



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Inmovilización de una mananasa en un soporte a base de quitina y/o quitosano para la hidrólisis de torta de palmiste

Laura Vanessa Zuluaga Cardona

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química
Manizales, Colombia

2013

**Inmovilización de una mananasa en un soporte a
base de quitina y/o quitosano para la hidrólisis
de torta de palmiste (Palm kernel cake hydrolysis with an
immobilized mannase on chitin/chitosan based carrier)**

Laura Vanessa Zuluaga Cardona

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D Carlos Eduardo Orrego Álzate

Línea de Investigación:

Proteínas

Grupo de Investigación:

Alimentos Frutales

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química
Manizales, Colombia

2013

A mi madre

Agradecimientos

Institucionales

A los directivos de la Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química en la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, por su autorización y apoyo para mi participación en el programa.

A las siguientes unidades e instituciones que aportaron los recursos para la realización de este trabajo:

Dirección de Postgrado Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química.

Dirección de Investigaciones de Manizales – DIMA –

Instituto de Biotecnología y Agroindustria – UNAL Manizales

Profesores del postgrado e investigadores extranjeros

A Carlos Eduardo Orrego Álzate, director de la tesis, por su apoyo constante y orientación.

A Oscar Hernán Giraldo

A Gloria Inés Gómez

A Carlos Ariel Cardona

A Natalia Salgado

A Julie Zimmerman, Evan Beach, Azadeh Kermansharpour, Patrick Foley de la Universidad de Yale, Estados Unidos, por su amable acogida durante mi pasantía y por su colaboración con este proyecto.

A la Federación Nacional de Cafeteros, en especial a Buencafé Liofilizado de Colombia y a Cenicafé, por permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de este y otros trabajos.

Resumen

La torta de palmiste es un subproducto de la extracción de aceite de palma, que contiene un 50% de carbohidratos, principalmente galactomananos que pueden ser hidrolizados enzimáticamente por mananasas para la liberación de azúcares reductores útiles como fuente de energía para diversos microorganismos en procesos fermentativos para la obtención de diversos productos de valor agregado tales como el bioetanol.

En esta investigación se realizó la inmovilización de una mananasa para la hidrólisis de la torta de palmiste. Se evaluaron seis diferentes tipos de soportes a base de quitina y quitosano, a saber: Quitina, Quitosano modificado con pectina y hierro obtenido por secado por aspersion (CPFF), Quitosano modificado con epiclorhidrina y hierro, obtenido por liofilización (CEFF), Quitosano modificado con anhídrido acético y hierro, secado por liofilización (CAFF), Quitosano modificado con epiclorhidrina secado por aspersion (CE), Quitosano modificado con anhídrido acético, secado por aspersion (CA).

Los soportes que presentaron mejor estabilidad en los medios de reacción y alta actividad enzimática cuando se inmovilizó en ellos la mananasa fueron la quitina, CPFF y CEFF. Con la mananasa sobre quitina se lograron realizar 6 ciclos de reacción sucesivos luego de los cuales se conservó una actividad remanente de alrededor del 15 % de la actividad de la enzima libre.

Las condiciones a las que se presentaron mejores resultados para la hidrólisis de la torta de palmiste fueron pH 6 y temperatura de 50°C, tanto para la enzima libre como para la inmovilizada en CEFF.

Palabras clave: Mananasa, Inmovilización de enzimas, Torta de Palmiste, Quitina/Quitosano

Abstract

Palm kernel press cake (PKC) is a byproduct of palm oil extraction, which contains 50% of total carbohydrates, mainly galactomannans. They can be converted into reducing sugars by enzymatic hydrolysis performed by a mannanase, and these sugars can be further used as an energy source by many microorganisms for the production of a variety of added value products like bioethanol.

In this research the immobilization of a mannanase for the hydrolysis of PKC was made. Six different supports of chitin/chitosan were evaluated as follows: Chitin, modified chitosan with pectin and iron obtained by spray drying (CEFF), modified chitosan with epichlorohydrin and iron obtained by freeze drying (CEFF), modified chitosan with acetic anhydride and iron obtained by freeze drying (CAFF), modified chitosan with epichlorohydrin obtained by spray drying (CE) and modified chitosan with acetic anhydride obtained by spray drying (CA).

The supports that showed lower solubilities in the reaction media and high immobilized mannanase activities were chitin, CPFF and CEFF. With the immobilized mannanase on chitin, 6 successive reaction cycles were performed keeping a 15% of the free enzyme activity in the last cycle.

Chitosan was used as a coating of iron particles, which will give magnetic properties to the material. The best system was selected to perform a kinetic study on the hydrolysis of palm kernel cake. The optimal conditions for PKC hydrolysis for free and immobilized enzyme in CEFF were at pH 6 and T=50°C.

Keywords: Mannanase, Enzyme immobilization, Palm Kernel Cake, Chitin, Chitosan

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Introducción	21
1. Estado del arte	25
1.1 Mananasa	25
1.2 Inmovilización de enzimas	26
1.3 Torta de Palmiste.....	28
1.3.1 Producción en Colombia	30
1.3.2 Aplicaciones de la torta de palmiste	32
2. Hipótesis y Objetivos	35
2.1 Hipótesis.....	35
2.2 Objetivo General.....	35
2.3 Objetivos Específicos.....	35
3. Materiales y Métodos	37
3.1 Reactivos y Materiales.....	37
3.2 Caracterización de la torta de palmiste	37
3.3 Producción de soportes	38
3.3.1 Quitina	38
3.3.2 Soportes obtenidos por secado por aspersión	39
3.3.2.1 Quitosano modificado con pectina y hierro (CPFF)	40
3.3.2.2 Quitosano modificado con epiclorhidrina (CE).....	41
3.3.2.3 Quitosano modificado con anhídrido acético (CA).....	41
3.3.3 Soportes obtenidos por Liofilización	41
3.3.3.1 Quitosano modificado con hierro y epiclorhidrina (CEFF).....	41
3.3.4 Quitosano modificado con hierro y anhídrido acético (CAFF).....	42
3.4 Caracterización de los soportes.....	42
3.4.1 Análisis de la morfología por microscopia	42
3.4.2 Caracterización Magnética	43
3.4.3 Resistencia a la agitación.....	43
3.4.4 Solubilidad de los soporte en diferentes medios.....	43
3.4.5 Hinchamiento	44
3.5 Inmovilización de mananasa.....	44
3.5.1 Inmovilización de mananasa en quitina.....	44

3.5.2	Inmovilización de mananasa en soportes basados en quitosano	44
3.6	Estudio cinético	45
3.6.1	Actividad catalítica β -mananasa	45
3.6.2	Método DNS	46
3.6.3	Hidrólisis enzimática de la torta de palmiste	46
4.	Resultados	49
4.1	Caracterización de la torta de palmiste.....	49
4.2	Dispersión de torta de palmiste en agua.....	50
4.3	Estudio cinético de la mananasa libre sobre la torta de palmiste	50
4.3.1	Efecto de la Temperatura	51
4.3.2	Efecto del pH	52
4.3.3	Efecto de la concentración de sustrato	53
4.3.4	Efecto de la concentración de enzima	55
4.3.5	Parámetros cinéticos de la enzima libre	56
4.4	Fabricación y caracterización de los soportes	57
4.4.1	Caracterización morfológica de los soportes.....	58
4.4.2	Medidas EDX.....	61
4.4.3	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	62
4.4.4	Perfiles de Magnetización	64
4.4.5	Solubilidad, hinchamiento y resistencia a la agitación de los soportes.....	65
4.5	Caracterización cinética de la mananasa inmovilizada	69
4.5.1	Actividad enzimática	69
4.5.2	Hidrólisis de la torta de palmiste	74
4.5.3	Actividad catalítica de la enzima inmovilizada.....	76
4.5.3.1	Efecto del pH	76
4.5.3.2	Efecto de la temperatura.....	77
4.5.4	Separación de los soportes.....	78
5.	Conclusiones y recomendaciones	81
5.1	Conclusiones.....	81
5.2	Recomendaciones.....	82
	Bibliografía	85

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Estructura de los galactomananos [21].	25
Figura 1-2. Fruto de la palma de aceite	29
Figura 1-3. Aprovechamiento industrial de la palma de aceite	29
Figura 1-4. Productores mundiales de Palma de aceite [45]	31
Figura 3-1 Diagrama de producción de quitina	39
Figura 3-2. Diagrama de los dos métodos de inmovilización utilizados para la enzima con quitosano magnético.	45
Figura 3-3. Curva de calibración de manosa para el método DNS. Absorbancia 540nm	46
Figura 4-1. Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de la torta de palmiste al 10%(w/w), pH=6. La actividad enzimática se expresa como actividad relativa, tomando como 100% la mayor actividad obtenida, la cual fue a 50°C. Los resultados se presentan por triplicado, (x) primer ensayo, (♦) Segundo ensayo, (■) Tercer ensayo.	51
Figura 4-2. Efecto del pH en la hidrólisis enzimática de la torta de palmiste al 10%(w/w), 50°C. La actividad enzimática se expresa como actividad relativa, tomando como 100% la mayor actividad obtenida, la cual fue a pH 6. Los resultados se presentan por triplicado, (x) primer ensayo, (♦) Segundo ensayo, (■) Tercer ensayo.	53
Figura 4-3. Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática de torta de palmiste. Condiciones de reacción: 50°C, 30 min, 150 rpm	54
Figura 4-4. Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10% (w/w). La reacción se siguió durante 170 minutos a 50°C, pH=6 y 150 rpm.	55
Figura 4-5. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros cinéticos de la enzima libre.	56
Figura 4-6. Soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas, polielectrolito quitosano-pectina (a) Microesferas de quitosano/pectina (sin propiedades magnéticas) (b) Microesferas magnéticas de quitosano con mananasa inmovilizada por atrapamiento (c) Enzima inmovilizada sobre microesferas magnéticas de quitosano por enlace covalente.	59
Figura 4-7. Soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas, membranas de quitosano-hierro y epiclorhidrina (CEFF). (a) Vista lateral de la membrana sin enzima (b) Vista lateral de membrana con enzima inmovilizada CEFFM (c) Vista frontal de CEFFM (d) Vista frontal de CEFFM zoom out.	60
Figura 4-8. Espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDX). La micrografía a la izquierda muestra un área de orientación de las muestras. Derecha: Respuesta típica	

EDX mostrando la concentración relativa de los elementos C,O y Fe en las microesferas.	61
Figura 4-9. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (a) CEFF, (b) CEFFM	62
Figura 4-10 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para las muestras de quitosano magnético con Epiclorhidrina con y sin enzima inmovilizada.	63
Figura 4-11 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para las muestras de quitina comercial y quitina extraída de caparazones de jaibas.	64
Figura 4-12 Curva de magnetización de las muestras recubiertas con quitosano/pectina.	65
Figura 4-13 Fotografías ensayo de actividad catalítica en <i>locust bean gum</i> al 1%, 50°C, pH=6 de las enzimas inmovilizadas: (a) CEFFM (b) CAFFM (c) Quitina y (d) CPFFM	71
Figura 4-14. Ciclos de hidrolisis de <i>locust bean gum</i> con mananasa inmovilizada sobre quitina. Las condiciones de cada ciclo fueron: 50°C, pH 6, 150 rpm, 30 minutos.	73
Figura 4-15. Ciclos de hidrolisis de <i>locust bean gum</i> con mananasa inmovilizada sobre quitina. Las condiciones de cada ciclo fueron: 50°C, pH 6, 150 rpm, 30 minutos.	73
Figura 4-16. Concentración de manosa durante la hidrólisis de la torta de palmiste al 10%w/w con enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 24 horas. (♦) Control sin enzima. (■) Enzima Libre (▲) CEFFM (X) CPFFM. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado.	74
Figura 4-17. Hidrolisis de la torta de palmiste a bajas concentraciones del 1% y el 5% con la mananasa inmovilizada sobre quitina. Seguimiento a la reacción durante 2 horas a 50°C y 150 rpm	76
Figura 4-18. Efecto del pH en la actividad enzimática relativa en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10%w/w con la enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 30 minutos. (♦) Enzima Libre (▲) CPFFM (■) CEFFM	77
Figura 4-19. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática relativa en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10% w/w con enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 30 min. . (♦) Enzima Libre (▲) CPFFM (■) CEFFM	78
Figura 4-20. Imán de 6000 Oe, con el cual se removió el material magnético de la enzima CPFFM	79

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Análisis bromatológico para la torta de palmiste.....	49
Tabla 2. Datos de actividad enzimática a diferentes temperaturas. Valores promedios y desviación estándar. Reacción en torta de palmiste al 10%(w/w), pH=6.....	52
Tabla 3. Datos de actividad enzimática a diferentes pHs. Valores promedios y desviación estándar. Reacción en torta de palmiste al 10%(w/w), T=50°C.....	53
Tabla 4. EDX (20 kV) contenido relativo (%) de C,O and Fe en los soportes magnéticos (CPFF) y en la mananasa inmovilizada. Contenido promedio de seis micro-zonas en cada muestra.....	61
Tabla 5. Porcentajes de solubilidad, hinchamiento y resistencia a la agitación de los soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas. Las cifras mostradas son el promedio de los resultados de tres medidas.	66
Tabla 6. Actividad remanente de las enzimas inmovilizadas en quitina, y en soportes a base de quitosano mediante secado por aspersion CPFFM y liofilización CEFFM	69
Tabla 7. Concentraciones de manosa determinadas en el avance de la hidrólisis de la torta de palmiste con la mananasa inmovilizada en quitina, los resultados se presentan con su respectiva desviación estándar.....	75
Tabla 8. Porcentaje de recuperación del soporte de quitina con enzima inmovilizada después de la hidrólisis de la torta de palmiste durante 2 horas a 50°C y 150 rpm	79

Introducción

Las enzimas son catalizadores atractivos con un gran inconveniente: su corta vida. La inmovilización, o la restricción deliberada de la movilidad de la enzima, puede servir a dos objetivos: primero, para mejorar la estabilidad enzimática y segundo para facilitar una disminución en el consumo ya que la enzima puede ser recuperada y reutilizada para varios ciclos de reacciones. Los procesos de inmovilización se pueden lograr mediante ingeniería ya sea modificando el microambiente de la enzima, como es el caso de inmovilización por unión a un soporte (por enlace covalente, hidrofóbico, adsorción, intercambio iónico, y/o entrecruzamiento), o por confinamiento de la enzima (por ejemplo en la micro-encapsulación mediante vesículas de lípidos, micelas inversas, atrapamiento en matrices poliméricas, y el confinamiento en fibras huecas para ultrafiltración), o, alternativamente, afectando su macro ambiente (como la modificación del medio de reacción, lo que se consigue por ejemplo a través de la precipitación en un disolvente orgánico) [1].

Las enzimas inmovilizadas fueron preparadas intencionalmente la primera vez por inclusión en matrices poliméricas, o por enlace a materiales de soporte en la década de 1950 [2]. Las propiedades de las enzimas inmovilizadas están gobernadas por las propiedades de la enzima y el material de soporte [3-4]. Un atributo importante para el uso de un soporte para enzimas en la industria alimentaria es el ser inerte y no tóxico. Para este fin la quitina y el quitosano ofrecen un conjunto único de características tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad hacia productos inofensivos, no tóxico, inocuidad fisiológica, propiedades antibacterianas, quelación de iones de metales pesados, propiedades formadoras de gel, hidrofiliencia, y una afinidad notable a las proteínas [3, 5]. Sin embargo, la alta solubilidad en agua del quitosano impide su uso como soporte en medios acuosos débilmente ácidos. Algunas estrategias sugeridas para superar este problema incluyen la insolubilización de quitosano por la formación de complejos policatiónicos y su reticulación con epíclorhidrina [6]. El quitosano con

modificaciones por reticulado tiene mayor resistencia mecánica, sin embargo, su densidad está demasiado cerca a la del agua (lo que provoca que flote fácilmente) y la textura es todavía demasiado blanda. El primer problema puede ser resuelto cuando el quitosano se mezcla con algunos polvos sólidos tales como arcillas y otros sólidos para aumentar su densidad y resistencia mecánica. El quitosano también se puede utilizar como un material de base para soportes magnéticos. En esta forma las partículas de enzima-quitosano magnéticas pueden ser controladas y separadas del medio de reacción mediante la aplicación de un campo magnético, mejorando la eficiencia catalítica y la estabilidad operativa [7-8].

Durante el secado por aspersión, las proteínas pueden desplegarse debido principalmente a estreses asociados a la deshidratación, a pesar de que las gotas permanecen la mayor parte del proceso de secado alrededor de la temperatura, relativamente baja (la de bulbo húmedo). Aditivos tales como sacarosa, tetralosa o malto dextrina permanecen en la fase amorfa con la proteína, aportándole además enlaces de hidrógeno a medida que el agua desaparece durante el secado. La desnaturalización y la adsorción de proteínas en la interfase agua/aire son tensiones adicionales implicadas. Sin embargo, el estrés de cizallamiento que ocurre durante el bombeo, el flujo y la atomización de la boquilla, no parece causarles daño importante [9].

En la encapsulación de enzimas por secado por aspersión el efecto estabilizador de los biopolímeros de carbohidratos ha sido explicado por dos hipótesis: la del “recambio de agua” que afirma que se preserva la estructura nativa de la proteína gracias a que los enlaces de hidrogeno que originalmente había entre la proteína y las moléculas de agua en solución acuosa se sustituyen por nuevos puentes de hidrogeno aportados por los carbohidratos en el estado seco. La hipótesis de “vitrificación” dice que es esencial mantener el biopolímero en estado vítreo, el cual previene que la proteína cambie su forma debido a la rigidez de la matriz de atrapamiento. Por lo tanto, la naturaleza del carbohidrato usado como soporte tiene un profundo efecto en la preservación de la enzima durante el proceso de secado y aquellos que produzcan la cristalización de los carbohidratos (o métodos de secado que promueven cristalinidad en el producto seco) son menos recomendados para la preservación de la actividad enzimática [10].

La torta de palmiste (PKC por sus iniciales en inglés) es un subproducto granular fino proveniente de la extracción del aceite de palma, obtenida de los residuos sólidos que resultan después de la extracción del aceite. Debido a que la torta de palmiste es una valiosa fuente de energía, la fibra y la proteína se han utilizado para mejorar el equilibrio nutricional de la alimentación animal [11]. La torta de palmiste contiene alrededor del 50% de carbohidratos, principalmente galactomananos, los cuales pueden ser hidrolizados enzimáticamente por enzimas como las mananasas. Los azúcares reductores liberados pueden ser usados como fuente de energía de varios microorganismos en la producción de bioetanol.

Colombia es el quinto productor de aceite de palma en el mundo, después de Malasia, Indonesia, Nigeria y Tailandia y el primero en Latino América con una capacidad de producción de 753.000 toneladas de aceite de palma crudo en el 2010 y más de 402.000 Ha plantadas. Los cultivos de palma de aceite en el país están creciendo rápidamente, con un incremento anual del 9% en el área cultivada de los últimos años [12].

La manosa es el principal carbohidrato presente en la torta de palmiste, con un contenido entre el 30 y el 35% [13] el cual puede ser transformado a etanol, implicando un enriquecimiento de proteína en el residuo sólido del 17% al 28% (un incremento del 70%), proceso que por ello permite obtener un suplemento alimenticio con alto contenido de proteína [14]. La torta de palmiste también tiene aplicaciones como sustrato en la fermentación sólida de *Aspergillus niger* para la producción de mananasa [15-16].

Las enzimas que degradan mananos han sido usadas para la maceración de frutas y vegetales, y la clarificación de jugos y vinos [17], la extracción de aceites vegetales de semillas de leguminosas, en la reducción de la viscosidad de extractos durante la manufactura de café instantáneo [18], mejorando la consistencia de la cerveza y como espesantes alimenticios [17, 19]. Las β -mananasas también fueron introducidas en el mercado de los detergentes como agentes contra las manchas que reaparecen durante el lavado [20].

En esta tesis, se prepararon seis soportes a base de quitina y quitosano, entre ellos complejos polielectrolíticos de quitosano-pectina, y entrecruzados entre quitosano-epiclorhidrina para producir sistemas de mananasa-quitosano con propiedades

magnéticas, tanto por secado por aspersion como por liofilización. Las mananasas inmovilizadas fueron analizadas para la hidrólisis enzimática de la torta de palmiste.

1. Estado del arte

1.1 Mananasa

Una de las mayores fuentes de materia orgánica renovables es la hemicelulosa, un complejo grupo de polímeros. En la pared celular de las plantas el manano es uno de los mayores constituyentes [17]. Los galactomananos se encuentran compuestos por una cadena principal de uniones β -1,4 de manosa y uniones α -1,6 de galactosa como se presenta en la figura 1-1 [21].

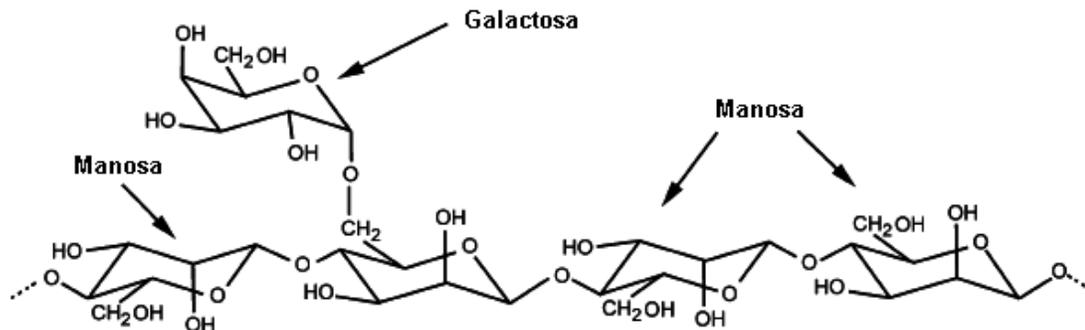


Figura 1-1 Estructura de los galactomananos [21].

La principal componente de los galactomananos es la manosa, un azúcar de seis carbonos. A pesar de la heterogeneidad y complejidad de los galactomananos estos pueden ser descompuestos completamente en azúcares simples que pueden ser fácilmente utilizados como fuente de energía por microorganismos por la acción de β -mananasas (E.C 3.2.1.78) y β -manosidasas (E.C 3.2.1.25) [19]. Las enzimas que degradan los galactomananos han encontrado aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia, y del papel [17].

En la industria de alimentos, las mananasas pueden ser usadas para la maceración de frutas y vegetales, y en la clarificación de jugos y vinos [17]; en la extracción de aceites vegetales de semillas de leguminosas, en la reducción de la viscosidad del extracto durante el proceso del café instantáneo [18], en el mejoramiento en la consistencia de la

cerveza, el biopulpeo de la madera [22] y para mejorar las propiedades gelificantes de los galactomananos para ser usados como espesantes alimenticios [17, 19]. Son usadas también como aditivos en alimentos para animales (pollos y cerdos), para facilitar la digestión y asimilación de los nutrientes [23-25]. Las β -mananasas también fueron introducidas dentro del mercado de los detergentes como agente contra las manchas difíciles de quitar durante el lavado [20, 26]. Últimamente la producción de una segunda generación del bioetanol a partir de sustratos lignocelulósicos ha recibido mucha atención ya que los mananos se encuentran en una cantidad importante en las maderas blandas que pueden ser llevados a azúcares reductores por acción de la mananasa [27-28].

1.2 Inmovilización de enzimas

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos [29]. Son de una gran actividad catalítica, alta especificidad de sustrato y muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

Muchas enzimas usadas en la industria son demasiado costosas, presentan una baja estabilidad a las condiciones de trabajo y, al ser usualmente solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil y por lo tanto no se pueden reutilizar [29]. Cuando son insolubilizadas en una matriz adecuada resulta un biocatalizador que puede ser reusado varias veces, y por lo tanto se disminuyen los costos del proceso [4, 30], permitiendo un mejor control de la reacción y el diseño de reactores que pueden ser fácilmente incorporados dentro de una línea de un proceso continuo [31].

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que 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 repetidamente [29]. Los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican de acuerdo al enlace de la enzima con el soporte, si es por *Retención Física* o por *Unión Química*.

Los métodos de inmovilización mediante retención física están divididos en atrapamiento e inclusión en membranas. El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por

prepolímeros o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano [32-33]. Sin embargo, existen algunas desventajas al utilizar este método las cuales incluyen una baja resistencia mecánica, tamaño de poro grande y una liberación de enzima del soporte [34]. Hasta el momento, se han propuesto varios métodos para optimizar la eficiencia del atrapamiento, como el recubrimiento de la superficie del soporte con biopolímeros entrecruzados [35].

Los métodos de inmovilización de enzimas mediante unión química están divididos en unión a soportes por enlace covalente y reticulado. La unión por enlace covalente es uno de los métodos más utilizados y de los que se dispone de una mayor información [36-37]. El soporte a utilizar y del tipo de enlace definen el comportamiento posterior del biocatalizador [38]. Se debe procurar que la inmovilización aumente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas [32, 39].

Entre las ventajas de las enzimas inmovilizadas se encuentra el aumento de la estabilidad de la enzima, la posibilidad de reutilizar la enzima disminuyendo costos del proceso y aumentando su productividad y la facilidad para el uso de biorreactores de procesos en continuo. [29, 40-41].

La inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas, se producen cambios en la estabilidad, y se crea un sistema heterogéneo en el cual los demás componentes se encuentran en interface, en el medio de reacción y en el sólido que contiene la enzima inmovilizada. Como consecuencia de esto la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno [29].

La quitina es un biopolímero biodegradable que se encuentra principalmente en los residuos pesqueros como los caparazones de jaibas y camarones. Tiene un alto grado de acetilación y es altamente insoluble. El quitosano se obtiene por desacetilación de la quitina y a medida que disminuye el grado de acetilación aumenta la solubilidad del material [42] lo que permite la formación de pellets de catalizadores con diferentes formas (placas, microesferas, etc.) [43]. Estos biopolímeros ofrecen un conjunto único de características: son biocompatibles, biodegradables a productos inocuos, no-tóxicos, fisiológicamente inertes, tienen propiedades antibacteriales, hacen quelación iónica de

metales pesados, tienen propiedades de formación de gel e hidrofiliidad, y una notable afinidad por las proteínas [3].

El quitosano con bajo grado de acetilación es altamente soluble en agua. No obstante, la formación de un polícatión con carbonato de amonio hace el biopolímero insoluble y da la posibilidad de obtener micro esferas por secado por aspersion [6]. En los últimos años, la tecnología de soporte magnético ha mostrado un atractivo significativo para la inmovilización de enzimas. El quitosano puede ser usado como material base para los soportes magnéticos [8]. El quitosano magnético es una opción de soporte para la inmovilización de enzimas, porque permite remover el sistema inmovilizado del medio de reacción con ayuda de un campo magnético.

1.3 Torta de Palmiste

La palma de aceite es el cultivo oleaginoso que mayor cantidad de aceite produce por unidad de superficie en el mundo. Tarda entre 4 y 5 años para empezar a producir fruto y puede hacerlo durante más de 25 años.

El procesamiento de los frutos de la palma de aceite, ilustrados en la figura 1-2, se lleva a cabo en la planta de beneficio que retira el aceite crudo de palma y el de sus almendras o aceite de palmiste. Estos dos aceites representan en promedio un 21% y 5%, respectivamente del peso de racimos de fruta fresca (RFF) que se procesan en una planta extractora. Adicionalmente, el proceso genera volúmenes importantes de biomasa, que constituyen aproximadamente el 41% en el peso de RFF; esto plantearía que las plantas son de manera general más productoras de biomasa que de aceite. El total de la biomasa residual producida está conformada por 22% de tusa, 13% de fibra, 4,5% de cuesco y, aproximadamente, 0,80 ton de efluentes liquidas por tonelada de RFF [44].



Figura 1-2. Fruto de la palma de aceite

El proceso consiste en esterilizar los frutos, desgranarlos, macerarlos, extraer el aceite de la pulpa, clarificarlo y recuperar las almendras del bagazo resultante. En la figura 1-3 se presentan un diagrama completo del aprovechamiento industrial de la palma de aceite.

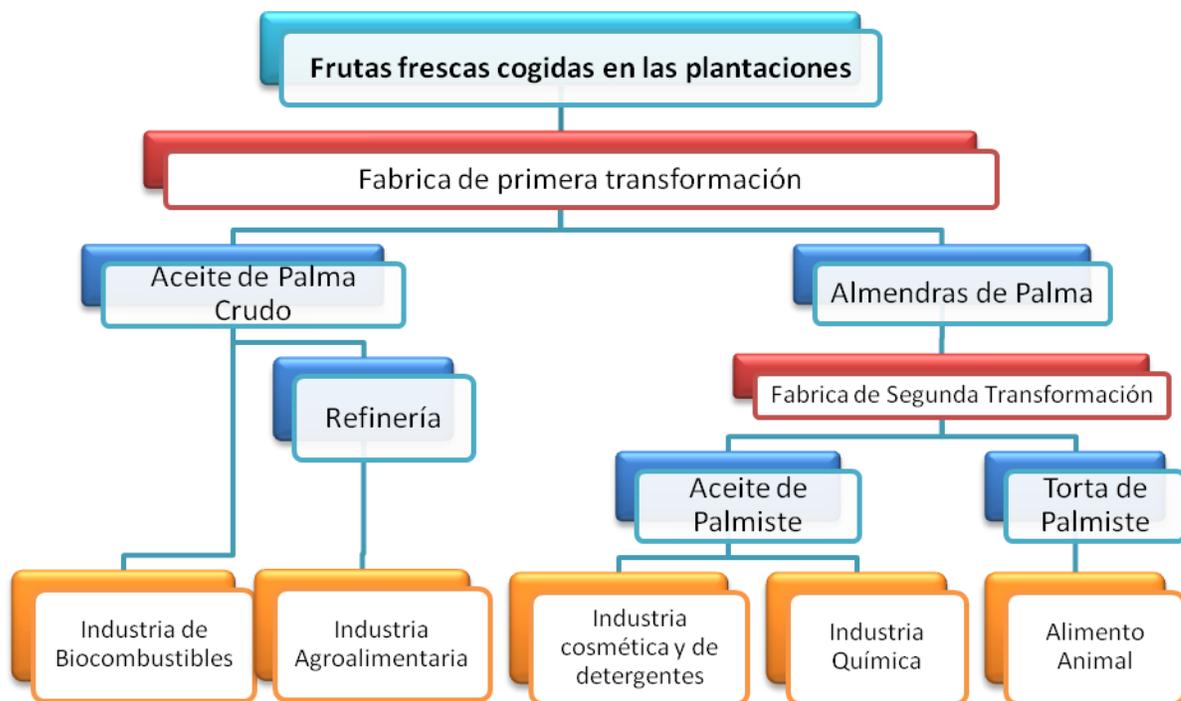


Figura 1-3. Aprovechamiento industrial de la palma de aceite

Los granos de palma producidos durante el proceso de molienda de frutos de palma contienen aproximadamente el 50% de aceite, el cual puede extraerse comercialmente a través de dos métodos: extracción mecánica y extracción con disolventes.

El aceite de palma es el segundo aceite mas consumido en el mundo y se emplea como aceite de cocina y para elaborar productos de panadería, pastelería, sopas instantáneas, diversos platos congelados y deshidratados. Igualmente se utiliza el aceite crudo para la producción de jabones y detergentes, en la elaboración de grasas lubricantes y secadores metálicos, destinados a la producción de pintura, barnices y tintas.

De las almendras se obtienen dos productos: el aceite de palmiste y la torta de palmiste, subproducto que es utilizado principalmente para la alimentación animal, en especial para el ganado pues gracias a sus propiedades se puede mezclar en concentrados haciéndolos más digeribles [45].

El aceite de palmiste, aunque proviene del mismo fruto, es muy diferente al de palma y en cambio guarda similitud con el de coco. Semisólido o sólido a temperatura ambiente, se derrite por encima de los treinta grados centígrados y, al contacto con la boca, brinda una suave sensación similar a la de la manteca de cacao. Ello lo hace especialmente atractivo para los amantes del chocolate, en cuya preparación sustituye al cacao, al igual que reemplaza la grasa de la leche, por su sabor neutro y su larga vida [46].

1.3.1 Producción en Colombia

En el caso de la palma de aceite, Colombia es el quinto productor de aceite de palma en el mundo después de Malasia, Indonesia, Nigeria y Tailandia; y el primero en Latinoamérica con una producción superior a 753 mil toneladas de aceite en el 2010 y más de 402 000 Ha sembradas [45]. En la figura 1-4 se observa que los productores mundiales de palma de aceite se encuentran en la zona ecuatorial. La siembra de palma africana en el país se encuentra en un crecimiento vertiginoso, registrando en los últimos años un aumento anual del área sembrada del 9%, lo que posiciona como un cultivo de interés nacional [47].



Figura 1-4. Productores mundiales de Palma de aceite [45]

El cultivo de la palma africana se presenta principalmente en los departamentos de Magdalena, Cesar, Santander, Casanare, Caquetá, entre otros.

Su cultivo en años anteriores era tardío, una palma se demoraba 50 años para crecer, madurar y dar el fruto. Actualmente el cultivo de palma es muy rápido, en aproximadamente 5 años se logra la maduración y gracias a la tecnología agroindustrial la cosecha se logra en menor tiempo e igualmente el producto final [48].

Las universidades de Colombia tienen un interés en estudiar los usos de la Palma Africana y sus derivados. Con el apoyo de Fedepalma, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Fondo de Fomento Palmero, se tiene como propósito fundamental la formulación de trabajos enfocados en la reducción de costos y/o la obtención de productos con mayor valor agregado, mediante métodos ambientalmente sustentables a través de los subproductos del proceso de extracción del aceite; desarrollar o implementar los bancos de germoplasma, para generar nuevas variedades que sean competitivas tanto en producción como en calidad, y de esta forma contribuir a mejorar la competitividad del sector palmicultor de Colombia [47].

1.3.2 Aplicaciones de la torta de palmiste

La torta de palmiste tiene un alto contenido de fibra y por lo tanto es usado generalmente en los alimentos para rumiantes como el ganado. Sin embargo, la torta de palmiste es también buena fuente de fitina, que es un precursor del ácido fítico y el inositol. Los dos últimos compuestos tienen muchas aplicaciones industriales.

Fuente de alimento para animales

Es una muy buena opción alimenticia por ser una valiosa fuente de energía, fibra y proteína que aporta en gran medida, en el balance nutricional de la alimentación animal [11]. Estudios de la combinación de enzimas como mananasas, galactosidasas y celulasas con la torta de palmiste prometen resultados alentadores, además que la acción de la enzima da tres beneficios a las aves de corral: la degradación puede eliminar factores antrinutricionales de la dieta, los carbohidratos se pueden absorber más fácilmente dentro del sistema y los manooligosacaridos tienen función prebiótica que mejora la salud de los animales [49].

Hidrólisis

Al realizar separadamente la hidrólisis de los galactomananos se obtiene una torta de palmiste enriquecida es sus demás componentes, principalmente en proteína. Este subproducto enriquecido se puede utilizar también como alimento para animales [14]. La torta de palmiste tiene también aplicación como sustrato en la fermentación sólida del *Aspergillus niger*, para la producción de mananasa [15-16].

Biocombustibles

Con la creciente demanda de los biocombustibles hay una búsqueda constante de nuevas materias primas, la alternativa de carbohidratos fermentables toma fuerza junto con la hidrólisis enzimática de subproductos agroindustriales como material lignocelulósico [28]. La torta de palmiste, por su alto contenido de carbohidratos es ideal para la producción de bioetanol [13]. Colombia al ser el quinto productor de palma en el mundo tiene una gran ventaja para la investigación y el desarrollo de biocombustibles a partir de esta materia prima que hasta ahora ha sido poco estudiada.

La industria de la palma de aceite genera grandes cantidades de residuos, como conchas, fibras y la torta de palmiste, las cuales pueden ser usadas para la generación de energía. La tendencia mundial hacia la búsqueda de alternativas energéticas más limpias y amigables con el ambiente, así como el óptimo aprovechamiento de los recursos disponibles, hacen volver la mirada hacia el potencial de esta biomasa generada [44].

La biomasa generada en la extracción del aceite puede transformarse por tres vías principalmente: mediante procesos biológicos, fisicoquímicos y térmicos. En cuanto a los tratamientos biológicos, se tienen los productos obtenidos mediante la fermentación, los cuales pueden ser azúcares, alcoholes, celulosa, metano, hidrógeno y CO₂; mediante la fermentación. Con la amonificación, se pueden obtener alimentos para animales. Adicionalmente, puede aplicarse tratamiento biológico para la obtención de compost y hongos comestibles. Con el tratamiento físico-químico de la biomasa se obtienen directamente pulpa para papel, aglomerados, aditivos para concreto, fertilizantes (secado), fibras especiales (carros) y absorbentes, así como compuestos carotenoides de alto valor agregado [44].

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Mediante una mananasa comercial inmovilizada en un soporte biopolimérico basado en quitina/quitosano es posible realizar la hidrólisis de sustratos ricos en mananos logrando una liberación de azúcares simples.

2.2 Objetivo General

Inmovilizar y caracterizar una mananasa sobre un soporte a base de quitina y/o quitosano para la hidrólisis de torta de palmiste.

2.3 Objetivos Específicos

- Realizar un estudio cinético de la mananasa libre sobre el sustrato.
- Sintetizar y caracterizar los soportes producidos en este trabajo a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de la enzima.
- Inmovilizar la mananasa sobre los soportes sintetizados.
- Realizar un estudio cinético del mejor sistema soporte-enzima inmovilizada sobre el sustrato y compararlo con la enzima libre.

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y Materiales

La torta de palmiste usada para la producción de alimentos para animales se obtuvo de CIPA, Cartago Colombia. El Quitosano en polvo (alto peso molecular 602kDa, grado de acetilación 76,5%) fue obtenido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, United States), Rohalase®GMP (preparación enzimática que contiene mananasa como actividad principal) con una actividad específica nominal de 1.000.000 MNU g⁻¹, es una enzima en polvo que contiene 44% de proteína (según medición en el método de Bradford) la enzima fue obtenida de AB Enzymes (Darmstadt, Germany). Pectina cítrica (contenido metoxy 60%) fue comprada de Cp Kelko (Sao Paulo, Brasil). Todos los demás reactivos orgánicos o inorgánicos usados fueron grado analítico.

3.2 Caracterización de la torta de palmiste

La torta de palmiste fue caracterizada por medio de un análisis bromatológico, con el objetivo de comparar sus componentes con los reportados en la literatura para tortas de palmiste provenientes de diferentes partes del mundo. La masa seca fue determinada secando a 115°C hasta peso constante. Las cenizas totales fueron calculadas por incineración a 550°C hasta peso constante. La proteína fue estimada como el nitrógeno total determinado por Kjeldahl. El contenido de grasa fue determinado por extracción Soxhlet con éter etílico. Todo el ensayo bromatológico fue realizado de acuerdo a la AOAC [50].

Para la hidrólisis enzimática se realizaron diferentes pruebas para la obtención de lodo de la torta de palmiste en agua, creando una dispersión uniforme con la ayuda de un homogenizador MICCRA D-1 a 35000 rpm. Se trabajaron concentraciones en el rango de concentraciones comprendido entre 5mg/ml y 300 mg/ml, con el objetivo de encontrar una dispersión homogénea y una alta concentración de sustrato para la hidrólisis enzimática. Se encontró que a concentraciones por encima de 250 mg/ml la dispersión es muy pesada, e imposible de agitar con los equipos de agitación disponibles.

3.3 Producción de soportes

Se fabricaron seis soportes a base de quitina y/o quitosano, buscando obtener un soporte adecuado para la inmovilización de la enzima que fuera estable en el medio de reacción. Se realizaron modificaciones al quitosano con pectina, epíclorhidrina y anhídrido acético procurando obtener una matriz polimérica insoluble. Adicionalmente se realizaron modificaciones con hierro, obteniendo soportes con características magnéticas para ser separados del medio de reacción a través de un campo magnético. A continuación se enlistan los soportes producidos:

- ✓ Quitina
- ✓ Quitosano modificado con pectina y hierro obtenidos por secado por aspersión (CPFF)
- ✓ Quitosano modificado con epíclorhidrina y hierro, obtenido por liofilización (CEFF)
- ✓ Quitosano modificado con anhídrido acético y hierro, secado por liofilización (CAFF)
- ✓ Quitosano modificado con epíclorhidrina y secado por aspersión (CE)
- ✓ Quitosano modificado con anhídrido acético y secado por aspersión (CA)

3.3.1 Quitina

La quitina se extrajo de caparazones de jaibas siguiendo el protocolo de Vaillant [31] y con modificaciones realizadas en el grupo de investigación. Como se muestra en la figura 3-1 los caparazones de jaibas inicialmente se lavaron con el fin de quitarles la materia orgánica e impurezas presentes, posteriormente se pusieron a secar en un horno a 60°C durante 48 horas. Una vez secos se molieron y tamizaron, y se usaron los gruesos malla 35 serie Tyler. A continuación se realizaron los procesos de desproteínización con NaOH, descalcificación con HCl y desacetilación con NaOH como se explica en la figura 3-1.

En el proceso de desacetilación se evaluaron diferentes concentraciones de NaOH, entre 1 y 6 N y tiempos de reacción entre 1 y 8 horas, como parte de un trabajo de investigación en el que participó la tesista, realizado para la Federación Nacional de

Cafeteros, de carácter reservado, se obtuvo un material de soporte basado en quitina/quitosano apto para la aplicación en café, diferente al utilizado en esta tesis.



Figura 3-1 Diagrama de producción de quitina

3.3.2 Soportes obtenidos por secado por aspersión

Tres soportes fueron preparados por secado por aspersión obteniendo soportes con una morfología microesférica. El quitosano se modificó con diferentes agentes como pectina, epichlorhidina y anhídrido acético con el objetivo de obtener soportes más resistentes en el medio de reacción.

3.3.2.1 Quitosano modificado con pectina y hierro (CPFF)

Uno de los métodos evaluados en esta tesis para obtener un soporte con base en quitosano con baja solubilidad fue crear un complejo polielectrolítico con pectina, y darle propiedades magnéticas para facilitar su separación del medio de reacción. A continuación se detallan los métodos de preparación del soporte.

El ferrofluido sintetizado fue el mismo para brindar propiedades magnéticas a los diferentes tipos de soportes a base de quitosano.

3.3.2.1.1 Síntesis del Ferro Fluido

Para la síntesis se preparó una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5M) y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.5M) (relación molar de 2:1). Inmediatamente se agregaron 15 ml de solución de amonio (25%v/v) usando agitación magnética hasta alcanzar un pH de la solución de 11. Se adicionó ácido oleico (5% v/v) y se agitó intensamente a 60°C por 30 min. El precipitado fue separado usando un imán y se lavó con agua desionizada varias veces. La solución de ferrofluido fue centrifugada y después una cantidad de la fase sólida fue dispersa en keroseno [51].

3.3.2.1.2 Síntesis del complejo polielectrolito quitosano-pectina

Una sal de quitosano (10 g, que contenían 1 gr de quitosano y una cantidad estequiométrica de HCl) y una solución saturada de NH_4HCO_3 fueron mezcladas e incubadas a 20°C durante 5 días, sin agitación para obtener carbamato de quitosano, $\text{Chit-NHCO}_2^- \text{NH}_4^+$. Este carbamato de quitosano se vertió en un peso cuatro veces mayor de agua, y se agitó durante 30s con un emulsionante para obtener una solución clara. El ácido poligalacturónico (pectina) se disolvió en una solución de NH_4HCO_3 . Las dos soluciones se mezclaron justo antes de secado por aspersion [6].

3.3.2.1.3 Preparación de microesferas magnéticas de quitosano

A 200 ml de la dispersión quitosano-pectina se añadieron 10 ml de Ferro Fluido. El sistema se agitó vigorosamente durante 2 horas. Después de eso, 100 ml de la dispersión se deshidrató en un secador por aspersion para obtener microesferas de quitosano modificado con hierro y pectina. La temperatura de entrada del aire fue de 120°C .

3.3.2.2 Quitosano modificado con epiclorhidrina (CE)

El segundo soporte a base de quitosano fue modificado con epiclorhidrina, con el fin de crear entrecruzamiento entre las moléculas de quitosano y crear un soporte con una menor solubilidad.

Seis gramos de quitosano se disolvieron en ácido acético al 1%, se mezcló con epichlorhidrina 0,05M, la solución se agitó durante 30 min y después fue secada por aspersion a una temperatura de entrada del aire= 120°C, Temperatura de salida del aire 60°C, buscando minimizar el efecto de la actividad enzimática.

3.3.2.3 Quitosano modificado con anhídrido acético (CA)

El tercer soporte se fabricó igualmente con quitosano de alto grado de acetilación (76%) que se hizo reaccionar con anhídrido acético, con el objetivo de disminuir el grado de desacetilación del soporte y, como consecuencia, la solubilidad del mismo.

Seis gramos de quitosano se disolvieron en ácido acético al 1%, se mezcló con Anhídrido acético disuelto en metanol, luego se agregaron 3 gr de enzima. La solución se agitó durante 30 min, posteriormente fue secada por aspersion a las condiciones: Temperatura de entrada del aire= 120°C, Temperatura de salida del aire= 60°C.

3.3.3 Soportes obtenidos por Liofilización

Dos soportes fueron preparados por liofilización, CEFF y CAFF, de quitosano modificado con epiclorhidrina y anhídrido acético respectivamente. Ambos con adición de ferrofluido para brindar las propiedades magnéticas. En la liofilización se obtuvieron membranas porosas de quitosano.

3.3.3.1 Quitosano modificado con hierro y epiclorhidrina (CEFF)

El cuarto soporte se preparó bajo el mismo principio de la modificación con epiclorhidrina, buscando entrecruzamiento de las moléculas. Esta vez se buscó obtener una matriz con propiedades magnéticas mediante liofilización.

El quitosano de 76% grado de acetilación se disolvió en una solución de ácido acético al 1%, se le agregó ferrofluido al 5% con agitación constante y se mezcló por 30 minutos. Se agregó epíclorhidrina 0,05M. Las soluciones se mezclaron por 30 min y se esparcieron en las bandejas de liofilización.

La gelificación se realizó en las bandejas de liofilización usando una solución de NaOH al 74% y etanol diluido al 26%. Se gelificó por dos horas, luego se realizaron tres lavados con agua destilada y se procedió a liofilizar el producto durante 10 horas utilizando un calentamiento lento y moderado.

3.3.4 Quitosano modificado con hierro y anhídrido acético (CAFF)

El quinto soporte se realizó igualmente con quitosano de alto grado de acetilación (76%), con mezcla con anhídrido acético, con el objetivo de disminuir el grado de desacetilación del soporte y como consecuencia disminuir la solubilidad del mismo.

Quitosano de 76% grado de acetilación se disolvió en una solución de ácido acético al 1%, se le agregó ferrofluido al 5% con agitación constante durante 30 minutos. Se adicionó Anhídrido Acético disuelto en metanol al 5%. Seguidamente se hizo un tratamiento de gelificación en las bandejas de liofilización igual que en ítem 3.3.1. Después se procedió a una lenta liofilización.

3.4 Caracterización de los soportes

En la caracterización de los soportes se realizaron diferentes ensayos que permitieron determinar el de mejores condiciones para la inmovilización de enzimas y posterior reacción. Para ello se estudiaron morfología, composición y características como solubilidad, hinchamiento y resistencia a la agitación, métodos estandarizados en el grupo de investigación los cuales se describen a continuación.

3.4.1 Análisis de la morfología por microscopia

La morfología de los soportes basados en quitina y/o quitosano fue analizada usando SEM y ESEM. En el primer caso se usó un microscopio Hitachi SU-70 en el laboratorio YINQE en la Universidad de Yale, con una resolución de 1 nm y una aceleración de voltaje entre 0,5 y 30kV. Antes del análisis en el microscopio las muestras fueron

recubiertas con una delgada capa de oro. En el segundo se utilizó un equipo FEI-ESEM Philips XL30, de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. En este último equipo se hicieron además las medidas de rayos X retro-dispersados de las muestras (EDX).

El análisis elemental de los soportes y los sistemas soporte-enzima se realizaron usando un equipo de rayos X con energía dispersa (EDX) en seis micro-zonas de cada muestra utilizando un equipo ESEM/EDX XL30 TMP Philips, con 20kV de aceleración de voltaje. Este ensayo se realizó en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.

3.4.2 Caracterización Magnética

Las propiedades magnéticas de los soportes CPFF, CEFF y CAFF se evaluaron usando un Versalab - Vibrating Sample Magnetometer Quantum Design Inc. En la Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.

3.4.3 Resistencia a la agitación

La resistencia mecánica a la agitación se determinó por inmersión de 100 mg de los soportes en 200 ml de agua destilada por un período de 10 h, sometidos a tres niveles de agitación (250, 500 y 1110 rpm) a 20°C.

Luego de retirar el agua con la ayuda de una malla metálica (Tyler 20) se retiraron los soportes, se pesaron hasta peso constante en una estufa a 60°C. Las pruebas se realizaron por triplicado.

3.4.4 Solubilidad de los soporte en diferentes medios

La solubilidad de los soportes de quitosano se evaluó por inmersión de 10 mg del material seco en 1 ml de medio acuso y medio acuoso acidulado pH=3, durante 72 h a 20 °C. Finalizada la prueba se centrifugó la solución, se eliminó el sobrenadante y se secó el soporte hasta peso constante. El porcentaje de solubilidad se calculó con la siguiente fórmula (Eq.1):

$$\%S = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Masa Final}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

Eq.1

3.4.5 Hinchamiento

El porcentaje de hinchamiento se refiere a la capacidad que tiene el soporte para absorber agua y aumentar su volumen. En un ensayo típico una muestra de 10 mg de los soportes secos se introdujo en agua destilada durante 96 h a 20 °C. Se retiraron los soportes, se removió el exceso superficial de agua con papel filtro y se pesó la muestra húmeda. El porcentaje de hinchamiento se calculó con la siguiente ecuación (Eq.2):

$$\%H = \frac{\text{Masa final húmeda} - \text{Masa inicial seca}}{\text{Masa inicial seca}} * 100 \quad \text{Eq.2}$$

3.5 Inmovilización de mananasa

La enzima se inmovilizó en los soportes de quitina y quitosano, por dos diferentes métodos: adsorción y entrecruzamiento.

3.5.1 Inmovilización de mananasa en quitina

La inmovilización en quitina se realizó por entrecruzamiento, se activó la quitina previamente con glutaraldehído por 2 horas. Después se puso en contacto con la enzima por 24 horas a 28°C y 250 rpm. Al finalizar la inmovilización la mezcla se centrifugó y se realizaron tres lavados con agua destilada, a los cuales se les evaluó el contenido de proteína para determinar el porcentaje de inmovilización de la enzima.

3.5.2 Inmovilización de mananasa en soportes basados en quitosano

En los cuatro diferentes soportes de quitosano (CE, CA, CEFF y CAFF) se inmovilizó la mananasa por adsorción. 3 gr de mananasa (Rohalasa GMP) se mezclaron con 100gr de las soluciones de quitosano modificado antes del proceso de secado, con una agitación vigorosa y durante 30 minutos. Después se procedió al proceso de secado, ya sea por secado por aspersión o liofilización, manteniendo temperaturas por debajo de 60°C para conservar la actividad enzimática.

La inmovilización por entrecruzamiento se realizó para la quitina y para las microesferas de quitosano modificadas con hierro y pectina (CPFF). Para este proceso los soportes fueron activados en una solución de glutaraldehído al 1% como agente entrecruzador, durante 2 horas. Después se retiró el soporte, se enjuagó con agua destilada y se sumergió en la solución enzimática concentrada (Mananasa al 5%) con agitación suave y constante durante 24 h. Finalmente se filtró el soporte y se enjuagó con agua. El remanente se secó a 4°C durante 48 horas. En la figura 3-2 se presenta un resumen de los procesos de inmovilización.

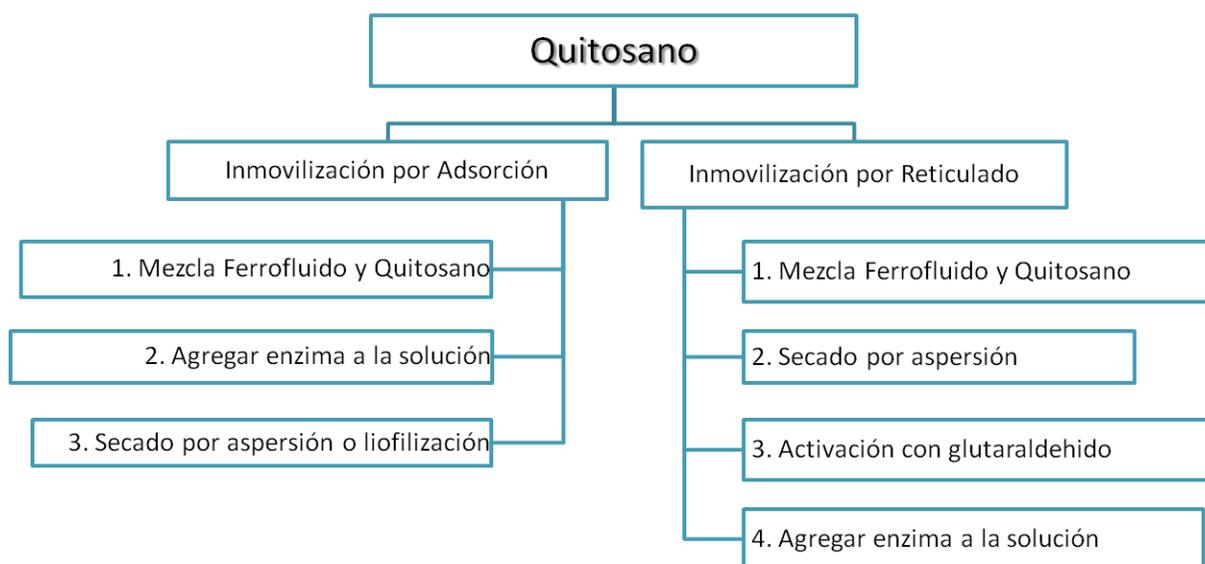


Figura 3-2. Diagrama de los dos métodos de inmovilización utilizados para la enzima con quitosano magnético.

3.6 Estudio cinético

3.6.1 Actividad catalítica β -mananasa

Para esta medida se utilizó *Goma Locust bean* soluble (1%; 0,5 ml). Las muestras de enzima inmovilizada (30 mg) se incubaron en la solución anterior a pH 6 y 50°C por 30 minutos. La reacción se detuvo realizando un choque térmico en un baño de hielo, luego la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm (1500 g) por 10 min a 4°C. La concentración de azúcares reductores en el sobrenadante fue determinada usando el método DNS. Una

unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que puede producir 1 μmol de azúcares reductores (base manosa) por 1 min [52].

3.6.2 Método DNS

En la reacción enzimática la mananasa hidroliza el galactomanano presente en la muestra. La cantidad de azúcares reductores liberados fue determinada espectrofotométricamente usando el método DNS para un equipo Nanodrop [53].

Para determinar el contenido de azúcares reductores por el método DNS se realizó una curva de calibración con manosa (ver Figura 3.3) en concentraciones desde 0 hasta 14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y el resultado que acá se presenta es el promedio de estos.

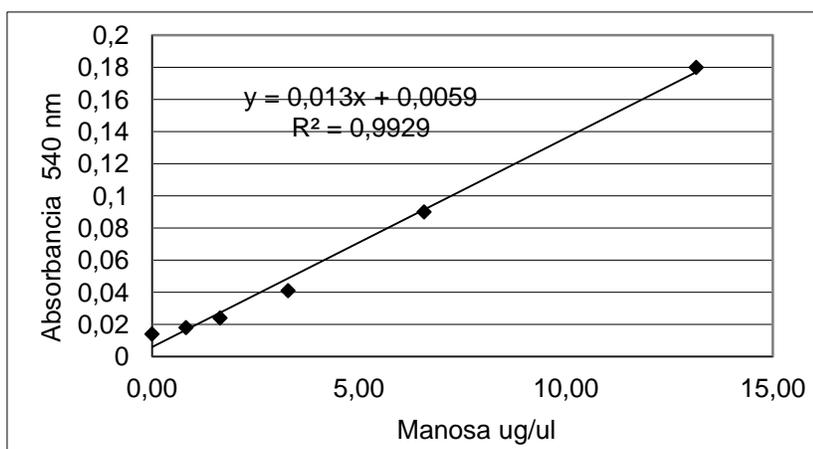


Figura 3-3. Curva de calibración de manosa para el método DNS. Absorbancia 540nm

3.6.3 Hidrólisis enzimática de la torta de palmiste

El sustrato para la hidrólisis enzimática fue preparado en buffer citrato 0.05M, pH 5,3, con una concentración de 10% w/w de torta de palmiste finamente granulada. La solución fue homogenizada a 35000 rpm con un MICCRA D-1. La hidrólisis fue realizada con 0,15% y 1% w/w de enzima libre e inmovilizada respectivamente. En cada ensayo también fue preparado un blanco de sustrato sin enzima.

La reacción se siguió durante 24 h a 50°C y 150 rpm, cinco muestras fueron analizadas durante la reacción. Estas pruebas se hicieron por triplicado.

Cuando se evaluó el comportamiento de la enzima comercial a diferentes valores de pH y temperatura se realizó la prueba de hidrólisis por 30 minutos a 50°C con agitación constante de 150 rpm, los rangos evaluados fueron pH entre 2 y 12, T entre 20 y 70 °C y concentración de sustrato entre 20 y 250 mg/ml.

La concentración de azúcares reductores en el sobrenadante fue determinada usando el método DNS. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que puede producir 1 μmol de azúcares reductores (base manosa) por 1 min [52].

4. Resultados

Las secciones 4.1 y 4.2 se refieren al sustrato y a su acondicionamiento para el tratamiento enzimático. Los demás resultados se relacionan en el mismo orden en el que se declararon los objetivos específicos. Así, en la sección 4.3 se realiza un estudio cinético de la mananasa libre sobre el sustrato; en la 4.4 se detallan las pruebas ejecutadas para sintetizar y caracterizar los soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de la enzima; en la 4.5 las actividades asociadas a la inmovilización de la mananasa sobre los soportes sintetizados y, finalmente, en la 4.6 se describe el estudio cinético de la mananasa inmovilizada sobre los sustratos de *locust bean gum* y torta de palmiste.

4.1 Caracterización de la torta de palmiste

Se realizó el análisis bromatológico de la torta de palmiste recibida, con el objetivo de conocer los componentes de esta y principalmente la cantidad de carbohidratos disponibles para realizar la hidrólisis. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos y el método que se usó para cada medida.

Determinación	Resultado	Método
pH	5,16 Unidades pH	Potenciométrico
Acidez	1,15 %CaCO ₃	Volumétrico
Cenizas (b.s)	3,79 %	Calcinación a 500°C
Grasas (b.s)	12,7 %	Soxhlet
Humedad	6,09 %	Secado a 110°C
Fibra (b.s)	24,6 %	Gravimétrico
Proteína (b.s)	16 %	Kjeldhal
Fosforo	4572 mgP/Kg	Colorimétrico - Cloruro Estañoso
Carbohidratos (b.s)	43 %	Extracto Libre de Nitrógeno

Tabla 1. Análisis bromatológico para la torta de palmiste.

Se encontró que la torta de palmiste se compone principalmente por carbohidratos en un 43,97%, seguido de fibra en un 24,57%, proteína 16% y grasas 12,6%. Estos resultados

son similares a los encontrados en la literatura, que para una torta de palmiste proveniente de Malasia se encontró un 48% de carbohidratos y un 15% de proteína [13]. Debido a esta composición la torta de palmiste es utilizada como alimento para animales, lo cual se podría seguir haciendo aun después de la extracción de azúcares para la producción de bioetanol, pues seguiría siendo un material rico en fibra y proteína [14].

4.2 Dispersión de torta de palmiste en agua

Existen diversos métodos para la producción de azúcares reductores por métodos biotecnológicos empleando materiales biomásicos sólidos, entre ellos se encuentran las fermentaciones en fase sólida y sumergida. En ambas técnicas la transformación del sustrato requiere de tiempos de operación del orden de días. En contraste, los tratamientos enzimáticos con este propósito duran entre 20 y 50 h [54].

Para el caso particular de la torta de palmiste se han realizado varios trabajos en los que se usó la fermentación en fase sólida con propósitos de mejora en su calidad con el propósito de utilizarla en piensos [55] como sustrato para el crecimiento de hongos [56] y la producción de enzimas [57].

Jørgensen et al. (2010) liberaron azúcares mediante una hidrólisis enzimática de un lodo diluído que contenía torta de palmiste. Utilizaron un coctel de enzimas no inmovilizadas [14]. Para el presente trabajo se siguió un procedimiento similar pero con una enzima inmovilizada.

Se escogió entonces una concentración de 100 mg/ml (10%w/w) para realizar los ensayos cinéticos, nivel en el que se tuvo una dispersión homogénea fácil de agitar mecánicamente. En adelante, cuando se mencione el sustrato de torta de palmiste debe entenderse como su dispersión al 10% en agua.

4.3 Estudio cinético de la mananasa libre sobre la torta de palmiste

La hidrólisis de la torta de palmiste se realizó con la enzima libre con el fin de encontrar las condiciones óptimas y la estabilidad de la enzima, el efecto del pH y la temperatura fue analizado con respecto de la actividad relativa de la enzima. En los apartados 4.3.1 al 4.3.3 se utilizó una concentración de enzima comercial de 0.15 %

4.3.1 Efecto de la Temperatura

Al igual que la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de una reacción catalizada por enzimas aumenta a medida que la temperatura se eleva. Un aumento de diez grados centígrados en la temperatura puede aumentar la actividad de las enzimas de un 50 a un 100%. La reacción se llevó a cabo con torta de palmiste al 10% (w/w), a un pH fijo de 6, referenciado como el pH óptimo de la enzima según su ficha técnica. La cantidad de azúcares liberados se evaluó por el método DNS después de 30 minutos la reacción se detuvo sumergiendo el reactor en un baño de hielo. Los resultados se presentan en la Figura 4-1, y en la Tabla 2.

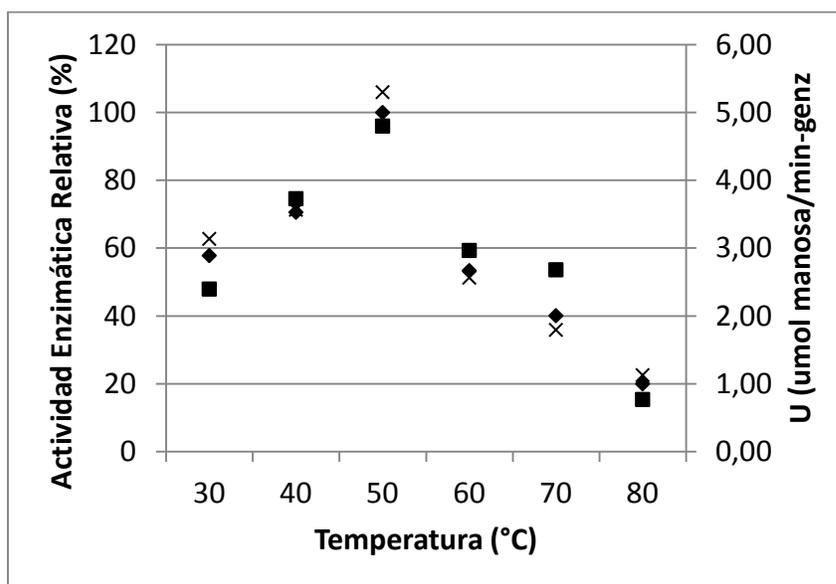


Figura 4-1. Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática de la torta de palmiste al 10%(w/w), pH=6. La actividad enzimática se expresa como actividad relativa, tomando como 100% la mayor actividad obtenida, la cual fue a 50°C. Los resultados se presentan por triplicado, (x) primer ensayo, (♦) Segundo ensayo, (■) Tercer ensayo.

Como se muestra en la Figura 4-1, el aumento de la velocidad de reacción con la temperatura llega a un nivel máximo, estableciendo la temperatura óptima en 50 °C. Las actividades relativas se determinaron entonces como el porcentaje de actividad respecto de la actividad de la reacción a 50°C.

T (°C)	Actividad Enzimática (U) 1	Actividad Enzimática (U) 2	Actividad Enzimática (U) 3	Promedio	Desviación Estándar
30	2,40	3,14	2,97	2,83	0,39
40	3,73	3,57	3,62	3,64	0,08
50	4,80	5,30	5,13	5,08	0,25
60	2,97	2,57	2,74	2,76	0,20
70	2,68	1,80	2,06	2,18	0,46
80	0,77	1,13	1,03	0,97	0,18

Tabla 2. Datos de actividad enzimática a diferentes temperaturas. Valores promedios y desviación estándar. Reacción en torta de palmiste al 10%(w/w), pH=6.

A 60°C la velocidad de reacción disminuye al 50% de la máxima y sigue disminuyendo con el aumento de la temperatura de tal forma que, en 80°C solo presenta el 20% de su actividad máxima. Se ha observado un comportamiento similar al reportado para mananasas de origen fúngico como la utilizada en este trabajo de *Trichoderma reesei* [58-59], sin embargo la mananasa es también una enzima muy termoestable y en algunos casos alcanza una temperatura óptima de hasta 75°C [60]. Mananasas de diferentes orígenes como hongos, bacterias y moluscos, presentan temperaturas óptima se encuentra en el rango entre 50 y 60°C [19, 27, 61]. A temperaturas por debajo de 50°C se encuentra la enzima aún activa, con un 60% de su actividad máxima.

En la tabla 2. se presentan los valores numéricos con los cuales se construyó la Figura 4-1, la reacción se realizó por triplicado y se presenta una desviación estándar aceptable para un nivel de confiabilidad del 95%.

4.3.2 Efecto del pH

Valores de pH extremadamente altos o bajos generalmente se traducen en la pérdida completa de la actividad para la mayoría de las enzimas. El pH es también un factor en la estabilidad de las enzimas. El estudio del efecto del pH se llevó a cabo a la temperatura óptima anteriormente determinada (50°C) y en torta de palmiste al 10% (w/w).

En la figura 4-2 se presenta la curva de pH, encontrando un óptimo alrededor de un pH de 6. Presentó una sensible disminución de actividad en valores inferiores a pH 6 y una ligera disminución de esta propiedad entre pH 5 y 8. La tabla 3 presenta los datos numéricos de los ensayos realizados, encontrando igualmente bajas desviaciones estándar para un nivel de confiabilidad del 95%.

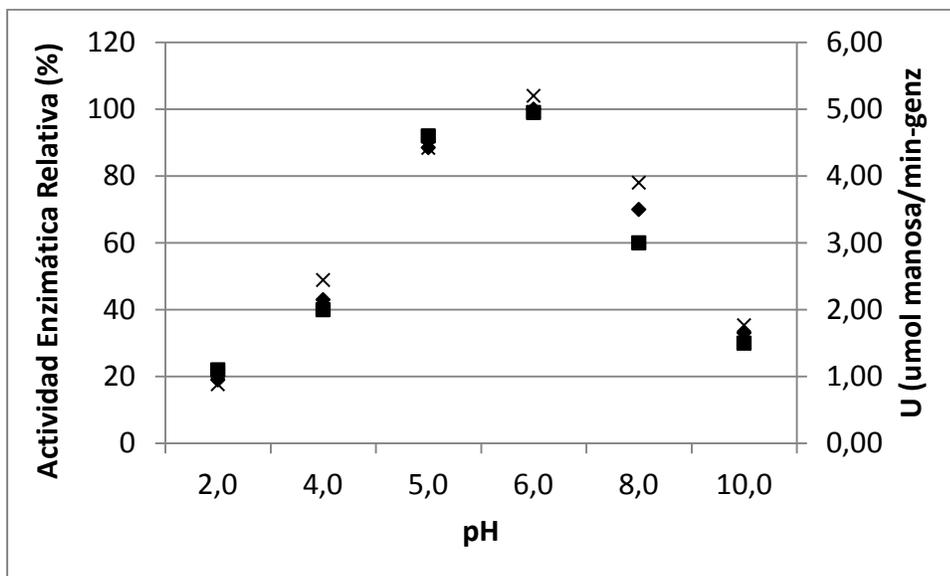


Figura 4-2. Efecto del pH en la hidrólisis enzimática de la torta de palmiste al 10%(w/w), 50°C. La actividad enzimática se expresa como actividad relativa, tomando como 100% la mayor actividad obtenida, la cual fue a pH 6. Los resultados se presentan por triplicado, (x) primer ensayo, (♦) Segundo ensayo, (■) Tercer ensayo.

pH	Actividad Enzimática (U) 1	Actividad Enzimática (U) 2	Actividad Enzimática (U) 3	Promedio	Desviación Estándar
2,0	1,14	0,88	0,99	1,01	0,13
4,0	2,08	2,44	2,24	2,25	0,18
5,0	4,78	4,42	4,60	4,60	0,18
6,0	5,15	5,20	5,20	5,18	0,03
8,0	3,12	3,90	3,64	3,55	0,40
10,0	1,56	1,77	1,72	1,68	0,11

Tabla 3. Datos de actividad enzimática a diferentes pHs. Valores promedios y desviación estándar. Reacción en torta de palmiste al 10%(w/w), T=50°C.

Las enzimas del tipo mananasa presentan un amplio rango en estabilidad de pH, dependiendo principalmente de su procedencia. Se ha reportado que las mananasas de origen fúngico tienen actividad en un amplio rango de pH entre 3,5 y 9 [57], mananasas provenientes de *Trichoderma reseei* presentan pH óptimo entre 5 y 6 [60].

4.3.3 Efecto de la concentración de sustrato

El efecto de la concentración del sustrato en la velocidad inicial se evaluó con el fin de encontrar la máxima concentración de sustrato hidrolizable por la enzima. Anteriormente

se había determinado que por encima de 250 mg/ml se tenía una solución sobresaturada imposible de agitar. Y se había escogido 100 mg/ml o 10%w/w para realizar los ensayos cinéticos, ya que a esta concentración se permitía una buena agitación de la solución homogénea. Sin embargo se realiza la hidrólisis con la enzima libre a diferentes concentraciones, buscando la concentración máxima, a partir de la cual se genera inhibición por parte del sustrato.

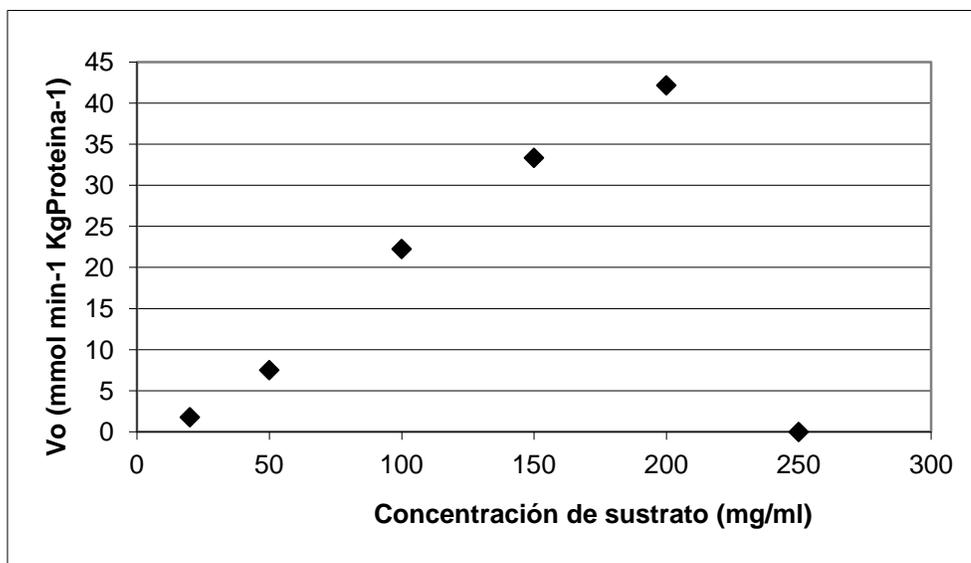


Figura 4-3. Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática de torta de palmiste. Condiciones de reacción: 50°C, 30 min, 150 rpm

La reacción se llevó a cabo para cada concentración de sustrato a 50°C, pH=6 durante 30 min. La solución se homogenizó a 35000 rpm. La velocidad inicial aumentó gradualmente con el ascenso de la concentración de sustrato hasta alcanzar un valor máximo de 42 mmol m⁻¹Kg⁻¹ (concentración de 200 mg/ml). Se obtuvo un descenso en la actividad catalítica para concentraciones por encima de la mencionada.

Las altas concentraciones de torta de palmiste (>200mg/ml), generan una dispersión homogénea altamente viscosa, imposible de agitar, lo cual impide una distribución uniforme de la enzima imposibilitando por limitaciones de transferencia de masa su acción catalítica.

Se eligió continuar trabajando a una concentración de torta de palmiste de 100 mg/ml (10%w/w), por facilidades de operación mecánica y comodidad del medio de reacción.

4.3.4 Efecto de la concentración de enzima

Para una concentración fija de torta de palmiste (10%w/w), pH 6 y temperatura 50°C, se evaluaron diferentes concentraciones de enzima, con el fin de encontrar la mínima cantidad de enzima necesaria para una buena liberación de azúcares.

En la figura 4-4, se observa que a mayor cantidad de enzima existe una mayor liberación de azúcares a los 170 minutos de la reacción. Con 0.15% de enzima se obtuvieron 6.2 mg/ml de azúcares, y con aumentos en la concentración de enzima a 0,25% y 0,5 % se obtuvo una liberación de 6,54 y 6,28 mg/ml de azucars respectivamente, valores que comparados con la prueba t student no son estadísticamente significativos, pues presentan valores de p iguales 0,09 y 0,08 respectivamente.

Para un 1% de concentración de enzima se obtuvieron 7.2 mg/ml de azucars reductores. Una diferencia de 1 mg/ml con respecto a lo obtenido con 0,15% de enzima, lo cual verificado con una prueba t de student es una diferencia estadísticamente significativa, ya que tiene un valor de p igual a 0,00001.

Sin embargo, se elige la concentración de enzima más baja utilizada (0.15%) para continuar con los ensayos, pues es adecuada para la hidrólisis enzimática, presenta una respuesta medible en el tiempo de reacción y nos lleva a un menor consumo de la enzima.

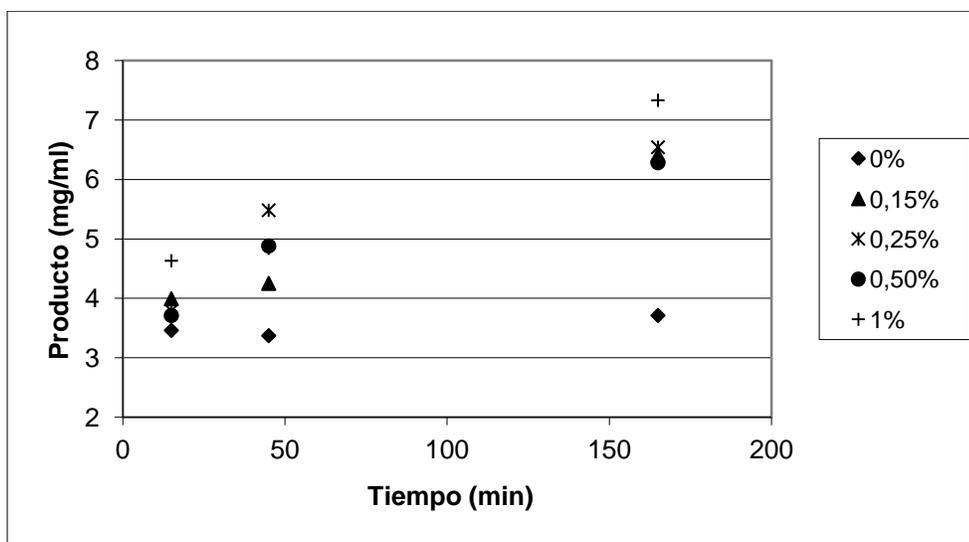


Figura 4-4. Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10% (w/w). La reacción se siguió durante 170 minutos a 50°C, pH=6 y 150 rpm.

4.3.5 Parámetros cinéticos de la enzima libre

Con los datos obtenidos de velocidad inicial para cada concentración de torta de palmiste (Sección 4.3.3) fue posible realizar la gráfica de Lineweaver-Burk para determinar las constantes cinéticas aparentes para la producción de manosa, suponiendo una reacción mono-sustrato catalizada por la enzima libre según la ecuación de Michaelis-Menten (Eq.3):

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 3}$$

Con el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten se tiene la ecuación para una línea recta en el diagrama de Lineweaver-Burk (Eq.4):

$$\frac{1}{V} = \frac{(K_m + [S])}{(V_{max}[S])} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Eq 4}$$

En la Figura 4-5 se presenta la gráfica de Lineweaver-Burk para la mananasa en su estado libre. Los datos se unen en una línea de tendencia recta y se calcula la regresión con un $R^2 = 0,97$.

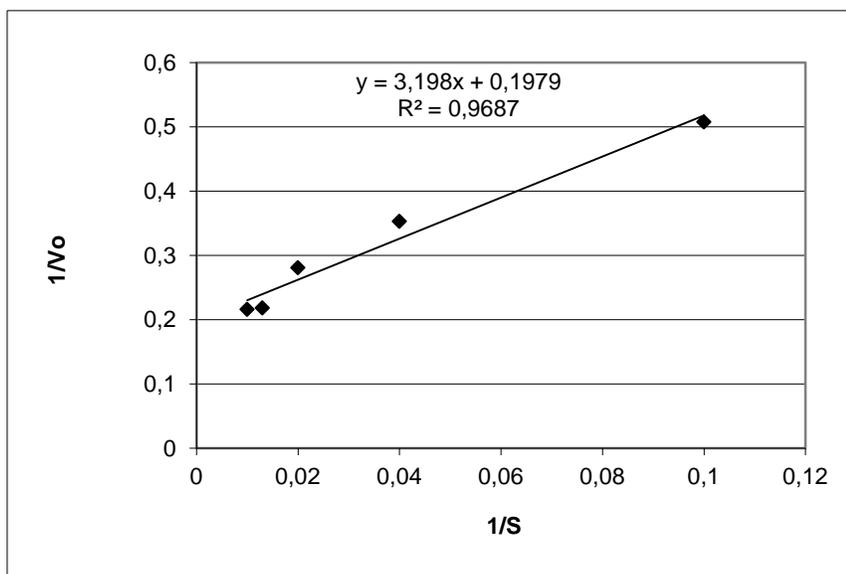


Figura 4-5. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros cinéticos de la enzima libre.

La regresión obtenida de la Figura 4-5 se presenta en la Eq. 5:

$$\frac{1}{v_o} = 3,198 \frac{1}{S} + 0,1979 \quad \text{Eq. 5}$$

De acuerdo a la Eq. 4 se pueden despejar los parámetros cinéticos V_{max} y K_m aparentes, se llaman aparentes debido a la heterogeneidad del sustrato:

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,1979 \rightarrow V_{max} = 5,05 \text{ mmol manosa min}^{-1} \text{ KgProteina}^{-1}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 3,198 \rightarrow K_m = 16,15 \text{ mg/ml}$$

El valor de K_m expresa la afinidad de la enzima por el sustrato en una relación inversamente proporcional, entre menor sea el valor de K_m , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato. En este caso se presenta un K_m aparente igual a 16 mg/ml, valor que puede ser considerado alto y que debido a la naturaleza de la torta de palmiste, heterogénea e insoluble, se presentan dificultades para una buena afinidad entre la enzima y el sustrato específico [62].

4.4 Fabricación y caracterización de los soportes

Los mayores problemas en la inmovilización de enzimas en matrices de biopolímeros para uso en medios acuosos son su baja resistencia mecánica y su solubilidad en dichos medios. Ya que en el grupo de investigación se tenía una experiencia previa exitosa en el uso de quitina y quitosano para catálisis enzimática heterogénea en medios no acuosos, se propuso utilizar esta familia de materiales biopoliméricos como soportes a los que se les debían hacer modificaciones con el propósito de lograr superar los dos problemas citados y, además, que facilitaran la separación del sistema biocatalítico del medio de reacción para reiterados usos. Para este último fin se consideraron entonces varios soportes híbridos biopolímero-ferrofluido que permitieran una separación del biocatalizador mediante campo magnético. Adicionalmente se evaluaron los mismos

materiales con tratamientos insolubilizantes pero sin hierro. En resumen, se prepararon y evaluaron los siguientes soportes:

- ✓ Quitina
- ✓ Quitosano modificado con pectina y hierro obtenido por secado por aspersión (CPFF)
- ✓ Quitosano modificado epiclorhidrina y hierro, obtenido por liofilización (CEFF)
- ✓ Quitosano modificado con anhídrido acético y hierro, secado por liofilización (CAFF)
- ✓ Quitosano modificado con epiclorhidrina secado por aspersión (CE)
- ✓ Quitosano modificado con anhídrido acético, secado por aspersión (CA)

Se realizó la caracterización morfológica de los soportes, se revisó su composición y capacidades magnéticas, y para verificar si estas matrices de soporte enzimático habían mejorado sus condiciones de solubilidad y resistencia mecánica fueron sometidas a pruebas de resistencia a las condiciones del medio y a la agitación.

4.4.1 Caracterización morfológica de los soportes

Para el soporte secado por aspersión se inmovilizó la enzima usando dos metodologías: la primera por atrapamiento, mezclando la enzima antes del secado por aspersión y obteniendo CPFFM, y la segunda por adsorción-enlace covalente, realizando un tratamiento a las microesferas CPFF con glutaraldehído durante 2 h y después ponerlas en exposición con la enzima.

Las microesferas de quitosano/pectina/FF (CPFF) y quitosano/pectina/FF/mananasa (CPFFM), estuvieron en un rango entre 1-5 μm de diámetro, similar a otras microesferas magnéticas preparadas por un método diferente [8].

El diámetro de las partículas es un factor importante para el material de soporte. Las partículas más pequeñas tienen mayor proporción superficie/volumen y, consecuentemente, mas exposición superficial de las enzimas y menor restricción para la difusión de sustratos y productos [63].

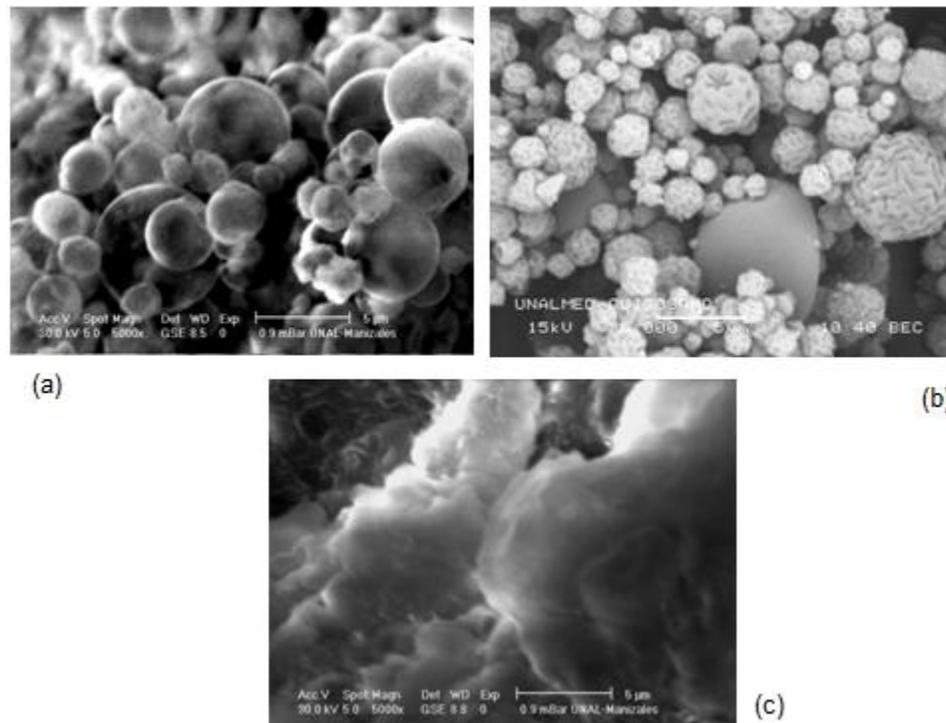


Figura 4-6. Soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas, polielectrolito quitosano-pectina (a) Microesferas de quitosano/pectina (sin propiedades magnéticas) (b) Microesferas magnéticas de quitosano con mananasa inmovilizada por atrapamiento (c) Enzima inmovilizada sobre microesferas magnéticas de quitosano por enlace covalente.

La superficie lisa es la característica más común cuando se obtienen microesferas por secado por aspersión de quitosano y complejos polielectrolitos de quitosano [8, 64-65]. Se observan cambios visibles en el aspecto morfológico de las microesferas de quitosano/pectina secadas por aspersión (Figura 4-6 (a)), y en las que se inmovilizó la enzima por atrapamiento de la mananasa (Figura 4-6 (b)). El patrón de surcos que se observa en la superficie de estas últimas microesferas (debido presumiblemente al efecto de incremento en la conductividad térmica de la microesfera por la presencia de hierro y, consecuentemente, al aumento de la velocidad de secado) casi desaparece con la mananasa inmovilizada por enlace covalente, en donde se realizó un tratamiento con glutaraldehído diluido en agua al 1%.

Las microesferas tratadas con glutaraldehído (CPFFMG) para la inmovilización de enzimas por enlace covalente pierden su forma en el procedimiento de inmovilización de la mananasa por efecto de la disolución parcial del material de soporte en la solución acuosa de la enzima. En la figura 4-6 (c), las micrográficas ESEM de las partículas

magnéticas CPFFMG fue transformada en un poroso plano con microesferas separadas, probablemente debido a la disolución y agregación parcial del polielectrolito recubriendo las partículas de ferrofluido, consecuencia del reticulado asociado con la activación del soporte con glutaraldehído requerido para el proceso de inmovilización por enlace covalente.

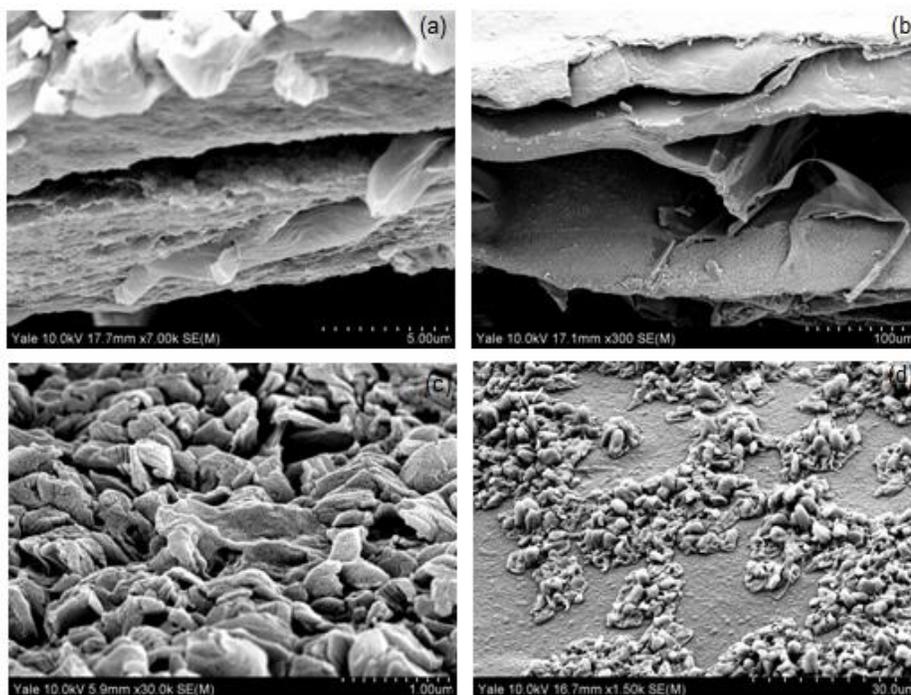


Figura 4-7. Soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas, membranas de quitosano-hierro y epíclorhidrina (CEFF). (a) Vista lateral de la membrana sin enzima (b) Vista lateral de membrana con enzima inmovilizada CEFFM (c) Vista frontal de CEFFM (d) Vista frontal de CEFFM zoom out.

El quitosano magnético tratado con epíclorhidrina fue secado por liofilización (CEFF). En la figura 4-7 se observan cuatro micrografías con diferentes magnificaciones. En la de menor aumento (figura 4-7 (a)) se observan superficies laminares sobre las que se insinúan algunas partículas superficiales. No se observan poros. El acercamiento mayor de la figura 4-7 (b) permite estimar un espesor de lámina entre 10 y 20 μm y una separación entre ellas muy variable. En las figuras 4-7 (c-d) se identifican racimos o agrupaciones de partículas sobre la superficie, comunes en membranas de quitosano

con entrecruzamiento por epíclorhidrina, en donde se presenta superficie áspera, rugosa y con abultamientos o plegada [66-68].

4.4.2 Medidas EDX

Para las microesferas magnéticas de quitosano se detectó la presencia de tres elementos mediante la técnica rayos X retro dispersados de las muestras expuestas al haz electrónico del microscopio ambiental ESEM (X-Ray EDX) (Figura 4-8). Las señales intensas del carbono y el oxígeno corresponden a los átomos de la matriz de atrapamiento biopolimérico. La señal del hierro se debe a la presencia del ferrofluido. Es importante señalar que esta última señal solo fue detectada cuando se usó un voltaje de aceleración de 20KeV (Tabla 4).

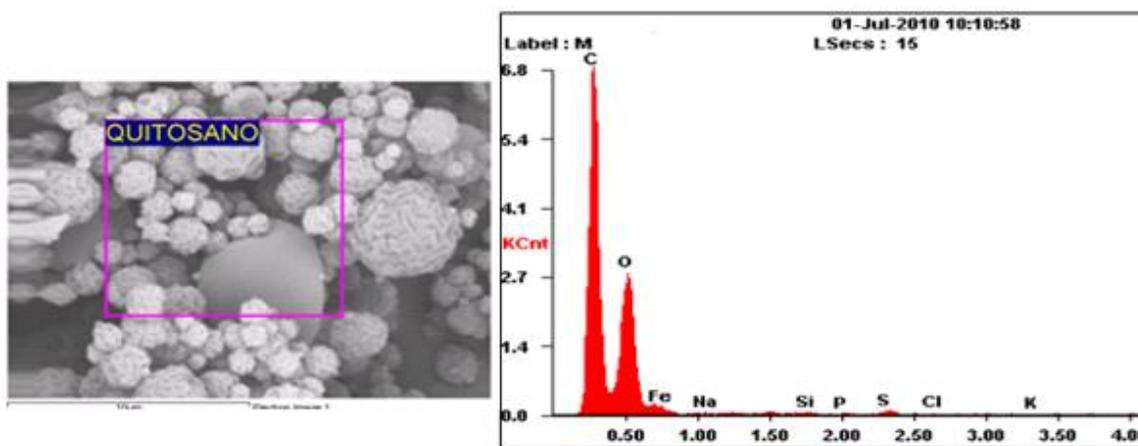


Figura 4-8. Espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDX). La micrografía a la izquierda muestra un área de orientación de las muestras. Derecha: Respuesta típica EDX mostrando la concentración relativa de los elementos C,O y Fe en las microesferas.

Muestra	C(%)	O(%)	Fe(%)
CPFF	67.1	31.5	0.9
CPFFM	68.9	29.7	1.0
CPFFMG	72.0	26.1	1.7

Tabla 4. EDX (20 kV) contenido relativo (%) de C,O and Fe en los soportes magnéticos (CPFF) y en la mananasa inmovilizada. Contenido promedio de seis micro-zonas en cada muestra.

Cuando el voltaje se reduce a 2.5 KeV, los electrones con esa energía no alcanzan a penetrar lo suficiente en las microesferas y por lo tanto las partículas de hierro no son

detectadas. Estos resultados confirman que el ferrofluido hace parte del núcleo de unas microesferas recubiertas con la matriz biopolimérica de quitosano/pectina.

El hierro contenido en CPFFMG (Tabla 4) es mayor que en las microesferas, una posible explicación es que el tratamiento con glutaraldehído hace el material más denso, lo que reduce el espesor recubrimiento biopolimérico de las partículas de hierro.

4.4.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La unión de mananasa en CEFF fue investigada por FTIR. Figura 4-9. El pico alrededor de 3390 cm^{-1} está relacionado con estiramiento NH, y es más profundo en Figura 4-9 (B), debido a la superposición de las aminas primarias y grupos hidroxilo que surgen de los grupos asimétricos y simétricos de estiramiento de la N-H₂ y O-H de la molécula de la enzima [69], también es evidente el incremento de las intensidades de los picos afilados a 1650 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , y 1190 cm^{-1} pertenecientes a CONH-amida I, II y C amida N-estiramiento de la amida III, respectivamente, que también puede ser atribuye a la unión de la enzima [70]. Los picos confirman la unión de la enzima dentro de la membrana CEFFM.

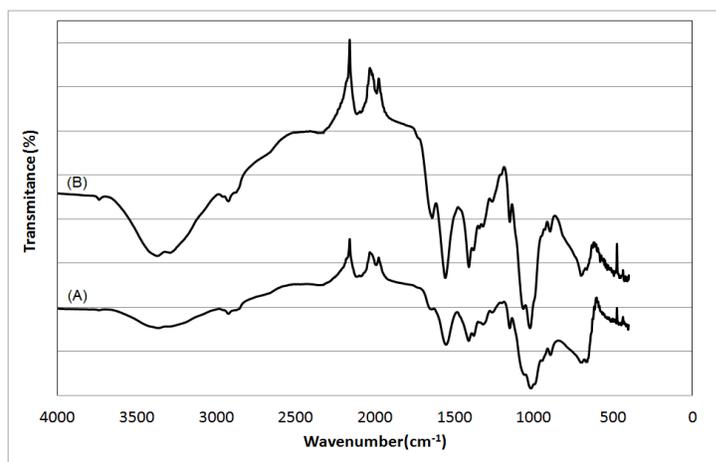


Figura 4-9. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (a) CEFF, (b) CEFFM

El mismo análisis se encuentra en las microesferas de quitosano modificado con epíclorhidrina, el cual se obtuvo por secado por aspersión. La comparación de las muestras con y sin enzima inmovilizada se muestra en la figura 4-10, donde se observa

claramente una pronunciación en el pico alrededor de 3400 cm^{-1} , el cual corresponde al estiramiento NH como se explicó anteriormente [69]. Se presentan también un incremento en la intensidad de los picos a 1650 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} (bandas amida I y amida II), y 1190 cm^{-1} los cuales confirman la inmovilización de la enzima en el soporte.

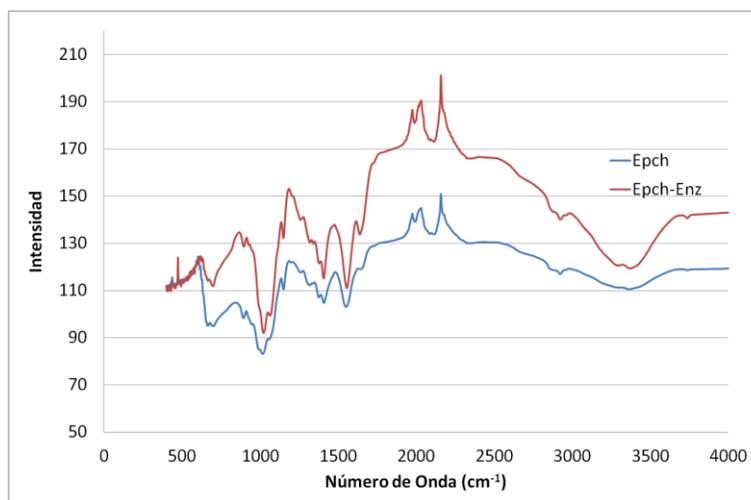


Figura 4-10 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para las muestras de quitosano magnético con Epiclorhidrina con y sin enzima inmovilizada.

Se realizó una comparación de la quitina extraída de los caparazones de jaibas con una muestra de quitina comercial, con el interés de verificar la quitina que se produjo. El espectro se presenta en la figura 4-11. En esta se observa una similitud en la intensidad presentada para números de onda mayores a 1500, los cuales corresponden a enlaces carbono-oxígeno, y en los cuales se puede presentar ruido debido las humedades de las muestras, la intensidad de los enlaces OH se observa en 1640 cm^{-1} . En la región de las bandas 1074 y 1025 cm^{-1} , se observan al menos dos bandas que pueden estar relacionadas con alguno de los enlaces CO, COH, COC y CH_2OH , la intensidad de estas se espera no cambie con el grado de desacetilación de la quitina [71].

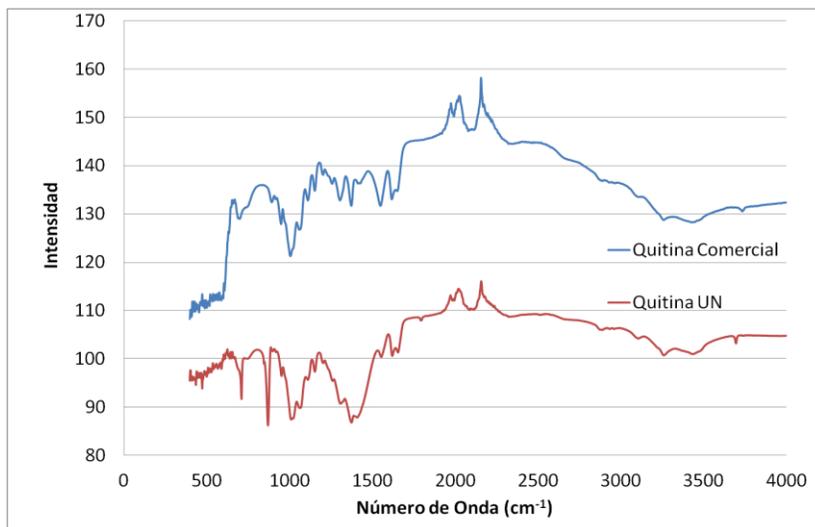


Figura 4-11 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para las muestras de quitina comercial y quitina extraída de caparzones de jaibas.

4.4.4 Perfiles de Magnetización

La Figura 4-12, muestra el perfil de magnetización de las microesferas CPFF, CPFFM y las partículas CPFFMG. Junto con el aumento de quitosano/pectina en las muestras decrece la magnetización saturada. Los rangos de magnetización saturada para las muestras CPFF y CPFFM fueron de 10 emu/g y 5 emu/g respectivamente. La magnetización saturada para la muestra con alto contenido de hierro fue igual a CPFF (10 emu/g) probablemente debido a la exposición parcial de las partículas de hierro en la muestra. Estos valores fueron similares a los reportados para otras microesferas de quitosano (10 a 20 emu/g) en estudios recientes [72-73]. La ausencia de histéresis indica que las micro esferas son superparamagneticas [74]. La magnetización saturada se alcanza para un campo magnético de 2500 Oe, es decir que el soporte puede ser retirado del medio de reacción por un campo magnético igual o superior a este.

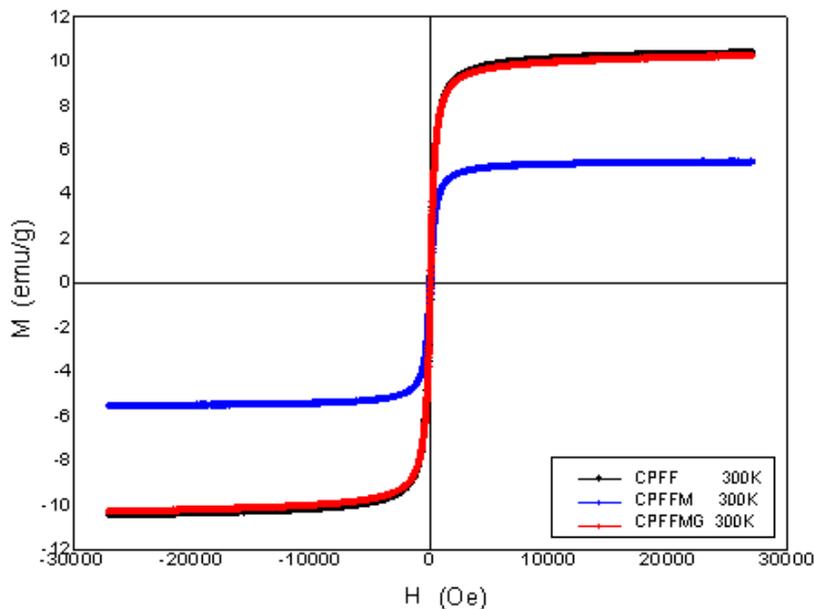


Figura 4-12 Curva de magnetización de las muestras recubiertas con quitosano/pectina.

4.4.5 Solubilidad, hinchamiento y resistencia a la agitación de los soportes

Los soportes preparados fueron analizados en sus propiedades físicas para determinar su viabilidad como soportes de inmovilización.

Los factores evaluados fueron: % de Solubilidad, % de Hinchamiento y % de Resistencia a la agitación. En la tabla 5 se presentan los resultados de estas variables analizadas, promedio de tres ensayos para cada soporte con su respectiva desviación estándar.

La Quitina presentó un % de solubilidad del 10,3%, el más bajo de todos los soportes, debido a su rígida estructura cristalina, y a los puentes de hidrogeno internos y externos realizados entre sus moléculas gracias a su alto grado de acetilación [75], igualmente es un soporte altamente resistente a la agitación.

Muestras	% Solubilidad		% Hinchamiento		% Resistencia Agitación	
	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
Quitina	10,3	0,2	14,6	0,5	95,3	0,5
CEFF	21,0	1,0	78,9	1,0	70,0	1,4
CAFF	36,7	0,6	97,8	0,7	52,8	1,2
CE	90,4	1,4	64,5	1,3	42,5	1,3
CA	97,5	0,5	71,7	0,6	35,4	1,2
CPFF	48,2	0,8	92,7	0,8	49,6	1,5

Tabla 5. Porcentajes de solubilidad, hinchamiento y resistencia a la agitación de los soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de enzimas. Las cifras mostradas son el promedio de los resultados de tres medidas.

De los materiales de quitosano modificado es evidente que aquellos materiales que contienen ferrofluido sean más insolubles que las mismas matrices que no lo tienen pues la fracción inorgánica que contienen es en sí misma insoluble en agua.

La epiclorhidrina es un agente entrecruzador por excelencia que reacciona únicamente con los grupos OH en condiciones básicas [76], el soporte de quitosano modificado con epiclorhidrina y secado por aspersión (CEFF) presentó los mejores resultados de solubilidad entre los soportes a base de quitosano, con un porcentaje del 21% de solubilidad, corroborando el entrecruzamiento realizado con la epiclorhidrina, el porcentaje de hinchamiento es 78,9%, debido a la naturaleza polimérica del quitosano que permite su expansión para la captación de agua, sin embargo a pesar de alcanzar un alto hinchamiento el soporte permanece intacto con una baja solubilidad. La fuerza del entrecruzamiento se observa también en el alto porcentaje de resistencia a la agitación alcanzado.

La acetilación del quitosano puede ser lograda usando anhídrido acético, y el grado de acetilación puede ser controlado por las condiciones de reacción [75], a un mayor grado de acetilación se logrará un menor porcentaje de solubilidad [77]. El soporte de quitosano modificado con anhídrido acético (CAFF) presenta un 36,6 % de solubilidad, y un porcentaje de hinchamiento del 97%, valores muy altos que indican que la re-acetilación del quitosano no fue exitosa, sin embargo la diferencia que existe entre el alto porcentaje

de hinchamiento y el relativamente bajo porcentaje de solubilidad indican que posiblemente existió una acetilación parcial y entrecruzamiento de las moléculas, que permite que estas se expandan para captar agua, sin solubilizarse completamente.

Comparativamente el método de secado que mejor se comportó en cuanto a las propiedades analizadas fue el de la liofilización. Los soportes liofilizados presentan una baja solubilidad del 21% y el 36% para los tratamientos con epiclorhidrina y anhídrido acético respectivamente. Estos tratamientos químicos generan entrecruzamiento por los grupos OH del quitosano y desacetilación, lo que a su vez hace que disminuya la solubilidad del soporte [78].

Los materiales secados por liofilización pasaron además por un proceso previo de gelificación y congelación, operaciones que tardan cierto tiempo, y que permiten la agregación de las moléculas, lo cual podría explicar el por qué estos materiales presentaron solubilidades menos respecto a los soportes secados por aspersión. Ambos materiales secados por liofilización CEFF y CAFF fueron escogidos para continuar con los ensayos de inmovilización y pruebas de actividad enzimática. El soporte CEFF fue el que presentó las mejores características para resistir el medio de reacción.

Los soportes secados por aspersión recibieron tres tratamientos independientes, con pectina, epiclorhidrina y anhídrido acético, los dos últimos se realizaron en ausencia de ferrofluido con el objetivo de evaluar el entrecruzamiento con solo estas moléculas.

Los soportes CE y CA son polvos que presentan porcentajes de solubilidad por encima del 90%, sin embargo se observó que el entrecruzamiento con epiclorhidrina fue más efectivo que con anhídrido acético, se presentó igual comportamiento en los soportes secados por liofilización. Estos dos soportes se descartaron para continuar con los análisis, debido a su pequeño tamaño de partícula y porcentaje de solubilidad se hace muy difícil la reacción enzimática propuesta.

Respecto del % de resistencia a la agitación se encontró que los soportes más débiles, que se fraccionan por consecuencia de fuertes agitaciones y rozamientos, fueron los secados por aspersión. Mientras que los soportes secados por liofilización presentan una mayor resistencia, de hasta el 70%, este hecho también se le puede atribuir al mayor tiempo de exposición a los reactivos inherente a las operaciones previas a la liofilización.

El % de hinchamiento es bastante alto para todos los soportes, esto debido a la naturaleza polimérica del quitosano y a su capacidad de expansión y absorción de agua, los porcentajes más bajos se presentan para el tratamiento con epiclorhidrina, donde posiblemente el grado de entrecruzamiento alcanzado limita la movilidad molecular y, consecuentemente, restringe el grado de hinchamiento.

De acuerdo a los anteriores resultados se escogieron cuatro soportes, mínimo uno por cada método de secado con los cuales se realizó la inmovilización de la mananasa y la hidrólisis del *locust bean gum* como primera medida de actividad. Estos soportes fueron:

- ✓ Quitina
- ✓ Quitosano modificado con epiclorhidrina y hierro, obtenido por liofilización (CEFF)
- ✓ Quitosano modificado con anhídrido acético y hierro y obtenido por liofilización (CAFF)
- ✓ Quitosano modificado con pectina y hierro obtenido por secado por aspersion (CPFF)

El sistema mananasa-quitina fue utilizado en un estudio de inmovilización de varias mananasas para la reducción de sedimentos del extracto del café, en el marco de un contrato entre la Universidad Nacional de Colombia y la Federación Nacional de cafeteros. El director de tesis y la estudiante autora de este documento participaron en este trabajo y, con el compromiso adquirido en el acuerdo de confidencialidad de este contrato, algunos aspectos técnicos relacionados con este sistema biocatalítico no pueden ser divulgados públicamente. Por ello, y aunque se realizaron todas pruebas con este soporte, solo se presentan ciertos resultados acá por las citadas limitaciones legales.

Los dos soportes magnéticos restantes se analizaron por separado en su morfología, composición, capacidad magnética, y, luego de ser utilizados para inmovilizar la enzima, se comparó su actividad enzimática con la que mostró la enzima comercial en estado libre.

4.5 Caracterización cinética de la mananasa inmovilizada

Las enzimas inmovilizadas sobre los soportes de quitina, quitosano/pectina (CPFF), quitosano/epiclorhidrina (CEFF) y quitosano/anhídrido acético (CAFF) fueron probadas para la hidrólisis de la torta de palmiste. Su actividad enzimática se analizó inicialmente en un sustrato estándar como lo es la goma locust que permite monitorear cuantitativamente por la liberación de azúcares y cualitativamente por la reducción de su viscosidad a medida que se liberan los azúcares.

4.5.1 Actividad enzimática

La actividad de las enzimas inmovilizadas fue determinada en la goma locust bean. Los resultados promedio de tres ensayos se presentan en la tabla 6. El proceso de inmovilización por atrapamiento durante el secado fue exitoso manteniendo más del 70% de la actividad catalítica de la enzima libre después de ser secada por aspersion (CPFFM) y liofilizada (CEFFM).

La inmovilización por secado por aspersion tiende a mostrar una actividad relativa baja comparada con métodos de secado a baja temperatura como la liofilización [79]. Con este trabajo se pudo demostrar que la mananasa inmovilizada por secado por aspersion tiene una alta actividad enzimática remanente, incluso mayor a la presentada por las muestras secadas por liofilización.

	Enzima Libre	Quitina	CPFFM	CEFFM	CAFFM
Unidad de Actividad (U)	384,5	312,4	296	277,5	154
Actividad Remanente (%)	-	81,2	76,9	72,1	40,1

Tabla 6. Actividad remanente de las enzimas inmovilizadas en quitina, y en soportes a base de quitosano mediante secado por aspersion CPFFM y liofilización CEFFM

El sistema enzima-soporte que presenta mayor actividad fue la quitina, reportando el 81% de la actividad, comparada con la enzima libre, a iguales condiciones de reacción (T=50°C, pH=6), la inmovilización por reticulado fue más eficaz y conservó mayor actividad enzimática debido a la formación de enlaces entre el soporte y la enzima a través del glutaraldehido [80]. Adicionalmente el enlace covalente con glutaraldehido

puede aumentar el área superficial del soporte y disminuir el impedimento estérico alrededor del sitio activo de la enzima [81]. La quitina ha presentado las mejores características en los análisis, con un bajo porcentaje de solubilidad, y manteniendo una buena actividad enzimática, factores fundamentales para el trabajo con enzimas inmovilizadas.

El sistema enzima-quitosano modificado con pectina (CPFFM), conservó el 76% de la actividad de la enzima libre, un buen porcentaje de actividad para el método de secado por aspersión, durante el proceso de inmovilización la temperatura de salida se conservó por debajo de 60°C, cercana a su temperatura óptima de reacción, variable que permitió conservar una buena parte de la actividad enzimática.

Los soportes secados por liofilización, correspondientes al quitosano modificado con epiclorhidrina (CEFFM) y anhídrido acético (CAFFM), presentan actividades enzimáticas muy diferentes. Por un lado, la epiclorhidrina es usada como un agente entrecruzador o reticulante como el glutaraldehído, con el cual se han tenido altas eficiencias en la inmovilización [82]. El soporte CEFFM presentó una actividad enzimática promedio del 72,1 %, confirmando un alto grado de inmovilización de la enzima en este soporte, para otras enzimas inmovilizadas en quitosano modificado con epiclorhidrina se presentó también un alto porcentaje de inmovilización [83], comprobado por análisis de proteína. Sin embargo, la actividad enzimática retenida fue menor al 20% de la actividad de la enzima libre [84]. El proceso final de liofilización se realizó a temperaturas por debajo de 60°C con el objetivo de preservar la enzima.

Para el soporte CAFFM, el anhídrido acético fue usado con el objetivo de acetilar nuevamente el quitosano, es decir, de agregar grupos acilo a la cadena principal del polímero, y de esta manera tener un soporte con baja solubilidad [85]. Aunque el soporte presentó un alto porcentaje de hinchamiento (97%), presenta también una solubilidad relativamente baja (36%), por lo cual se probó su actividad enzimática en la *goma locust bean*, los resultados obtenidos demuestran una baja actividad enzimática residual, del 40%, la más baja de los cuatro sistemas analizados.

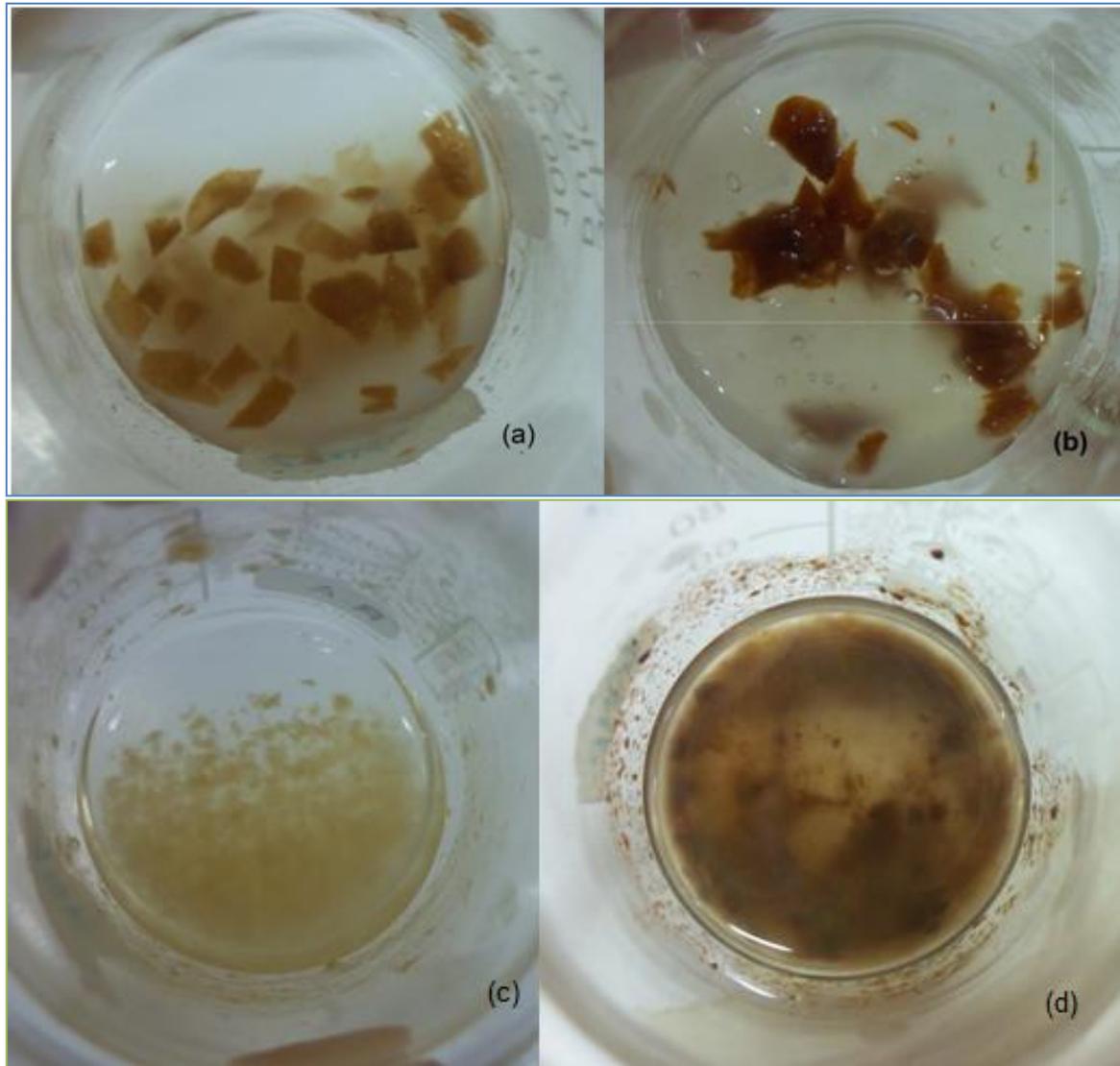


Figura 4-13 Fotografías ensayo de actividad catalítica en *locust bean gum* al 1%, 50°C, pH=6 de las enzimas inmovilizadas: (a) CEFFM (b) CAFFM (c) Quitina y (d) CPFFM

La figura 4-13 presenta fotografías en donde se muestra como quedó el sistema sustrato-enzima inmovilizada luego de realizar esta prueba comparativa de actividad. Una mayor turbidez y mejor definición entre las fronteras de las partículas del catalizador y el medio da una idea de la insolubilidad del sistema. Para el caso de muestras codificadas como CEFFM (Fig 4-13(a)), CAFFM (Fig 4-13(b)), Quitina (Fig 4-13 (c)) se logra diferenciar las partículas del medio, con una baja solubilidad. Sin embargo, para la muestra CPFFM (Fig 4-13(d)) se observa claramente como el soporte no es estable en el sustrato y se

presenta una pérdida de la integridad del soporte. Sin embargo presenta una buena actividad enzimática.

La enzima inmovilizada en CAFFM, no presentó una actividad notable en la hidrólisis el *locust bean gum*, como se observa en la Figura 4-13(b) el medio continua viscoso después de 30 min de reacción mientras que los demás medios presentan alta fluidez, demostrando la actividad de la enzima.

Por medio de filtración fue posible separar los sistemas de quitina y CEFFM, ambos fueron usados para realizar ciclos sucesivos de actividad enzimática en el *locust bean gum*, para determinar su estabilidad operacional.

El soporte de CEFFM, no presentó actividad enzimática en el segundo ciclo, esto posiblemente por el alto porcentaje de hinchamiento de la muestra, el cual pudo permitir una liberación de la enzima y/o cambios en la distribución de la enzima.

Con el sistema quitina-mananasa se realizaron 7 ciclos sucesivos, las curvas de reacciones se presentan en las figuras 4-14 y 4-15. En cada ciclo se usaron los mismos 30 mg de quitina y se hidrolizó *locust bean gum* al 1%, la actividad enzimática se comparó con la enzima libre. Inicialmente se reportó la concentración de azúcares liberados por la enzima en cada ciclo, donde se encuentra que esta liberación de azúcares desciende en cada ciclo, teniendo una pérdida de actividad del 35% para el cuarto ciclo, ver Figura 4-14. En una de las muestras se presentó un aumento en la liberación de azúcares en el último ciclo. Para la Figura 4-15 se realizó nuevamente el procedimiento alcanzando 7 ciclos sucesivos de actividad enzimática, en los cuales la actividad enzimática se mantuvo constante durante 5 ciclos.

En la primera reacción con el sistema quitina-mananasa presentó el 50% de la actividad enzimática de la mananasa libre, después de los 30 minutos de reacción se filtró y se enjuagó el sistema inmovilizado con agua destilada, para proceder al segundo ciclo, en donde se observó una caída brusca en la actividad de la enzima, reportando solamente el 15 % con respecto a la enzima libre, una caída del mas del 50% de la actividad. En los siguientes ciclos se presentaron altibajos en la actividad, pero todos estuvieron por debajo del 50% de la actividad inicial, en el séptimo ciclo ya no se presenta actividad enzimática. Diferentes enzimas inmovilizadas sobre quitina han logrado ser recuperadas

y usadas en ciclos sucesivos de reacción, variables desde 5 hasta 200 ciclos dependiendo del sistema y de las condiciones de reacción [86-87].

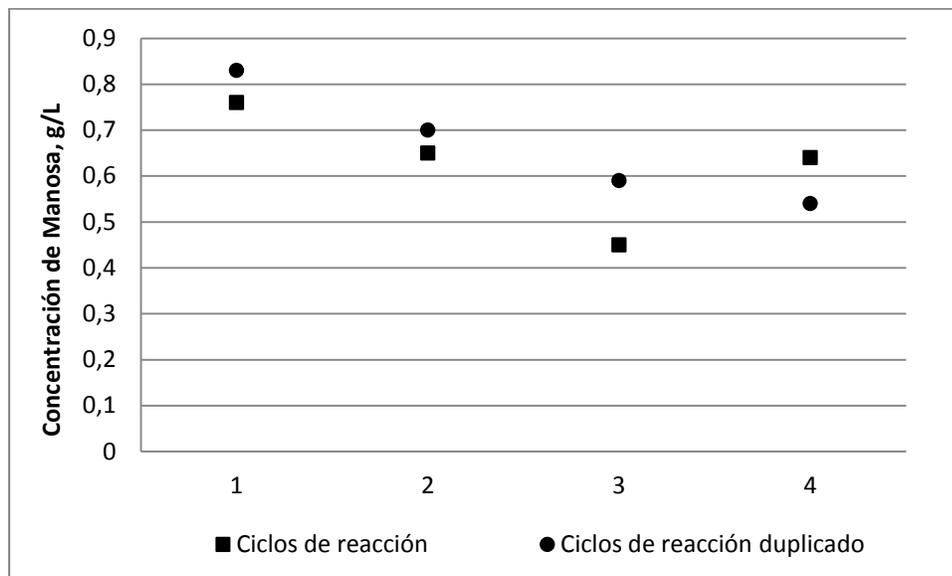


Figura 4-14. Ciclos de hidrolisis de *locust bean gum* con mananasa inmovilizada sobre quitina. Las condiciones de cada ciclo fueron: 50°C, pH 6, 150 rpm, 30 minutos.

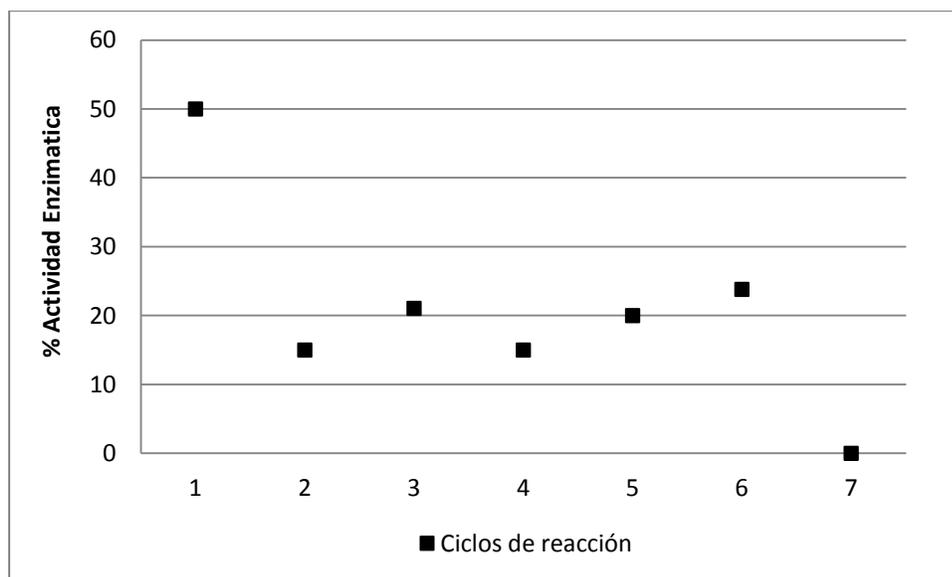


Figura 4-15. Ciclos de hidrolisis de *locust bean gum* con mananasa inmovilizada sobre quitina. Las condiciones de cada ciclo fueron: 50°C, pH 6, 150 rpm, 30 minutos.

4.5.2 Hidrólisis de la torta de palmiste

La hidrólisis de la torta de palmiste fue realizada con la enzima libre y con las enzimas inmovilizadas CPFFM y CEFFM

Para realizar el análisis con dos enzimas inmovilizadas se escogieron CEFFM y CPFFM.

El avance de la reacción, medido según la liberación de manosas de la torta de palmiste, fue seguido durante 24 horas y se presenta en la figura 4-16.

La liberación de azúcares por parte de la enzima inmovilizada por secado por aspersión (CPFFM) fue mayor a la inmovilizada por liofilización (CEFFM) debido en parte a que el soporte fue parcialmente soluble en la dispersión de torta de palmiste, lo cual permitió una liberación de enzima en el medio.

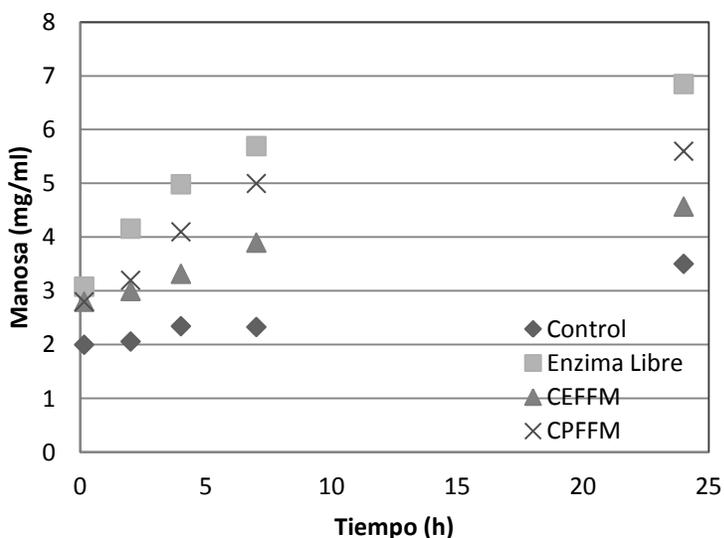


Figura 4-16. Concentración de manosa durante la hidrólisis de la torta de palmiste al 10%w/w con enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 24 horas. (◆) Control sin enzima. (■) Enzima Libre (▲) CEFFM (X) CPFFM. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

Para unas condiciones de reacción de 10% (w/w) PKC, 0,15% de enzima libre a 50°C durante 30 minutos, los azúcares reductores totales liberados con enzima libre fueron 68,5 mg/grPKC, lo cual corresponde a un 16% del contenido teórico de carbohidratos totales, valor más bajo a los encontrados por Cerveró J.M et al. (2010), quienes realizaron una hidrólisis a 5% w/w PKC y 5% de enzima libre, donde se alcanzó una

liberación del 23% del total de carbohidratos en 24 horas [13]. Con la enzima inmovilizada CEFFM, se logró una liberación del 13 % del contenido de carbohidratos de la torta de palmiste, un 3% por debajo de lo que se alcanzó con la enzima libre.

El biocatalizador sobre matriz de quitina no presentó actividad enzimática a las condiciones de reacción anteriores, para una solución de PKC del 10%w/w, la cual se puede explicar por un impedimento estérico entre el soporte y el sustrato, ya que la torta de palmiste aunque se homogenizó en el sistema, continúa teniendo partículas insolubles, y debido a la baja solubilidad y al bajo hinchamiento que presenta la quitina, no logra tener contacto con el sustrato y por lo tanto la hidrólisis es nula. Por lo tanto se prepararon solamente para la evaluación de este soporte soluciones más diluidas de la torta de palmiste, al 1% y al 5%, y se realizó la hidrólisis a iguales condiciones anteriores, 50°C, 150 rpm con una concentración del soporte del 1%. Se realizó un control de temperatura, para garantizar que el azúcar liberado fuese por efecto de la actividad enzimática y no por efecto de la alta temperatura de reacción, estos resultados se presentan en la tabla 7. El seguimiento a las reacciones con la liberación neta de azúcares se presenta en la figura 4-17. Para la reacción a la concentración más baja se presenta un aumento leve pero progresivo en la concentración de azúcares libres. Para la concentración de PKC al 5% se observa un aumento en la concentración de azúcares libres durante la primera hora de reacción, después de esto se observa una concentración constante que demuestra la estabilización del sistema.

Tiempo de Rxn (horas)	g/L manosa PKC 1%	g/L manosa PKC 5% (A)	g/L manosa PKC 5% - Control de temperatura sin Enzima (B)	g/L manosa PKC 5% liberados por efecto de la enzima (A-B)
0	0,3±0,01	1,98±0,3	1,73±0,2	0,25±0,02
0,5	0,5±0,08	2,34±0,2	1,51±0,3	0,83±0,04
1	0,58±0,07	3,46±0,3	2,02±0,4	1,44±0,07
1,5	0,62±0,05	3,59±0,1	2,2±0,2	1,39±0,09
2	0,76±0,07	4,27±0,2	2,8±0,5	1,47±0,06

Tabla 7. Concentraciones de manosa determinadas en el avance de la hidrólisis de la torta de palmiste con la mananasa inmovilizada en quitina, los resultados se presentan con su respectiva desviación estándar.

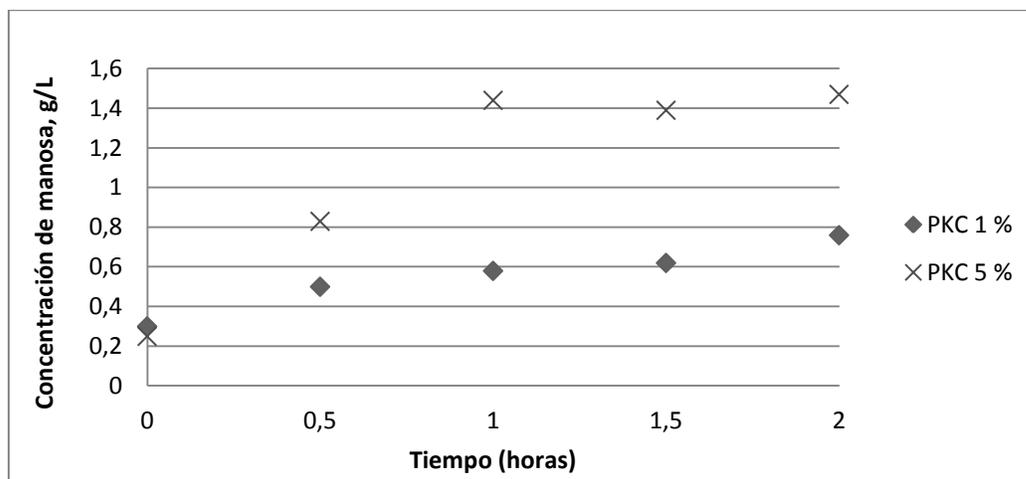


Figura 4-17. Hidrólisis de la torta de palmiste a bajas concentraciones del 1% y el 5% con la mananasa inmovilizada sobre quitina. Seguimiento a la reacción durante 2 horas a 50°C y 150 rpm

4.5.3 Actividad catalítica de la enzima inmovilizada

La hidrólisis de la torta de palmiste se realizó con la enzima libre y con dos de las enzimas inmovilizadas (CPFFM y CEFFM), con el fin de encontrar las condiciones óptimas de reacción y evaluar la estabilidad de la enzima.

El cálculo de las constantes cinéticas de Michaelis-Menten no se realizó para las enzimas inmovilizadas debido a que no se tiene el conjunto de datos necesarios para dicho cálculo.

El efecto del pH y la Temperatura en la actividad relativa de la enzima fue analizado. La actividad relativa es la relación entre las actividades a cada pH/T con la actividad más alta que se da al pH/T óptimo.

4.5.3.1 Efecto del pH

El pH óptimo de la mananasa libre se encontró a pH 6, común entre mananasas de diferentes orígenes [19, 27].

En la Figura 4-18 se presenta el efecto del pH en la actividad enzimática, la enzima inmovilizada en soporte a base de quitosano y pectina (CPFFM) es más estable a pH bajo que la enzima libre. Y tiene su punto óptimo a pH=4. En cambio la enzima

inmovilizada CEFFM presentó un pH óptimo de pH 6, igual a la enzima libre, y presentó mayor estabilidad a pH altos.

El rango de pH en el que trabaja la enzima libre y la inmovilizada en CEFFM es entre pH 4 y pH 9. Mientras que para el sistema CPFFM el rango se encuentra entre pH 3 y pH 7.

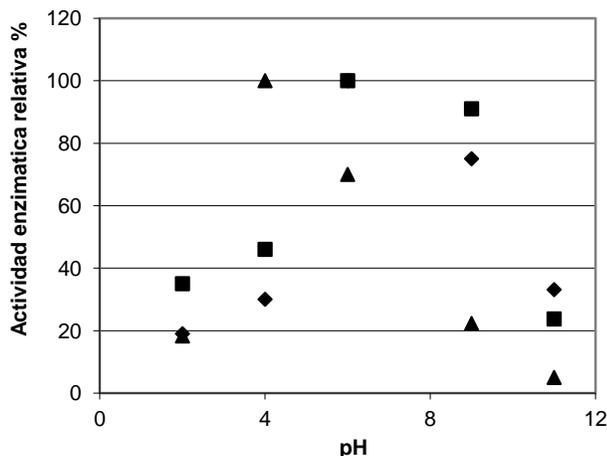


Figura 4-18. Efecto del pH en la actividad enzimática relativa en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10%w/w con la enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 30 minutos. (♦) Enzima Libre (▲) CPFFM (■) CEFFM

4.5.3.2 Efecto de la temperatura

En la comparación del efecto de la temperatura en la enzima libre e inmovilizada se encuentra, como se muestra en la Figura 4-19, que el desempeño de la enzima libre e inmovilizada es bastante similar, la velocidad de reacción aumenta con la temperatura hasta un nivel máximo, y después decae abruptamente con mayores incrementos de la temperatura.

La temperatura óptima fue 50°C tanto para la enzima libre como para las enzimas inmovilizadas (CPFFM y CEFFM), estas presentan una mayor estabilidad en temperaturas por encima y por debajo de la óptima.

Este resultado puede ser explicado con el hecho de que la enzima inmovilizada por reticulado tiene un aumento en la rigidez de la enzima, lo que comúnmente se releja en el

aumento de la estabilidad, igualmente el proceso de inmovilización protege la enzima de la inactivación térmica.

La mananasa es una enzima muy estable en amplios rangos de pH y temperaturas, manansas de otros orígenes inmovilizadas sobre quitina han presentado pH óptimo de 4 y temperaturas óptimas de 70°C, superiores a las acá encontradas [80].

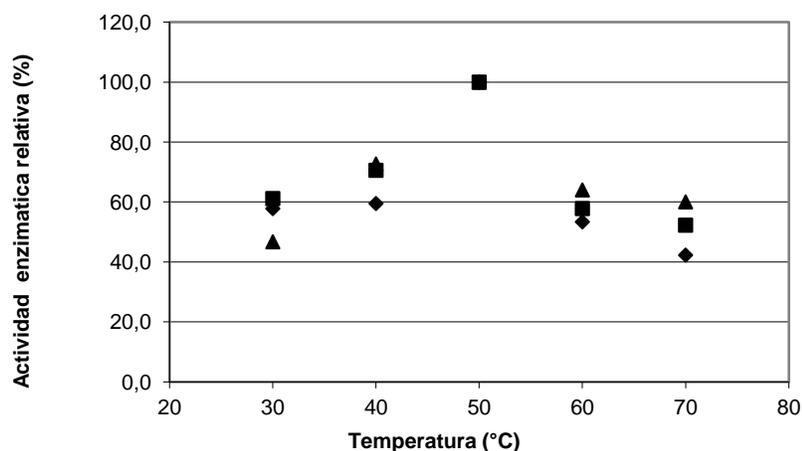


Figura 4-19. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática relativa en la hidrólisis de la torta de palmiste al 10% w/w con enzima libre e inmovilizada. La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 30 min. . (♦) Enzima Libre (▲) CPFFM (■) CEFFM

4.5.4 Separación de los soportes

El objetivo de preparar soportes de quitosano con ferro fluido era obtener un sistema inmovilizado que fuera fácilmente removible del medio de reacción por medio de un campo magnético.

En este trabajo, debido a que no se logró una insolubilidad total del soporte a base de quitosano, no fue posible realizar una separación completa del soporte y por lo tanto tampoco se pudo hacer una reutilización del soporte.

Para la enzima CPFFM, la cual se desintegra casi completamente con la agitación, fue posible remover únicamente las partículas magnéticas con las que fue realizado el material. En la figura 4-20 se presenta el imán de 6000 Oe el cual se usó para remover la

enzima inmovilizada. Este recuperó el 90% del material magnético utilizado en el soporte CPFFM.



Figura 4-20. Imán de 6000 Oe, con el cual se removió el material magnético de la enzima CPFFM

El material CEFFM, presenta una mayor insolubilidad, y fue posible separarlo del ensayo enzimático en *locust bean gum*, sin embargo al realizar el segundo ciclo la actividad enzimática fue mínima, posiblemente debido al alto hinchamiento que presenta la muestra se produce una liberación de la enzima del soporte.

La separación de CEFFM en la torta de palmiste no fue posible mediante un medio magnético debido a la alta concentración de sólidos de la torta de palmiste en el sistema, que no permitió una buena movilidad del soporte hacia el campo magnético.

	gr soporte recuperado	gr iniciales de soporte	% de recuperación
PKC 1%	0,29	0,5	58,0%
PKC 5%	0,40375	0,5	80,7%

Tabla 8. Porcentaje de recuperación del soporte de quitina con enzima inmovilizada después de la hidrólisis de la torta de palmiste durante 2 horas a 50°C y 150 rpm

La separación de la quitina fue posible en las reacciones a bajas concentraciones de PKC. Después de las dos horas de reacción la muestra se filtró y se logró recuperar una mezcla del soporte con altas cantidades de partículas de PKC. Se realizaron tres lavados con agua destilada para separar el soporte de la torta de palmiste y se logró recuperar el 58% de este en la solución al 1%, y el 80% del soporte en la solución al 5%, los resultados se presentan en la tabla 8. Se estima que el resto del soporte se pudo haber solubilizado en el medio.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La torta de palmiste tiene un alto contenido de carbohidratos (43%) reducibles a azúcares simples por medio de hidrólisis enzimática, con altos rendimientos en la producción de manosa, azúcar que puede usarse para la producción fermentativa de bioetanol y otros productos. Según la literatura disponible el residuo que queda de su tratamiento mediante hidrólisis enzimática podría continuar siendo materia prima para la producción de piensos para animales. Con esto se le está dando un valor agregado a un residuo agroindustrial que presenta grandes volúmenes en Colombia.

En este trabajo la hidrólisis, utilizando la enzima libre logró, en las mejores condiciones (pH=6 y T=50°C), una liberación del 16% de los carbohidratos presentes, valor más bajo a los reportados en la literatura.

En esta tesis se utilizaron diferentes metodologías para la síntesis de soportes a base de quitina y/o quitosano para la inmovilización de una mananasa, utilizando técnicas por secado por aspersión y liofilización. Se incorporaron partículas de hierro para tener un soporte con características magnéticas para que pudiera ser removido del medio utilizando un campo magnético. Las formas de los soportes obtenidos fueron microesferas de 1 a 5 μm (por secado por aspersión) y láminas entre 300 y 500 μm (por liofilización) con un área superficial suficiente para utilizarlos en la inmovilización de enzimas,

Los soportes se caracterizaron con técnicas de SEM/ESEM para estudiar su morfología. Mediante EDX se evaluó el contenido de hierro de los soportes que se fabricaron con ferro-fluido para los cuales también se determinó su perfil de magnetización que llegó a un nivel de saturación similar al encontrado en la literatura para soportes magnéticos basados en quitosano. Sin embargo el recubrimiento con quitosano que se obtuvo en este trabajo no fue lo suficientemente insoluble en los medios de reacción estudiados por lo que no fue posible la separación integral del biocatalizador por medio de un campo magnético.

La mananasa se inmovilizó por adsorción y por enlace covalente. Tal inmovilización fue exitosa y se comprobó la presencia de la enzima en el soporte por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.

El comportamiento catalítico de los sistemas mananasa-soporte fue aceptable en comparación con la actividad que mostró la enzima libre en las mismas condiciones. Las enzimas inmovilizadas conservaron más del 70% de la actividad, y presentaron mayor estabilidad catalítica en los puntos extremos de pH y temperatura. Las condiciones óptimas de pH y temperatura fueron semejantes a las encontradas para la enzima libre. Para el caso de la enzima inmovilizada CPFFM presentó un cambio en el pH óptimo, siendo este más básico que el pH óptimo para la enzima libre.

En conclusión el soporte recomendado para la inmovilización de enzimas fue la quitina, ya que presenta baja solubilidad y un buen comportamiento en los medios de reacción homogéneos, y altamente viscosos. Además que es de fácil separación del medio y se logró su reutilización por 7 ciclos continuos.

El quitosano presentó ventajas como soporte de inmovilización ya que puede ser moldeado buscando la mejor geometría para crear partículas. Los soportes de quitosano modificado obtenidos por secado por liofilización presentaron buena estabilidad en cuanto a solubilidad y resistencia a la agitación, sin embargo, como tuvieron un alto porcentaje de hinchamiento se presentó liberación de la enzima.

5.2 Recomendaciones

Se debe investigar más a fondo en métodos de insolubilización del quitosano que permitan un soporte más estable en los medios de reacción. Los que se usaron en este trabajo aparentemente fueron muy débiles y, consecuentemente se requerirá en un futuro utilizar mayores concentraciones de los reactivos usados en los tratamientos, así como tiempos de reacción más prolongados.

Para el caso de la quitina se sugiere utilizar una concentración superior de glutaraldehído como agente activador para mejorar la estabilidad operacional del sistema inmovilizado garantizando una mayor unión de la enzima al soporte.

Se recomienda evaluar la enzima a la concentración máxima de sustrato soportada (PKC al 20% w/w), a la cual se presentó la mayor actividad enzimática y evaluar diferentes métodos de agitación para facilitar la hidrólisis. Igualmente se recomienda manejar concentraciones más bajas de sustrato que pueden permitir un mayor contacto con la enzima y se pueden lograr mayores eficiencias en la hidrólisis.

En el momento de tener un soporte con enzima inmovilizada que cumpla los requisitos se deben ampliar los resultados experimentales de tal manera que permitan la comparación entre la enzima libre e inmovilizada, debido a la poca información que se encuentra sobre mananases inmovilizadas en la literatura.

Bibliografía

1. Paiva, A.N., V.M. Balcão, and J. Malcata, *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. Enzyme and Microbial Technology 2000. **27**: p. 187-204.
2. Tischer, W., Kasche, V., *Immobilized enzymes: crystals or carriers?* . Tibtech, 1999. **17**: p. 326-335.
3. Krajewska, B., *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **35**: p. 126-139.
4. Carpio, C., et al., *Bone-bound enzymes for food industry application*. Food Chemistry, 2000. **68**: p. 403-409.
5. Orrego CE and Valencia JS, *Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009. **32**(2): p. 197-206.
6. Muzzarelli, C., et al., *Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres*. Carbohydrate Polymers, 2004. **57**(1): p. 73-82.
7. Chang, M.-Y. and R.-S. Juang, *Use of chitosan–clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase*. Biochemical Engineering Journal, 2007. **35**(1): p. 93-98.
8. Jiang, D.-S., et al., *Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **25**(1): p. 15-23.
9. Erdinc, B. and R.J. Neufeld, *Protein micro and nanoencapsulation within glycol-chitosan/Ca²⁺/alginate matrix by spray drying*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2011. **37**(6): p. 619-627.
10. Millqvist-Fureby, A., M. Malmsten, and B. Bergenståhl, *Spray-drying of trypsin-surface characterisation and activity preservation*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **188**(2): p. 243-253.
11. Sue, T.T., *Quality and Characteristics of Malaysian Palm Kernel Cakes/Expellers*. Palm Oil Developments 2001. **34**.
12. Fedepalma, *La agroindustria de palma de aceite en Colombia y en el mundo 2006-2010*. Anuario estadístico 2011: p. 35-62.
13. Cerveró, J.M., et al., *Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol*. Enzyme and Microbial Technology 2010. **46**: p. 177–184.
14. Jorgensen, H., R. Sanadi, and C. Felby, *Production of Ethanol and Feed by High Dry Matter Hydrolysis and Fermentation of Palm Kernel Press Cake*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **161**: p. 318–332.
15. Abdeslahian, P., N. Samat, and A.A. Hamid, *Utilization of palm kernel cake for production of b-mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid*

- substrate fermentation using an aerated column bioreactor*. J Ind Microbiol Biotechnology, 2010. **37**: p. 103-109.
16. Abd-Aziz, S., G.S. hung, and M.A. Hassan, *Indirect Method for Quiantificaction of Cell Biomass During Solid-State Fermentation of Palm Kernel Cake Based on Protein Content*. Asian Journal of Scientific Research, 2008. **1**(4): p. 385-393.
 17. Moreira, L.R.S. and E.X.F. Filho, *An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **79**: p. 165-178.
 18. Sachslehner, A., et al., *Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of Sclerotium rolfsii*. Journal of Biotechnology, 2000. **80**: p. 127-134.
 19. Dhawan, S. and J. Kaur, *Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications*. Critical Reviews in Biotechnology, 2007. **27**: p. 197–216.
 20. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**: p. 345-351.
 21. Sittikijyothin, W., D. Torres, and M. Gonçalves, *Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions*. Carbohydrate Polymers, 2005. **59**: p. 339-350.
 22. Benech, R., et al., *Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a Phanerochaete chrysosporium endo- β -1,4-mannanase*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **41**: p. 740–747.
 23. Chong, C., I. Zulkifli, and R. Blair, *Effects of dietary inclusion of palm kernel cake and palm oil, and enzyme supplementation on performance of laying hens*. Asian-Austral J Anim Sci, 2008. **21**(7): p. 1053–1061.
 24. Lee, J.T., et al., *Effects of Guar Meal By-Product with and Without β -Mannanase Hemicell on Broiler Performance*. Poultry Science, 2005. **84**: p. 1261-1267.
 25. Zou, X.T., X.J. Qiao, and Z.R. Xu, *Effect of β -Mannanase (Hemicell) on Growth Performance and Immunity of Broilers*. Poultry Science, 2006. **85**: p. 2176-2179.
 26. Bettioli, J.-L., et al., *Detergent compositions comprising a mannanase and a bleach system*. 2002, US6420331B1 United States of America
 27. H van Zyl, W., et al., *Fungal B-mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications*. Process Biochemistry, 2010. **45**: p. 1203-1213.
 28. Menon, V. and M. Rao, *Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept*. Progress in Energy and Combustion Science, 2012. **38**(4): p. 522-550.
 29. Arroyo, M., *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica, 1998. **39**(2): p. 23-39.
 30. Alkorta, I., et al., *Industrial applications of pectic enzymes: a review*. Process Biochemistry, 1998. **33**(1): p. 21-28.

31. Vaillant, F., et al., *Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and Nylon supports*. Process Biochemistry, 2000. **35**: p. 989-996.
32. Miletić, N., A. Nastasović, and K. Loos, *Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications*. Bioresource Technology, 2012. **115**(0): p. 126-135.
33. Taqieddin, E. and M. Amiji, *Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules*. Biomaterials, 2004. **25**(10): p. 1937-1945.
34. Gülay, S. and G. Şanlı-Mohamed, *Immobilization of thermoalkalophilic recombinant esterase enzyme by entrapment in silicate coated Ca-alginate beads and its hydrolytic properties*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(3): p. 545-551.
35. Levy, M.C. and F. Edwards-Levy, *Coating alginate beads with cross-linked biopolymers: A novel method based on a transacylation reaction*. Journal of Microencapsulation, 1996. **13**(2): p. 169-183.
36. Sheldon, R.A., *Enzyme immobilization: The quest for optimum performance*. Advanced Synthesis and Catalysis, 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.
37. Mateo, C., et al., *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*☆. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **26**(7): p. 509-515.
38. Tischer, W. and F. Wedekind, *Immobilized Enzymes: Methods and Applications Biocatalysis - From Discovery to Application*, W.-D. Fessner, et al., Editors. 1999, Springer Berlin / Heidelberg. p. 95-126.
39. Bolivar, J.M., et al., *The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment*. Enzyme and Microbial Technology, 2009. **45**(6–7): p. 477-483.
40. Guisan, J.M., *Immobilization of Enzymes and Cells*. Second ed. Methods in Biotechnology. Vol. 22. 2006: Humana Press.
41. Bickerstaff, G., *Immobilization of Enzymes and Cells*. Methods in Biotechnology. Vol. 1. 1997, Totowa NJ.W: Humana Press.
42. Pillai, C.K.S., W. Paul, and C.P. Sharma, *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(7): p. 641-678.
43. Chandy, T. and C.P. Sharma, *Chitosan - As a biomaterial*. Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs, 1990. **18**(1): p. 1-24.
44. Cenipalma, *Subproductos*. Publicaciones Investigación e Innovación Tecnológica en Palma de Aceite, 2009.
45. Fedepalma, *La agroindustria de palma de aceite en Colombia y en el mundo 2006-2010*. Anuario estadístico 2011: p. 35-62.
46. Indupalma. *Torta de Palmiste*. 2011.
47. FedePalma. *Historia de la palma de aceite - Proyecciones*. 2009.

48. Wolf, K., *Empresa procesadora y comercializadora de torta de palmiste con salvado de arroz en el departamento de Magdalena.*, in *Facultad de Ciencias Administrativas*. 2009, Universidad Sergio Arboleda: Santa Marta. p. 65.
49. Sundu, B. and J. Dingle, *Use of enzymes to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal*. Proc. Queensland Poult Sci. Symp. Australia **11**(14): p. 1-15.
50. AOAC, *Association of Official Analytical Chemists. Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists*. sixteenth ed, Washington, 1995.
51. Ghasemi, E., A. Mirhabibi, and M. Edrissi, *Synthesis and rheological properties of an iron oxide ferrofluid*. Journal of Magnetism and Magnetic Material, 2008. **320**: p. 2635-2639.
52. Kurakake, M., et al., *Production of Galacto-manno-oligosaccharides from Guar Gum by α -Mannanase from *Penicillium oxalicum* SO*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 7885-7889.
53. Roos, A.A., et al., *Protein Release from Galactoglucomannan Hydrogels: Influence of Substitutions and Enzymatic Hydrolysis by β -Mannanase*. Biomacromolecules, 2008. **9**(8): p. 2104-2110.
54. Montoya Barreto, S., C.E. Orrego Alzate, and L. Levin, *Modeling *Grifola frondosa* fungal growth during solid-state fermentation*. Engineering in Life Sciences, 2011. **11**(3): p. 316-321.
55. Mirnawati, I.P.K.a.S.A.L., *Effect of Substrate Composition and Inoculum Dosage to Improve Quality of Palm Kernel Cake Fermented by *Aspergillus niger**. Pakistan Journal of Nutrition, 2012. **11**(5): p. 434-438.
56. Chukwurah, N.F., Eze, S. C., Chiejina, N. V., et al, *Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in different local agricultural waste materials*. African Journal of Biotechnology, 2012. **11**(37): p. 8979-8985.
57. van Zyl, W.H., et al., *Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications*. Process Biochemistry, 2010. **45**(8): p. 1203-1213.
58. Stålbrand, H., et al., *Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei**. Journal of Biotechnology, 1993. **29**(3): p. 229-242.
59. Harjunpää, V., et al., *Kinetic and Stereochemical Studies of Manno-Oligosaccharide Hydrolysis Catalysed by β -Mannanases from *Trichoderma Reesei**. European Journal of Biochemistry, 1995. **234**(1): p. 278-283.
60. Arisan-Atac, I., et al., *Purification, and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993. **39**(1): p. 58-62.
61. Xu, B., et al., *endo- β -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action*. Journal of Biotechnology, 2002. **92**(3): p. 267-277.
62. Bansal, P., et al., *Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates*. Biotechnology Advances, 2009. **27**(6): p. 833-848.

63. Oh, J.T. and J.H. Kim, *Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PNaSS microspheres*. Enzyme and Microbial Technology 2000. **27**: p. 356-361.
64. Denkbas, E.B., E. Kilicay, and C. Birlikseven, *Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization*. Reactive & Functional Polymers, 2002. **50**: p. 225–232.
65. Podzus, P.E., M.E. Daraio, and S.E. Jacobo, *Chitosan magnetic microspheres for technological applications: Preparation and characterization*. Physica B, 2009. **404**: p. 2710–2712.
66. Chen, A.-H., et al., *Comparative adsorption of Cu(II), Zn(II), and Pb(II) ions in aqueous solution on the crosslinked chitosan with epichlorohydrin*. Journal of Hazardous Materials, 2008. **154**(1–3): p. 184-191.
67. Tirtom, V.N., et al., *Comparative adsorption of Ni(II) and Cd(II) ions on epichlorohydrin crosslinked chitosan–clay composite beads in aqueous solution*. Chemical Engineering Journal, 2012. **197**(0): p. 379-386.
68. Wan Ngah, W.S., M.A.K.M. Hanafiah, and S.S. Yong, *Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan–epichlorohydrin beads: Kinetics and isotherm studies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. **65**(1): p. 18-24.
69. Bayramoğlu, G., et al., *Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase*. Process Biochemistry, 2009. **44**(8): p. 880-885.
70. Monier, M., et al., *Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(3): p. 324-330.
71. Duarte, M.L., et al., *An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, 2002. **31**(1–3): p. 1-8.
72. P.E.Podzus, M.E.Daraio, and S.E.Jacobo, *Chitosan magnetic microspheres for technological applications:Preparation and characterization*. Physica B, 2009. **404**: p. 2710-2712.
73. Huang, H.-Y., et al., *Magnetic chitosan/iron (II, III) oxide nanoparticles prepared by spray-drying*. Carbohydrate Polymers, 2010. **81**: p. 906-910.
74. Feyen, M., C. Weidenthaler, and F. Schüth, *Synthesis of Structurally Stable Colloidal Composites as Magnetically Recyclable Acid Catalysts*. Chemistry of Materials, 2010. **22**: p. 2955 - 2961.
75. Morimoto, M., H. Saimoto, and Y. Shigemasa, *Control of Functions of Chitin and Chitosan by Chemical Modification*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2002. **14**(78): p. 205-222.
76. Zeng, X. and E. Ruckenstein, *Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1996. **35**(11): p. 4169-4175.

77. Torres, M.A., et al., *Production of chemically modified chitosan microspheres by a spraying and coagulation method*. Materials Research, 2007. **10**: p. 347-352.
78. Gümüşderelioğlu, M. and P. Açı, *Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes*. Reactive and Functional Polymers, 2004. **61**(2): p. 211-220.
79. Twyman, R.M., *ENZYMES | Immobilized Enzymes*, in *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, W. Editors-in-Chief: Paul, T. Alan, and P. Colin, Editors. 2005, Elsevier: Oxford. p. 523-529.
80. Blibech, M., et al., *Production of manno-oligosaccharides from locust bean gum using immobilized Penicillium occitanis mannanase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. **73**(1-4): p. 111-115.
81. Siso, M.I.G., et al., *Effect of diffusional resistances on the action pattern of immobilized alpha-amylase*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1990. **48**(2): p. 185-200.
82. Rodrigues, D.S., et al., *Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008. **51**(3-4): p. 100-109.
83. Zwirtes de Oliveira, I.R.W., S.C. Fernandes, and I.C. Vieira, *Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(2): p. 366-372.
84. Yi, S.-S., J.-M. Noh, and Y.-S. Lee, *Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from Candida rugosa*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **57**(1-4): p. 123-129.
85. Takahashi, T., M. Imai, and I. Suzuki, *Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control*. Biochemical Engineering Journal, 2007. **36**(1): p. 43-48.
86. Martins, A.S., et al., *A simple method for obtaining reusable reactors containing immobilized trehalase: Characterization of a crude trehalase preparation immobilized on chitin particles*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **38**(3-4): p. 486-492.
87. Durán, N., et al., *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 907-931.