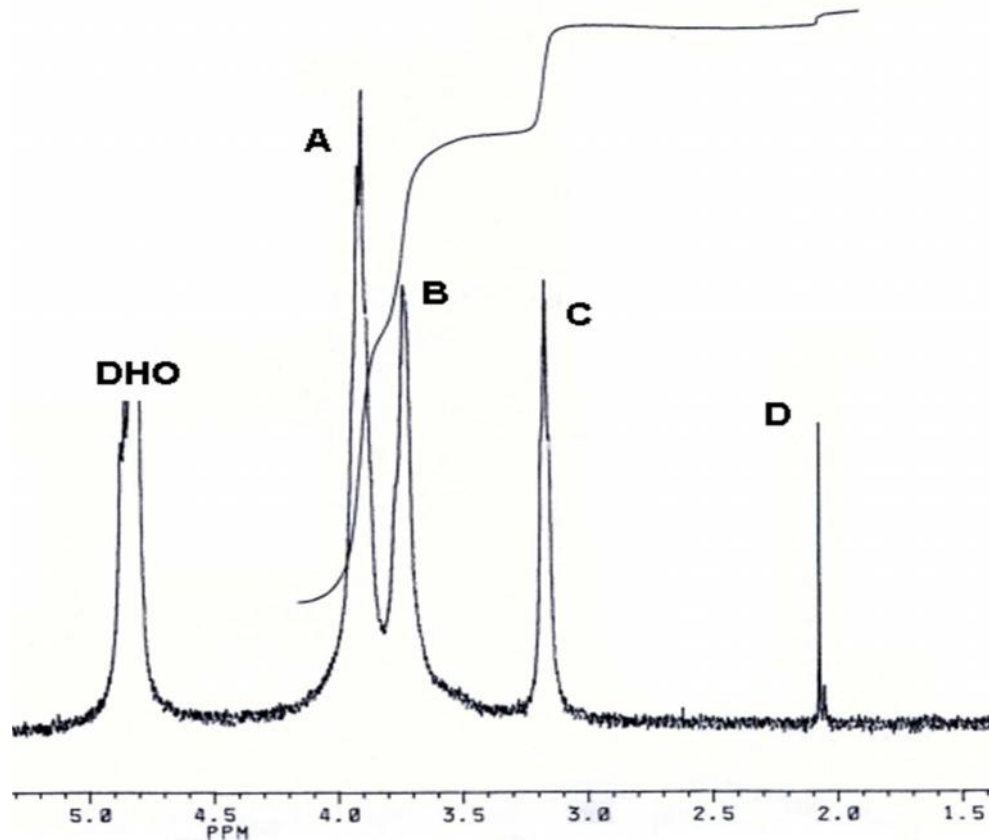


Figura 3.2. Espectro de RMN- H^1 de la quitosana en DCl al 3% (v/v) en D_2O a 25°C y a 500 MHz

Tabla 3.2. Asignación de las bandas del espectro de RMN- H^1 de la quitosana

Señal	Asignación	δ (ppm)	Integración (mm)
A	H-3, H-4, H-6b	3,84	46
B	H-5, H-6a	3,67	35
C	H-2	3,13	18
D	CH_3CO-	2,51	3

resultados previamente publicados en la literatura por Rinaudo *et al.*, (1992).

El grado de acetilación se determinó haciendo uso de la espectroscopía RMN- H^1 según la metodología propuesta por Rinaudo *et al.*, (1992) y se obtuvo como resultado un 5,6 % de acetilación. El valor determinado es indicativo de que la quitosana de estudio presenta un bajo grado de acetilación, lo que trae consigo una gran densidad de grupos aminos disponibles en las moléculas de D-glucosa, que facilitan la reacción de acoplamiento de los grupos amino del polímero con la quitina previamente activada con el glutaraldehído para la formación del soporte o en otro caso con los residuos de carbohidratos de la invertasa, previamente oxidados con $m\text{-NaIO}_4$ para la formación del conjugado INV-QSA.

3.2 Obtención de los soportes

3.2.1 Síntesis del soporte quitina-polímero aniónico

A los polímeros carboximetilcelulosa (CMC), pectina (Pc), alginato de sodio (Alg) y ácido hialurónico (HyA) utilizados para la preparación de los soportes se les determinó la masa molar promedio, según se informa en el **Epígrafe 2.3** de Materiales y Métodos, lo que permitió conocer el tamaño de las macromoléculas empleadas para modificar la quitina. Conjuntamente a esta determinación se registraron los espectros RMN- H^1 (informados en el **Epígrafe 2.3** de Materiales y Métodos), que permitieron confirmar las características estructurales de los polímeros utilizados y evidenciaron que presentaban los grupos aniónicos necesarios para su enlace a la quitina.

La unión química de la quitina a los polímeros aniónicos CMC, Pc, Alg y HyA para la preparación de los soportes se realizó a través de la formación de enlaces amida. En la **Figura 3.3** se muestra la reacción involucrada en la síntesis de los soportes.

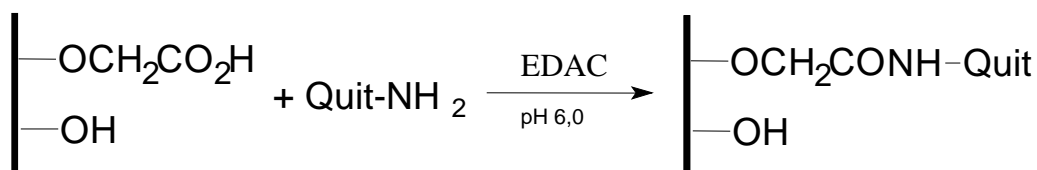


Figura 3.3 Reacción de la quitina con el polímero aniónico para la formación del soporte

En la **Figura 3.3** se aprecia que el proceso de formación transcurre a partir de la reacción química que se establece entre los grupos carboxilo de los polímeros activados con la carbodiimida y los grupos amino de la quitina. Las reacciones se desarrollaron a un valor de pH 6,0 donde la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) actúa como catalizador. El proceso se realizó teniendo en cuenta las consideraciones informadas por Kobayashi *et al.*, (1989) y Dizge *et al.*, (2008) para las reacciones de acoplamiento entre grupos químicos diferentes.

Como resultado del proceso de síntesis se formaron los soportes quitina-carboximetilcelulosa de sodio (Quit-CMC), quitina-pectina (Quit-Pc), quitina-alginato de sodio (Quit-Alg) y quitina-ácido hialurónico (Quit-HyA). La composición de los mismos se conoció determinando la cantidad de polímero aniónico enlazado a cada gramo de quitina y los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3 Composición de los soportes empleados para la inmovilización del conjugado INV-QSA

SopORTE	Masa de polímero que se enlaza a la quitina (mg/g de quitina) x \bar{E} DS (nN 3) ¹
Quit-CMC	18,2 ± 0,2
Quit-Pc	30,0 ± 1,0
Quit-Alg	6,3 ± 0,1
Quit-HyA	9,1 ± 0,1

¹ Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS.

Los resultados presentados muestran que la cantidad de polímero que se enlaza a la quitina depende del polímero aniónico en cuestión, el mayor promedio se obtuvo para la pectina, único

polímero ramificado empleado en la preparación de los soportes. Este resultado pudiera estar relacionado con la disposición espacial de las cadenas del polímero, que al estar ramificado puede favorecer la formación de los enlaces entre los grupos carboxilos de la pectina y los grupos amino de la quitina.

Los soportes de quitina-polímero aniónico obtenidos se utilizarán para la inmovilización del conjugado INV-QSA.

3.2.2 Síntesis del soporte quitina-polímero catiónico (Quit-QSA)

La unión química de la Quit a la QSA para la preparación del soporte se realizó a través de la formación de enlaces covalentes. En la **Figura 3.4** se muestra la reacción involucrada en la síntesis del mismo.

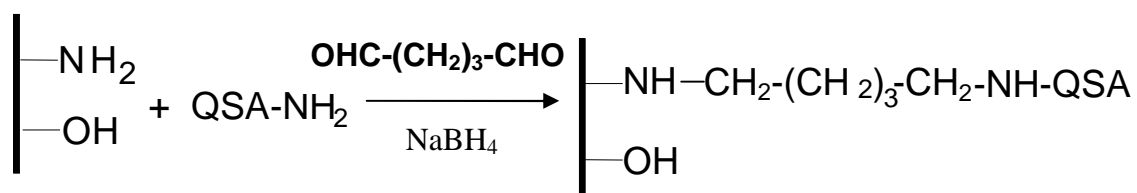


Figura 3.4 Reacción de la quitina y la quitosana con el glutaraldehído para la formación del soporte

Como se aprecia en la **Figura 3.4** la unión de la quitina a la quitosana se llevó a cabo empleando para ello el reactivo bifuncional glutaraldehído o 1,5-pentanodial (OHC-(CH₂)₃-COH). Este proceso transcurre a través de la reacción de los grupos aminos de la quitina y de la quitosana con los grupos aldehídicos del dialdehído adicionado, dando lugar a la formación de bases de Schiff inestables, que se convierten en alquilaminas secundarias por tratamiento con borohidruro de sodio. El proceso de síntesis se realizó teniendo en cuenta lo informado en la literatura por Tanriseven y Olcer (2008). La composición del soporte se conoció determinando la cantidad de QSA enlazada a cada gramo de quitina mediante el procedimiento descrito por Muzzarelli (1997)

y el valor fue de 15,4 mg de QSA enlazada a cada gramo de quitina. El soporte obtenido a base de quitina-quitosana se utilizará para la inmovilización de las enzimas pectinasa y celulasa.

3.3 Síntesis y caracterización del conjugado invertasa-quitosana (INV-QSA)

Al realizar un análisis de la bibliografía se ha constatado que en todos los trabajos consultados el proceso de inmovilización se efectúa a partir de una enzima nativa, sin embargo, en esta tesis se propone por primera vez llevar a cabo la inmovilización de un conjugado hidrosoluble, en particular el conjugado invertasa-quitosana.

El conjugado fue seleccionado para su inmovilización en los soportes sintetizados atendiendo a los resultados informados previamente en la literatura por Gómez *et al.*, (2000). Al modificar químicamente la invertasa con la quitosana se produce un conjugado hidrosoluble con buena retención de actividad enzimática, mejoras en sus propiedades catalíticas e incrementos en la estabilidad funcional de la enzima, sin embargo, su hidrosolubilidad no permite la aplicación industrial del mismo por la imposibilidad de su reutilización (Gómez *et al.*, 2000). Si estas mejoras funcionales de la invertasa modificada se pudieran llevar a una fase sólida mediante inmovilización se obtendría una enzima con buena estabilidad funcional que puede ser aplicada a nivel industrial.

La formación del conjugado INV-QSA ocurre mediante el acoplamiento de la quitosana con los residuos de carbohidratos de la invertasa, previamente oxidados con m-NaIO₄ (**Anexo VI, Figura 6.1**). Este método involucra un proceso de alquilación reductiva con NaBH₄. El rendimiento del proceso de síntesis fue de 78 %, atendiendo al contenido proteico del biocatalizador.

El contenido de quitosana en el conjugado, determinado por el procedimiento descrito por Muzzarelli (1997), fue estimado igual a 1,7 moles por mol de proteína. Resultados similares

informaron Darias y Villalonga (2001), al preparar el conjugado celulasa-quitosana, con un promedio de 1,5 moles de quitosana enlazados a cada mol de enzima.

El conjugado INV-QSA sintetizado por este método retuvo el 81 % de la actividad inicial de la enzima después de la modificación. La reducción en la actividad de la enzima pudiera estar asociada fundamentalmente al impedimento estérico originado por las moléculas de quitosana acopladas a la enzima, las que limitan la difusión del sustrato al sitio catalítico de la invertasa (Gómez *et al.* 2000).

3.4 Formación de los complejos polielectrolitos

A continuación se muestran los resultados de la evaluación de las mejores condiciones de pH, tiempo de incubación y concentración de proteína para la inmovilización del conjugado INV-QSA en los soportes quitina-polímero aniónico mediante la formación de complejos polielectrolitos.

La **Figura 3.5** muestra el perfil de actividad de la enzima en la determinación del pH para la formación del complejo polielectrolito a partir de la inmovilización del conjugado INV-QSA en el soporte de Quit-CMC (INV-QSA:Quit-CMC).

La máxima actividad catalítica para el conjugado inmovilizado fue observada a pH 5,0; siendo este valor de pH el utilizado en los posteriores experimentos. A pesar de que en este estudio se trabajó con la enzima modificada en forma de conjugado, el resultado concuerda con el obtenido por Mansour y Dawoud, (2003) los cuales plantearon que la invertasa nativa de *S.cerevisiae* presenta un intervalo de pH óptimo entre 3,5-6,0, dependiendo de la concentración de sustrato, la solución tampón y la temperatura de trabajo. Dizge *et al.*, (2008) inmovilizaron invertasa nativa en una matriz de poli(3-metiltienilmetacrilato)/poli(3-ácido tiofenoacético) y el mayor rendimiento en el proceso de inmovilización lo encontraron a pH 4,5. A mayores valores de pH la

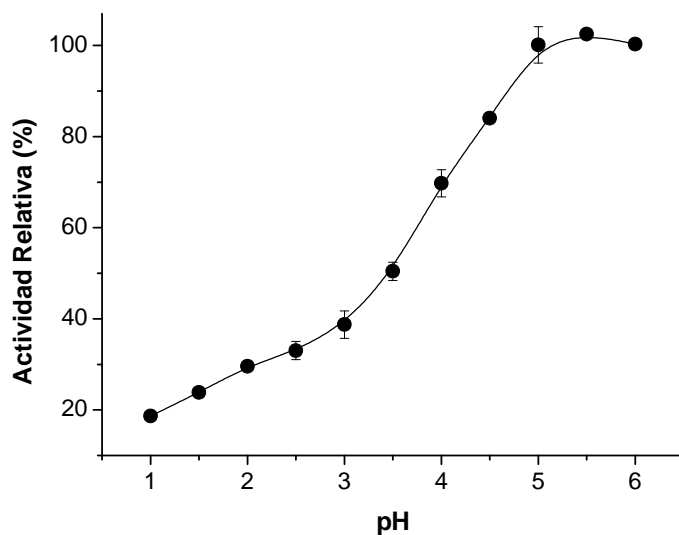


Figura 3.5 Efecto del pH en la formación del complejo polielectrolito entre el conjugado INV-QSA y el soporte Quit-CMC. Solución tampón: glicina/HCl 20 mmol/L; pH 1,0-1,5; ácido cítrico/ Na_2HPO_4 20 mmol/L, pH 2,0-6,0. Tiempo de incubación: 24 h. Masa de soporte: 20 mg. Masa de enzima en el conjugado: 50 ~g.

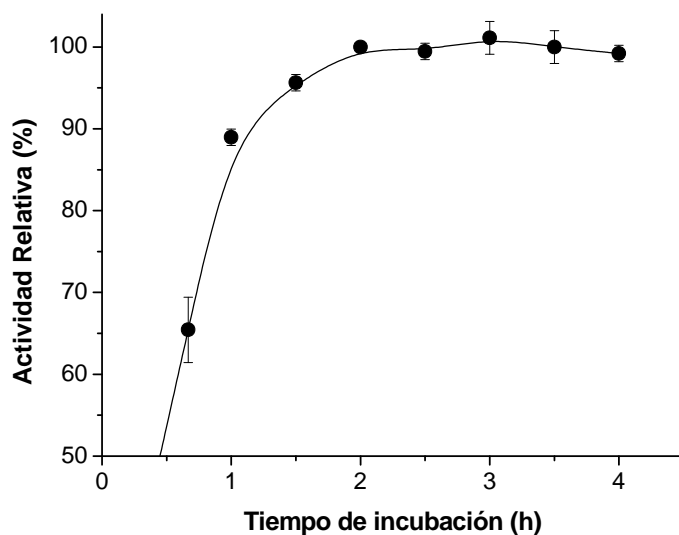


Figura 3.6 Efecto del tiempo de incubación en la formación del complejo polielectrolito INV-QSA:Quit-CMC a pH 5. Masa de soporte: 20 mg. Masa de enzima en el conjugado: 50 ~g.

enzima fue desnaturalizada irreversiblemente resultando en una menor eficiencia de la inmovilización.

Un estudio similar al del pH se realizó para la determinación del tiempo de formación del complejo. En la **Figura 3.6** se muestra la variación de la actividad catalítica en función del tiempo, donde se aprecia que la actividad máxima del conjugado inmovilizado fue encontrada a partir de 2 horas de incubación, siendo este el tiempo mínimo requerido para formarse el complejo INV-QSA:Quit-CMC.

La **Figura 3.7** muestra el perfil de actividad de la enzima al estudiar el efecto de la concentración de proteína en la formación del complejo polielectrolito INV-QSA:Quit-CMC. La actividad de la enzima inmovilizada se incrementa progresivamente con el aumento de la concentración de proteína en solución aportada por el conjugado INV-QSA, obteniendo la actividad máxima a partir de un valor de concentración inicial de proteína de 8,5 µg/mL. Este valor de concentración inicial del conjugado INV-QSA fue seleccionado para la formación de los complejos polielectrolitos.

Estudios similares fueron realizados con los restantes soportes sintetizados (Quit-Pc, Quit-Alg, Quit-HyA) lo que permitió determinar los mejores valores para las variables estudiadas en la formación de cada complejo. En la **Tabla 3.4** se muestran los valores de pH, tiempo de incubación y concentración de proteína seleccionados para la formación de los complejos polielectrolitos empleados en el trabajo.

En las condiciones de síntesis descritas el rendimiento del conjugado inmovilizado fue determinado como 6,1; 1,07; 1,1 y 2,5 mg/g de soporte Quit-CMC, Quit-Pc, Quit-Alg, Quit-HyA respectivamente, lo que representa un 72, 54, 85 y 30 % de la cantidad inicial de conjugado adicionado. Hsieh *et al.*, (2000) determinaron acoplamientos de invertasa nativa entre 9,5 mg/g y

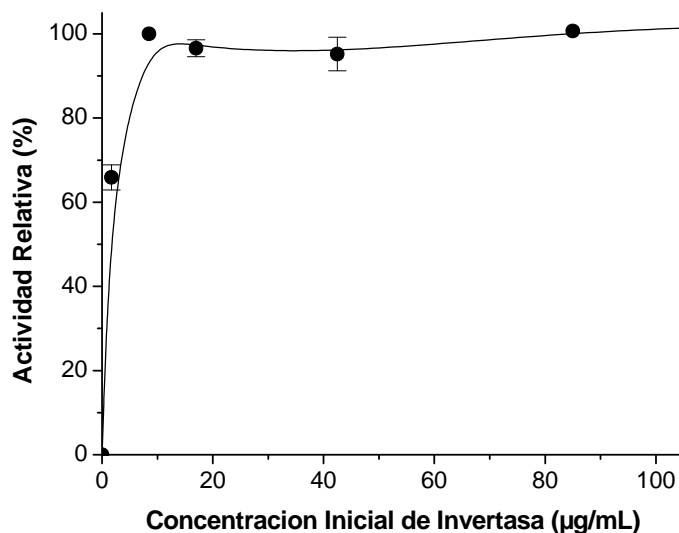


Figura 3.7 Efecto de la concentración de proteínas en la formación del complejo polielectrolito INV-QSA:Quit-CMC a pH 5 y tiempo de incubación 2 h.

Tabla 3.4 Parámetros seleccionados para la inmovilización del conjugado INV-QSA

Parámetros	INV-QSA: Quit-CMC	INV-QSA: Quit-Pc	INV-QSA: Quit-Alg	INV-QSA: Quit-HyA
pH	5,0	4,5	4,5	5,5
Tiempo incubación (h)	2	2	3	2
Concentración de proteínas (µg/mL)	8,5	400,0	43,0	85,0
Proteína inmovilizada (mg/g)	6,10	1,07	1,10	2,50

14 mg/g de matriz dependiendo del método empleado en soportes de sefarosa. Mansour y Dawoud, (2003) obtuvieron 3 mg/g y 10 mg/g de invertasa inmovilizada en soportes de celita y poliacrilamida respectivamente.

Los complejos polielectrolitos presentaron valores entre 1 y 6,1 mg de conjugado INV-QSA/g de soporte. En el caso de INV-QSA:Quit-CMC y INV-QSA:Quit-HyA los valores obtenidos se encuentran en un intervalo similar al determinado por Mansour y Dawoud, sin embargo, los preparados en los soportes Quit-Pc y Quit-Alg aceptaron cantidades inferiores de enzima por gramo de soporte a los informados por estos autores. Los resultados corroboran lo planteado por Hsieh *et al.*, (2000) cuando refiere que cada soporte preparado acepta una cantidad de enzima determinada dependiendo de la enzima seleccionada, del método de inmovilización y del soporte empleado.

En la **Figura 3.8** se muestra el esquema general de obtención de los complejos polielectrolitos una vez definidos los parámetros para su formación, donde el polímero aniónico utilizado como ejemplo en la representación es la pectina.

Según Smid y Fish, (1988) la unión de macromoléculas con cargas opuestas se produce a través de fuerzas de atracción electrostáticas, lo que da lugar a la formación de enlaces iónicos y por tanto, a los complejos polielectrolitos. En la **Figura 3.8** se propone que el proceso de adsorción del conjugado INV-QSA sobre los soportes cargados transcurre a través de interacciones electrostáticas que se establecen entre los grupos NH_3^+ de la QSA unida a la invertasa y los grupos CO_2^- de los polímeros enlazados a la quitina, dando lugar a la formación de complejos polielectrolitos. El proceso se facilita por la presencia de la quitosana, macromolécula que posee grupos aminos en su estructura que favorecen la formación de estos complejos con otros polianiones como CMC, Pc, Alg y HyA.

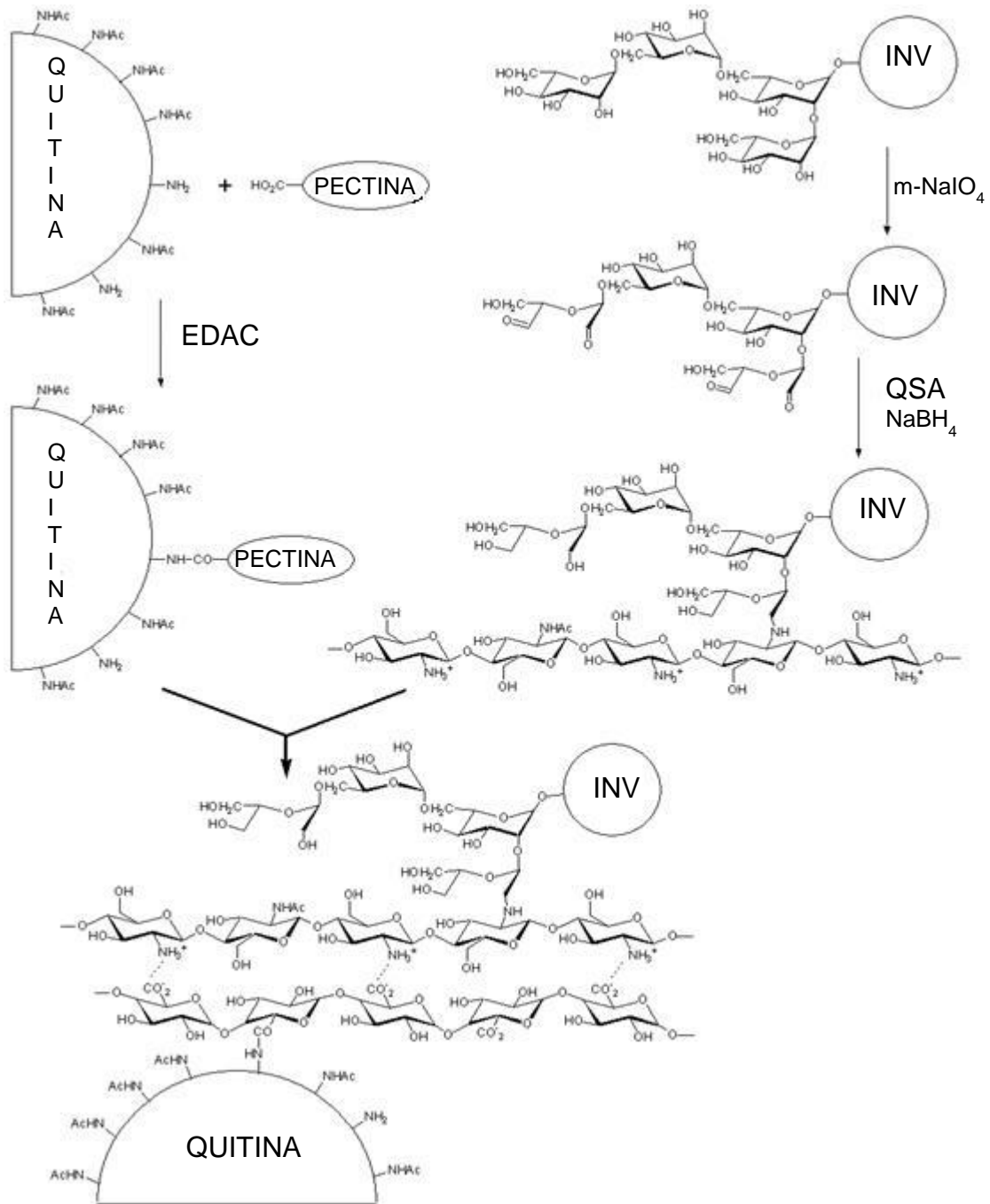


Figura 3.8 Esquema general de formación de los complejos polielectrolitos. INV representa la invertasa. PECTINA representa los polímeros aniónicos. QSA representa la quitosana.

Para llevar a cabo el proceso de inmovilización fue seleccionado el método de adsorción debido a que el mismo es un proceso sencillo y fácil de realizar, el cual normalmente preserva la actividad catalítica de la enzima (Mateo *et al.*, 2000, Tran y Balkus 2011). Sin embargo, su principal desventaja está relacionada con la baja estabilidad de los preparados que se obtienen, debido fundamentalmente a la poca fortaleza de las interacciones que unen a la enzima y el soporte, lo que trae como consecuencia la desorción de la enzima (Kharrat *et al.*, 2011; Labus *et al.*, 2012). Se ha planteado que en la mayoría de los casos la unión de enzimas a soportes iónicos resulta muy débil, siendo desorbidas aún con fuerzas iónicas moderadas (0,2-0,3 mol/L NaCl) (Mateo *et al.* 2000). Para comprobar la hipótesis de que el conjugado INV-QSA fue inmovilizado por formación de fuertes interacciones polielectrolíticas con los soportes sintetizados, se estudió la resistencia de los 4 biocatalizadores preparados frente a NaCl 1 mol/L en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 4,5; reteniendo completamente la actividad después de 4 horas de incubación a 30°C bajo esas condiciones. Los resultados arrojados por esta determinación permitieron comprobar la hipótesis planteada anteriormente. Asimismo, permiten proponer por primera vez la utilización de la formación de complejos polielectrolitos para la inmovilización de enzimas, en este caso en particular la inmovilización de un conjugado hidrosoluble en soportes sólidos cargados.

Una vez definidas las condiciones para la formación de los complejos polielectrolitos se estudiaron las principales propiedades estructurales de las formas inmovilizadas.

3.5 Propiedades catalíticas de los complejos polielectrolitos

3.5.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática del conjugado INV-QSA inmovilizado en los soportes sintetizados

Cuando un biocatalizador es inmovilizado los parámetros cinéticos sufren variaciones con respecto a los correspondientes a la forma libre de la enzima, mostrando cambios en su afinidad por el sustrato. Las variaciones son atribuidas a factores tales como, cambios conformacionales de la proteína inducidos por el soporte, impedimentos estéricos y efectos difusionales. Estos factores pueden influir simultáneamente o separadamente, en función del microambiente existente alrededor de la enzima enlazada (Arica y Bayramoglu, 2006). Para la aplicación de los biocatalizadores es necesario contar con el valor de los parámetros cinéticos aparentes de los mismos después del proceso de inmovilización.

La actividad específica de los complejos polielectrolitos de la invertasa con respecto a la forma modificada de la enzima se indica en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Actividad específica de los complejos polielectrolitos sintetizados. (A.E. UI/mg)

Propiedad	Magnitud	INV-QSA: Quit-CMC $\bar{x} \pm DS (nN 5)$	INV-QSA: Quit-Pc $\bar{x} \pm DS (nN 5)$	INV-QSA: Quit-Alg $\bar{x} \pm DS (nN 5)$	INV-QSA: Quit-HyA $\bar{x} \pm DS (nN 5)$
A.E. enzima inmovilizada con respecto al conjugado	(%)	84 ± 3 (a)	98 ± 2 (b)	97 ± 2 (b)	99 ± 1 (b)

Los datos reportados son representativos de 5 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \pm DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

Al analizar los resultados de la **Tabla 3.5** se aprecia que al inmovilizar el conjugado INV-QSA tres de los complejos formados retienen prácticamente el 100 % de la actividad del mismo, solo una reducción a un 84 % fue determinada en INV-QSA:Quit-CMC. La obtención de los

complejos con alta retención de actividad específica toma una significación especial teniendo en cuenta que posibilita la utilización del conjugado INV-QSA en procesos industriales.

La **Tabla 3.6** muestra los valores de la constante de afinidad de la enzima por el sustrato al evaluar el efecto que ejerce la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática. El valor de K_M aparente para la INV-QSA inmovilizada se encuentra en un intervalo entre 27,3-32,0 $\mu\text{mol/L}$, mayor que el calculado para la enzima libre (12,4 $\mu\text{mol/L}$), lo que evidencia una disminución de la afinidad de la enzima modificada por el sustrato después del proceso de inmovilización. Tomando en consideración lo informado por Hsieh *et al.* (2000) este efecto pudiera explicarse por los cambios conformacionales que sufre la enzima al ser inmovilizada y a una limitada difusión del sustrato hacia la enzima, causada por la estructura tridimensional del soporte y por las cadenas de los polímeros.

Tabla 3.6. Constante de Michaelis Menten (K_M) para los complejos polielectrolitos.

Propiedad	Magnitud	INV x \dot{E} DS (nN 3) ^l	INV-QSA: Quit-CMC x \dot{E} DS (nN 3) ^l	INV-QSA: Quit-Pc x \dot{E} DS (nN 3) ^l	INV-QSA: Quit-Alg x \dot{E} DS (nN 3) ^l	INV-QSA: Quit-HyA x \dot{E} DS (nN 3) ^l
$K_{M(\text{aparente})}$	$\mu\text{mol/L}$	12,4 \pm 3,2 (a)	27,3 \pm 4,1 (b)	30,0 \pm 5,0 (b)	27,7 \pm 3,8 (b)	32,0 \pm 4,0 (b)

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \dot{E} DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $r = 0,05$.

Incrementos en el valor de la constante K_M de la invertasa inmovilizada en diferentes soportes, respecto a la enzima libre, han sido informados por varios autores. Márquez *et al.* (2008) señalaron un incremento de 3,9 veces del valor de la constante K_M de la invertasa inmovilizada en una resina de intercambio iónico con respecto a la invertasa libre, el cual atribuyeron a la resistencia difusional. Resultados similares fueron encontrados por Rebros *et al.* (2007) los cuales calcularon un incremento en K_M de 3,6 veces de la invertasa inmovilizada en hidrogel de

alcohol polivinílico. El valor de K_M obtenido por Sanjay y Sugunan (2006), para la invertasa adsorbida en montmorilonite K-10 fue 14 veces mayor que el de la contraparte libre. Osman *et al.* (2005) indicaron un incremento en K_M de 19 veces para la invertasa adsorbida en geles de N-vinilimidazol respecto a la forma libre. Los incrementos determinados en este trabajo entre 2 y 2,5 veces el valor de la constante K_M respecto a la de la enzima nativa, al ser comparados con los informados en la literatura, indican que la disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato en estos casos es menos marcada que la mencionada para otros procesos de inmovilización.

3.5.2 El pH óptimo

Diferentes comportamientos de las curvas de pH-actividad para la invertasa inmovilizada, en función del soporte utilizado y del método de inmovilización empleado han sido informados por varios autores. Amaya-Delgado *et al.* (2006) inmovilizaron invertasa en microcapas de nylon-6 y encontraron que la actividad máxima de la enzima libre e inmovilizada se hallaba en un intervalo de pH entre 5,0 y 7,0. Sin embargo, Márquez *et al.* (2008) inmovilizaron invertasa en una resina de intercambio iónico y determinaron que el pH óptimo de la enzima libre e inmovilizada era el mismo.

La **Figura 3.9** muestra los gráficos de la dependencia de la actividad de la enzima nativa y sus formas inmovilizadas con el pH, a 37°C en un intervalo de pH 2-6. A valores de pH mayores no es posible llevar a cabo el experimento porque la quitosana es una polibase débil que se disuelve fácilmente en soluciones ácidas ($\text{pH} < 6,1-6,5$) (Muzzarelli 1996), pero se vuelve insoluble a valores mayores a su pKa. El valor de pKa para este polímero se ha informado igual a 6,0 (Peniche 2006).

Los resultados manifiestan que el intervalo de pH óptimo para la actividad catalítica de la invertasa fue ampliado fundamentalmente hacia la zona de valores de pH ácidos, después del

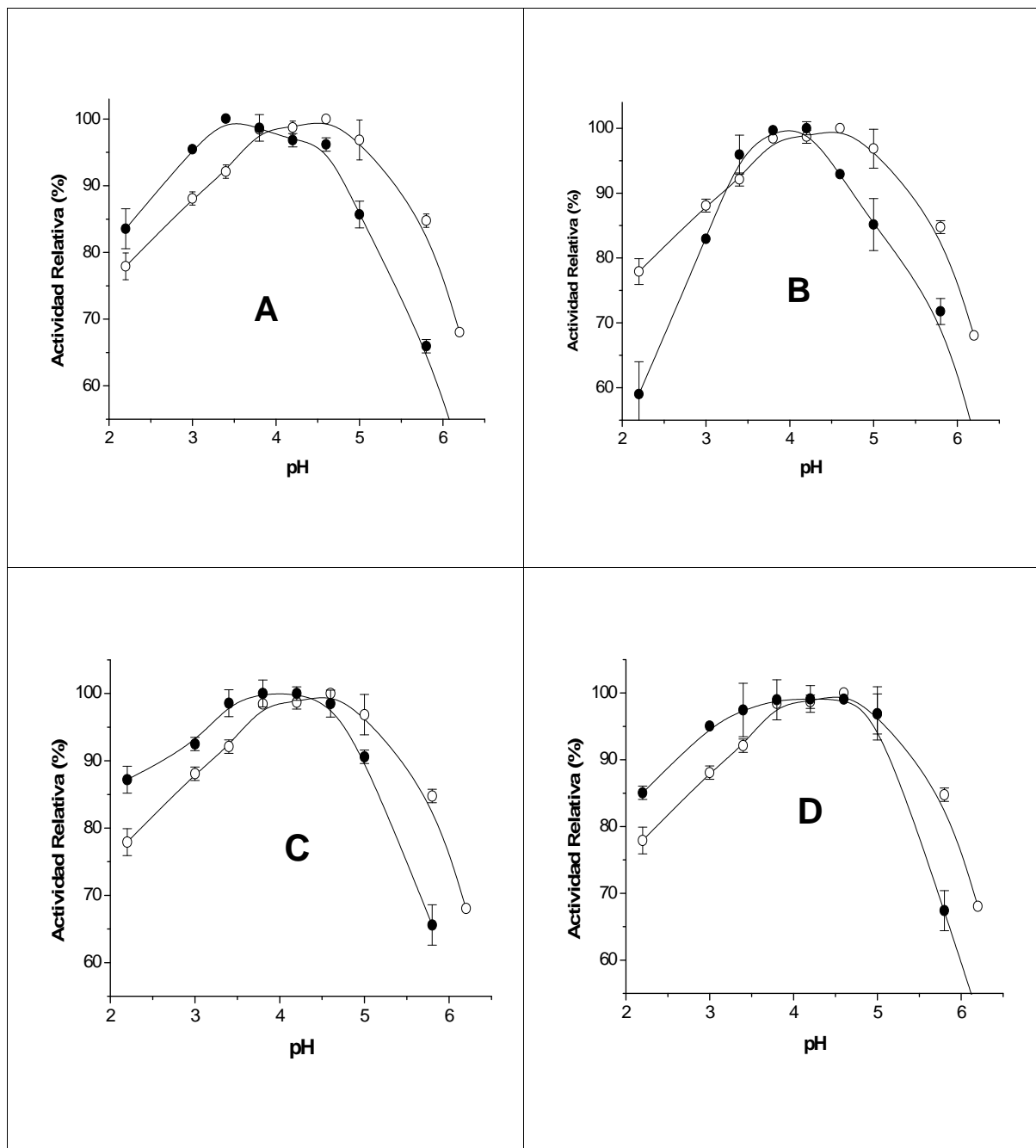


Figura 3.9 Efecto del pH sobre la actividad catalítica a 37°C de la invertasa nativa (●) e inmovilizada (○)
Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA

proceso de inmovilización. El pH óptimo de la enzima nativa se encontró en un intervalo de 4,2 y 4,6. Sin embargo, las curvas del conjugado inmovilizado en los soportes estudiados revelaron valores entre 3,4 y 4,6 para los complejos polielectrolitos INV-QSA:Quit-CMC e INV-QSA:Quit-Alg, ampliándose en estos casos el intervalo de pH hacia la zona ácida en 0,8 unidades. Para el complejo INV-QSA:Quit-Pc se determinó un desplazamiento del valor óptimo de este parámetro hacia la zona de pH más ácido correspondiendo este valor al intervalo 3,4-4,2. El pH óptimo para el biocatalizador INV-QSA:Quit-HyA fue determinado en un intervalo entre 3,0-5,0. El corrimiento del valor óptimo hacia la zona de pH más ácido en los complejos polielectrolitos estudiados, pudiera ser consecuencia de las interacciones secundarias que se establecen entre la enzima y el soporte polimérico durante el proceso de inmovilización (Rebros *et al.* 2007).

El corrimiento del valor del pH hacia la zona de pH más bajo coincide con resultados notificados previamente por Palmieri *et al.* (1994) que plantean que soportes cargados positivamente unidos a las enzimas desplazan las curvas de dependencia de pH hacia valores de pH bajos. Es de resaltar que a pH 3,0 la invertasa nativa posee una actividad del 88 %, mientras que para los complejos polielectrolitos INV-QSA:Quit-CMC y INV-QSA:Quit-HyA se determinaron porcentos de actividad superiores al 95 %. Estos elevados porcentos de actividad a valores de pH bajo son resultados importantes para la aplicación de la enzima inmovilizada, ya que al trabajar a este valor de pH se pudiera disminuir la posible contaminación microbiana que se produce durante largos períodos de operación (Rebros *et al.* 2007).

3.5.3 Temperatura óptima

La **Figura 3.10** muestra el estudio del efecto de la temperatura (20-80°C) sobre la actividad catalítica de la invertasa y del conjugado INV-QSA inmovilizado en los soportes sintetizados. Se

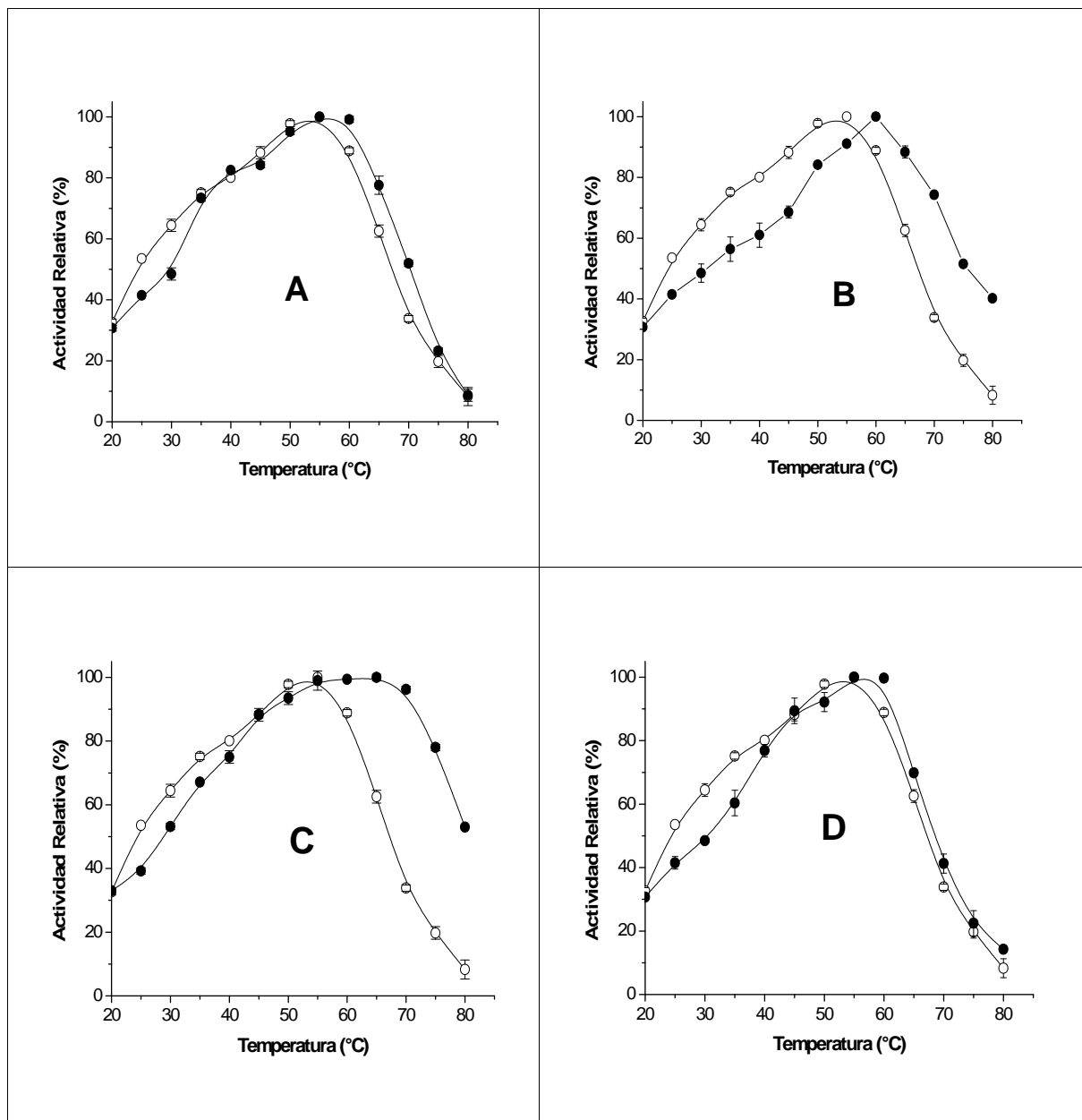


Figura 3.10 Efecto de la temperatura a pH 4,6 sobre la actividad catalítica de la invertasa nativa (○) e inmovilizada (●) Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA.

puede apreciar un incremento en la actividad de la enzima nativa e inmovilizada con el incremento de la temperatura hasta alcanzar el valor de la temperatura óptima, después de la cual decrece debido al proceso de inactivación térmica que sufren las enzimas, lo que concuerda con lo planteado por Mansour y Dawoud (2003), David *et al.* (2006), Albertini *et al.* (2013) en cuanto a que la actividad de la invertasa es fuertemente dependiente de la temperatura. La temperatura óptima determinada para la enzima nativa fue de 55°C. Al inmovilizar el conjugado la temperatura óptima de la enzima se desplazó hasta 60°C para Quit-CMC, Quit-Pc, Quit-HyA y a 65°C en Quit-Alg. Estos incrementos entre 5 y 10°C de la temperatura óptima de la INV-QSA inmovilizada comparados con la enzima nativa, evidencian que la misma exhibe su máxima actividad catalítica a una mayor temperatura, posiblemente motivado por presentar una estructura más rígida y más resistente a la desnaturalización por calor que la enzima nativa (Rajalakshmi y Sundaram 1995). Cuando el conjugado INV-QSA es inmovilizado parte de las cargas positivas de las cadenas de quitosana son involucradas en la formación de los complejos polielectrolitos con los soportes sintetizados.

Es de señalar que aún a una temperatura de 70°C la INV-QSA inmovilizada en el soporte de Quit-CMC y Quit-HyA retuvo aproximadamente el 55 % de su actividad inicial y en el de Quit-Pc y Quit-Alg 75 % y 96 % respectivamente, mientras que la enzima nativa solo retuvo el 30 % de su actividad. La resistencia a altas temperaturas de la enzima inmovilizada en la mayoría de los soportes bajo estudio, es un resultado de gran valor para la aplicación industrial de la misma, ya que permite trabajar a altas temperaturas en función de las exigencias del proceso donde se vaya a emplear. El comportamiento mostrado por los biocatalizadores frente a la temperatura reafirma que los parámetros catalíticos pueden variar en dependencia del soporte utilizado para su inmovilización.

David *et al.* (2006) determinaron la no variación del perfil de temperatura de la enzima al inmovilizarla en una matriz de silica gel (N-CSMG). Valeiro *et al.* (2013) mostraron que la temperatura óptima de la invertasa (55°C) no varió después de su inmovilización en nanopartículas de quitosana, mientras que otros autores no encontraron variación de la temperatura óptima de la misma al inmovilizar la invertasa *in situ* empleando la criogelación (Olcer *et al.*, 2013). Estudios similares fueron realizados por Márquez *et al.* (2008) al inmovilizar la invertasa por adsorción en resinas de intercambio iónico y determinaron que la enzima inmovilizada disminuía su temperatura óptima en 7°C con respecto a la enzima libre probablemente debido al cambio del microambiente de la enzima.

Los resultados alcanzados hasta el momento demuestran la factibilidad de inmovilizar el conjugado INV-QSA en los nuevos soportes de quitina-polímero aniónico sintetizados, lo que permitió determinar las mejores condiciones para la formación de los complejos polielectrolitos y estudiar sus propiedades catalíticas. El incremento en el valor de la temperatura óptima, la mayor resistencia a altas temperaturas y la ampliación del intervalo de pH óptimo de las formas inmovilizadas hacia la zona de pH más ácidos, constituyen evidencias de las mejoras que trae consigo el proceso de inmovilización en las propiedades de la enzima nativa. Es importante resaltar que las formas inmovilizadas superan además limitaciones que presentan las hidrosolubles para su aplicación a escala industrial, entre las que se pueden destacar: presencia de productos contaminantes, poca estabilidad, dificultades en su recuperación de una mezcla de sustrato y producto que limita la posibilidad del reuso, haciendo los procesos enzimáticos más costosos.

3.6 Inmovilización de pectinasa y celulasa en el soporte de quitina-quitosana

En el presente epígrafe se presentan los resultados de la aplicación por primera vez del soporte quitina-quitosana para la inmovilización de pectinasa y celulasa, enzimas de amplia aplicación industrial. El nuevo soporte preparado mantiene la quitina como polímero base y se enlazó a la quitosana mediante la adición de glutaraldehído. Las enzimas pectinasa y celulasa fueron inmovilizadas en dicho soporte empleando para ello dos métodos: adsorción no específica (A) y formación de enlace covalente (E).

Los complejos quitina-quitosana-pectinasa-A (Quit-QSA-PNSA-A) y quitina-quitosana-celulasa-A (Quit-QSA-CLSA-A) se formaron mediante la adsorción de la enzima correspondiente sobre el soporte de quitina-quitosana. Este proceso de adsorción está basado en interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el soporte, que pueden establecerse a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas. Estas fuerzas por independiente son muy débiles, pero lo suficientemente grandes en número para asegurar una unión efectiva. Esta metodología ha sido utilizada para la inmovilización de enzimas debido a que la misma es un proceso económicamente atractivo que no produce cambios químicos en el soporte ni daño a la enzima (Kim *et al.* 2008, Wang y Hsieh 2008, Cheng y Chang 2013).

Los conjugados quitina-quitosana-pectinasa-E (Quit-QSA-PNSA-E) y quitina-quitosana-celulasa-E (Quit-QSA-CLSA-E) se formaron por inmovilización mediante la formación de enlaces covalentes. La enzima es primeramente adsorbida en el soporte y posteriormente tratada con glutaraldehído bajo condiciones moderadas, lo que trae consigo que todos los grupos aminos primarios de la enzima y del soporte puedan ser activados por el glutaraldehído dando lugar a un fuerte entrecruzamiento entre ellos. De esta forma, las moléculas de glutaraldehído enlazadas a los grupos -amino de las lisinas de las enzimas pueden reaccionar covalentemente con los

grupos aminos primarios del soporte estableciendo un enlace covalente multipuntual entre la enzima y el soporte (López-Gallego *et al.* 2005). Este método ha sido utilizado en procesos de inmovilización de enzimas de relevancia industrial como lipasas y α -galactosidasas en matrices de silica-gel (Guang *et al.* 2010, Yoon Seok *et al.* 2010) y celulasas en matrices de quitosana, quitosana-ácido L-glutámico y quitosana-ácido-4-amino butírico (El-Ghaffar y Hashem 2010).

Para la obtención de los conjugados se estudiaron previamente las condiciones de trabajo en cuanto a pH, tiempo de incubación de la reacción y concentración de proteína. Los resultados de la inmovilización de pectinasa en el soporte de Quit-QSA se exponen en la **Figura 3.11**. Primeramente se evaluó el efecto del pH en la actividad de la enzima, encontrándose que la mayor actividad catalítica de la enzima inmovilizada fue observada a un valor de pH de 4,5 (**Figura 3.11 A**). A este valor de pH fue estudiado el efecto del tiempo de incubación en el proceso de inmovilización, determinándose en este caso que a las cuatro horas la enzima inmovilizada mostraba su mayor actividad (**Figura 3.11 B**). Bajo estas condiciones se evaluó el efecto de la concentración inicial de proteína en la solución alcanzándose los mejores resultados a una concentración de proteína de 340 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3.11 C**). El rendimiento del proceso de inmovilización fue de 6,7 mg/g de soporte, lo que representa un 30 % de la cantidad inicial de la enzima adicionada.

Según varios autores, en dependencia de la enzima, el soporte y/o el método empleado varían las condiciones necesarias para llevar a cabo un proceso de inmovilización. Tuoping *et al.* (2008) refieren que la pectinasa inmovilizada en un soporte de agar mostró su máxima actividad a un pH de 3,6 y 24 horas de reacción, con un rendimiento de 0,52 mg de enzima/g de gel.

La concentración de glutaraldehído a añadir para la inmovilización donde esté presente la quitosana .puede .afectar la actividad de la enzima, ocasionado probablemente por un excesivo

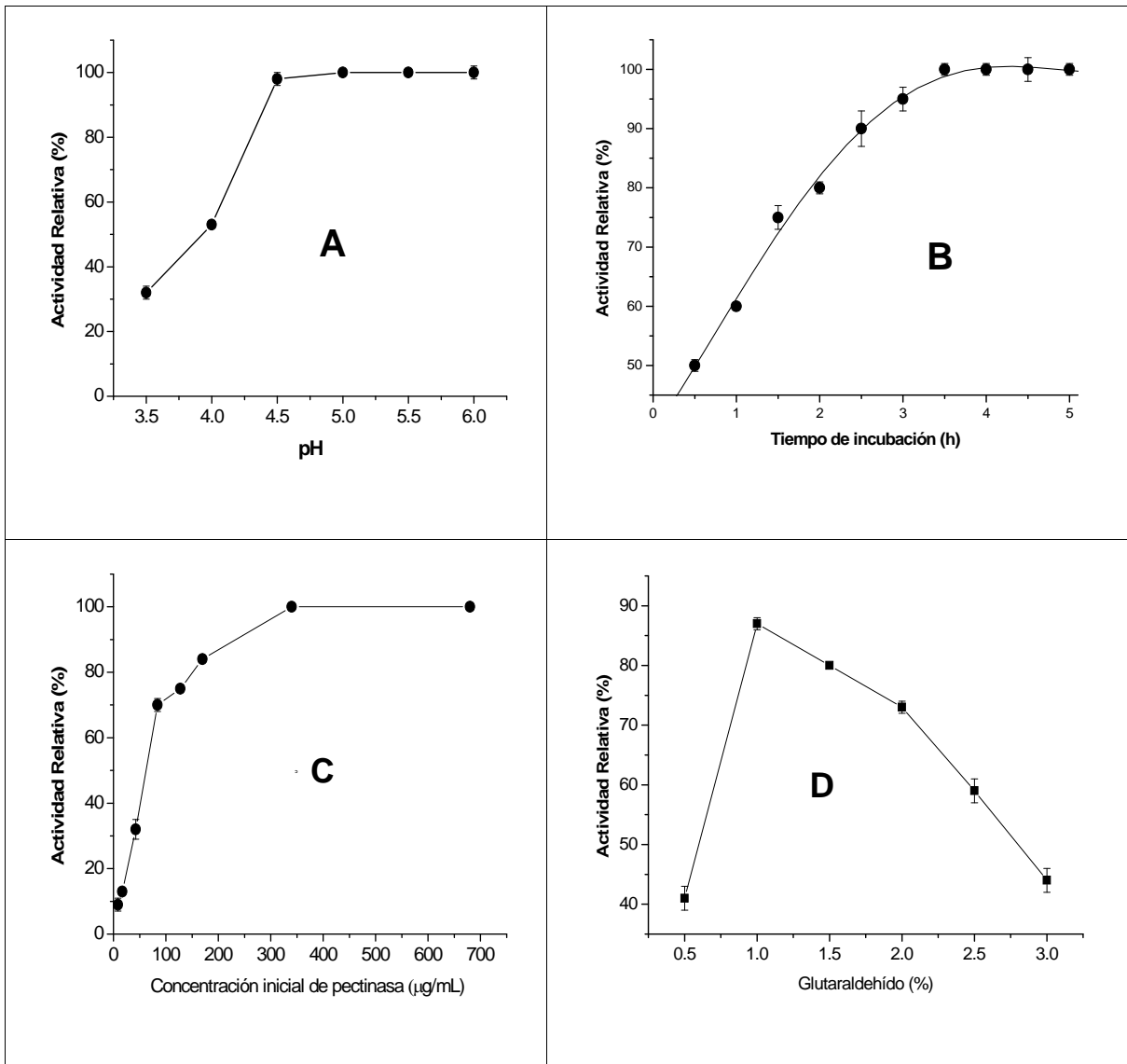


Figura 3.11 Parámetros para la inmovilización de la enzima pectinasa. A- Efecto del pH en el proceso de inmovilización. Solución tampón: ácido cítrico/ Na_2HPO_4 20 mmol, pH 2,0-2,5; NaAc/HAc 20 mmol, pH 3,0-6,0. Tiempo de incubación: 16 h. B- Efecto del tiempo de incubación en el proceso de inmovilización a pH 4,5. C- Efecto de la concentración de proteínas en el proceso de inmovilización a pH 4,5 y tiempo de incubación: 4 h. D- Efecto de la concentración de glutaraldehído en la formación del conjugado Quit-QSA-PNSA-E a pH 4,5; tiempo de incubación: 4 h y concentración de proteínas: 340 µg/mL.

entrecruzamiento que pudiera inhibir la difusión del sustrato (Liu *et al.* 2012). Tomando en consideración lo anterior, se estudió la concentración de agente acoplante a añadir para la formación del conjugado Quit-QSA-PNSA-E, a través de la unión multipuntual con el glutaraldehído. Se emplearon concentraciones de glutaraldehído entre 0,5 y 3 % y se determinó que la máxima actividad catalítica se encontraba al añadir un 1 % de este reactivo (**Figura 3.11 D**). Con estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 19,4 mg/g de soporte, lo que representa un 80 % de la cantidad inicial de la enzima empleada. Los rendimientos alcanzados por este método son mayores a los informados por Busto (10,6 %) y Li (66 %) para pectinasas inmovilizadas en soportes de alginato (Busto *et al.* 2006, Li *et al.* 2007). La inmovilización de pectinasa en el soporte de Quit-QSA mediante la formación de enlace covalente mostró rendimientos superiores a los obtenidos para la enzima al inmovilizarla mediante el proceso de adsorción.

Estudios similares a los realizados para la formación del conjugado Quit-QSA-PNSA-A fueron realizados para la preparación del conjugado Quit-QSA-CLSA-A. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.12**. Al estudiar el efecto del pH de la solución en la actividad de la enzima, se encontró que la mayor actividad catalítica de la celulasa inmovilizada fue observada a un valor de pH de 4,5 (**Figura 3.12 A**). La formación de este conjugado se llevó a cabo en un tiempo de 4 horas (**Figura 3.12 B**) y la concentración inicial de proteína requerida para la reacción fue de 170 µg/mL (**Figura 3.12 C**). Bajo estas condiciones de reacción se determinó que el rendimiento de la inmovilización fue de 11,2 mg de proteína por gramo de soporte, lo que representa un 50 % de la cantidad inicial de la celulasa añadida.

Para la formación covalente del conjugado Quit-QSA-CLSA-E, al igual que el Quit-QSA-PNSA-E, fue necesario adicionar glutaraldehído como agente entrecruzante. Al realizar el estudio de

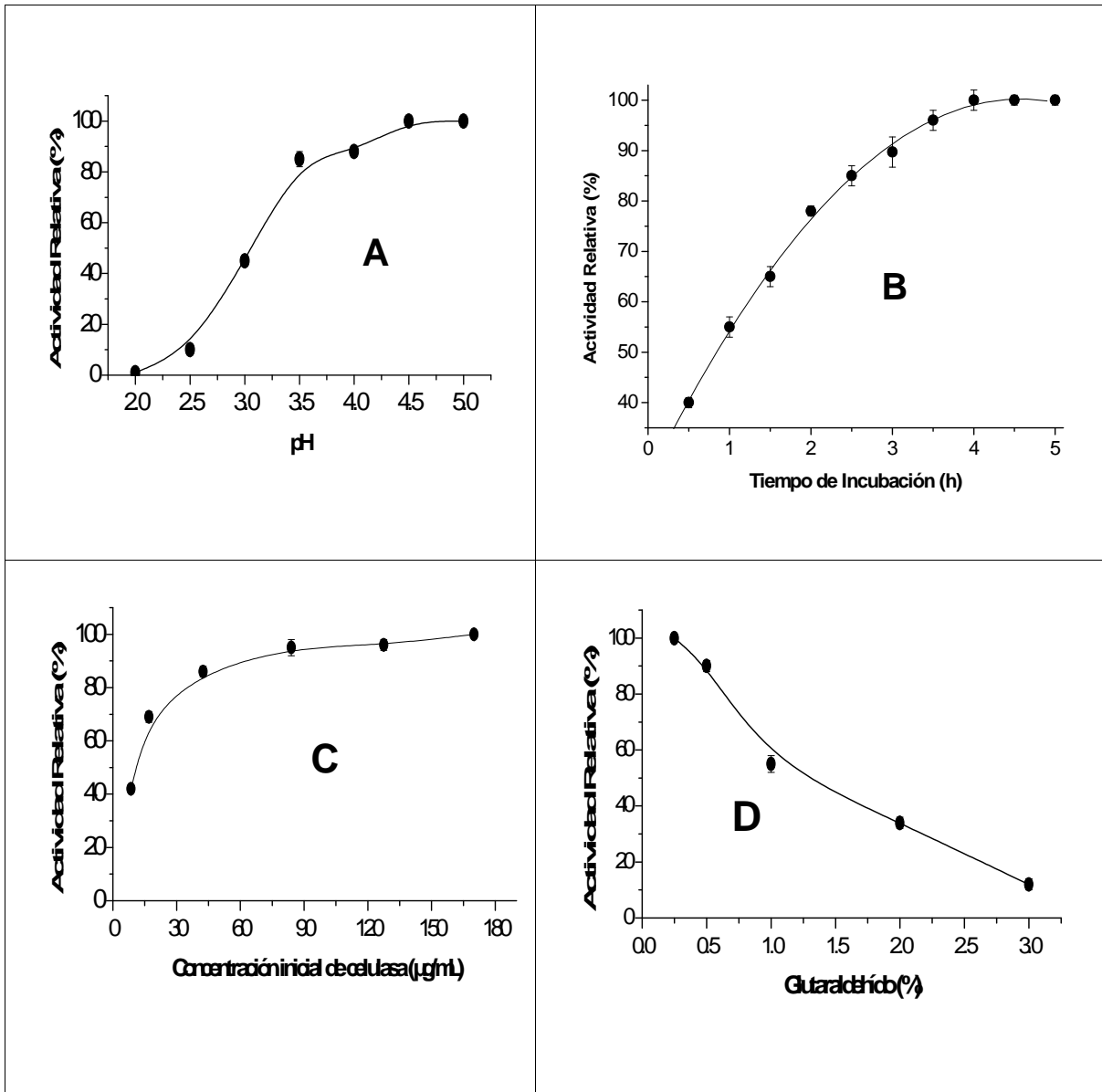


Figura 3.12 Parámetros para la inmovilización de la enzima celulasa. A- Efecto del pH en el proceso de inmovilización. Solución tampón: ácido cítrico/ Na_2HPO_4 50 mmol, pH 2,0-2,5; NaAc/HAc 50 mmol, pH 3,0-6,0. Tiempo de incubación: 16 h. B- Efecto del tiempo de incubación en el proceso de inmovilización a pH 4,5. C- Efecto de la concentración de proteínas en el proceso de inmovilización a pH 4,5 y tiempo de incubación: 4 h. D- Efecto de la concentración de glutaraldehído en la formación del conjugado Quit-QSA-PNSA-E a pH 4,5; tiempo de incubación: 4 h y concentración de proteínas: 170 µg/mL.

adición de este reactivo se apreció que la concentración de trabajo era de 0,25 % (v/v) de glutaraldehído en el medio de reacción, para unir covalentemente la enzima al soporte y preservar su actividad (**Figura 3.12 D**). Bajo estas condiciones se determinó que el rendimiento de la inmovilización fue de 12,5 mg de proteína por gramo de soporte, lo que representó un 55 % de la cantidad inicial de celulasa.

En los dos métodos de inmovilización empleados para la celulasa se obtuvieron valores muy similares de rendimiento de proteína por gramo de soporte. En este caso, a diferencia de la inmovilización de pectinasa donde la adición de glutaraldehído incrementó en un 50 % (30 a 80 %) el rendimiento de la inmovilización, no se apreciaron grandes diferencias en la cantidad de enzima enlazada al soporte para los dos métodos evaluados. Este resultado pudiera estar relacionado con el bajo porcentaje de glutaraldehído (0,25 %) que fue determinado como concentración de trabajo para inmovilizar covalentemente la celulasa al soporte. Experimentalmente se observó que concentraciones mayores de glutaraldehído afectaban apreciablemente la actividad de la enzima inmovilizada.

Los rendimientos obtenidos están en concordancia con los informados por Dincer y Telefoncu (2007) al inmovilizar la celulasa en alcohol polivinílico modificado con quitosana, donde obtuvieron un valor del 60 %. Sin embargo, Wu *et al.* (2005) inmovilizó celulasa por electrospinning y obtuvo un resultado muy inferior al determinado en este trabajo al alcanzar rendimientos que variaban entre 2,5 y 10 % en dependencia de la cantidad de enzima adicionada.

3.7 Propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas

Una vez establecidas las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso de inmovilización de la pectinasa y celulasa en el soporte de Quit-QSA, se estudiaron las principales propiedades catalíticas de las formas inmovilizadas de las enzimas bajo estudio.

3.7.1 Parámetros cinéticos aparentes de la catálisis enzimática

En la **Tabla 3.7** se muestra la actividad específica de los conjugados sintetizados con la pectinasa y celulasa, donde se pone de manifiesto que los parámetros cinéticos de los biocatalizadores sufrieron variaciones con respecto a los correspondientes a la forma libre de la enzima.

Al analizar los resultados de la tabla se aprecia que en tres de los cuatro conjugados la enzima mantiene entre el 80-85 % de su actividad inicial. Se determinó solamente un valor inferior para el conjugado Quit-QSA-CLSA-E el cual retuvo un 71 % de actividad. Los conjugados preparados por ambos métodos presentan un alto recobrado de actividad inicial con un buen rendimiento de inmovilización. Aún el menor valor de actividad determinado para estos conjugados es similar al obtenido por Lei *et al.* (2007) al estudiar la pectinasa adsorbida en partículas de sílica, la cual retuvo el 74 % de la actividad inicial de la enzima. Un valor de solo 56 % de actividad inicial de la enzima fue determinado previamente para un sistema alginato-pectinasa (Munishwar y Meryan 2003). Ramírez *et al.* (2013) inmovilizaron pectinasa en un soporte de quitina-alginato de sodio y la enzima solo retuvo el 60 % de su actividad inicial.

Tabla 3.7 Actividad específica de los conjugados sintetizados. (A.E., UI/mg)

Propiedad	Magnitud	Quit-QSA PNSA-A $\bar{x} \pm DS (nN3)$	Quit-QSA PNSA-E $\bar{x} \pm DS (nN 3)$	Quit-QSA CLSA-A $\bar{x} \pm DS (nN 3)$	Quit-QSA CLSA-E $\bar{x} \pm DS (nN3)$
A.E. enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa	(%)	85,0 ± 2,0 (a)	82,5 ± 0,9 (a,b)	80,0 ± 3,0 (b)	71,0 ± 2,0 (c)

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{x} DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

La actividad de las enzimas libres e inmovilizadas a diferentes concentraciones de sustrato fue estudiada. Los valores de K_M , parámetro que refleja las características intrínsecas de la enzima, aparecen reflejados en la **Tabla 3.8**.

Al analizar la tabla se aprecia que la K_M aparente de ambas enzimas se afectó después del proceso de inmovilización al que fueron sometidas. Al evaluar la afinidad de la pectinasa por el ácido poligalacturónico se pudo notar que no existió un incremento significativo en el valor de la K_M del conjugado Quit-QSA-PNSA-A con respecto a la PNSA, sin embargo en el caso Quit-QSA-PNSA-E el valor de la K_M se incremento en 3,2 veces. Cuando se realizó el estudio para los conjugados de CLSA se pudo constatar que el valor de la K_M en ambas preparaciones enzimáticas se duplicó al compararla con la enzima nativa. Los incrementos en el valor de la K_M evidencian una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato después de los procesos de inmovilización, lo que pudiera estar originado por los efectos difusionales provocados por la estructura tridimensional del soporte y las cadenas del polímero.

Tabla 3.8. Constante de Michaelis Menten (K_M) para los conjugados sintetizados. Pectinasa, sustrato: ácido poligalacturónico en un intervalo de concentraciones entre 0,025 y 0,25 % (m/v) en solución tampón de NaAc 20 mmol pH 4,2. Celulasa, sustrato: carboximetilcelulosa en un intervalo de concentraciones entre 2 y 50 mmol/L en solución tampón de NaAc 50 mmol pH 5,5.

Propiedad	Magnitud	Pectinasa		
		PNSA x \bar{E} DS (nN5)l	Quit-QSA PNSA-A x \bar{E} DS (nN5)l	Quit-QSA PNSA-E x \bar{E} DS (nN5)l
$K_{M(\text{aparente})}$	g/L	0,94 ± 0,05 (a)	1,25 ± 0,20 (a)	3,00 ± 0,80 (b)
		Celulasa		
	μmol/L	CLSA x \bar{E} DS (nN5)l	Quit-QSA CLSA-A x \bar{E} DS (nN5)l	Quit-QSA CLSA-E x \bar{E} DS (nN5)l
		6,56 ± 0,60 (a)	12,00 ± 0,90 (b)	11,50 ± 0,70 (b)

Los datos reportados son representativos de 5 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

Liu *et al.* (2012) han informado que la adición de glutaraldehído en soportes con quitosana puede provocar un entrecruzamiento excesivo que pudiera inhibir la difusión del sustrato hacia la enzima. Esta pudiera ser una de las razones de la menor afinidad de la PNSA por el sustrato en el

conjugado Quit-QSA-PNSA-E al compararlo con Quit-QSA-PNSA-A, tomando en consideración que para la formación del mismo se adicionó un 1 % de glutaraldehído como agente entrecruzante. En el caso de los conjugados Quit-QSA-CLSA-A y Quit-QSA-CLSA-E, el valor obtenido para la K_M fue muy similar, lo que pudiera estar en correspondencia con el valor de concentración de glutaraldehído de 0,25 % necesario para la formación del conjugado Quit-QSA-CLSA-E.

Otra razón pudiera estar relacionada con la explicación propuesta por Arslan *et al.* (2006) para el proceso de adsorción. En este caso los autores plantean que este proceso está dividido en dos etapas: una primera donde se establece un equilibrio entre la enzima libre y la enzima adsorbida y una segunda etapa donde la enzima adsorbida se reordena dentro de la matriz, de forma tal que el proceso de desorción se vuelve lento en el tiempo de duración del experimento. En estos casos, se ha planteado que la interacción entre la enzima inmovilizada y el polímero juegan un importante rol en la disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato (Lei y Bi 2007).

En otros trabajos estos autores han obtenido resultados similares a los determinados para los conjugados en estudio, el valor de la K_M de la pectinasa inmovilizada en copolímeros de poliestireno con ácido acrílico fue incrementado en 1,3 veces, disminuyendo así la afinidad de la enzima por el sustrato (Lei y Bi 2007a). Al evaluar este parámetro para la pectinasa inmovilizada en alcohol polivinílico los autores determinaron un incremento en 1,6 veces su valor, similar a los determinados para los conjugados en estudio (Esawy *et al.* 2013).

3.7.2 pH y temperatura óptimos

La actividad de las enzimas en función del pH del medio de reacción sufre variación después de la inmovilización. Por esta razón, se llevó a cabo la determinación de la actividad de la PNSA y CLSA libres e inmovilizadas en un intervalo de pH de 2 a 6 (**Figura 3.13**). Similarmente se

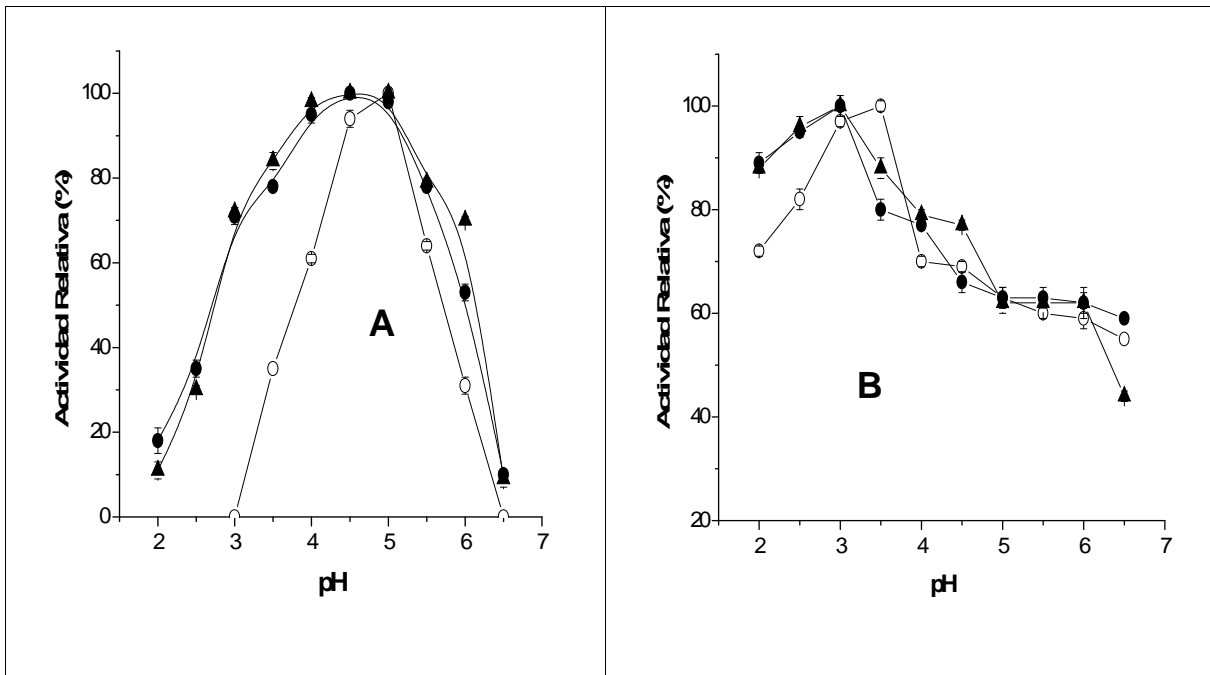


Figura 3.13 Efecto del pH sobre la actividad catalítica a 37°C de las enzimas nativas e inmovilizadas. A- PNSA (○), Quit-QSA-PNSA-A (●), Quit-QSA-PNSA-E (▲). B- CLSA (○), Quit-QSA-CLSA-A (●), Quit-QSA-CLSA-E (▲).

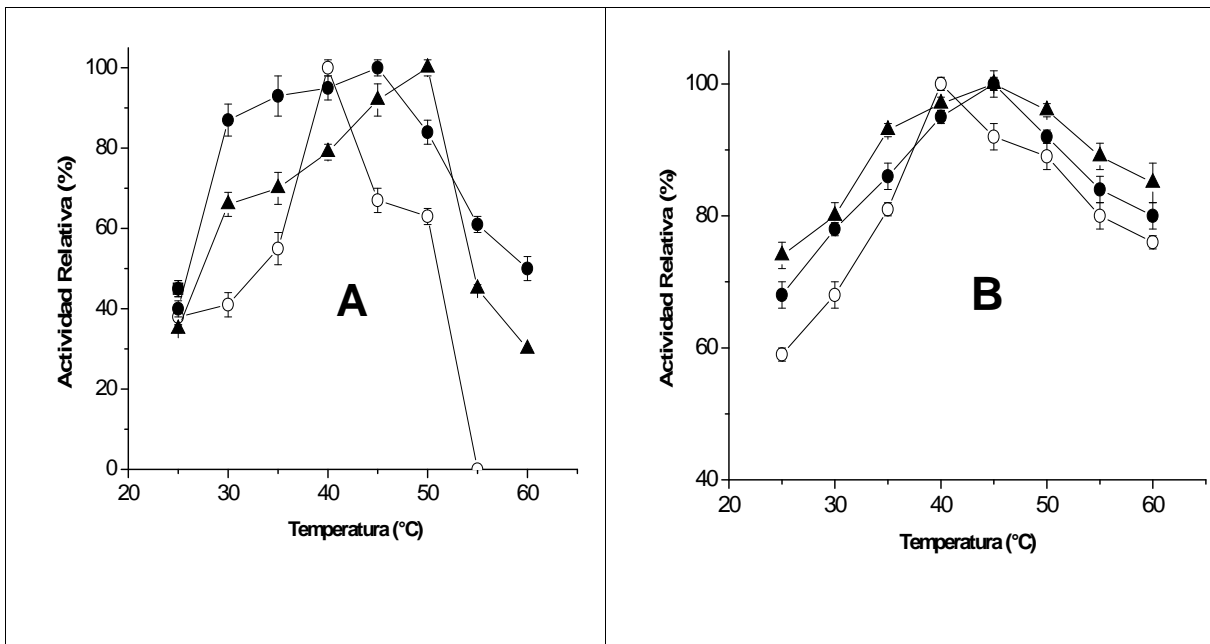


Figura 3.14 Efecto de la temperatura a pH 4,5 sobre la actividad catalítica de las enzimas nativas e inmovilizadas. A- PNSA (○), Quit-QSA-PNSA-A (●), Quit-QSA-PNSA-E (▲). B- CLSA (○), Quit-QSA-CLSA-A (●), Quit-QSA-CLSA-E (▲).

realizó un estudio del efecto de la temperatura (20-80°C) sobre la actividad catalítica de las enzimas nativas e inmovilizadas en el soporte de Quit-QSA (**Figura 3.14**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.9**.

Del análisis de los resultados se puede deducir que el intervalo de pH óptimo para la actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas, empleando las dos vías de inmovilización, sufrió variaciones hacia zonas de pH más ácido. Para la pectinasa el intervalo se amplió de 4,5-5,0 a 4,0-5,0 con ambos métodos. En la celulasa se determinó el pH óptimo entre 3,0-3,5 y en las formas inmovilizadas se desplazó el intervalo a 2,5-3,0. La ampliación del intervalo de pH para los conjugados de PNSA, así como el corrimiento del valor de pH óptimo para los conjugados de CLSA, al compararlos con las correspondientes enzimas libres, es indicativo de que los métodos de inmovilización empleados desplazan la actividad enzimática máxima del conjugado hacia un valor de pH más ácido.

Tabla 3.9 Valores de pH y temperatura a los cuales la pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada mostraron su máxima actividad. Intervalo de pH (2-6), intervalo de temperatura (20-80°C)

Parámetro	PNSA	CLSA	Quit-QSA-PNSA-A	Quit-QSA-PNSA-E	Quit-QSA-CLSA-A	Quit-QSA-CLSA-E
pH	4,5-5,0	3,0-3,5	4,0-5,0	4,0-5,0	2,5-3,0	2,5-3,0
Temperatura (°C) x ± DS (n=3) ¹	40 ± 2 (a)	40 ± 1 (d)	45 ± 2 (b)	50 ± 2 (c)	45 ± 2 (e)	45 ± 1 (e)

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{x} DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en este trabajo para el proceso de inmovilización del conjugado INV-QSA. Se ha planteado en la literatura que la inmovilización de enzimas en soportes donde estén presentes polímeros catiónicos como la quitosana trae consigo, en muchos casos, el corrimiento de la zona de pH óptimo a valores más bajos.

Resultados similares fueron obtenidos por Lei y Bi (2007) para la pectinasa inmovilizada en una matriz de sílica recubierta con quitosana. Los autores atribuyeron este efecto a la presencia de la quitosana en el medio, lo que provoca un ambiente tamponado en el entorno de la enzima haciéndola menos susceptible a la acción degradante de los pH ácidos.

Al analizar los resultados obtenidos en los experimentos realizados para la determinación de la temperatura óptima se observó un incremento en la velocidad de las reacciones enzimáticas con el aumento de la temperatura, hasta alcanzar la temperatura máxima a partir de la cual comienzan a sufrir procesos de inactivación térmica y con ello disminuir la velocidad de reacción. En la **Tabla 3.9** aparecen reflejados los valores de temperatura óptima para la pectinasa y la celulasa nativa y sus formas inmovilizadas después de haber estudiado el comportamiento de la actividad de las mismas en un intervalo de temperatura entre 20-80°C.

La pectinasa nativa presentó una temperatura óptima de 40°C y al inmovilizarla en el soporte de Quit-QSA por el método de absorción se incrementó en 5°C, mientras que por entrecruzamiento el valor determinado fue de 50°C, mostrando un incremento en 10°C, lo que significa que esta enzima expresa su máxima actividad catalítica a una mayor temperatura después del proceso de inmovilización por ambos métodos. El mayor incremento en la temperatura óptima del conjugado Quit-QSA-PNSA-E puede ser consecuencia de los múltiples enlaces covalentes que se establecen entre la enzima y el soporte después de la adición del glutaraldehído, lo que hace que su estructura sea más rígida y por lo tanto más resistente a la desnaturalización por calor. Es de señalar además, que ambas preparaciones enzimáticas mostraron mayor actividad en un amplio intervalo de temperaturas al compararlas con la enzima libre. A 55°C la PNSA nativa no mostró actividad, mientras que los conjugados Quit-QSA-PNSA-A y Quit-QSA-PNSA-E presentaron un 61 % y 45 % de actividad respectivamente. Estos incrementos en la temperatura pueden atribuirse

a una mayor estabilización de la enzima por los múltiples puntos de enlace entre las moléculas de PNSA y el soporte, lo que trae consigo que la pectinasa inmovilizada pueda mantener su estructura activa a mayores temperaturas, al compararla con la libre (Tuoping *et al.* 2008).

Incrementos similares fueron determinados al inmovilizar la pectinasa en un soporte de agar (Tuoping *et al.* 2008). Sin embargo, no todos los procesos de inmovilización en soportes sólidos provocan el mismo efecto. La pectinasa inmovilizada en copolímeros de poliestireno con ácido acrílico mantiene el mismo valor de temperatura óptima (Lei y Bi 2007a) y cuando esta misma enzima es inmovilizada en soportes de alginato su temperatura óptima tampoco varía de 40°C (Li *et al.* 2007, Ramírez *et al.* 2013).

Al realizar el estudio para la celulasa se determinó que la temperatura óptima de la misma se encuentra en 40°C, mientras que al inmovilizarla en el soporte de Quit-QSA por ambos métodos se incrementa en 5°C. Según Bayramoglu *et al.* (2013) las interacciones multipuntuales de la molécula de celulasa con un soporte donde esté presente la QSA con/o sin entrecruzamiento con glutaraldehído pueden reducir la flexibilidad conformacional de la enzima y resultar en un incremento de la temperatura óptima de la misma. Por el contrario en trabajos similares Dincer y Telefoncu (2007) encontraron que al inmovilizar la celulasa la temperatura óptima no varió de 40°C. Zhou (2010) determinó que la enzima libre e inmovilizada en N-succinyl-quitosana alcanzaba su temperatura óptima a 45°C. Sin embargo, Ince *et al.* (2012) y Ogeda *et al.* (2012) informaron que la celulasa inmovilizada exhibía un valor de temperatura óptima mayor que su contraparte libre, lo que reitera que la temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas varía en dependencia del soporte utilizado así como de las condiciones de inmovilización.

Estos resultados son similares a los determinados al inmovilizar la pectinasa en este soporte, lográndose también para la celulasa una mayor estabilidad térmica debido al proceso de inmovilización que sufrió la enzima.

3.8 Evaluación de la estabilidad funcional de las enzimas inmovilizadas

La conformación nativa de una enzima puede sufrir alteraciones cuando es sometida a la acción de agentes químicos o físicos externos, los cuales provocan desnaturalización y por consiguiente pérdida de actividad. Uno de los aspectos más importante a considerar en el empleo de las enzimas como catalizadores en diferentes procesos industriales, sometidas a la acción de agentes externos, lo constituye su termotolerancia. Tomando en consideración además, lo planteado por Klibanov (1983) al afirmar que desde el punto de vista práctico las reacciones llevadas a cabo a altas temperaturas son de gran importancia porque generalmente mejoran las velocidades de conversión de los sustratos y reducen la contaminación microbiana, se propone en el presente trabajo evaluar la estabilidad térmica de las nuevas preparaciones enzimáticas. Para determinar la influencia que ejerce sobre la termorresistencia de la invertasa el proceso de inmovilización en los soportes de quitina, fueron evaluadas dos tipos de respuestas: termoestabilidad y cinética de inactivación térmica.

3.8.1 Estabilidad térmica del conjugado INV-QSA inmovilizado

3.8.1.1 Perfil de termoestabilidad

El efecto que provocó el proceso de inmovilización sobre la termoestabilidad de la invertasa fue estudiado después de 10 minutos de incubación de la enzima nativa y el conjugado inmovilizado a diferentes valores de temperatura (**Figura 3.15**).

El análisis de los gráficos permite apreciar que el conjugado INV-QSA inmovilizado es más resistente al tratamiento térmico a temperaturas superiores a 50°C, que la INV nativa. Los valores

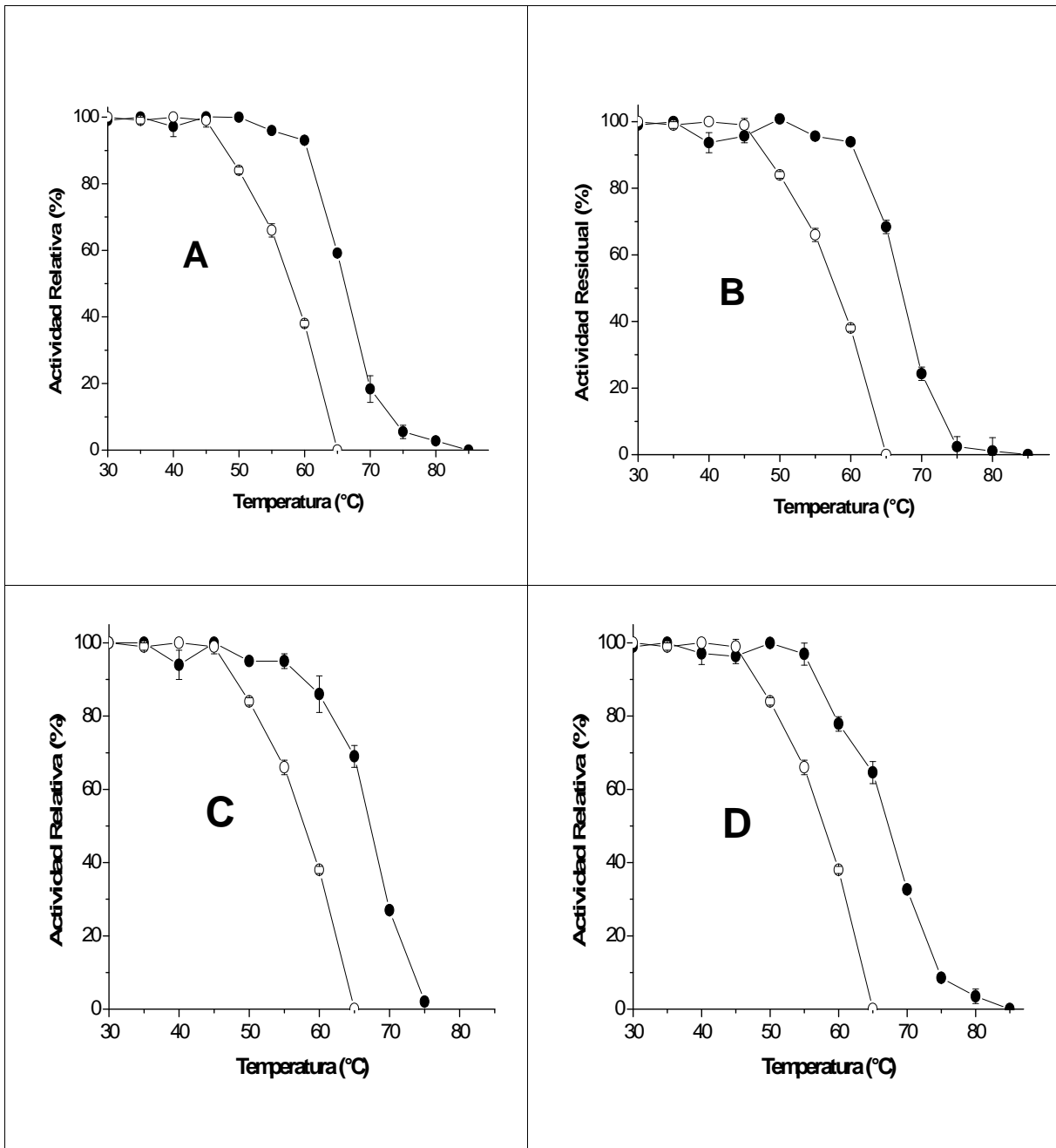


Figura 3.15 Actividad residual de la invertasa nativa (○) e inmovilizada (●) después de 10 min de incubación a diferentes temperaturas en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5,0. Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA.

calculados de T_{50} , definida como la temperatura a la cual la enzima retiene el 50 % de su actividad, mostraron que la misma se incrementa de 57°C en la enzima libre a 66°C en la INV-QSA inmovilizada en los soportes de Quit-CMC, Quit-Alg y 67°C en los soportes de Quit-Pc y Quit-HyA.

La mayor resistencia a la temperatura mostrada por el conjugado INV-QSA inmovilizado se puede apreciar además al comparar los porcentajes de actividad de las formas de la enzima a 65°C (**Figura 3.15**). A esta temperatura la invertasa no presentó actividad, sin embargo, el conjugado inmovilizado en los cuatro soportes alcanzó entre un 60-70 %. Un estudio similar realizaron D'Souza y Godbole, (2002) para la invertasa libre e inmovilizada en cáscara de arroz y determinaron que la misma retenía solo el 6 % de su actividad, mientras que al inmovilizarla su actividad se incrementaba hasta un 69 %, resultado que coincide con el obtenido en esta tesis al inmovilizar el conjugado INV-QSA. Sin embargo, cuando Amaya-Delgado *et al.* (2006) inmovilizaron la INV en microcapas de nylon-6 determinaron que a una temperatura de 50°C la enzima libre e inmovilizada retenían el 80 % de su actividad, pero a 60°C decaía rápidamente para ambas formas de la enzima demostrando que en este caso no les fue posible incrementar la estabilidad térmica de la invertasa después de haber sido sometida al proceso de inmovilización.

3.8.1.2 Cinética de inactivación térmica

La cinética de inactivación térmica de las diferentes formas de la enzima después de ser incubadas durante 1 hora a una temperatura de 65°C se muestra en la **Figura 3.16**.

Del análisis de la figura se puede apreciar que todas las preparaciones enzimáticas expuestas a 65°C disminuyen su actividad progresivamente con el tiempo. En la invertasa nativa y el conjugado inmovilizado en tres de los soportes sintetizados Quit-CMC, Quit-Pc y Quit-HyA la

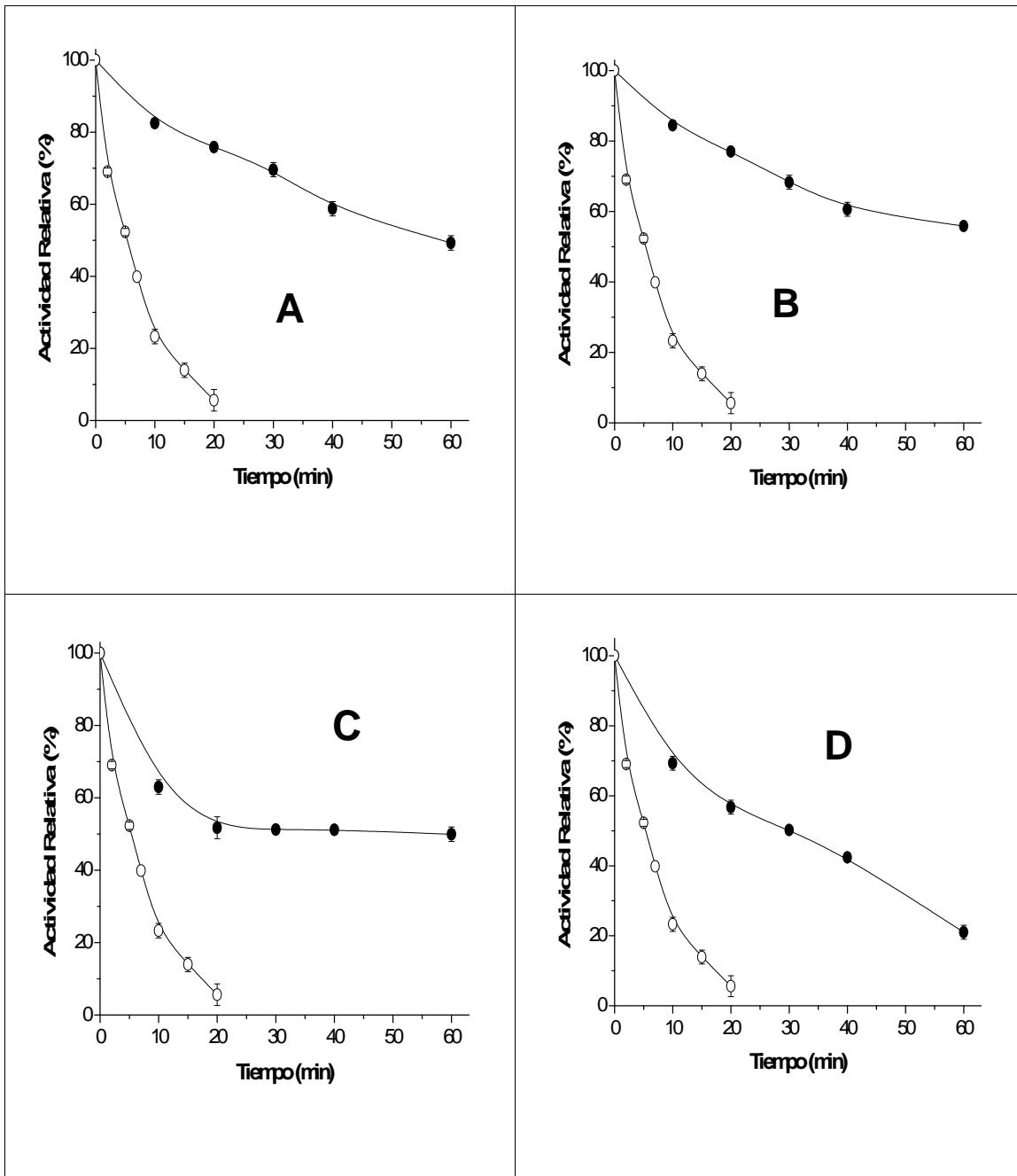


Figura 3.16 Actividad residual de la invertasa nativa (○) e inmovilizada (●) vs tiempo de incubación, a una temperatura de 65°C en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5,0. Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA.

pérdida de actividad transcurre acorde a una cinética de primer orden. Los ajustes matemáticos de las ecuaciones cinéticas se pueden apreciar en el **Anexo VII, Figura 7.1**.

La enzima nativa pierde su actividad más rápidamente que las preparaciones enzimáticas, lo que demuestra una mayor resistencia del conjugado INV-QSA inmovilizado a la inactivación térmica. Las mayores diferencias en este sentido se encontraron al comparar la invertasa nativa con los complejos INV-QSA:Quit-Pc y INV-QSA:Quit-CMC en los cuales el $t_{1/2}$, tiempo al cual las preparaciones enzimáticas retienen el 50 % de la actividad inicial, se incrementó en aproximadamente 17 y 13 veces respectivamente. Los menores valores de la k_i , y consecuentemente, los mayores valores de $t_{1/2}$ correspondientes a los complejos polielectrolitos demuestran la mayor estabilidad térmica de estos conjugados al compararlos con la enzima nativa (**Tabla 3.10**). Estos resultados, al igual que los obtenidos en el epígrafe anterior, evidencian un incremento de la estabilización funcional de la enzima después del proceso de inmovilización.

Tabla 3.10 .Parámetros cinéticos de los procesos de inactivación térmica de la invertasa nativa e inmovilizada a una temperatura de 65°C.

Parámetro	INV x \bar{E} DS (nN5) ¹	INV-QSA: Quit-CMC x \bar{E} DS (nN5) ¹	INV-QSA: Quit-Pc x \bar{E} DS (nN5) ¹	INV-QSA: Quit-HyA x \bar{E} DS (nN5) ¹
$t_{1/2}$ (min)	5 \pm 1	63 \pm 2	87 \pm 3	30 \pm 2
r ($t_{1/2}$ inmov. / $t_{1/2}$ nat.)	-	12,6	17,4	6,0
k_i (min ⁻¹)	0,141 \pm 0,012	0,111 \pm 0,010	0,008 \pm 0,001	0,024 \pm 0,002

Los datos reportados son representativos de 5 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS.

El conjugado inmovilizado supera en estabilidad térmica a la enzima nativa, lo cual constituye un resultado muy importante desde el punto de vista práctico debido a que la insolubilización del conjugado permite su posible aplicación industrial.

En la literatura se refieren trabajos donde Amaya-Delgado *et al.* (2006) estudian la invertasa inmovilizada en microcapas de nylon-6 y determinan que el mecanismo de inactivación térmica de la misma transcurre a través de una cinética de primer orden. El $t_{1/2}$ determinado para la enzima inmovilizada a una temperatura de 60°C presentó un valor de 22 minutos. A 70°C este valor era solo de 6 minutos. Estudios similares realizaron Akgo'1 *et al.* (2001) para la invertasa inmovilizada en microesferas de alcohol polivinílico y determinaron que el $t_{1/2}$ a 60°C era de 75 minutos y a 70°C de 16 minutos. Los valores de $t_{1/2}$ determinados para la invertasa inmovilizada en los soportes anteriormente mencionados son inferiores a los obtenidos para la enzima inmovilizada en los soportes en estudio.

El conjugado INV-QSA inmovilizado en el soporte Quit-Alg pierde su actividad acorde a una cinética de inactivación bifásica (**Figura 3.16**). La cinética de inactivación bifásica es una de las desviaciones más comunes de la cinética de primer orden, manifestándose gráficamente por una curva de actividad vs tiempo biexponencial. Existen diferentes mecanismos capaces de describir la inactivación bifásica pero una interpretación física de esta, muestra que la inactivación es controlada en cada etapa por reacciones diferentes y la velocidad en la segunda fase es generalmente menor (Polakovic y Vrabel, 1996). El complejo polielectrolito INV-QSA:Quit-Alg perdió su actividad progresivamente en el tiempo acorde a una cinética de inactivación bifásica. El ajuste de los resultados de este experimento responde a la ecuación biexponencial (**Anexo VII Figura 7.2**):

$$Y = Ae^{-k_x t} + Be^{-k_y t} + C$$

Donde A; B; k_x y k_y son funciones de las diferentes constantes de velocidad del sistema y C una actividad residual que persiste en el tiempo.

El procesamiento de los datos del proceso de inactivación térmica del complejo polielectrolito INV-QSA:Quit-Alg mostró la siguiente ecuación:

$$Y = 47,54e^{-1,5 \times 10^{-1}t} + 27,79e^{-1,5 \times 10^{-3}t} + 24,76$$

Del análisis de los resultados de la ecuación se obtienen las constantes macroscópicas de este sistema. El gráfico correspondiente al análisis de los residuos se muestra en el **Anexo VII**,

Figura 7.3:

$$k_x = 1,5 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1} \quad \text{y} \quad k_y = 1,5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$t_{1/2x} = 0,08 \text{ h}^{-1} \quad \text{y} \quad t_{1/2y} = 7,7 \text{ h}^{-1}$$

Se puede plantear que las enzimas inmovilizadas generalmente son más resistentes que la forma nativa frente a la acción del calor y de otros agentes desnaturalizantes. La utilización práctica de las enzimas se ve muy favorecida al incrementarse su estabilidad térmica mediante los procesos de inmovilización (Akgȯl *et al.*, 2001).

3.8.2 Estabilidad térmica de la pectinasa y la celulasa inmovilizada

3.8.2.1 Perfil de termoestabilidad

Las enzimas pectinasa y celulasa en sus formas nativa e inmovilizada se incubaron durante 10 minutos a temperaturas entre 40-90°C, con el objetivo de estudiar el efecto que ejerce el proceso de inmovilización sobre la termoestabilidad de las mismas (**Figura 3.17**). Al analizar los gráficos se puede apreciar que en todos los casos la enzima inmovilizada en el soporte Quit-QSA presentó un mejor perfil de termoestabilidad que su contraparte nativa, mostrándose los valores de T_{50} en la **Tabla 3.11**.

Los valores presentados en la tabla evidencian un incremento de la T_{50} para todos los conjugados preparados. En la PNSA inmovilizada por el método de adsorción se determinó un incremento en la T_{50} de 3,5°C, mientras que por entrecruzamiento la variación fue de 5°C. Un comportamiento

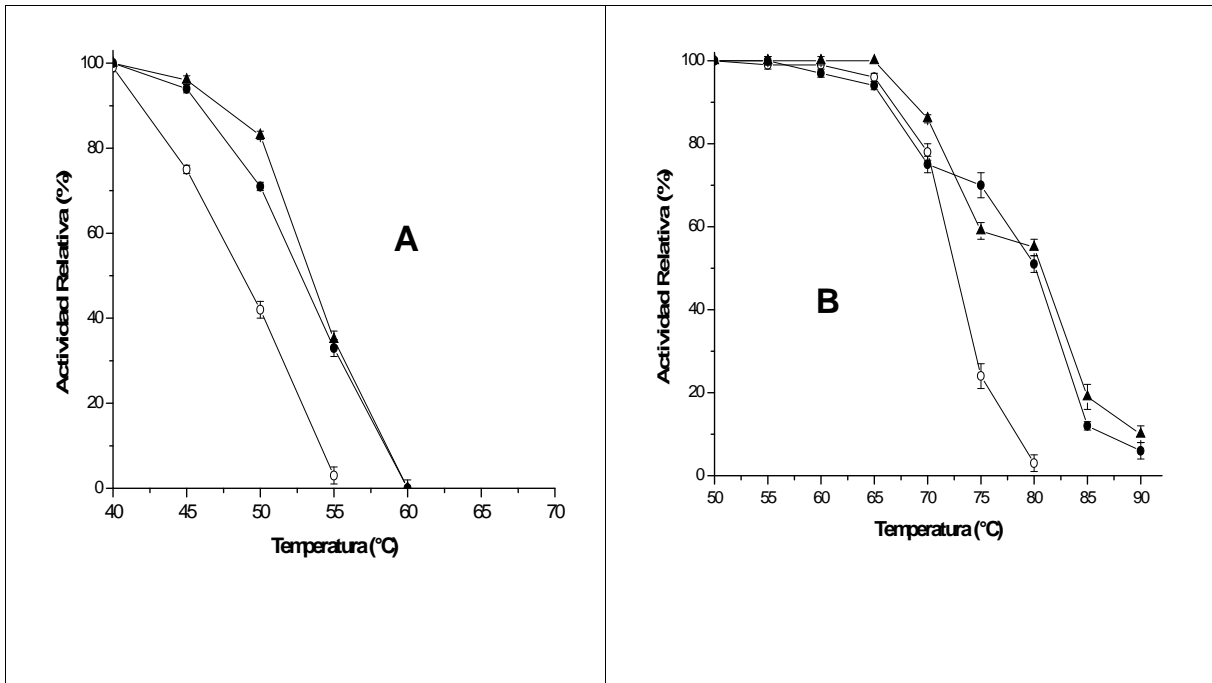


Figura 3.17 Actividad residual de las enzimas nativas e inmovilizadas después de 10 min de incubación a diferentes temperaturas. A- solución tampón de acetato de sodio 20 mmol/L, pH 4,5; PNSA (○), Quit-QSA-PNSA-A (●), Quit-QSA-PNSA-E (▲). B- solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 4,5; CLSA (○), Quit-QSA-CLSA-A (●), Quit-QSA-CLSA-E (▲).

similar presentó la CLSA con incrementos de 4,5°C y 6,5°C para cada método de inmovilización respectivamente. Tomando en consideración lo expresado por Tuoping *et al.* (2008) se puede plantear que el aumento en la estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas se deba al establecimiento de enlaces multipuntuales entre el soporte y la proteína, los que incrementan la rigidez de la conformación activa de la enzima, previniendo la desnaturalización de los biocatalizadores sintetizados. Los resultados alcanzados en este trabajo están en concordancia con lo planteado por estos autores, debido a que las mayores diferencias de T_{50} en ambas enzimas se obtuvieron por entrecruzamiento con glutaraldehído, método en el cual se establece un enlace covalente multipuntual entre la enzima y el soporte con mayor fortaleza que las interacciones superficiales reversibles originadas que prevalecen en la adsorción (López-Gallego *et al.*, 2005).

Tabla 3.11 Valores de T_{50} para la pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada.

Parámetro	PNSA	CLSA	Quit-QSA-PNSA-A	Quit-QSA-PNSA-E	Quit-QSA-CLSA-A	Quit-QSA-CLSA-E
T_{50} (°C) $\bar{x} \pm DS$ (n=3)	48,0 ± 1,0 (a)	72,0 ± 2,0 (c)	51,5 ± 0,8 (b)	53,0 ± 1,0 (b)	76,5 ± 0,6 (d)	78,5 ± 0,3 (d)

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{x} \pm DS. La significación estadística de los datos se definió mediante la prueba de ANOVA. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

Otros autores han informado incrementos en la estabilidad térmica de estas enzimas después de la inmovilización (Zhou 2010, Wu *et al.*, 2013, Rehman *et al.*, 2013). Sin embargo, Busto *et al.* (2006) no encontraron diferencias en la termoestabilidad de la pectinasa nativa e inmovilizada en capas de alginato a temperaturas de 40 y 50°C.

3.8.2.2 Cinética de inactivación térmica

La cinética de inactivación térmica de la pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada se evaluó comparativamente. Con este fin se determinó la actividad residual de los preparados enzimáticos después de su incubación en el tiempo a la temperatura en estudio. En la **Figura 3.18** se muestran

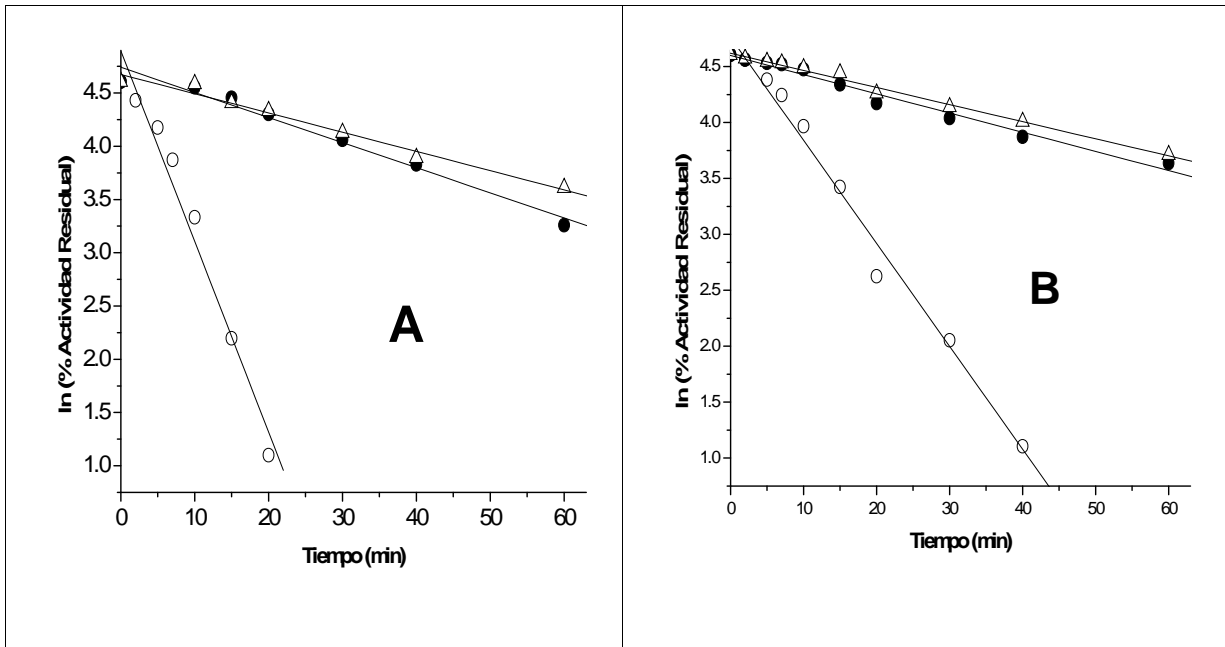


Figura 3.18 Actividad residual de las enzimas nativas e inmovilizadas vs tiempo de incubación. A- PNSA (●), Quit-QSA-PNSA-A (○), Quit-QSA-PNSA-E (△) a una temperatura de 50°C en solución tampón de acetato de sodio 20 mmol/L, pH 4,5. B- CLSA (●), Quit-QSA-CLSA-A (○), Quit-QSA-CLSA-E (△) a una temperatura de 75°C en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 4,5.

los resultados para estas determinaciones, donde se puede apreciar que los procesos de inactivación térmica de todas las preparaciones enzimáticas ocurren de acuerdo con una cinética de primer orden. Los ajustes matemáticos de las ecuaciones se presentan en el **Anexo VIII**.

La enzima nativa en ambos casos pierde actividad más rápidamente que sus contrapartes inmovilizadas a la temperatura en estudio. Estos resultados demuestran la mayor resistencia de los conjugados a la inactivación térmica, lo cual se refleja en sus menores valores de k_i , y mayores $t_{1/2}$. Los valores obtenidos para estas determinaciones se muestran en la **Tabla 3.12**.

Los conjugados Quit-QSA-PNSA-A y Quit-QSA-PNSA-E incrementaron su $t_{1/2}$ en 8 y 10 veces el valor de la enzima libre. La pectinasa inmovilizada es más activa y estable a 50°C que la enzima nativa en los dos casos. El incremento en la estabilidad de los conjugados preparados puede ser explicado por el mantenimiento de la conformación activa de la enzima, debido a la protección que ejerce el soporte preservando su estructura terciaria (Tardioli *et al.*, 2006).

Tabla 3.12 Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los procesos de inactivación térmica de la pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada

Parámetro	PNSA x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹	CLSA x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹	Quit-QSA- PNSA-A x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹	Quit-QSA- PNSA-E x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹	Quit-QSA CLSA-A x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹	Quit-QSA- CLSA-E x \bar{x} \pm DS (nN3) ¹
$t_{1/2}$ (min)	3,8 \pm 0,4	7,5 \pm 0,5	30,0 \pm 1,0	39,0 \pm 2,0	41,0 \pm 1,0	46,0 \pm 3,0
r ($t_{1/2}$ inmov. / $t_{1/2}$ nat.)	-	-	7,90	10,00	5,46	6,13
k_i (min ⁻¹)	0,18 \pm 0,02	0,092 \pm 0,007	0,023 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001	0,017 \pm 0,001	0,015 \pm 0,001

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{x} \pm DS.

El estudio realizado para la celulasa y sus formas inmovilizadas a 75°C mostró que a esta temperatura los conjugados preparados incrementaron su tiempo de vida media en 5 y 6 veces con respecto a la enzima nativa. La celulasa al igual que la pectinasa incrementó su estabilidad después de los procesos de inmovilización a los que fue sometida. Estos resultados, al igual que

los obtenidos al estudiar el perfil de termoestabilidad (**Epígrafe 3.8.2.1**) constituyen un índice de la eficiencia de los métodos de inmovilización seleccionados y reflejan un balance adecuado entre la estabilidad conformacional adquirida por la enzima y el microambiente creado alrededor de la misma. Los resultados alcanzados para las formas inmovilizadas de la pectinasa y celulasa, al igual que los determinados para el conjugado INV-QSA inmovilizado en los soportes aniónicos, permiten afirmar que los procesos de inmovilización a los que fueron sometidas estas enzimas posibilitan obtener formas inmovilizadas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor.

Lo hasta aquí analizado es de gran relevancia práctica, teniendo en cuenta que varios de los procesos industriales donde ellas se aplican demandan enzimas estables térmicamente, resistentes a valores extremos de temperatura.

3.9 Evaluación de las propiedades operacionales de las enzimas inmovilizadas

La estabilidad operacional y el almacenaje (no operacional) de los catalizadores inmovilizados constituyen parámetros importantes que pueden determinar la factibilidad económica de la realización de un proceso. La estabilidad operacional de las enzimas es uno de los factores más importante que define las aplicaciones sucesivas de los sistemas inmovilizados ([Dincer y Telefoncu, 2007](#)). Con el propósito de evaluar estos procesos se llevó a cabo el estudio de la estabilidad operacional, ciclos de reuso y estabilidad en el tiempo de los biocatalizadores sintetizados.

3.9.1 Ciclos de reuso de la INV-QSA inmovilizada en un reactor empacado

Sandar *et al.* (2003) han planteado que la mayor virtud de la inmovilización en la práctica real es la reusabilidad del biocatalizador, independientemente de su termoestabilización. Con el propósito de evaluar esta propiedad se llevó a cabo un estudio de ciclos de reuso a los

biocatalizadores sintetizados, en un reactor empacado operado a 30°C y almacenado a 4°C entre cada ciclo (**Figura 3.19**).

La INV-QSA inmovilizada en los soportes sintetizados mantuvo una alta estabilidad cuando es utilizada repetidamente para la hidrólisis de la sacarosa. El complejo INV-QSA:Quit-HyA (D) retuvo el 100 % de la actividad de la enzima después de ser sometido a 10 ciclos de reuso. Los biocatalizadores INV-QSA:Quit-CMC (A), INV-QSA:Quit-Pc (B) e INV-QSA:Quit-Alg (C) mostraron más de un 98 % de actividad al terminar los 10 ciclos. Estos resultados son muy satisfactorios debido a que el reuso del biocatalizador es una condición indispensable para la aplicación práctica de los mismos desde el punto de vista industrial. La cantidad de ciclos de reuso a los que se puede someter una enzima con buena retención de actividad puede contribuir positivamente al logro de una alta rentabilidad en el bioproceso empleado.

Experimentos similares se han realizado por otros autores, Osman *et al.* (2005) estudiaron la invertasa adsorbida en geles de N-vinil imidazol y determinaron que después de ser sometida a 10 ciclos de reuso la enzima perdía aproximadamente un 20 % de su actividad inicial. Al inmovilizar la invertasa en poros de silicona funcionalizados los autores determinaron que al reutilizar la enzima la actividad inicial se mantenía intacta durante los tres primeros tratamientos, pero después del séptimo se reducía en 33 % su valor inicial (Azodi *et al.* 2011). La estabilidad en el uso repetido de los biocatalizadores sintetizados en esta tesis son superiores a los mostrados anteriormente.

3.9.2 Ciclos de reuso de la pectinasa y celulasa inmovilizadas en el soporte de Quit-QSA

El comportamiento experimentado por la pectinasa y la celulasa inmovilizadas en el soporte de Quit-QSA al ser sometidas a 16 ciclos de reuso se expone en la **Figura 3.20**. Para la determinación de la reusabilidad de la PNSA inmovilizada por ambas vías se empleó como

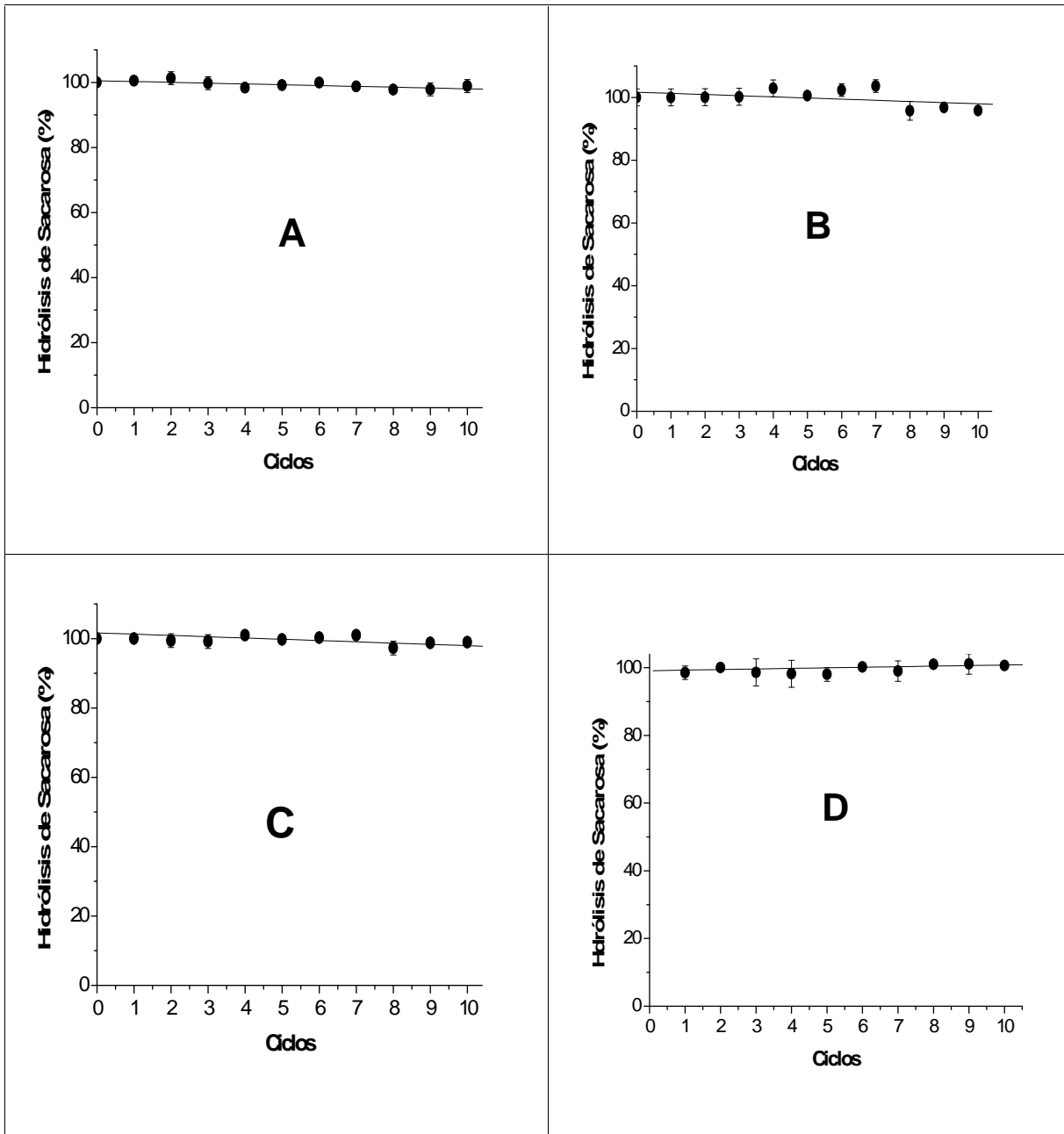


Figura 3.19 Estabilidad operacional de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado a 30°C para ciclos de reuso. Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA. Tiempo del ciclo de reuso: 60 min.

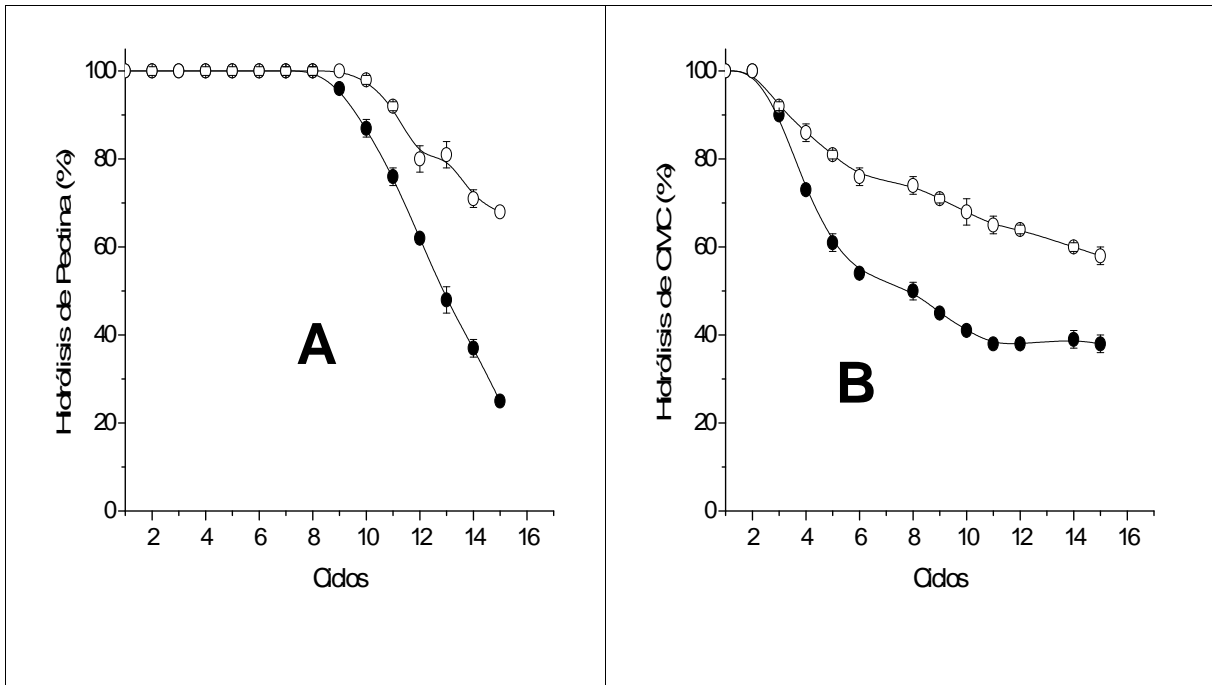


Figura 3.20 Estabilidad operacional de la pectinasa (A) y celulasa (B) inmovilizadas por dos vías diferentes en un soporte de Quit-QSA para ciclos de reuso. (○) Quit-QSA-Enzima A, (●) Quit-QSA-Enzima E. Tiempo del ciclo de reuso: 30 min.

sustrato una solución de pectina de manzana al 0,25 %, durante 30 min a 30°C (**Figura 3.20 (A)**). El análisis de la **Figura 3.20 (A)** muestra que la PNSA inmovilizada por las dos vías en estudio presentó una alta estabilidad cuando se utiliza repetidamente para la hidrólisis de la pectina. Ambas preparaciones retuvieron un 100 % de actividad después de 9 ciclos de reuso, a partir de los cuales comienza a disminuir la misma. Los mejores resultados fueron obtenidos para la PNSA inmovilizada por unión covalente al soporte de Quit-QSA, la cual retuvo un 70 % de actividad inicial después de 15 ciclos de reuso. Para la PNSA-Quit-QSA (A) se determinó una retención de un 25 % de actividad después de los reusos.

Los porcentajes de actividad retenida al reutilizar la enzima por ambos métodos son superiores a los determinados por otros autores. Roy *et al.* (2003) inmovilizaron pectinasa en alginato mediante interacciones no covalente y determinaron que la enzima perdía el 55 % de su actividad al realizar el primer ciclo de reuso, después del cual el conjugado mantenía el 45 % de la actividad durante 5 ciclos más. Demirel y Mutlu (2005) adsorbieron pectinasa en partículas magnéticas y hallaron que la enzima mantenía aproximadamente el 75 % de su actividad al tercer ciclo de reuso. Al inmovilizar la pectinasa en una matriz de quitina-alginato Ramírez *et al.* (2013), encontraron que la misma mantenía el 50 % de su actividad después de haber sido utilizada repetidamente durante 10 ciclos.

La **Figura 3.20 (B)** muestra la reusabilidad de la CLSA inmovilizada por las dos vías en estudio, empleando como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % a 40°C durante 1 hora. En ambos casos el porcentaje de hidrólisis de la CMC va disminuyendo con el transcurso de los ciclos, siendo más marcada la disminución para la celulasa inmovilizada por adsorción. Se determinó que el conjugado Quit-QSA-CLSA-A retuvo un 54 % de actividad después de 6 ciclos de reuso y la inmovilizada de forma covalente Quit-QSA-CLSA-E retuvo un 76 % de la actividad

original después de la misma cantidad de ciclos. Los mejores resultados se obtuvieron en el conjugado Quit-QSA-CLSA-E que retuvo un 58 % de actividad original después de 15 ciclos de reuso.

Como resultado de los procesos de inmovilización se obtuvieron mayores porcentajes de retención de actividad de la CLSA ante el reuso que en otros sistemas de inmovilización empleados para la enzima. El-Ghaffar y Hashem (2010) inmovilizaron CLSA en quitosana empleando glutaraldehído como agente entrecruzante y en esas condiciones la CLSA inmovilizada retuvo el 60 % de la actividad original después de 6 ciclos de reuso, mostrando una pérdida total de actividad en la repetición 11. En otros trabajos Dincer y Telefoncu (2007) inmovilizaron celulasa en quitosana modificada con alcohol polivinílico y determinaron que el biocatalizador preparado retenía el 52 % de actividad después de 8 ciclos de reuso.

Al analizar los resultados de la inmovilización de PNSA y CLSA en el soporte de Quit-QSA, se apreció que en ambos casos el método de inmovilización covalente con adición de glutaraldehído mostró resultados superiores a los determinados al inmovilizar las enzimas empleando la adsorción no específica. Estos resultados están acorde a lo esperado, ya que en el método de adsorción la enzima se une al soporte mediante interacciones superficiales que facilitan la obtención de derivados sencillos con bajo costo de preparación, pero con una menor estabilidad mecánica debido a una unión más débil al soporte. Los conjugados preparados por unión covalente con adición de glutaraldehído son más resistentes a condiciones estresantes, con una mayor estabilización de la estructura terciaria de la enzima.

3.9.3 Estabilidad en el tiempo de la INV-QSA inmovilizada en los soportes quitina-polímero aniónico

La actividad de las enzimas decrece gradualmente con el tiempo, siendo la estabilidad durante el almacenaje fuertemente dependiente de las condiciones de almacenamiento. Con vistas a la futura aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas se estudió la estabilidad en el tiempo de la invertasa nativa y el conjugado inmovilizado a 37°C durante 50 días, mostrándose los resultados en la **Figura 3.21**. Del análisis de la misma se puede plantear que la enzima nativa pierde rápidamente la actividad en el tiempo y al transcurrir los 50 días retiene aproximadamente solo el 35 % de su actividad (**Tabla 3.13**). La INV-QSA inmovilizada retiene un alto porcentaje de su actividad (81-95) al transcurrir los 50 días de almacenaje a 37°C, un valor más bajo de actividad (50 %) solo fue determinado en el complejo INV-QSA:Quit-HyA.

La estabilidad en el tiempo para todas las formas de la enzima fue realizado también a 4°C. A esta temperatura la invertasa nativa pierde actividad en el tiempo, pero más lentamente que a 37°C. Al transcurrir el tiempo del experimento retenía aproximadamente el 90 % de su actividad, mientras que los cuatro complejos sintetizados mantenían el 100 %. A esta temperatura y al transcurrir los 50 días de almacenaje los complejos formados no mostraron pérdida de actividad (**Tabla 3.13**). A diferencia de los complejos sintetizados en esta tesis, al inmovilizar la invertasa en otros soportes se han informado mayores pérdidas de actividad en el tiempo de los conjugados formados. Un estudio realizado a 4°C para la invertasa libre e inmovilizada en microesferas de alcohol polivinílico realizado por Akgo'l *et al.* (2001) mostró que la enzima nativa perdía totalmente su actividad a los 28 días, mientras que la inmovilizada retenía en este mismo período de tiempo el 62 %. Este decrecimiento fue justificado por la pérdida natural de actividad de las enzimas en el tiempo. A esta misma temperatura Danisman *et al.* (2004) estudiaron la estabilidad

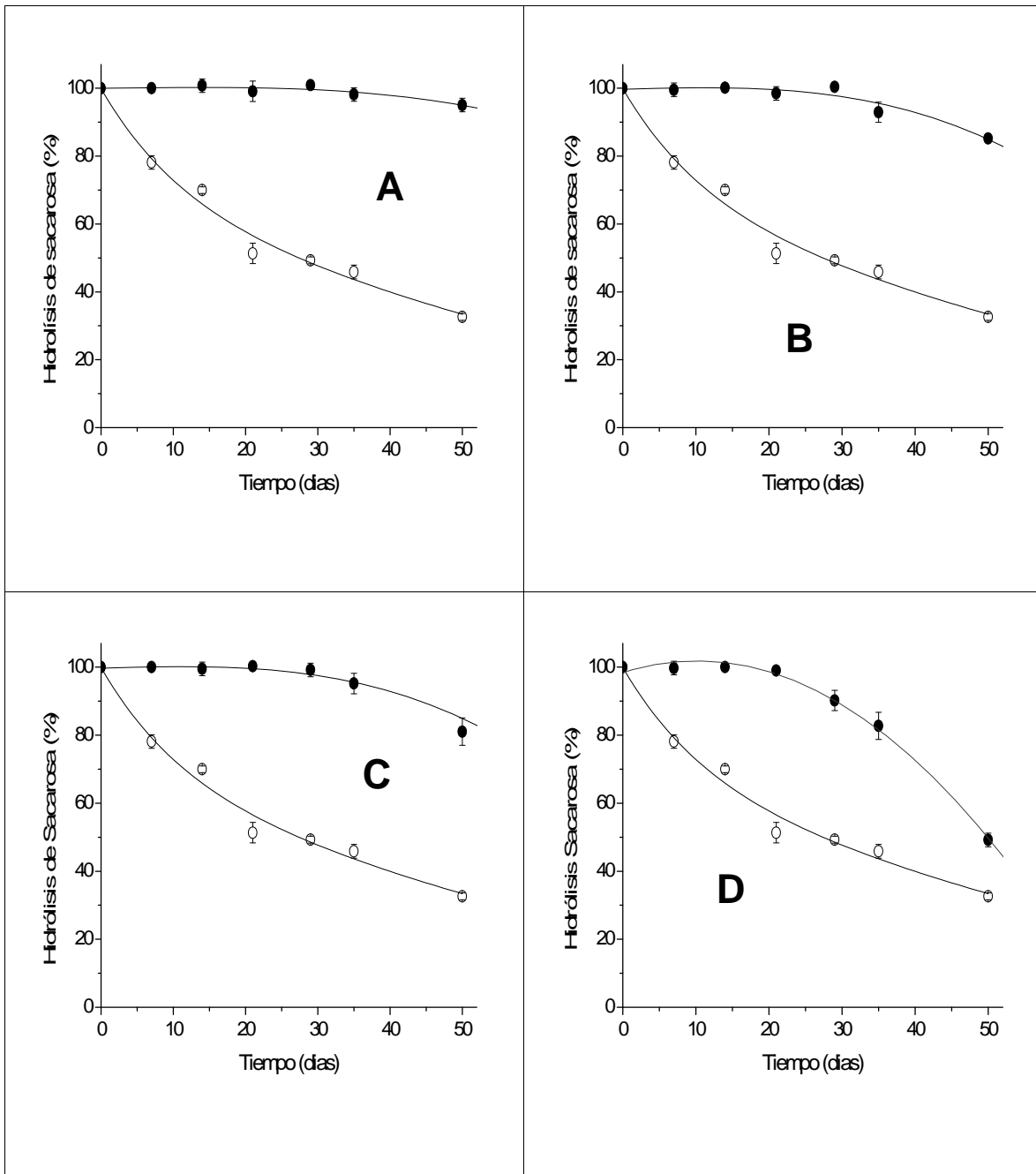


Figura 3.21 Estabilidad durante el almacenaje de la invertasa nativa (●) e inmovilizada (○) a 37°C en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5,0 Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA.

Tabla 3.13 Actividad retenida (%) por la invertasa nativa e inmovilizada después de 50 días de almacenaje.

Parámetro	INV x \bar{E} DS (nN 3)	INV-QSA: Quit-CMC x \bar{E} DS (nN 3)	INV-QSA: Quit-Pc x \bar{E} DS (nN 3)	INV-QSA: Quit-Alg x \bar{E} DS (nN 3)	INV-QSA: Quit-HyA x \bar{E} DS (nN 3)
Actividad retenida (%) a 4°C	92 \pm 2	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Actividad retenida (%) a 37°C	32 \pm 1	95 \pm 2	85 \pm 3	81 \pm 1	50 \pm 2

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS.

Tabla 3.14. Actividad retenida (%) por la pectinasa y celulasa nativas e inmovilizadas después de 50 días de almacenaje. PNSA: sustrato, ácido poligalacturónico al 0,5 % en solución tampón de NaAc 20 mmol pH 4,2. CLSA: sustrato, CMC al 1 % en solución tampón de NaAc 50 mmol pH 5,5.

Parámetro	PNSA x \bar{E} DS (nN 3)	CLSA x \bar{E} DS (nN 3)	Quit-QSA- PNSA-A x \bar{E} DS (nN3)	Quit-QSA- PNSA-E x \bar{E} DS (nN3)	Quit-QSA- CLSA-A x \bar{E} DS (nN3)	Quit-QSA- CLSA-E x \bar{E} DS (nN3)
Actividad retenida (%) a 4°C	80 \pm 2	95 \pm 1	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
Actividad retenida (%) a 30°C	30 \pm 1	70 \pm 2	36 \pm 1	52 \pm 2	83 \pm 2	90 \pm 3

Los datos reportados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS.

de la enzima libre e inmovilizada en membranas de pHEMA–GMA, determinando que la invertasa libre pierde completamente su actividad a los 32 días de almacenamiento y la inmovilizada hasta ese momento mantenía el 78 %.

Los resultados de estabilidad obtenidos a 4 y a 37°C mostraron que la INV-QSA inmovilizada en los cuatro soportes incrementó su estabilidad durante el almacenamiento al compararla con la enzima nativa. La estabilización en el tiempo de la INV-QSA inmovilizada constituye un resultado muy importante para la aplicación industrial de la misma, ya que la enzima en solución no es estable durante el almacenaje. Los valores positivos alcanzados en estas determinaciones pueden conducir a resolver los problemas de la utilización de enzimas en disolución, no estables en el almacenaje con pérdida de actividad en el tiempo; e inclusive cuando se encuentran operando discontinuamente. Los complejos preparados superan una de las dificultades tecnológicas de la utilización de los sistemas inmovilizados a nivel industrial, la estabilidad en el tiempo del biocatalizador sintetizado. La inmovilización definitivamente surge para retener la enzima en una posición estable en comparación con la contraparte libre (Bayramoglu *et al.* 2003) y los resultados de este trabajo así lo demuestran.

3.9.4 Estabilidad en el tiempo de PNSA y CLSA inmovilizadas en un soporte de Quit-QSA

La estabilidad en el tiempo de la PNSA y la CLSA inmovilizadas en un soporte de Quit-QSA fue observado durante 50 días a temperaturas de 4 y 30°C. En todos los casos la enzima inmovilizada retiene mayor porcentaje de actividad que su contraparte libre a las temperaturas en estudio. Los resultados obtenidos en estas determinaciones se muestran en la **Tabla 3.14**.

A 30°C la PNSA retuvo el 30 % de su actividad a los 50 días de experimento, mientras los conjugados Quit-QSA-PNSA-A y Quit-QSA-PNSA-E retuvieron el 36 y el 52 % respectivamente. A 4°C la PNSA conservó el 80 % de su actividad y las formas inmovilizadas

mantuvieron el 100 % al transcurrir los 50 días. Para la CLSA se determinó que la enzima libre retiene el 70 % de su actividad original a 30°C, mientras que la Quit-QSA-CLSA-A y la Quit-QSA-CLSA-E mantuvieron el 83 y 90 %. Al realizar el experimento a 4°C la enzima conservó el 95 % de su actividad y los conjugados preparados mantuvieron el 100 % después de los 50 días. Estos resultados revelan que las formas inmovilizadas retienen mayor % de actividad que las libres en todos los casos, encontrándose que a 4°C todas mantenían el 100 % en todo el tiempo de estudio. Los incrementos en la estabilidad durante el almacenaje determinado para ambas enzimas resultaron muy satisfactorios teniendo en cuenta la importancia y posible aplicación industrial de las mismas.

Los resultados alcanzados en esta tesis son superiores a los obtenidos por otros autores al trabajar con estas enzimas, Lei y Bi (2007) al inmovilizar la pectinasa en una matriz de sílica recubierta con quitosana encontraron que a 20°C, al transcurrir 45 días de experimento la enzima no tenía actividad y su forma inmovilizada mantenía solo el 20 %. Estos mismos autores determinaron que la pectinasa adsorbida en partículas de sílica, al realizarle este estudio por 30 días, no presentaba actividad y la enzima inmovilizada retenía aproximadamente el 50 % (Lei *et al.* 2007). Ramírez *et al.* (2013) estudiaron la PNSA a 37°C y determinaron que a los 3 días de realización del experimento la enzima no presentaba actividad y el conjugado retenía el 50 % al transcurrir 10 días.

Estudios similares se han realizado para la CLSA, Dincer y Telefoncu (2007) analizaron la estabilidad de la enzima y su conjugado a 4°C durante 11 días y encontraron que al transcurrir los mismos esta había perdido el 28 % de su actividad, mientras el conjugado no presentaba una pérdida significativa. Al inmovilizar celulasa en quitosana empleando glutaraldehído como agente entrecruzante se determinó que a 4°C y al término de 100 días la enzima y el conjugado

mantenían aproximadamente el 50 % de su actividad inicial, mientras al inmovilizarla en quitina modificada con ácido amino-butírico el conjugado mantuvo un 80 % de su actividad inicial en el mismo período de tiempo (El-Ghaffar y Hashem 2010).

A partir de los resultados alcanzados se puede plantear que fue posible el empleo del soporte Quit-QSA para la inmovilización de las enzimas pectinasa y celulasa utilizando dos vías diferentes. Las formas inmovilizadas incrementaron su estabilidad funcional y en el tiempo a 4 y a 30°C, al compararlas con la enzima nativa. Manifestaron además propiedades operacionales que las convierten en interesantes candidatos para la aplicación práctica de las mismas.

Los resultados fueron superiores en los conjugados preparados por el método de entrecruzamiento con glutaraldehído, al compararlos con los obtenidos por adsorción. La diferencia fue más marcada para la PNSA donde, como se había planteado se determinó una mayor concentración de glutaraldehído necesaria para la formación del conjugado. Esta pudiera ser una de las causas que provocó la variación entre ambas enzimas.

El comportamiento obtenido para la PNSA y CLSA después de ser inmovilizadas en el soporte Quit-QSA, las propone como excelentes candidatos para su aplicación en procesos industriales. Se ha demostrado que el soporte Quit-QSA obtenido por vez primera en esta tesis, puede ser empleado para la inmovilización de enzimas utilizando diferentes técnicas.

3.9.5 Estabilidad operacional del conjugado INV-QSA inmovilizado en un reactor empacado bajo régimen de operación continuo

La estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas en soportes sólidos, para su aplicación en regímenes de operación continuos, es fundamental para su aplicación en procesos industriales. La **Figura 3.22** muestra la estabilidad operacional del conjugado inmovilizado en un reactor empacado, bajo un régimen de operación continuo durante 70 h a 30°C.

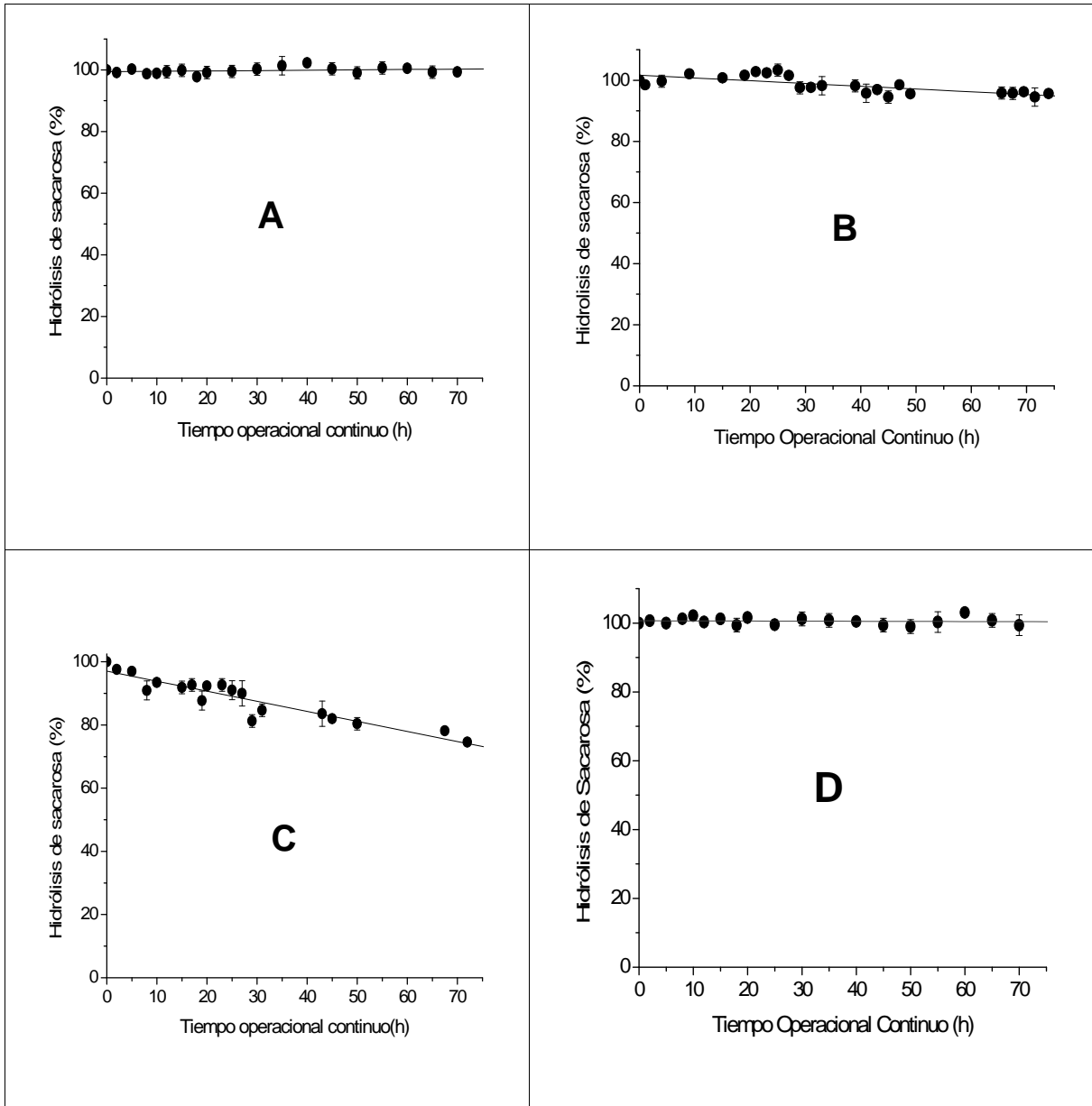


Figura 3.22 Estabilidad operacional de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado a 30°C.

Soportes: A-Quit-CMC, B-Quit-Pc, C-Quit-Alg, D-Quit-HyA.

Al realizar el análisis de los gráficos se observa que los biocatalizadores INV-QSA:Quit-CMC (A) e INV-QSA:Quit-HyA (D) retienen aproximadamente el 100 % de la actividad después de 70 h de operación continua. El tiempo de vida media del reactor ($t_{1/2}$ reactor) estimado en estos casos fue de 170 y 192 días respectivamente para ambos biocatalizadores (**Tabla 3.15**). Los biocatalizadores INV-QSA:Quit-Pc (B) e INV-QSA:Quit-Alg (C) presentaron una mayor disminución en la actividad de la enzima que los analizados anteriormente, respondiendo a una cinética de un proceso de primer orden. Las constantes de velocidad de los procesos de inactivación operacional se muestran en la **Tabla 3.15**. Los ajustes matemáticos de las ecuaciones cinéticas se pueden apreciar en el **Anexo IX**. La reducción más significativa de actividad fue encontrada en el biocatalizador INV-QSA:Quit-Alg (C), el cual a las 70 horas de operación había perdido el 25 % de la actividad de la enzima inmovilizada. El tiempo de vida media del reactor para este biocatalizador fue estimado en 5 días.

En tres de los cuatro soportes preparados para la inmovilización del conjugado INV-QSA se determinaron resultados superiores a los informados por Akgo'ı̇l *et al.* (2001), cuando realizaron un estudio similar para la invertasa inmovilizada en microesferas de alcohol polivinílico. En este caso los autores determinaron que después de 40 horas de operación continua del reactor la enzima inmovilizada había perdido el 17 % de su actividad inicial. El tiempo de vida media del reactor fue estimado en 8 días.

Los resultados logrados para el conjugado inmovilizado son de gran relevancia práctica. La alta estabilidad operacional determinada posibilita su empleo en procesos de producción en continuo, permitiendo la obtención de altas productividades y rendimientos que pueden reducir significativamente el costo de operación en las aplicaciones prácticas de la misma. Según lo

obtenido los biocatalizadores INV-QSA:Quit-CMC y INV-QSA:Quit-HyA pudieran ser utilizados en un sistema continuo para la producción de glucosa y fructosa a partir de sacarosa.

Tabla 3.15 Parámetros de estabilidad operacional de la invertasa inmovilizada.

Parámetro	Inv-Qsa: Quit-CMC x \bar{E} DS (nN5)l	Inv-Qsa: Quit-Pc x \bar{E} DS (nN5)l	Inv-Qsa: Quit-Alg x \bar{E} DS (nN5)l	Inv-Qsa: Quit-HyA x \bar{E} DS (nN5)l
$k_{opi}(h^{-1})$	$1,7 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-3} \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-3} \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-4} \pm 0,6 \times 10^{-5}$
$t_{1/2}$ reactor (días)	$170,0 \pm 2,0$	$23,3 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,1$	$192,0 \pm 7,0$

Los datos reportados son representativos de 5 experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \bar{E} DS.

La literatura refiere que la liberación de grandes cantidades de enzima bajo regímenes operacionales cíclicos o continuos, y consecuentemente la reducción de la actividad catalítica, constituye una de las limitaciones más importante de los métodos no covalentes de inmovilización (Klibanov 1979). Estas consideraciones son determinantes cuando se requiere utilizar enzimas inmovilizadas en procesos industriales como los de producción de alimentos, medicamentos, entre otros, donde es necesario eliminar la posible contaminación de los productos finales.

La invertasa inmovilizada en los soportes sintetizados no es liberada durante los experimentos de régimen operacional continuo y ciclos de reuso, lo que fue comprobado al determinar la concentración de proteínas en la solución de desecho del reactor. Estos resultados se deben a la formación de fuertes interacciones polielectrolíticas entre las cargas positivas de la enzima modificada y los soportes aniónicos sintetizados.

Se puede plantear que los biocatalizadores de invertasa preparados en los cuatro soportes sintetizados mejoraron su estabilidad térmica al compararlos con la enzima nativa. Mostraron una mayor estabilidad operacional y en el tiempo a 4 y a 37°C. Estas formas inmovilizadas pueden ser consideradas como excelentes candidatos para su potencial uso industrial. Los resultados

expuestos proponen a la quitina como un polímero base adecuado para su funcionalización con polímeros aniónicos, los que permitieron la inmovilización del conjugado INV-QSA mediante la formación de complejos polielectrolito. Es de señalar que de manera general los mejores resultados se obtuvieron en el conjugado inmovilizado en el soporte Quit-CMC, el cual fue seleccionado para realizar una valoración económica preliminar de la aplicación del mismo a nivel industrial para la obtención de glucosa. En la **Figura 3.23** se muestra un esquema que resume las etapas del proceso de obtención del biocatalizador INV-QSA:Quit-CMC.

3.10 Valoración de la posible implementación industrial de la hidrólisis enzimática de la sacarosa

El complejo INV-QSA:Quit-CMC se emplea en la valoración de la posible implementación industrial de la hidrólisis enzimática de la sacarosa para la obtención de glucosa. El sistema de inversión enzimático propuesto permite trabajar de forma continua sin adicionar reactivos químicos, eliminando los efectos corrosivos provocados por la inversión ácida y produciendo siropes de mayor calidad, con un impacto favorable sobre el medio ambiente.

El proceso considerado como referencia y sobre el cual se realiza la modificación de la operación es la hidrólisis ácida tradicional de la sacarosa para la obtención de glucosa (glucosa ácida).

3.10.1 Descripción del proceso tecnológico de producción de glucosa y sirope de fructosa mediante hidrólisis ácida

El proceso de inversión ácida de la sacarosa se lleva a cabo con una tecnología de origen nacional que opera en régimen discontinuo. Desarrolla la producción de glucosa y sirope rico en fructosa a partir del azúcar refino, mediante la inversión ácida de la sacarosa. Este método de hidrólisis tiene como inconveniente el empleo de ácido fosfórico a elevada temperatura (85-90°C), lo que

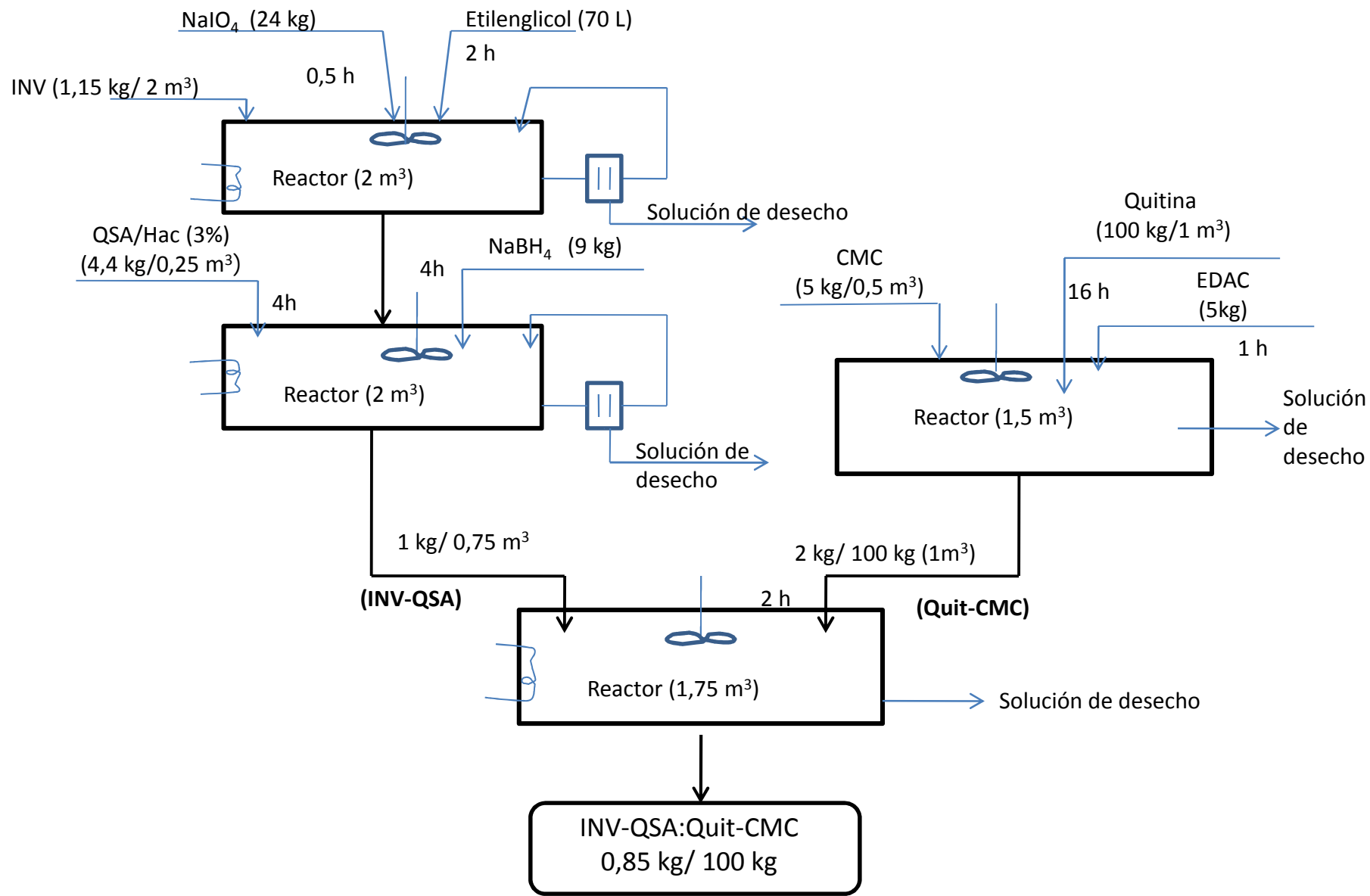


Figura 3.23 Esquema de las etapas del proceso de obtención del biocatalizador INV-QSA:Quit-CMC.

puede originar productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados (Duarte, 1997; Albertini *et al.*, 2012).

En el **Anexo X** se muestran las siete etapas del proceso de producción de glucosa y sirope de fructosa mediante hidrólisis ácida. El azúcar refino se disuelve en un tanque disolutor provisto de agitación mecánica por aire y calentamiento con vapor, posteriormente se efectúa la inversión adicionando ácido fosfórico y se controla la operación hasta que concluya. La solución invertida es bombeada hacia el cristalizador de enfriamiento en primera cristalización hasta una capacidad del 90%, donde se efectúa el enfriamiento por burbujeo de aire. Cuando la temperatura alcance alrededor de 35°C, se bombea hacia los cristalizadores en operación donde se semilla por un pie de semilla existente en cada uno.

Cuando la masa este agotada (15-20 días) se filtra en filtro prensa, aquí se obtiene el sirope rico en fructosa el cual se bombea al tanque de almacenamiento. Las tortas de glucosa se disuelven en el disolutor y se bombean hacia el cristalizador de enfriamiento en segunda cristalización donde se efectúa el enfriamiento por burbujeo de aire y después de alcanzar menos de 40°C, es bombeada a los cristalizadores en operación donde se semilla por un pie de semilla existente en cada uno.

Cuando la masa este agotada (siete días), se purga en centrifuga discontinua. Las aguas madres de la centrifuga es un sirope rico en glucosa el cual es retornado a los cristalizadores de primera cristalización. La glucosa se envasa y se pesa. Debe almacenarse en un lugar seco y fresco.

3.10.2 Modificación de la operación de inversión

Para la valoración económica preliminar de la aplicación del complejo INV-QSA:Quit-CMC en la hidrólisis enzimática de la sacarosa se toma como premisa considerar solo la etapa de inversión. Se propone llevar a cabo la modificación de la operación de hidrólisis ácida por la de

hidrólisis enzimática. En la **Tabla 3.16** se aprecia el listado de los equipos requeridos en las dos tecnologías.

En la hidrólisis enzimática se sustituye el reactor discontinuo (hidrólisis ácida) por un reactor de lecho fijo empacado con el biocatalizador INV-QSA:Quit-CMC, que da la posibilidad de la operación continua. La proyección se realiza a partir del diseño del reactor de invertasa inmovilizada como lecho fijo propuesto. En el **Anexo XI** se muestra el procedimiento seguido en esta investigación. Los parámetros de diseño y las condiciones de operación se muestran en la **Tabla 3.17**.

3.10.3 Valoración económica preliminar

La valoración económica se realiza en dos etapas, en la primera se valora la factibilidad del caso base y en la segunda cómo incide desde el punto de vista económico el tiempo de reemplazo de la enzima.

Se parte de un grupo de premisas: 1-se considera como año de trabajo 170 días, lo cual se corresponde con el tiempo obtenido como tiempo de vida media del biocatalizador (glucosa enzimática). Durante los 170 días de operación del reactor enzimático en el método tradicional de hidrólisis ácida (glucosa ácida) se realizan 85 ciclos de producción trabajando la planta a máxima capacidad (15 ciclos por mes). 2- Solo se toma en cuenta la etapa de hidrólisis de la sacarosa. Los precios estimados para las materias primas, productos y servicios auxiliares en el proceso de hidrólisis de la sacarosa se muestran en el **Anexo XII**.

La **Tabla 3.18** muestra una comparación de los principales indicadores del proceso de obtención de glucosa y fructosa por ambas tecnologías teniendo en cuenta los 170 días de operación.

Para la valoración de la factibilidad económica se toma en cuenta los indicadores recomendados por Peter y Timmerhaus (1991), que permiten efectuar una evaluación preliminar de los procesos

Tabla 3.16 Listado de equipos involucrados en las tecnologías de hidrólisis ácida y enzimática.

Equipos involucrados	Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida
Disolutor con agitación	2	1
Columna	1	-
Bomba	1	1

Tabla 3.17 Parámetros de diseño y condiciones de operación continua del reactor de lecho fijo empacado con el biocatalizador INV-QSA:Quit-CMC

Parámetros	
Tamaño del reactor (m ³)	0.8
Altura del reactor (m)	2
Diámetro del reactor (m)	0,75
Masa de soporte (kg)	106
Masa de enzima(kg)	0,9
Actividad específica del catalizador (U/mg)	1820
Flujo de alimentación(m ³ /h)	2
Concentración de sustrato en alimentación (kg/m ³)	342
Conversión promedio	0,75
Temperatura (°C)	30
pH	4,5

Tabla 3.18 Comparación de los principales indicadores del proceso de obtención de glucosa y fructosa por ambas tecnologías para 170 días de operación

Indicadores	Hidrólisis Enzimática	Hidrólisis Ácida
Consumo de azúcar (T)	2 825	1 913
Consumo de biocatalizador (kg)	107	-
Consumo de ácido fosfórico (L)	-	1 148
Consumo de electricidad (Kw-h)	293 760	37 485
Consumo de vapor (kgv)	-	104 958
Volumen del reactor (m ³)	0.8	28
Temperatura de trabajo (°C)	30	87

Tabla 3.19 Comportamiento de los indicadores económicos: costo de producción (CP), volumen de producción (N), tiempo de operación (t_{OP}), valor de la producción (VP) y costo operacional/peso producido (cpp) para la obtención de la glucosa ácida y enzimática.

Indicador	Glucosa enzimática	Glucosa ácida
Costo de producción (\$)	1 528 390,06	1 022 786,84
Volumen de producción (t/d)	24,5	20,0
Tiempo de operación(d)	170	170
Valor de la producción (\$)	3 061 255,05	1 250 392,50
Costo operacional/peso	0,51	0,82

analizados. Los mismos se muestran en la **Tabla 3.19**. La estimación de los costos de amortización se realiza considerando lo recomendado por Turton y Bailie (2009), en el caso del reactor enzimático se utilizaron los datos aportados por el diseño del mismo.

El volumen de producción y el valor de la producción en ambos procesos se determinan considerando la obtención de glucosa y de sirope de fructosa. Los precios de venta utilizados se corresponden con los establecidos en la planta de glucosa ácida (**Anexo XIII**).

Como se puede apreciar en la **Tabla 3.19**, el costo de producción de la glucosa enzimática es superior en aproximadamente un 33 % al de la ácida. Esto se debe, fundamentalmente, a que el proceso opera en régimen continuo lo que requiere un mayor volumen de sacarosa para procesar, con un incremento en el costo de la materia prima; la presencia de dos disolutores, lo que origina un mayor consumo de electricidad y un incremento en el costo por concepto de salario.

No obstante el incremento del costo de producción de la glucosa enzimática, se puede apreciar que el valor de la producción de la misma supera en 2,4 veces al obtenido en el proceso de la glucosa ácida. Esto se debe principalmente, como se había expresado, a un proceso de operación continuo, donde se obtiene una mayor producción en un tiempo de trabajo determinado. En ambos procesos el costo operacional/peso, una particularidad del indicador costo/peso, muestra el costo de un peso producido es menor que la unidad. Sin embargo, este valor es inferior (0,51) en la operación de la hidrólisis enzimática con respecto a la ácida (0,82) debido al incremento del valor de la producción.

En una segunda etapa de la valoración se determina cómo influye en el indicador de costo operacional/peso dos factores: tiempo de cambio de la enzima e incremento en el costo del soporte. El análisis se lleva a cabo previendo errores a la hora de la estimación del costo del soporte.

La evaluación económica se realiza suponiendo incrementos de un 40 y un 100 % del costo del soporte. Los valores determinados se muestran en la **Tabla 3.20**. Como un ciclo se consideran los 170 días fijados previamente como año de trabajo. Los intervalos de días corresponden con los cambios de la conversión en el tiempo y con ello la producción de glucosa obtenida cada 170 días de trabajo, así como el costo operacional/peso en dependencia de la variante analizada. Los tiempos que corresponden a los intervalos de conversión obtenidos a partir del procesamiento matemático de la ecuación que responde al modelo de cinética operacional de la invertasa inmovilizada en el soporte de quitina-carboximetilcelulosa (**Anexo IX**).

En la tabla se aprecia como varía la conversión en el tiempo y con ello la cantidad de glucosa obtenida, así como el costo operacional/peso para las alternativas analizadas. Desde el punto de vista técnico y económico se puede determinar en qué momento es más factible realizar los cambios del biocatalizador empleado como lecho fijo. Al concluir los primeros 13 días de operación se observa una tendencia a la disminución de la producción y al incremento en el costo operacional/peso del producto. Sin embargo, se aprecia que existen dos opciones donde pueden obtenerse los mejores rendimientos del proceso, los cuales serían al término del día 26 o al transcurrir 40 días de operación.

A los 26 días de trabajo se obtiene el menor valor de costo operacional/peso en el proceso, con la mayor cantidad de glucosa obtenida en el ciclo de 170 días y con un porcentaje de conversión en correspondencia con el obtenido en el proceso de hidrólisis ácida de la sacarosa, sin embargo requeriría realizar una mayor cantidad de paradas para el reemplazo del biocatalizador que si este se mantuviera operando 40 días ininterrumpidamente, al final de los cuales se obtiene un costo operacional/peso y un porcentaje de conversión similar al anterior, lo que no traería consigo inconvenientes en el resto de las etapas de obtención de la glucosa. Las restantes opciones pueden

Tabla 3.20 Comportamiento del costo operacional/peso para la producción de glucosa enzimática considerando incrementos de un 40 y 100% del precio del soporte, para diferentes períodos de reemplazo del biocatalizador.

Días	Conversión (%)	Masa de glucosa / ciclo de 170 días (T)	Costo operacional/peso del proceso al variar costos del soporte		
			Estimado	Con un 40 % de incremento	Con un 100 % de incremento
0-13	100-95	2 516,80	0,3970	0,4000	0,4020
14-26	95-90	2 554,02	0,3950	0,3960	0,3970
27-40	90-85	2 510,91	0,4090	0,4100	0,4110
41-55	85-80	2 429,25	0,4190	0,4192	0,4200
56-71	80-75	2 431,95	0,4230	0,4235	0,4240
72-88	75-70	2 309,70	0,4470	0,4479	0,4484
89-106	70-65	2 264,10	0,4566	0,4569	0,4574
107-125	65-60	2 093,00	0,4940	0,4943	0,4950
126-147	60-55	2 072,36	0,4990	0,4992	0,5000
148-170	55-50	2 016,00	0,5140	0,5150	0,5160

ser tomadas en cuenta de acuerdo a las condiciones y disponibilidad del soporte que pudieran existir en un determinado momento, o en dependencia de las características del producto final que se requiere obtener después del proceso de hidrólisis.

El costo del soporte no pone en peligro la aplicación de la hidrólisis enzimática, aun duplicando su precio el costo operacional/peso de la glucosa enzimática sigue siendo inferior a la glucosa ácida en todas las variantes analizadas. El análisis económico preliminar realizado evidencia la factibilidad del proceso que se propone y muestra no solo la superioridad técnica, sino también económica de la propuesta analizada.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron nuevos soportes de quitina-polímero aniónico a través de la formación de enlaces amida entre la quitina y la carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio y ácido hialurónico. Se sintetizó el soporte Quitina-Quitosa a través de la formación de enlaces covalentes.
2. Se incrementó la estabilidad funcional de la invertasa, lo cual se reflejó en un aumento del valor de T_{50} entre 9 y 10°C, así como una mayor resistencia a la inactivación térmica al inmovilizar el conjugado invertasa-quitosa en los soportes quitina-polímero aniónico.
3. La estabilidad funcional de la pectinasa y la celulasa se incrementó al inmovilizarlas sobre el soporte quitina-quitosa. Los conjugados obtenidos mediante unión covalente mostraron propiedades superiores a los formados por el método de adsorción.
4. Se comprobó que la inmovilización del conjugado invertasa-quitosa incrementa la estabilidad operacional de la enzima, aumentando la estabilidad durante el almacenamiento y posibilitando el reuso de la misma. Los mejores resultados se obtuvieron para el complejo invertasa-quitosa-quitina-carboximetilcelulosa.
5. Se comprobó que los conjugados de pectinasa y celulasa incrementaron la estabilidad operacional de las enzimas nativas, lo que posibilita la aplicación práctica de los mismos. La mayor estabilización se alcanzó en el conjugado pectinasa-quitina-quitosa por entrecruzamiento el cual retuvo 70 % de su actividad inicial después de 15 ciclos de reuso.
6. El análisis económico preliminar realizado mostró la superioridad del proceso de hidrólisis enzimática de la sacarosa, empleando para ello el complejo invertasa-quitosa-quitina-carboximetilcelulosa

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el uso de los conjugados de pectinasa y celulasa sintetizados en procesos de interés industrial.
2. Escalar el proceso de obtención de los biocatalizadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Abdou, E. S., Nagy, Kh., Elsabee, M. (2008) Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99(5): 1359–1367.
2. Akgo'1, S., Kacar, Y., Denizli, A., Arica, M. (2001) Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry* 74: 281–288.
3. Albertini, A., Cadena, P., Silva, J., Nascimento, G., Reis, A., Freire, V., Santos, R., Martins, J. L., Cavada, B., Neto, P., Pimentel, M., Martínez, C., Porto, A., Filho, J.V. (2012) Performance of invertase immobilized on glass–ceramic supports in batch bioreactor *Chemical Engineering Journal* 187: 341– 350.
4. Albertini, A., Silva, J., Freire, V., Santos, R., Martins, J., Cavada, B., Cadena, P., Neto, P., Pimentel, M., Martínez, C., Porto, A., Filho, J. V. (2013) Immobilized invertase studies on glass–ceramic support from coal fly ashes. *Chemical Engineering Journal* 214: 91–96.
5. Alijotas-Reig, J. Hindie, M., Kandhaya-Pillai, R., Miro-Mur, F. (2010) Bioengineered hyaluronic acid elicited a nonantigenic T cell activation: implications from cosmetic medicine and surgery to nanomedicine. *Journal Biomedical Mater Res A* 95(1): 180-190.
6. Aguilera, J. Estévez, C. (2014) La Biotecnología Industrial: una realidad hoy, una necesidad mañana. *Biotech Magazine*. Publicaciones M K M. Consultado: mayo de 2014. Disponible *on line*: <http://www.mkm-pi.com/biotech/la-biotecnologia-industrial-una-realidad-hoy-una-necesidad-mañana/>

7. Alves, N. M., Mano, J. F. (2008) Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 401–414.
8. Arica, M. Y., Bayramoglu, G. (2006) Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA–MMA) beads for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38: 131-138.
9. Amaya-Delgado, L., Hidalgo, M., Montes-Horcasitas, M. (2006) Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry* 99: 299-304.
10. Arslan, A., Kıralp, S., Toppare, L., Bozkurt, A. (2006) Novel conducting polymer electrolyte biosensor based on poly(1-vinylimidazole) y poly (acrylic acid) networks. *Langmuir* 22: 2912-2915.
11. Arroyo, M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39(2): 23-29.
12. Awad, G., Amer, H., El-Gammal, E., Helmy, W., Esawy, M., Elnashar, M. (2013) Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. *Carbohydrate Polymers* 93: 740-746.
13. AZCUBA. 2014 Contrato marco de suministros. AZCuba, Matanzas, noviembre de 2014.
14. Azodi, M., Falamaki, C., Mohsenifar, A. (2011) Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69: 154–160.
15. Bagal, D., Karve, M. S. (2006) Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose–guar gum biopolymer membrane. *Analytica Chimica Acta* 555: 316-321.

16. Bagal-Kestwal, D., Kestwal, R., Chiang, B., Karve, M. (2011) Development of dip-strip sucrose sensors: Application of plant invertase immobilized in chitosan–guar gum, gelatin and polyacrylamide films. *Sensors and Actuators B: Chemical* 160(1): 1026-1033.
17. Barbucci, R., Leone, G., Vecchiullo, A. (2004) Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery. *Journal Biomaterial Science Polymer* 15: 607-619.
18. Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K., Roberts, G. (1992) Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 14: 166-169.
19. Bayramoglu, G., Akgöl, S., Bulut, A., Denizli, A., Arica, M. (2003) Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochemical Engineering* 14: 117-126.
20. Bayramoglu, G., Senkal, B., Arica, M. (2013) Preparation of clay–poly(glycidyl methacrylate) composite support for immobilization of cellulase. *Applied Clay Science* 85: 88-95.
21. Bernfeld, P. (1955) Amylases α - and β -. *Methods Enzymology* 1: 149-158.
22. Betancor, L., Luckarift, H. R. (2008) Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology* 26(10): 566-572.
23. Bhat, M. K., Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* 15(3/4): 583-620.
24. Bhatti, H. N., Asgher, M., Abbas, A., Nawaz, R., Sheikh, M. (2006) Studies on Kinetics and Thermostability of a Novel Acid Invertase from *Fusarium solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4617-4623.
25. Bohinski, R. C. (1987) *Bioquímica*. 2da Edición. Addison–Wesley Iberoamericana.

26. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
27. Brady, D., Jordaan J. (2009) Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters* 31: 1639-1650.
28. Busto, M. D., García-Tramontín, K., Ortega, N., Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresource Technology* 97: 1477-1483.
29. Cadena, P. G., Jeronimo, R., Melo, J., Silva, R., Filho, J., Pimentel, M. (2010) Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresource Technology* 101: 1595-1602.
30. Cadena, P. G., Wiggers, F., Silva, R., Filho, J., Pimentel, M. (2011) Kinetics and bioreactor studies of immobilized invertase on polyurethane rigid adhesive foam. *Bioresource Technology* 102(2): 513-518.
31. Cao, L. (2005) Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 217-226.
32. Capitani, C., Perez, O., Pacheco, B., Pilosof, M. R. (2007) Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 21: 1344-1354.
33. Celebi, M., Kaya, M., Altikatoglu, M., Yildirim, H. (2013) Enzymatic Decolorization of Anthraquinone and Diazo Dyes Using Horseradish Peroxidase. Enzyme Immobilized onto Various Polysulfone Supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 716-730.

34. Cen, L., Neoh, K., Li, Y., Ka, E. (2004) Assessment of in Vitro Bioactivity of Hyaluronic Acid and Sulfated Hyaluronic Acid Functionalized Electroactive Polymer. *Biomacromolecules* 5: 2238-2246.
35. Chávez, M. C., Díaz, J., Perez, U., Delfín, J. (1990) *Temas de Enzimología. Tomo I.* Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
36. Chen, H., Qiu, W. (2010) Key technologies for bioethanol productions from lignocelluloses. *Biotechnology Advances* 28: 556-562.
37. Cheng, Ch., Chang, K. (2013) Development of immobilized cellulase through functionalized goldnano-particles for glucose production by continuous hydrolysis of waste bamboo chopsticks. *Enzyme and Microbial Technology* 53: 444– 451.
38. Chico, B. (2005) Preparación enzimática de filmes biodegradables de quitosana y proteínas del suero de la leche. Aplicaciones Medioambientales. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Químicas. Universidad de Matanzas, Cuba. Universidad de Girona, España.
39. Chitunda, B. (2002). Ingeniería de biocatalizadores y bioprocesos: -galactosidasa de *Thermussp.*, cepa T2. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Químicas. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
40. Choi, K. Y., Min, K., Yoon, H., Kim, K. (2011) PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. *Biomaterials* 32(7): 1880-1889.
41. Chu, F. K., Watorek, W., Maley, F. (1983) Factors affecting the oligomeric structure of yeast external invertase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 223: 543-555.
42. Coenen, G. J., Bakx, E., Verhoef, R., Schols, H., Voragen, A. (2007) Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* 70: 224-235.

43. Combo, M. M., Aguedo, M., Goffin, D., Wathelet, B., Paquot, M. (2012) Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing* 90(3): 588-596.
44. Cordovéz-Herrera, M., Sáenz-Coopat, T., Cabello-Balbín, A. (2013) Los derivados de la caña de azúcar en Cuba. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 47(3): 31-37.
45. Danisman, T., Tan, S., Kacar, Y., Ergene, A. (2004) Covalent immobilization of invertase on microporous HEMA–GMA membrane. *Food Chemistry* 85: 461-466.
46. Daoud, F-B., Kaddour, S., Sadoun, T. (2010) Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75: 93-99.
47. Darias, R., Villalonga, R. (2001) Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76: 489-493.
48. Das, S., Ng, K. Y. (2010) Impact of glutaraldehyde on in vivo colon-specific release of resveratrol from biodegradable pectin-based formulation. *Journal of Pharmaceutical Science* 99(12): 4903-4916.
49. Datta, S., Christena, R., Rani, Y., Rajaram, S. (2012) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. DOI 10.1007/s13205-012-0071-7.
50. David, A. E., Wang, N., Yang, V., Yang, A. (2006) Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of Biotechnology* 125: 395-407.
51. Davidovich-Pinhas, M., Bianco-Peled, H. (2011) Alginate–PEGAc: A new mucoadhesive polymer. *Acta Biomaterialia* 7: 625-633.

52. Demirel, D., Mutlu, M. (2005) Performance immobilized pectinex ultra SP-L on magnetic duolite-polystyrene composite particles. Part II: A magnetic fluidized bed reactor study. *Journal of Food Engineering* 70: 1-6.
53. Dickensheets, P. A., Chen, L., Tsao, G. (1977) Characteristics of yeast invertase immobilized on porous cellulose beads. *Biotechnology and Bioengineering* 19: 365-375.
54. Dincer, A., Telefoncu, A. (2007) Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45: 10-14.
55. Dizge, N., Gunaydin, O., Yilmaz, F., Tanriseven, A. (2008) Immobilization of invertasa onto poly(3-methylthienylmethacrylate) /poly(3-thiopheneacetic acid) matrix. *Biochemical Engineering Journal* 40: 64-71.
56. D'Souza, S. F., Godbole, S. S. (2002) Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 52: 59-62.
57. D'Souza, J. R., Carvalho, J., Trevisan, M., Paula, R., Ricardo, N., Feitosa, J. (2009) Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids* 23: 2278-2286.
58. Duarte, E. (1997) Siropes Invertidos. Pasado y presente. *Revista ATAC*.47.
59. Dubois, M. K., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
60. Eisenhaber F., Bork P. (1999) *Biotechnology*. Second Edition. Volume 5a. Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic Genes. Sequence and Structure of proteins.
61. Ele-Ekouna, J. P., Pau-Roblot, C., Courtois, B., Courtois, J. (2010) Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*). *Carbohydrate Polymers* 83(3): 1232-1239.

62. El-Ghaffar, M. A. A., Hashem, M. S. (2010) Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. *Carbohydrate Polymers* 81: 507-516.
63. Emregul, E. Sungur, S., Akbulut, U. (2006) Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry* 97: 591-597.
64. Esawy, M. A., Gamal, A., Kamel, Z., Ismail, A., Abdel-Fattah, A. (2013) Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes. *Carbohydrate Polymers* 92(2): 1463-1469.
65. Fagain, C. O., Kennedy, R. (1991) Functionally-stabilized proteins-A review. *Biotech Advance* 9: 351-409.
66. Ferguson, E. L., Alshame, A., Thomas, D. (2010) Evaluation of hyaluronic acid-protein conjugates for polymer masked-unmasked protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 402(1-2): 95-102.
67. Figueira, J., Dias, F., Sato, H., Fernandez, P. (2011) Screening of supports for the immobilization of α -glucosidase. *Enzyme Research* 1-8.
68. Fernández, E., Gonzales, G., Mayo, O. (2002) Ingeniería Económica para Ingenieros Químicos. Facultad de Ingeniería Química. CUJAE. Ciudad de la Habana.
69. Fernández, P. (2010) Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzyme Research* 1-19.
70. Fishman, M. L. (1988) Chemical and physical properties of pectin. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 1: 215-219.

71. Fraeye, I., Duvetter, Th., Dounsla, E., Loey, A., Hendrickx, M. (2010) Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology* 21: 219-228.
72. Franco, A. P., Ramalho Merce, A. L (2006) Complexes of carboxymethylcellulose in water.1: Cu^{2+} , VO^{2+} and Mo^{6+} . *Reactive & Functional Polymers* 66: 667-681.
73. Gasesa, P., Hubble, J. (1990) Tecnología de las Enzimas, Editorial acribis. S. A., Segunda Edición, Zaragoza, España.
74. Gatej, I., Popa, M., Rinaudo, M. (2005) Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 6: 61-67.
75. Ghosh, B., Ray, R. R. (2010) Saccharification of raw native starches by extracellular isoamylase of *Rhizopusoryzae*. *Biotechnology* 9: 224-228.
76. Girelli, A. M., Mattei, E. (2005) Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B* 819: 3-16.
77. Gómez, L., Villalonga, R. (2000) Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin. *Biotechnology Letters* 22: 1191-1195.
78. Gómez, L. Ramírez, H. L., Villalonga, R. (2000) Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan. *Biotechnology Letters* 22: 347-350.
79. Gómez, L., Ramírez, H. L., Villalonga, R. (2001) Modification of α -Amylase by Sodium Alginate. *Acta Biotechnological* 21(3): 265-273.
80. Gonzáles, P. (2000) Estudio del complejo polielectrolito entre quitosana y pectina. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. Ciudad de la Habana.
81. González, R. A. (2003) Principios Básicos de Escalado. Centro de Estudios de Combustión y Energía (CECYEN). Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

82. Gopinath, S., Sugunan, S. (2007) Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science* 35: 67-75.
83. Grasdalen, H., Larsen, B., Smidsrod, O. (1979) A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research* 68: 23-31.
84. Grasdalen, H. (1983) High-field, ¹H-N.M.R. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research* 338: 2325-2336.
85. Grasdalen, H., Bakoy, O., Larsen, B. (1988) Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectin by ¹H-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research* 184: 183-191.
86. Guang, Y., Wu, J., Xu, G., Yang, L. (2010) Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78: 351-356.
87. Hajós, P., Horvath, O., Revesz, G. (1998) Chemical equilibria in ion chromatography: Theory and applications. In: *Advances in Chromatography*. Vol. 39, chapter 6. P. R. Brown, E. Grushka, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, pág. 311-350.
88. Ham, W., He, M. (2010) The applications of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decompositions. *Bioresource Technology* 101: 3724-3731.
89. Hahn, S. K., Hoffman, S. H. (2005) Preparation and characterization of biocompatible complex multilayer of hyaluronic acid and poly-l-lysine polyelectrolyte. *International Journal of Biological Macromolecules* 37: 227-231.

90. Hamerska-Dudra, A., A. Bryjak, J., Trochimczuk, A. (2006) Novel method of enzymes stabilization on crosslinked thermosensitive carriers. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 921-925.
91. Harsa, S., Furusaki, S. (1995) Bioaffinity adsorption behavior of several enzymes onto β -cyclodextrin-chitosan. *Separation Science and Technology* 30: 2695-2706.
92. Heatley, F., Scott, J., Casu, B. (1979) ^1H -NMR spectra of glycosaminoglycan monomers and dimers in solution in methyl sulphoxide and water. *Carbohydrate Research* 72: 13-23.
93. Heinze, T., Erler, U., Nehls, I., Klemm, D. (1994) Determination of the substituent pattern of heterogeneously and homogeneously synthesized carboxymethyl cellulose by using high-performance liquid chromatography. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 215: 93-106.
94. Henriques, R. D., Nieto, O. M. (1980) Método para obtención de quitina suficientemente pura. Patente cubana No. 20760.
95. Hernández, J. E. (2013) Modelamiento y simulación de un biorreactor piloto de lecho fijo para la obtención de jarabes de fructosa a partir de almidón de yuca. Tesis en opción al Título Académico de Máster en Ciencias Agroalimentarias con énfasis en Ingeniería. Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
96. Ho, F. F. L., Klosiewics, D. W. (1980) Proton nuclear magnetic resonance spectrometry for determination of substituents and their distribution in carboxymethylcellulose. *Analytical Chemistry* 52: 913-916.
97. Holtan, S., Zhang, Q., Strand, W., Skjåk-Bræk, G. (2006) Characterization of the Hydrolysis Mechanism of Polyalternating Alginate in Weak Acid and Assignment of the Resulting MG-Oligosaccharides by NMR Spectroscopy and ESI-Mass Spectrometry. *Biomacromolecules* 7: 2108-2121.

98. Horovitz, D., Magalhães, T., Acosta, R. A., Giuliani, L., Palhares, D., Kim, Ch., Paula, A., Kerstenestzy, M., Pianovski, M., Costa, M., Santos, F., Martins, A., Aranda, C., Neto, J., Holanda, G., Cardoso Jr., L., Silva, C., Bonatti, R., Ribeiro, B., Rodrigues, M., Llerena, J. (2013) Enzyme replacement therapy with galsufase in 34 children younger than five years of age with MPS VI. *Molecular Genetics and Metabolism* 109(1): 62-9.
99. Hradil, J., Svec, F. (1981) Inversion of sucrose with α -D-fructofuranosidase (invertase) immobilized on bead DEAHP-cellulose: batch process. *Enzyme and Microbial Technology* 3: 331-335.
100. Hsieh, H-J., Liu, P., Liao, W. (2000) Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters* 22: 1459-1464.
101. Illanes, A., Wilson, L. (2004) Reactores Enzimáticos. Colección Tópicos en Biotecnología. Editorial Casa abierta al tiempo. México. 175-213.
102. Ince, A., Bayramoglu, G., Karagoz, B., Altintas, B., Bicak, N., Arica, M. (2012) Method for fabrication of PANI coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization. *Chemical Engineering Journal* 189-190: 404-441.
103. Isik, S., Alkan, S., Toppare, L., Cianga, I., Yagci, Y. (2003) Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal* 39: 2375-2381.
104. Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., Tamura, H. (2007) Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules* 40: 175-181.
105. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P., Nair, S., Tamura, H. (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* 29(3): 322-337.

106. Junde, W., Yujin, W., Zhaohui, Sun. (1994) Preparation of chitosan-bonded and chitosan-coated high performance liquid chromatography (HPLC) packings and their applications to separation of biopolymers. *Chinese Journal of Chromatography* 12: 327-329.
107. Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E., Hasirci, N. (2012) Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science* 123(2): 707-716.
108. Kasaai, M. R. (2008) A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 71: 497-508.
109. Kasaai, M. R. (2010) Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers* 79: 801-810.
110. Kaur, G., Kumar, S., Satyanarayana, T. (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichumthermofile* Apinis. *Bioresource Technology* 94: 239-243.
111. Karmakar, M., Ray, R. R. (2010) Characterization of extracellular thermostable endoglucanase from *Rhizopusoryzae* using response surface methodology. *Research and Reviews in BioSciences* 4: 50-55.
112. Karmakar, M., Ray, R. R. (2011) Current Trends in Research and Applications of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6(1): 41-53.
113. Kennedy, I. F., Cabral, J. M. S. (1983) Immobilized cells and enzymes. A practical approach. Ed. 3. Woodward, IRL Press, 19-54.
114. Khan, A. A., Alzohairy, M. A. (2010) Recent advances and applications of immobilized enzymes technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences* 5(8): 565-575.

115. Kharrat, N., Ali, Y., Marzouk, S., Gargouri, Y., Karra-Châabouni, M. (2011) Immobilization of *Rhizopusoryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry* 46(5): 1083-89.
116. Kim, J., Kim, J., Lee, J., Shin, S., Na, H., Hyeon, T., Park, H., Chang, H. (2008) One-dimensional crosslinked enzyme aggregates in SBA-15: Superior catalytic behavior to conventional enzyme immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials* 111: 18-23.
117. Kim, K. S., Park, S., Yang, J., Jeon, J., Bhang, S., Kim, B., Hahn, S. (2011) Injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Biomaterialia* 7(2): 666-674.
118. Kika, K., Korlos, F., Kiosseoglou, V. (2007) Improvement by dry-heating, of the emulsion-stabilizing properties of a whey protein concentrate obtained through carboxymethylcellulose complexation. *Food Chemistry* 104: 1153-1159.
119. Klibanov, A. M. (1983) Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advance Applied Microbiology*. 29: 1-28.
120. Kobayashi, M. Yanagihara, Sh., Ichishima, E. (1989) Preparation of Taka-amylase A attached to carboxymethyl dextran by water-soluble carbodiimide. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3133-3138.
121. Kotwal, S. M., Shankar, V. (2009) Immobilized invertase. *Biotechnology Advances* 27: 311-322.
122. Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126-139.
123. Krajewska, B. (2005) Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology* 41: 305-312.

124. Kulicke, W. M., Kull, A., Kull, W., Thielking, H., Engelhardt, J., Pannek, J. (1996) Characterization of aqueous carboxymethylcellulose solution in terms of their molecular structure and its influence on rheological behaviour. *Polymer* 37: 2723-2731.
125. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. (2010) Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Mar Drugs* 8(5): 1567-1636.
126. Kurita, K., Sannan, T., Iwakura, Y. (1977) Studies on chitin, 4: Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Die Makromolekulare Chemie* 178: 3197-3202.
127. Labus, K., Gancarz, I., Bryjak, J. (2012) Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamides membranes. *Materials Science and Engineering C* 32: 228-235.
128. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2006) *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. Worth Publishers.
129. Lei, Z., Bi, S. (2007) The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1442-1447.
130. Lei, Z., Bi, S. (2007a) Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-b-PAA diblock copolymers. *Journal of Biotechnology* 128: 112-119.
131. Lei, Z., Bi, S., Yang, H. (2007) Chitosan-tethered the silica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Food Chemistry* 104: 577-584.
132. Li, C., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., Nakao, K. (2007) Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresource Technology* 98: 1366-1372.

133. Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M., Zhang, Ch. (2007) Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters* 29: 1413-1416.
134. Li, T., Li, S., Wang, N., Tain, L. (2008) Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry* 109: 703-708.
135. Li, Y., Hu, M., Du, Y., Xiao, H., Mc Clements, D. (2011) Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. *Food Hydrocolloids* 25(1): 122-130.
136. Lin, T-Y., Wu, Ch., Brennan, J. (2007) Entrapment of horseradish peroxidase in sugar-modified silica monoliths: Toward the development of a biocatalytic sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1861-1867.
137. Liu, H., Zhang, L., Takaragi, A., Miyamoto, T. (1997) Water solubility of regioselectively 2,3-O-substituted carboxymethylcellulose. *Macromolecular Rapid Communications* 18: 921-925.
138. Liu, J., Cao, X. (2013) Biodegradation of microcrystalline cellulose in pH-pH recyclable aqueous two-phase systems with water-soluble immobilized cellulase. *Biochemical Engineering Journal* 79: 136-143.
139. Liu, L., Liu, D., Wang, M., Du, G., Chen, J. (2007) Preparation and characterization of sponge-like composites by cross-linking hyaluronic acid and carboxymethylcellulose sodium with adipic dihydrazide. *European Polymer Journal* 43: 2672-2681.
140. Liu, K., Zhao, G., He, B., Chen, L., Huang, L. (2012) Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking. *Bioresource Technology* 123: 616-619.

141. López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso, N., Dellamora, G., Guisan, J., Fernández-Lafuente, R. (2005). Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology* 119: 70-75.
142. López-Munguía, A. (2004) Reactores Enzimáticos. Colección Tópicos en Biotecnología. Editorial Casa abierta al tiempo. México. 11-36.
143. López Isunza, F., Flores y de Hoyos, S. (2004) Reactores Enzimáticos. Colección Tópicos en Biotecnología. Editorial Casa abierta al tiempo. México. 37-92.
144. Ludwig, A. (2005) The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advance Drug Delivery Reviews* 57: 1595–1639.
145. Madyastha, K. M., Ganguli, A., Kubair, V., Kowser, N., Vidya, D. (1987) Extracellular invertase from *Aspergillus thecicus*: isolation and immobilization. *Biotechnology Letters* 9: 555-560.
146. Maeda, H., Suzuki, H., Sakimae, A. (1973) Preparation of immobilized invertase. *Biotechnology and Bioengineering* 15: 403-412.
147. Maleki, A., Kjøniksen, A., Nystrom, B. (2007) Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents. *Carbohydrate Research* 342: 2776-2792.
148. Mansour, E. H., Dawoud, F. M. (2003) Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 446-450.
149. Markowska, J., Madry, R., Markowska, A. (2011) The effect of hyaluronic acid (Cicatridine) on healing and regeneration of the uterine cervix and vagina and vulvar dystrophy therapy. *European Journal of Gynecological Oncology*. 32(1): 65-68.

150. Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., Gutiérrez, E. (2011) Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU* 1: 53-58.
151. Marshall, J. J., Rabinowitz, M. L. (1975) Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate. *Archives of Biochemistry Biophysics* 167: 777-779.
152. Marshall, J. J. (1978) Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate. *Trends Biochemistry Science* 3: 79-81.
153. Márquez, L. D. S., Cabral, B., Freitas, F., Cardoso, V., Ribeiro, E. (2008) Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 51: 86-92.
154. Mata, Y. N., Blázquez, M., Ballester, A., González, F., Muñoz, J. (2009) Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: preparation and determination of biosorption and desorption characteristics. *Chemical Engineering Journal* 150(2-3): 289-301.
155. Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J. (2000) Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support polyethyleneimine composites. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 98-105.
156. Mateo, C., Palomo, J., Lorente, G., Guisan, J., Fernández-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1451-1463.
157. Melo, J. S., D'Souza, S. F. (2000) A simple approach for the simultaneous isolation and immobilization of invertase using crude extracts of yeast and Jack bean meal. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 42: 133-135.

158. Mi, F. L., Sung, H., Shyu, Sh. (2002) Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers* 48: 61-72.
159. Milovanovic, A., Bozic, N., Vujcic, Z. (2007) Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food Chemistry* 104: 81-86.
160. Moehlenbrock, M. J., Minter, S. D. (2011) Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. *Methods in Molecular Biology* 679: 1-7.
161. Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 266-277.
162. Mohd Zain, N. A., Suhaimi, M., Idris, A. (2011) Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochemistry* 46(11): 2122-2129.
163. Montoro-Garcia, S., Gil, F., Navarro, J., Rubio, V., García, F., Sánchez, Á. (2010) Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl b-lactam antibiotics intermediates. *Bioresource Technology* 101: 331-336.
164. Mourya, V. K., Inamdar, N. N. (2008) Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers* 1013-1051.
165. Munarin, F., Guerreiro, S., Grellier, M., Tanzi, M., Barbosa, M., Petrini, P., Granja, L. (2011) Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules* 12(3): 568-577.
166. Munishwar, N., Meryam, S. (2003) Evaluation of a smart bioconjugate of pectinase for chitin hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 16: 319-325.
167. Muzzarelli, R. A. A. (1997) The determination of minute quantities of chitin in tissues. In: *Chitin Handbook*. R. A. A. Muzzarelli, M. G. Peter, eds., European Chitin Society, 15-25.

168. Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Gupta, V. (2012) Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochemistry* 47(9): 1402-10.
169. Naumov, D. G., Doroshenko, V. G. (1998) β -Fructosidases: A new superfamily of glycosyl hydrolases. *Molecular Biology* 32: 761-766.
170. Nelson, J. M., Griffin, E. G. (1916) Adsorption of invertase. *Journal American Chemical Society* 38: 1109-1115.
171. Ogeda, T. L., Silva, I., Fidale, L., Seoud, O., Petri, D. (2012) Effect of cellulose physical characteristics, especially the water sorption value, on the efficiency of its hydrolysis catalyzed by free or immobilized cellulase. *Journal of Biotechnology* 157: 246-252.
172. Ogushi, Y., Sakai, S., Kawakami, K. (2007) Synthesis of Enzymatically-Gellable Carboxymethylcellulose for Biomedical Applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104: 30-33.
173. Ohya, S., Nakayama, Y., Matsuda, T. (2001) Thermoresponsive Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering: Hyaluronic Acid Bioconjugated with Poly(N-isopropylacrylamide) Grafts. *Biomacromolecules* 2: 856-863.
174. Olcer, Z., Ozmen, M., Sahin, Z., Yilmaz, F., Tanriseven, A. (2013) Highly Efficient Method Towards In Situ Immobilization of Invertase Using Cryogelation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 2142-2152.
175. Osman, B., Kara, A., Uzun, L., Besirli, N., Denizli, A. (2005) Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37: 88-94.

176. Paljevac, M., Primožic, M., Habulin, M., Novak, Z., Knez, Z. (2007) Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulose immobilized on silica gels at low and high pressures. *Journal of Supercritical Fluids* 43: 74-80.
177. Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M., Sannia, G. (1994) A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 151-158.
178. Peniche C. A. (2006) Estudios sobre quitina y quitosana. Trabajo presentado para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de la Habana. Cuba.
179. Peters, M. S., Timmerhaus, K. D. (1991). Plant Design and Economics for chemical Engineers. 4th Ed. Singapore: McGraw-Hill.
180. Peng, D., Lan, Zh., Guo, Ch., Yang, Ch., Dang, Zh. (2013) Application of cellulase for the modification of corn stalk: Leading to oil sorption. *Bioresource Technology* 137: 414-418.
181. Polakovic, M., Vrabel, P. (1996) Analysis of the Mechanism and Kinetics of Thermal Inactivation of Enzymes: Critical Assessment of Isothermal Inactivation Experiments *Process Biochemistry* 31(8): 787-800.
182. Prieto, C. A.; Guadix, E. M., Guadix, A. (2008) Influence of temperature on protein hydrolysis in a cyclic batch enzyme membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal* 42 (3): 784-787.
183. Rai, A., Prabhune, A., Perry, C. (2012) Entrapment of commercially important invertase in silica particles at physiological pH and the effect of pH and temperature on enzyme activity. *Materials Science and Engineering C*. 32(4): 785-789.
184. Raimunda de Abreu, F., Campana-Filho, S. P. (2009) Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. *Carbohydrate Polymers* 75: 214-221.

185. Ramírez, H. L., Chico, B., Villalonga, R., Hoste, K., Schacht, E. H. (2002) Invertase stabilization by chemical modification of sugar chains with carboxymethylcellulose. *Journal of Bioactive Compatible Polymers* 17: 161-172.
186. Ramírez, H. L., Briones, A. I., Úbeda, J., Arévalo, M. (2013) Immobilization of pectinase by adsorption on alginate-coated chitin support. *Biotecnología Aplicada* 30(2): 101-104.
187. Rajalakshmi, N., Sundaram, P. V. (1995) Stability of native and covalently modified papain. *Protein Engineering* 8: 1039-1047.
188. Rebros, M., Rosenberg, M., Mlichova, Z., Kristofikova, L. (2007) Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. *Food Chemistry* 102: 784-787.
189. Reddy, V. A., Johnson, R., Biemann, K., Williams, R. S., Frederick, D., Ziegler, R., Trimble, B., Maley, F. (1988) Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. I. N-linked oligosaccharide content of the individual sequins. *Journal Biological Chemistry* 263: 6978-6985.
190. Reddy, V. A., Maley, F. (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Journal Biological Chemistry* 265: 10817-10820.
191. Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, Sh., Molinaro, A., Ansari, A. (2013) Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry* 139: 1081–1086.
192. Rina, W., He, B., Zhao, G., Qian, L., Li, X. (2013) Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in white water treatment. *Carbohydrate Polymers* 97 (2): 523-529.
193. Rinaudo, M., Le Dung, P., Gey, C., Milas, M. (1992) Substituent distribution on O, N-carboxymethylchitosans by ^1H and ^{13}C n.m.r. *International Journal of Biological Macromolecules* 14: 122-128.

194. Rinaudo, M., Le Dung, P., Gey, C., Milas, M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31: 603–632.
195. Rodríguez, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Fernández-Lafuente, R. (2011) Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. *Advanced Synthesis and Catalysis* 353: 2216-2238.
196. Roy, I., Sardar, M., Gupta, M. (2003) Evaluation of a smart bioconjugate of pectinase for chitin hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 16: 329-335.
197. Salihu, A., Alama, Md., Karim, M., Salleh, H. (2012) Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling* 58: 36-44.
198. Sánchez. S., Demain, A. L. (2011) Enzymes and Bioconversion of Industrial, Pharmaceutical and Biotechnological Significance. *Organic Process Research & Development* 15(1): 224-230.
199. Sandar, M., Roy, I., Gupta, M. (2003) A smart bioconjugate of alginate and pectinase with unusual biological activity toward chitosan. *Biotechnology Progress* 19: 1654-1658.
200. Sanjay, G., Sugunan, S. (2006) Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry* 94: 573-579.
201. Sankalia, V., Mashru, R., Sankalia, J., Sutariya, V. (2007) Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65: 215-232.
202. Sassolas, A., Blum, L., Leca, B. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* 30(3): 489-511.

203. Sattarahmady, N., Khodaghohi, F., Movahedi, A., Heli, H., Hakimelahi, Gh. (2007) Alginate as an antiglycating agent for human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 180-184.
204. Selimoglu, S. M., Elibol, M. (2010) Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(2): 145-159.
205. Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M. (2013) Microbial pectinase: sources, characterization and applications *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1): 45-60.
206. Silva, M. S., Cocenza, D., Grillo, R., Melo, N., Tonello, P., Oliveira, L., Cassimiro, D., Rosa, A., Fraceto, L., (2011) Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials* 190: 366-374.
207. Singh V, Kumar P. (2011) Carboxymethyl-tamarind gum-silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (1-2): 67-73.
208. Smid, J., Fish, D. (1988) Polyelectrolytes Complexes, en: *Encyclopedia of Polymer Science & Engineering*, John Wiley & Sons Inc., 720.
209. Songkroah, C., Nakbanpote, W., Thiravetyan, P. (2004) Recovery of silver-thiosulfate complexes with chitin. *Process Biochemistry* 39: 1553-1559.
210. Souza, J. R., Carvalho, J., Trevisan, M., Paula, R., Ricardo, N., Feitosa, J. (2009) Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids* 23(8): 2278-2286.
211. Spiro, M. D., Ridley, B., Glushka, J., Darvill, A., Albersheim, P. (1996) Synthesis and characterization of tyramine-derivatized (1-4)-linked α -D-oligogalacturonides. *Carbohydrate Research* 290: 147-157.

212. Suzuki, H., Ozawa, Y., Maeda, H. (1966) Studies on the water-insoluble enzyme hydrolysis of sucrose by insoluble yeast invertase. *Agricultural and Biological Chemistry* 30: 807-812.
213. Szyman´ska, K., Pudło, W., Mrowiec-Białon, J., Czardybon, A., Kocurek, J., Jarzebski, A. (2013) Immobilization of invertase on silica monoliths with hierarchical pore structure to obtains continuous flow enzymatic microreactors of high performance. *Microporous and Mesoporous Materials* 170: 75-82.
214. Tanriseven, A., Olcer, Z. (2008) A novel method for the immobilization of the glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatine. *Biochemical Engineering Journal* 39: 430-434.
215. Tam, S. K., Dusseault, J., Bilodeau, St., Langlois, G., Halle, J., Yahia, L. (2011) Factors influencing alginate gel biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research A* 98: 40-52.
216. Tardioli, P. W., Zanin, G., Moraes, F. (2006) Characterization of thermo anaerobacter cyclomalto dextrin glucanotransferasas immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1270-1278.
217. Terbojevich, M., Cosani, A., Focher, B., Marsano, E. (1993) High-performance gel-permeation chromatography of chitosan samples. *Carbohydrate Research* 250: 301-314.
218. Ting, X., Long, W., Shaoli, N., Xiaomin, L., Zhiqinq, D., Yue-Dong, Y. (2011) Study on CMC-Chitosan capsule immobilized Sucrase. *Journal of Hebei Normal University of Science and Technology*. 02-003.
219. Toffanin, R., Kvam, B., Flaibani, A., Atzori, M., Biviano, F., Paoletti S. (1993) NMR studies of oligosaccharides derived from hyaluronate complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of aqueous di- and tetra-saccharides, and comparison of chemical shifts for oligosaccharides of increasing degree of polymerization. *Carbohydrate Research* 245: 113-128.

220. Tomohisa, H., Okazaki, N., Hara, K., Ishii, J., Kondo, A. (2013) A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology* 135: 513-522.
221. Tomotani, E. J., Vitolo, M. (2004) Screening of Dowex® Anion-Exchange Resins for Invertase Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116: 145-159.
222. Tomotani, E. J., Vitolo, M. (2006) Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. *Process Biochemistry* 41: 1325-1331.
223. Tomotani, E. J., Vitolo, M. (2007) Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *Journal of Food Engineering* 80: 662-667.
224. Tran, D. N., Balkus, K. J. (2011) Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catalysis* 1: 956-968.
225. Trimble, R. B., Maley, F. (1977) Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biological Chemistry* 252: 4409-4412.
226. Tumturk, H., Tufan, Y. (2004) Immobilization of invertase onto dimmer acid-co-alkyl polyamine. *Journal of Applied Polymers Science* 93: 1526-1530.
227. Tuoping, L., Li, S., Wang, N., Tain, L. (2008) Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry* 109: 73-78.
228. Turton, R., Bailie, W. B. (2009) Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes. New York: Prentice Hall.
229. Urias-Orona, V., Rascón, A., Lizardi, J., Carvajal, E., Gardea, A., Ramírez, B. (2010) A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 3686-3695.

230. Valerio, S. G., Alves, J., Klein, M., Rodríguez, R., Hertz, P. (2013) High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 92: 462-468.
231. Vasie-Racki, D. Findrik, Z., Presecki, A. (2011) Modeling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development. *Applied Microbiology Biotechnology* 91: 845–856.
232. Vega-Paulino, R. J., Zúniga-Hansen, M. E. (2012) Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76: 44-51.
233. Villalonga, R., Gómez, L., Ramírez, H. L., Villalonga, M. L. (1999) Stabilization of α -amylase by chemical modification with carboxymethylcellulose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74: 635-638.
234. Villalonga, R., Villalonga, M. L., Gómez, L. (2000) Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10: 483-490.
235. Villanueva, M. J., Redondo, A., Rodriguez, M., Rueda, A. (1990) Determinación de sustancias pécticas en berenjena y calabacín por dos métodos espectrofotométricos. *Anales de Bromatología* XLII: 57-64.
236. Wattanakorn, N. Asavapichayont, P., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S., Sungthongjeen, S., Chantasart, D., Sriamornsak, P. (2010) Pectin-based bioadhesive delivery of carbenoxolone sodium for aphthous ulcers in oral cavity. *AAPS Pharm Sci Tech.* 11(2): 743-51.
237. Wang, Y., Hsieh, Y. L. (2008) Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science* 309: 73-81.

238. Wang, X., Han, M., Bao, J., Tu, W., Dai, Zh. (2012) A superoxide anion biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase on sodium alginate sol-gel film and its application to monitoring of living cells. *Analytica Chimica Acta* 717(2): 61-66.
239. Wang, B., Cheng, F., Lu, Y., Ge, W., Zhang, M., Yue, B. (2013) Immobilization of pectinase from *Penicillium oxalicum* F67 onto magnetic cornstarch microspheres: Characterization and application in juice production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97: 137-143.
240. Weideman, F., Niemann, M., Steork, S., Breunig, F., Beer, M., Sommer, C., Herrmann, S., Ertl, G., Wanner, C. (2013) Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. *Journal of Internal Medicine* 274(4): 331-41.
241. West, E. R., Xu, M., Woodruff, T., Shea, L. (2007) Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* 28: 4439-4448.
242. Williams, S. R., Trumbly, R., MacColl, R., Trimble, R., Maley, F. (1985) Comparative Properties of Amplified External and Internal Invertase from the Yeast SUC2 Gene*. *Journal Biological Chemistry* 260(24): 13334-13341.
243. Winning, H., Viereck, N., Nørgaard, L., Larsen, J., Engelsen, S. (2007) Quantification of the degree of blockiness in pectins using ^1H NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Hydrocolloids* 21: 256-266.
244. Wu, L., Yuan, X., Sheng, J. (2005) Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science* 250: 167-173.
245. Yamasaki, H., Cheok, R., Fraser, A. (1984) Immobilization of invertase on polyethylenimine coated cotton cloth. *Biotechnology Letters* 6: 165-170.

246. Yandri, Y., Susanti, D., Suhartati, T., Hadi, S. (2012) Immobilization of α -Amylase from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Carboxymethyl Cellulose (CM-Cellulose). *Modern Applied Science* 6(3): 68-73.
247. Yang, J., Xie, Y., He, W. (2011) Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers* 84: 33-39.
248. Ye, P. Xu, Zh., Che, A., Wub, J., Seta, P. (2005) Chitosan-tethered poly (acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. *Biomaterials* 26: 6394-6403.
249. Yildiz, H. B., Kamaci, M., Azak, H., Secgin, O., Suer, O. (2013) A comparative study: Immobilization of yeast cells and invertase in poly(ethyleneoxide) electrodes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 91: 52-58.
250. Yoon Seok, S., Lee, J., Kang, S., Kim, S. (2010) Performance of β -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. *Food Chemistry* 123: 1-5.
251. Youngsukkasem, S., Rakshit, S., Taherzadeh, M. (2012) Biogas production by encapsulated methane-producing bacteria. *BioResources* 7(1): 56-62.
252. Zhang, J., Wang, Zh., Yu, W., Wu, J. (2011) Pectins from *Canna edulis* Ker residue and their physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymers* 83: 210-216.
253. Zhao, L., Luo, F., Wasikiewicz, J., Mitomo, H., Nagasawa, N., Yagi, T., Tamada, M., Yoshii, F. (2008) Adsorption of humic acid from aqueous solution onto irradiation-crosslinked carboxymethylchitosan. *Bioresource Technology* 99(6): 1911-1917.
254. Zhou, J. (2010) Immobilization of Cellulase on a Reversibly Soluble-Insoluble Support: Properties and Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6741-6746.

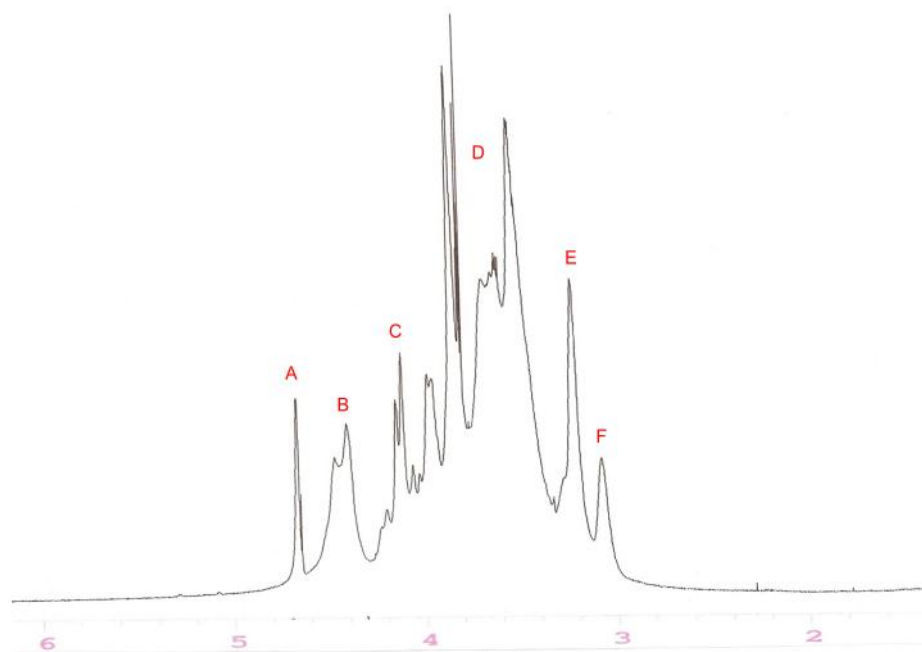
ANEXOS

Anexo I. Determinación de la masa molar de los polímeros empleados en la obtención de los soportes utilizados para la inmovilización de las enzimas

Tabla I.1. Masa molar de los polímeros empleados en la obtención de los soportes utilizados para la inmovilización de las enzimas

Polímero	Masa Molar (kDa)
Carboximetilcelulosa	$3,0 \times 10^4$
Pectina	$1,03 \times 10^5$
Alginato de sodio	$1,97 \times 10^5$
Ácido hialurónico	$1,8 \times 10^5$

Anexo II Caracterización de la carboximetilcelulosa

Figura 2.1. Espectro RMN-H¹ de la CMC en D₂O a 25°C y a 500 MHzTabla II.1. Asignación de las bandas del espectro RMN-H¹ de la CMC

Señal	U(ppm)	Asignación	Protones que integra
A	4,70	H1 de la Glu.	1
B	4,45	H2 y H3 de unidades de Glu. carboximetilada en 2 y 3	2
C	4,15	H6 de una unidad de Glu. carboximetilada en 6	1
D	4,05-3,30	H3, H4, H5, H6 de la unidad de Glu. de la carboximetilcelulosa	5
E	3,20	H2 de unidad carboximetilada	1
F	3,10	H2 de unidad no carboximetilada	1

ANEXO III Caracterización de la pectina

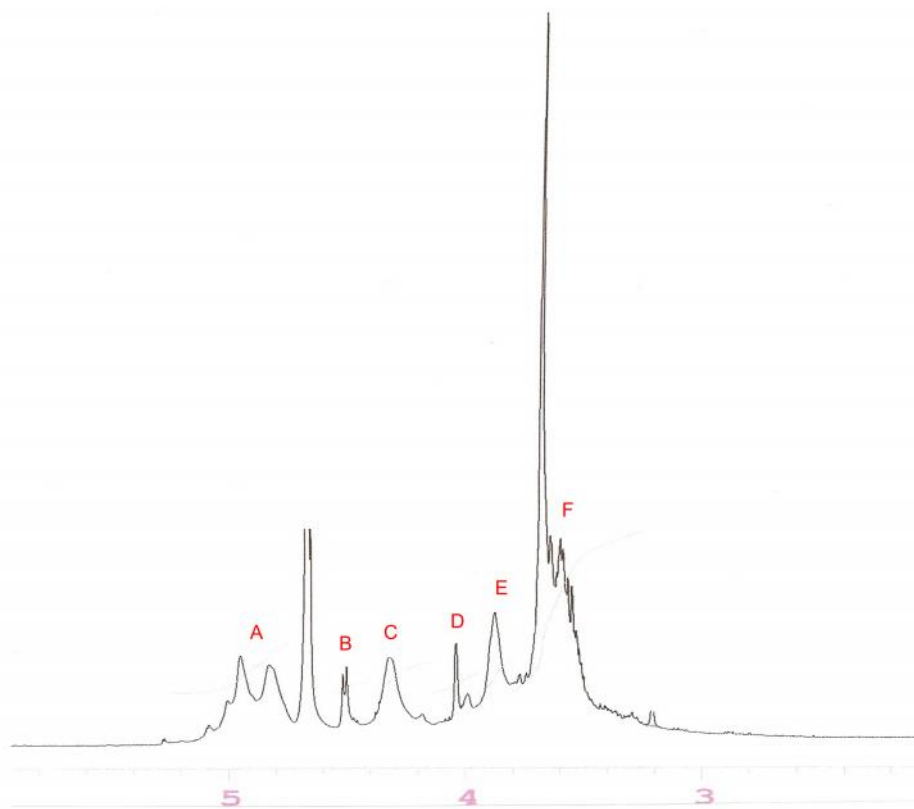
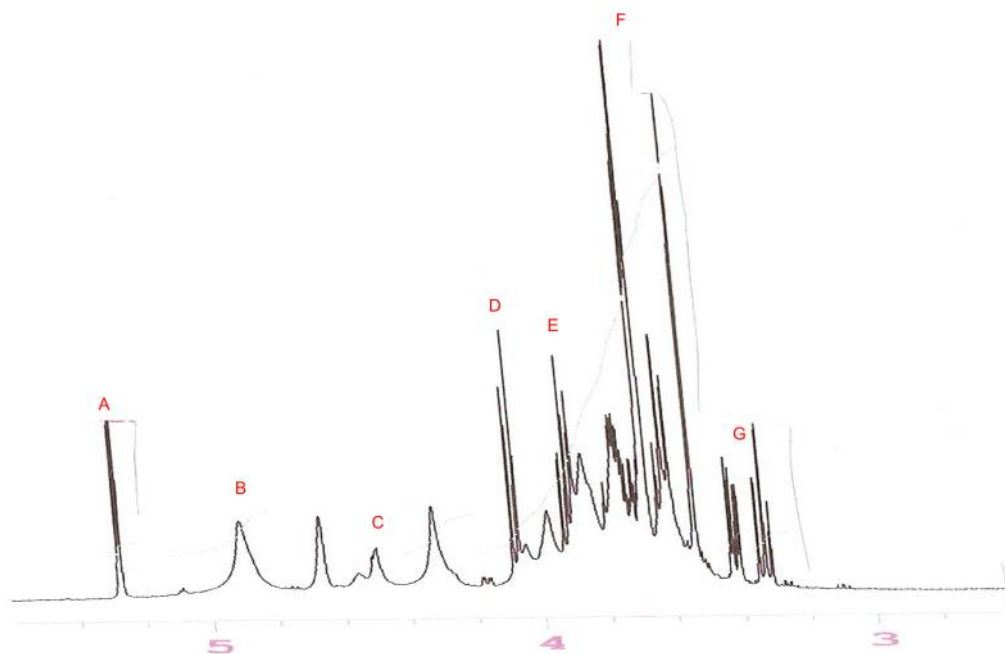


Figura 3.1. Espectro RMN- H^1 de la pectina en D_2O a 25 °C y a 500 MHz

Tabla III.1. Asignación de las bandas del espectro RMN- H^1 de la pectina

Señal	δ (ppm)	Asignación	Protones que integra
A	5,01-4,82	H1, H5 de una unidad de ácido galacturónico esterificada H1 de una unidad de ácido galacturónico no esterificado	3
B	4,51	H5 de una unidad de ácido galacturónico	1
C	4,36	H4 de una unidad de ácido galacturónico esterificada H4 de una unidad de ácido galacturónico no esterificada	2
D	4,01	H3 de una unidad de ácido galacturónico	1
E	3,87	H2 de una unidad de ácido galacturónico	1
F	3,79-3,40	CH ₃ de una unidad de ácido galacturónico esterificada	3

ANEXO IV Caracterización del alginato de sodio

Figura 4.1 Espectro RMN- H^1 del alginato de sodio en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y a 500 MHzTabla VI.1 Asignación de las bandas del espectro RMN- H^1 del alginato de sodio

Señal	δ (ppm)	Asignación	Protones que integra
A	5,26	H1 del ácido gulurónico.	1
B	4,90	H1 del ácido manurónico y H5 de dos unidades contiguas de ácido gulurónico y manurónico	3
C	4,6-4,49	H5 de dos unidades contiguas de ácido gulurónico	2
D	4,08	H3 de una unidad de ácido gulurónico	1
E	3,98-3,8	H4 de una unidad de ácido gulurónico	1
F	3,75-3,55	H2, H3, H4 de una unidad de ácido manurónico	3
G	3,30-3,55	H2 de una unidad de ácido gulurónico	1

ANEXO V Caracterización del ácido hialurónico

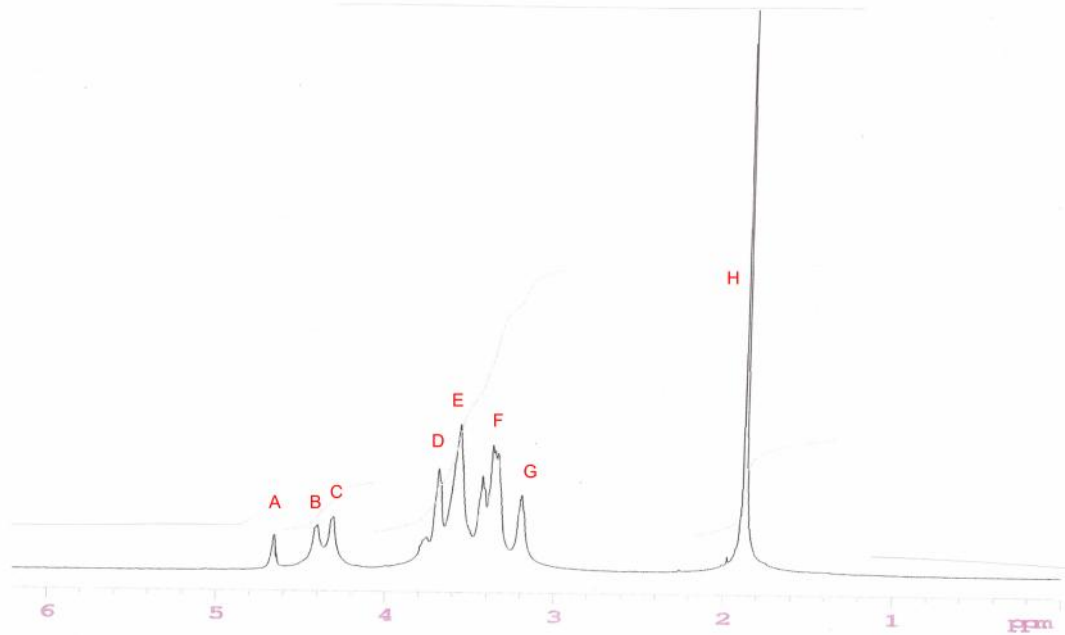


Figura 5.1 Espectro RMN- H^1 del ácido hialurónico en D_2O a 25 °C y a 500 MHz

Tabla V.1 Asignación de las bandas del espectro RMN- H^1 del ácido hialurónico

Señal	δ (ppm)	Asignación	Protones que integra
A	4,66	H1 de la unidad de N-acetil glucosamina	1
B	4,40	H1 de la unidad de ácido glucurónico	1
C	4,32	H6 de la unidad de N-acetil glucosamina	1
D	3,75	H3 y H6 de la unidad de N-acetil glucosamina	2
E	3,6	H4,H5 y H2 de la unidad de N-acetil glucosamina	3
F	3,42	H4 y H5 de la unidad de ácido glucurónico	2
G	3,20	H2 y H3 de la unidad de ácido glucurónico	2
H	1,85	CH ₃ de la unidad N-acetil glucosamina	3

ANEXO VI Síntesis del conjugado INV-QSA

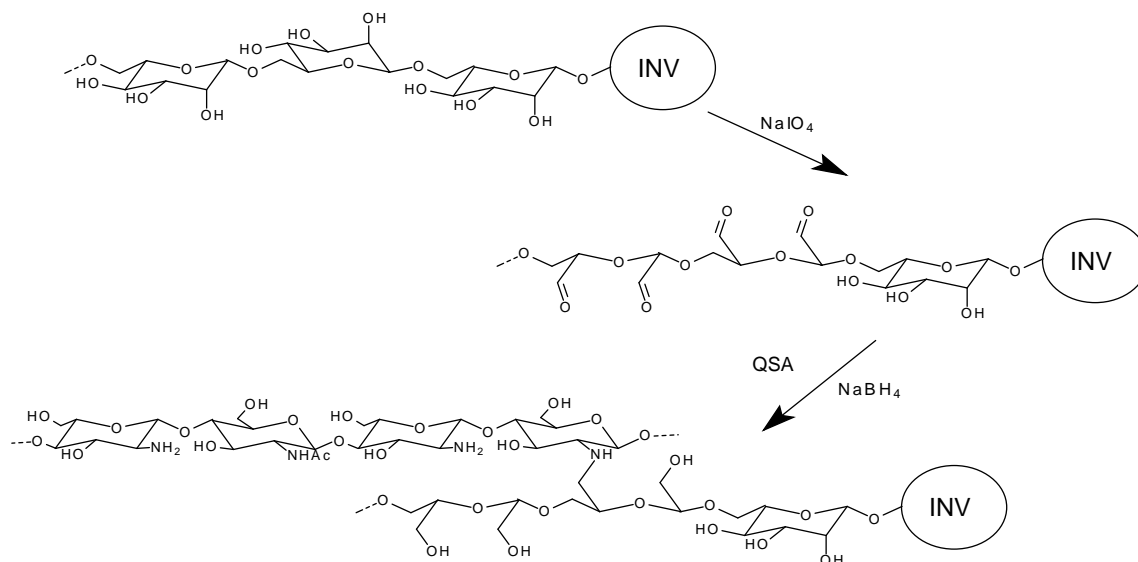


Figura 6.1 Acoplamiento de la quitosana a los residuos de carbohidratos de la invertasa. INV representa la enzima, QSA representa el polímero

ANEXO VII Inactivación térmica de la invertasa nativa e inmovilizada

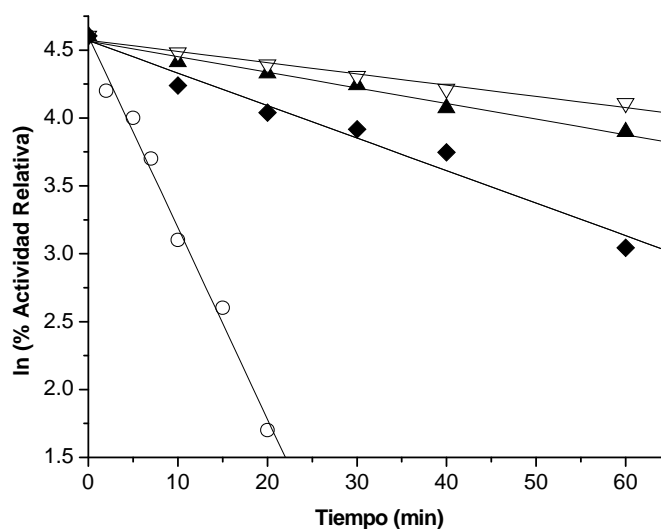


Figura 7.1 Cinética de inactivación térmica a 65°C de la invertasa nativa (○) e inmovilizada en los soportes de: Quit-CMC (▽), Quit-Pc (◀) y Quit-HyA (▲) en solución tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,0.

Tabla VII.1 Ajustes matemáticos de las ecuaciones de la cinética de inactivación térmica de la invertasa nativa e inmovilizada que responden a un modelo de primer orden.

	Ecuación Matemática $Y = m * x + n$	Valor de R^2
INV	$\ln(\% \text{ actv}) = -14,1 \times 10^{-2} t + 4,60$	0,995
INV-QSA:Quit-CMC	$\ln(\% \text{ actv}) = -11,1 \times 10^{-2} t + 4,56$	0,991
INV-QSA:Quit-Pc	$\ln(\% \text{ actv}) = -0,8 \times 10^{-2} t + 4,57$	0,989
INV-QSA:Quit-HyA	$\ln(\% \text{ actv}) = -2,38 \times 10^{-2} t + 4,57$	0,984

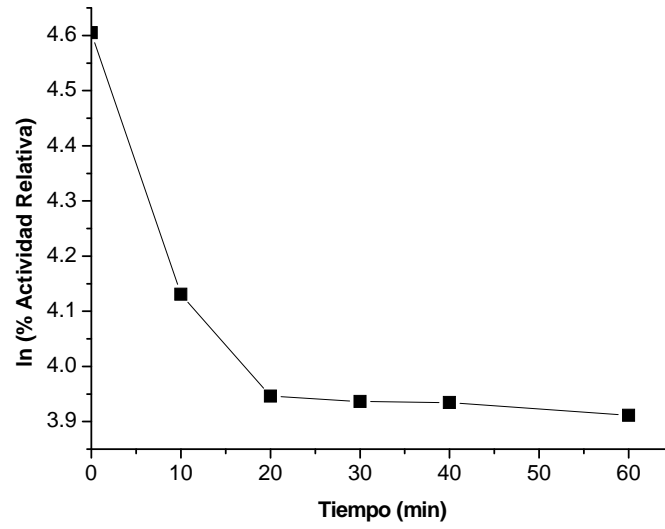


Figura 7.2 Cinética de inactivación térmica bifásica a 65°C de la invertasa inmovilizada en el soporte de: Quit-Alg en solución tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0.

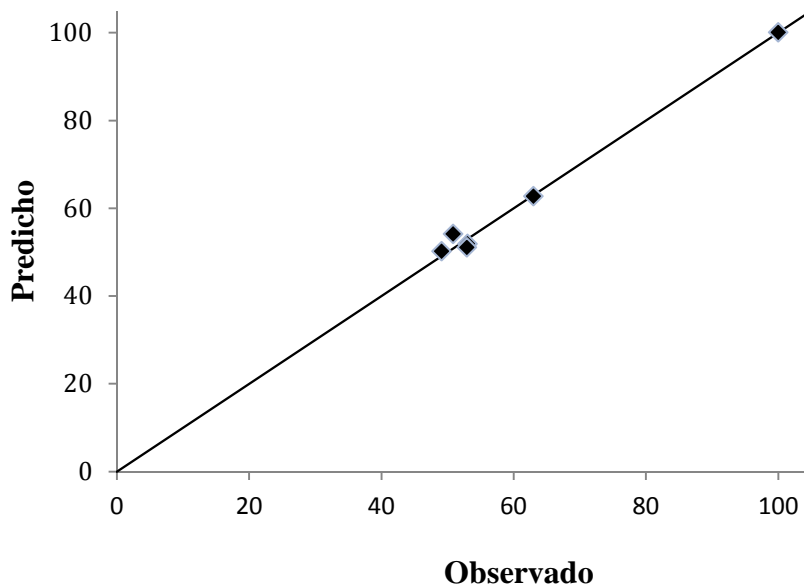


Figura 7.3 Representación gráfica de los residuos del ajuste del modelo matemático a la cinética de inactivación bifásica de la invertasa inmovilizada en el soporte de: Quit-Alg.

Anexo VIII Inactivación térmica de las enzimas pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada en el soporte de Quit-QSA.

Tabla VIII.1 Ajustes matemáticos de las ecuaciones de la cinética de inactivación térmica de la pectinasa y celulasa nativa e inmovilizada en el soporte de Quit-QSA.

	Ecuación Matemática Y= m * x + n	Valor de R²
PNSA	$\ln(\% \text{ actv}) = - 17,91 \times 10^{-2} t + 4,89$	0,986
Quit-QSA-PNSA-A	$\ln(\% \text{ actv}) = -2,35 \times 10^{-2} t + 4,74$	0,988
Quit-QSA-PNSA-E	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,8 \times 10^{-2} t + 4,67$	0,989
CLSA	$\ln(\% \text{ actv}) = -9,2 \times 10^{-2} t + 4,76$	0,993
Quit-QSA-CLSA-A	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,71 \times 10^{-2} t + 4,59$	0,990
Quit-QSA-CLSA-E	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,52 \times 10^{-2} t + 4,61$	0,995

Anexo IX Cinética operacional de la invertasa inmovilizada en los soportes de quitina

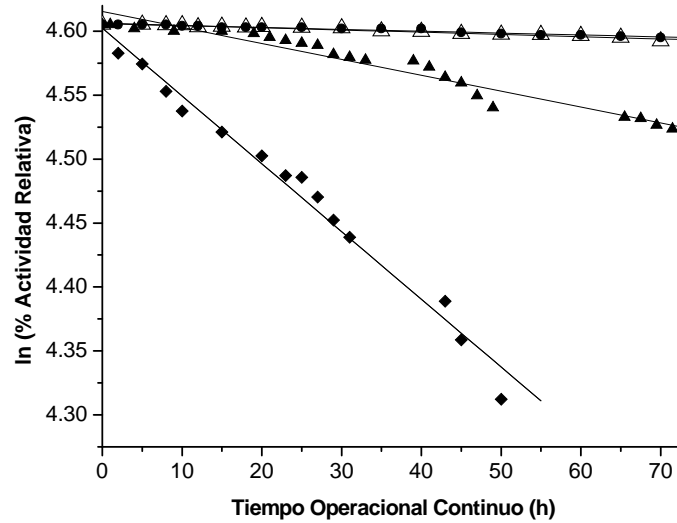


Figura 9.1 Cinética operacional de la invertasa inmovilizada en un reactor empacado a 30°C. Soportes: Quit-CMC (U), Quit-Pc (), Quit-Alg (Ã) y Quit-HyA () en solución tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0.

Tabla IX.1 Ajustes matemáticos de las ecuaciones de la cinética operacional de la invertasa inmovilizada en los soportes de quitina.

	Ecuación Matemática $Y = m * x + n$	Valor de R^2
INV-QSA:Quit-CMC	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,75 \times 10^{-4} t + 4,606$	0,981
INV-QSA:Quit-Pc	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,24 \times 10^{-3} t + 4,615$	0,976
INV-QSA:Quit-Alg	$\ln(\% \text{ actv}) = -5,3 \times 10^{-3} t + 4,602$	0,991
INV-QSA:Quit-HyA	$\ln(\% \text{ actv}) = -1,5 \times 10^{-4} t + 4,605$	0,979

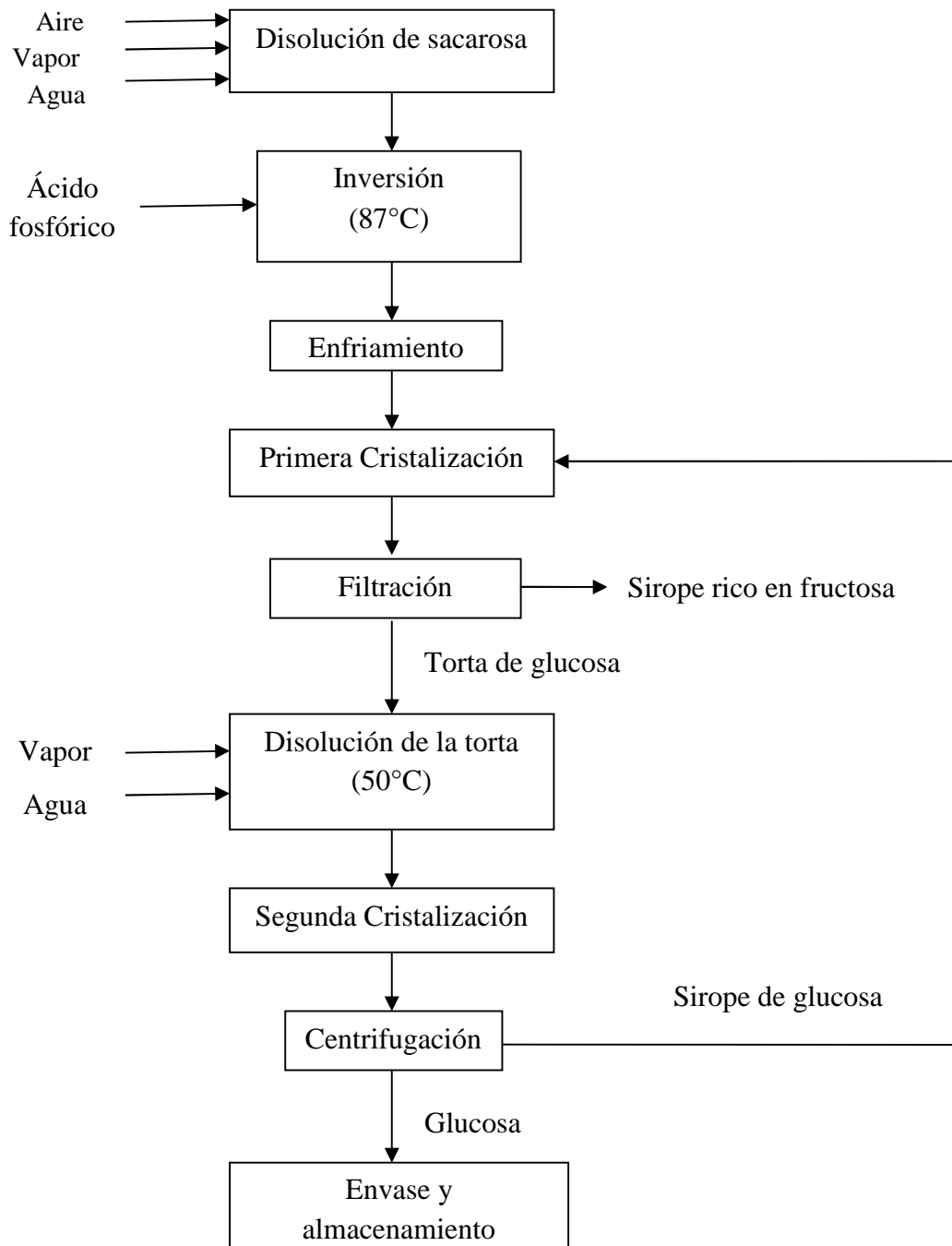
Anexo X Proceso tecnológico de producción de glucosa y sirope de fructosa mediante hidrólisis ácida

Figura 10.1 Etapas del proceso tecnológico de producción de glucosa y sirope de fructosa mediante hidrólisis ácida.

Anexo XI Metodología para el diseño del reactor de invertasa inmovilizada como lecho fijo en operación isotérmica.

Para la proyección del reactor se requieren dos etapas. En la primera son empleadas las técnicas del escalado industrial en la obtención de características y datos ingenieriles del sistema necesarios para la modelación matemática del diseño que se realiza en la segunda etapa.

Primera etapa. Experimentación a escala de laboratorio.

A nivel del laboratorio se determinan las constantes de velocidad de la ecuación cinética de la biorreacción bajo condiciones correspondientes al proceso industrial.

Se construye un reactor a pequeña escala (modelo) con un factor f entre 5 y 15 recomendado por la literatura (González, 2003) a partir de la relación altura-diámetro $H/D = f$.

Una vez conformado el lecho fijo (enzima inmovilizada) se opera experimentalmente bajo el mismo régimen a que estará sometido el prototipo (escala mayor). Se determina la ecuación de velocidad en función de la conversión, se calculan las constantes catalíticas de la reacción y la densidad aparente del lecho.

Segunda etapa. Aplicación de la modelación matemática: proyección del prototipo.

Se calcula la masa de enzima que debe quedar activa cuando se inmoviliza y se realiza a través de la ecuación de diseño de un reactor de lecho fijo donde las constantes y otros parámetros provienen de la primera etapa.

Ecuación básica del diseño de un reactor de lecho fijo (Illanes y Wilson, 2004):

$$\frac{V_r \xi}{F C_{S0}} = \int_0^x \frac{dx}{v_{e,x}}$$

donde:

F: Flujo volumétrico de alimentación. [$L^3 \cdot s^{-1}$]

C_{s0} : Concentración inicial de sustrato. [$M \cdot L^{-3}$]

x: Conversión de sustrato.

v: Ecuación de la velocidad de reacción para el sustrato. [$M \cdot L^{-3} \cdot s^{-1}$]

V_r : volumen del reactor. [L^3]

e: Actividad enzimática volumétrica. [$U \cdot L^{-3}$]

ϵ : Porosidad del lecho.

Al substituirse la expresión general de velocidad (Michaelis-Menten) en función de la conversión se obtiene:

$$E_0 = \frac{F \cdot K_M}{k_{cat}} \frac{C_{s0}}{K_M} * x_s - \ln 1 - x_s$$

donde:

E_0 : Carga enzimática inicial o unidad de activación inicial. [U]

k_{cat} : Constante catalítica. [s^{-1}]

K_M : Constante de Michaelis-Menten. [$M \cdot L^{-3}$].

C_{s0} : Concentración inicial de sustrato. [$M \cdot L^{-3}$]

En función de la masa de enzima (M_{cat}) resulta:

$$M_{cat} = \frac{F \cdot K_M}{k_{cat} \epsilon_s} \frac{C_{s0}}{K_M} * x_s - \ln 1 - x_s$$

Las cantidades de cada uno de los componentes que forman el lecho (prototipo) son obtenidas a través de las relaciones de cada uno de estos componentes a pequeña escala (modelo) pero todo sobre la base de la masa de enzima activa respectivamente, o sea:

$$\frac{\text{Masa del componente } i \text{ en el lecho}}{\text{Masa de enzima}}_{mod} = \frac{\text{Masa del componente } i \text{ en el lecho}}{\text{Masa de enzima}}_{prot}$$

y así se procede con cada uno de los componentes del lecho, obteniéndose la masa total del complejo en el prototipo:

$$\text{Masa total}_{prot} = \sum \text{de los componentes del lecho}$$

El cálculo del volumen del reactor para el prototipo se despeja de la relación existente entre las densidades aparentes del lecho obtenidas en el modelo que es la misma que la del prototipo:

$$(\rho_{ap})_{mod} = (\rho_{ap})_{prot} = \frac{\text{Masa de los componentes del lecho}}{V_R}$$

siendo:

V_R : volumen del reactor o volumen del lecho.

El cálculo de las dimensiones del prototipo es efectuado con la ayuda de la relación de escala correspondiente al modelo:

$$\frac{H}{D}_{prot} = \frac{H}{D}_{mod} \cdot f$$

$$D_{prot} = \frac{V_R^{1/3}}{0,785 \cdot f}$$

$$H_{prot} = f \times D_{prot}$$

Anexo XII Precios estimados para realizar la valoración económica de la aplicación del biocatalizador inmovilizado para la obtención de glucosa

Tabla XII.1 Precios estimados para las materias primas, productos y servicios auxiliares del proceso de hidrólisis de la sacarosa.

Materiales y servicios auxiliares	Precio	Fuente
Ácido fosfórico (\$/1000 kg)	2053,90	AZCUBA, 2014
Agua (\$/m ³)	0,10	AZCUBA, 2014
Azúcar Refino (\$/1000 kg)	516,15	AZCUBA, 2014
Electricidad (\$/Kw)	0,09	AZCUBA, 2014
Biocatalizador (\$/kg)	11,70	*Estimado por la autora
Vapor (\$/1000 kg)	4,00	AZCUBA, 2014
Fructosa (\$/1000 kg)	849,70	AZCUBA, 2014
Glucosa (\$/1000 kg)	621,35	AZCUBA, 2014

*Precio estimado para el soporte considerando lo recomendado por Kalk (Fernández *et al.*, 2002).

Para la estimación del precio del biocatalizador INV-QSA:Quit-CMC se tomaron en cuenta los planteamientos de Fernández *et al.*, (2002) considerando que el costo de materias primas constituye el 80 % del costo del producto. Para la determinación del costo de adquisición de las materias primas se parte de los criterios de la Importadora del MES, (2014). El margen de ganancia establecido fue de un 10 %.