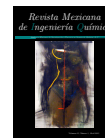




Biotecnología



## UTILIZACIÓN DE MATERIALES A BASE DE QUITINA Y QUITOSANO EN LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEASAS: EFECTOS EN SU ESTABILIZACIÓN Y APLICACIONES

### UTILIZATION OF CHITIN AND CHITOSAN BASED MATERIALS FOR PROTEASE IMMOBILIZATION: STABILIZATION EFFECTS AND APPLICATIONS

J.A. Salazar-Leyva<sup>1</sup>, J. Lizardi-Mendoza<sup>1</sup>, J.C. Ramírez-Suarez<sup>1</sup>, G. García-Sánchez<sup>1</sup>, J.M. Ezquerro-Brauer<sup>2</sup>, E.M. Valenzuela-Soto<sup>1</sup>, M.G. Carvallo-Ruiz<sup>1</sup>, M.E. Lugo-Sánchez<sup>1</sup> y R. Pacheco-Aguilar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria, C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>2</sup>Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Rosales y Niños Héroes S/N. Hermosillo, Sonora, México.

Received September 17, 2013; Accepted November 20, 2013

#### Resumen

Las enzimas proteolíticas poseen un amplio campo de aplicación en diversas áreas de la industria, por lo que la búsqueda de estrategias para optimizar su desempeño catalítico es de gran importancia. La inmovilización de enzimas en soportes sólidos es una tecnología que induce cambios a nivel estructural en los sistemas catalíticos inmovilizados, ocasionando que las características de reacción de estos se vea mejorada notablemente, permitiendo, además, la posibilidad de utilizar repetidamente a las enzimas inmovilizadas en un mismo proceso. La quitina y su derivado el quitosano, son compuestos que poseen propiedades funcionales que los convierten en excelentes materiales para ser utilizados como soportes en la inmovilización de enzimas. Este artículo de revisión discute los efectos que causa el proceso de inmovilización en materiales a base de quitina y quitosano sobre la estabilidad bioquímica y operacional de enzimas proteolíticas; de igual forma, se presentan algunas aplicaciones de los sistemas catalíticos inmovilizados.

*Palabras clave:* inmovilización, proteasas, quitina, quitosano, estabilidad.

#### Abstract

Proteolytic enzymes have a wide range of applications in different industrial fields therefore the development of strategies focused in the optimization of their catalytic performance is a topic of great interest. Enzyme immobilization onto solid supports induces changes at structural level in the immobilized systems, and consequently some reaction characteristics can be enhanced; furthermore, immobilized enzymes can be reused in the same process. Due to the unique physicochemical and functional properties that chitin and its derivate chitosan possess, these biopolymers are an excellent option as support for enzyme immobilization. This review discusses the effects on the biochemical and operational performance of proteases immobilized in chitin and chitosan based materials. Some aspects related with the industrial applications of the immobilization systems are also mentioned.

*Keywords:* immobilization, proteases, chitin, chitosan, stability.

\*Autor para la correspondencia. E-mail: rpacheco@ciad.mx  
Tel/Fax. 662-280-04-21Ext. 525

## 1 Introducción

Las enzimas se consideran un grupo de moléculas altamente especializadas, las cuales poseen un gran poder catalítico mucho mayor al de catalizadores de origen inorgánico (Nelson y col. 2008). Comparando con catalizadores químicos de naturaleza no proteica, las enzimas son específicas en su modo de acción y capaces de operar bajo condiciones suaves de temperatura, presión y pH, ayudando a crear procesos de manufactura de menor costo debido al ahorro de energía (Krajewska, 2004). Tomando en cuenta lo anterior, actualmente muchas aplicaciones industriales se ven apoyadas en gran medida por el uso de la tecnología enzimática, lo cual ha provocado que las ventas de enzimas a nivel mundial crezcan anualmente en aproximadamente un 7.5 % (Beilen y Li, 2002; Rasmussen y Morrissey, 2007; Ferraro y col. 2010; Wohlgemuth, 2010).

Las enzimas del grupo de las hidrolasas, particularmente las proteasas, representan al menos el 60% de las ventas globales de enzimas en el mundo. Lo anterior debido a que estos biocatalizadores poseen múltiples aplicaciones en procesos industriales como la producción de detergentes, alimentos, textiles y medicamentos (Gupta y col. 2002; Kirk y col. 2002; Tavano, 2013).

En la mayoría de los procesos industriales las enzimas operan en sistemas de una sola fase, es decir, se encuentran disueltas con el sustrato el cual a su vez es transformado en producto. Por lo anterior, resulta difícil separar a las enzimas del resto de los componentes de la mezcla de reacción y por ende, en un proceso continuo, la enzima soluble puede ser arrastrada junto con el producto obtenido. Este tipo de proceso no es conveniente desde el punto de vista económico ya que por lo general el precio de las enzimas es elevado (Novick y Rozzell 2005).

La inmovilización de enzimas en soportes sólidos se ha posicionado como una metodología capaz de aumentar la eficiencia de un bioproceso, ya que al compararse con el uso de enzimas libres (sin inmovilizar) esta metodología ofrece diversas ventajas. La inmovilización, en la mayoría de los casos, estabiliza la estructura de las enzimas y por consecuencia su capacidad catalítica aumenta en condiciones extremas de pH y temperatura. Además, la fácil separación de la enzima inmovilizada facilita su reutilización permitiendo la implementación de procesos continuos de catálisis en reactores (Chiu y col. 2007; Brady y Jordaan, 2009; Hanefeld y col. 2009; Mahmoud y Helmy, 2009).

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son

regidas por las características del sistema enzimático y del material utilizado como soporte (Bickerstaff, 1997). De la gran variedad de materiales que han sido estudiados y utilizados para inmovilizar enzimas destacan la quitina y el quitosano, debido a que la estructura química de estos compuestos posee una gran disponibilidad de grupos funcionales que pueden reaccionar con las enzimas o que son susceptibles a ser modificados químicamente para aumentar su reactividad (Kurita, 2001; Zohuriaan-Mehr, 2005; Mourya e Inamdar, 2008). Además, estos biopolímeros son abundantes, biodegradables y no presentan toxicidad (Krajewska, 2004; Macquarrie y Hardy, 2005; Kurita, 2006).

Debido al gran potencial de aplicación tecnológica que poseen las proteasas y a que la quitina y el quitosano presentan características adecuadas como soportes para inmovilizar enzimas, en esta revisión se muestra el estado del arte en lo referente a los efectos de la inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano sobre los siguientes aspectos: estabilidad al pH y la temperatura; parámetros cinéticos; estabilidad operacional y aplicaciones.

## 2 Inmovilización de enzimas

La tecnología de inmovilización de enzimas data de principios del siglo XX, siendo en los años de 1910 y 1930 cuando ciertas proteínas fueron físicamente adsorbidas en superficies como carbón, caolinita, celulosa y esferas de cristal (Nelson y Griffin, 1916; Nelson y Hitchcocks, 1921; Langmuir y Schaefer, 1938). Esta tecnología es generalmente definida como el aprisionamiento de una molécula de enzima en una fase que permite el intercambio o difusión de sustancias. El proceso de inmovilización confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, debido a que en la mayoría de los casos se lleva a cabo la interacción de la enzima con un soporte dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente (Novick y Rozzell 2005).

### 2.1 Métodos para la inmovilización de enzimas

De manera general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en físicos y químicos. Su diferencia radica en que en los físicos las interacciones entre la enzima y el soporte son débiles, mientras que en los químicos, la enzima y el soporte se unen a través de enlaces covalentes (Tischer y Wedekind, 1999).

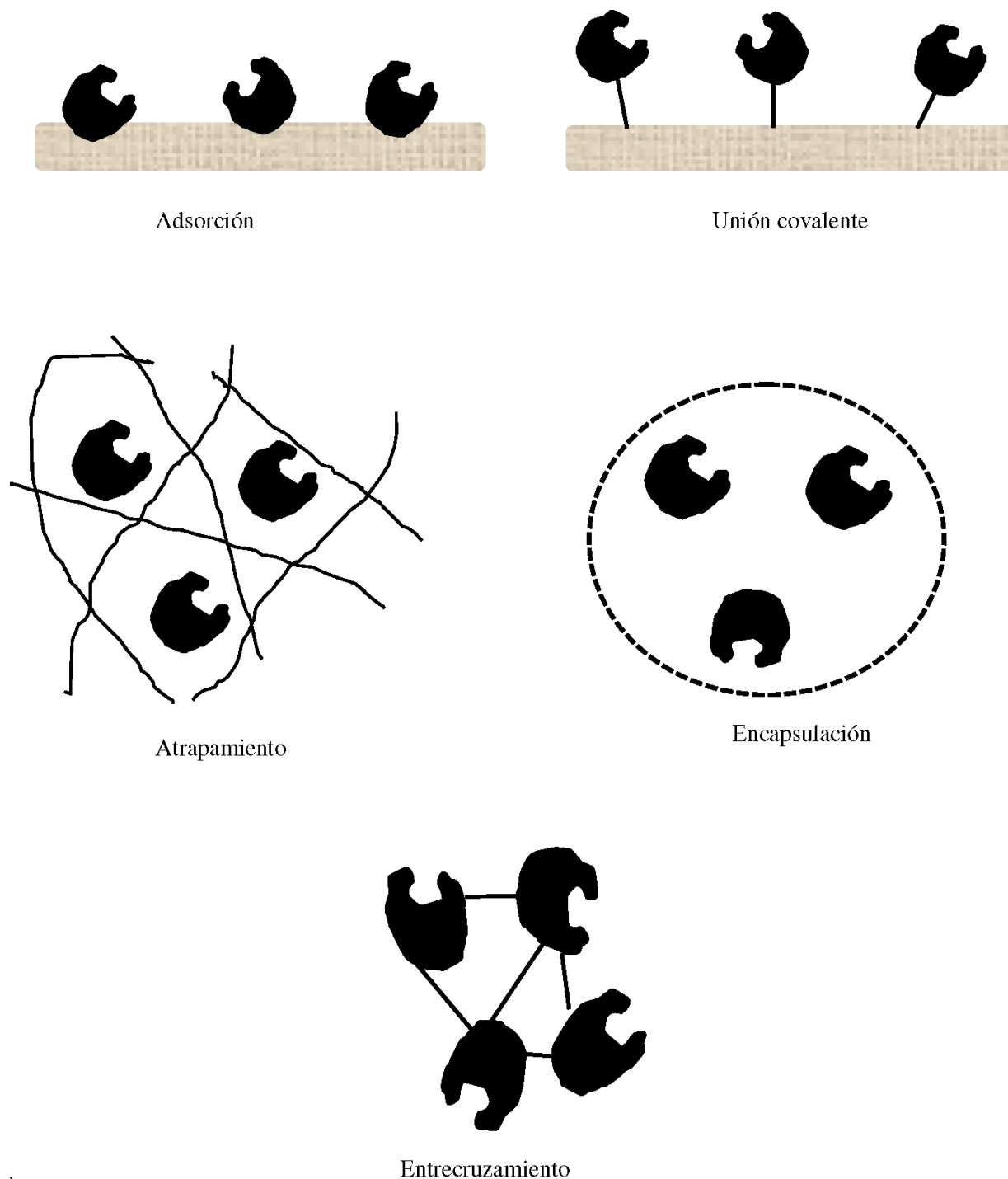


Fig. 1. Métodos de inmovilización de enzimas más utilizados en la actualidad.

A través del tiempo se han diseñado diferentes metodologías para la inmovilización de enzimas. Sin embargo, es importante mencionar que no existe un sistema universal de inmovilización, ya que para un caso dado es necesario evaluar varias metodologías

en función de la enzima que se desea inmovilizar y del proceso en el que se pretende utilizar el sistema catalítico. Inclusive, a pesar de que los diferentes procesos de inmovilización son conceptualmente distintos, se puede decir que frecuentemente se

traslapan entre ellos, utilizándose en algunos casos sistemas de inmovilización múltiples (Novick y Rozzell 2005).

De acuerdo a Bickerstaff (1997), existen cinco métodos principales de inmovilización de enzimas, a saber: adsorción, unión covalente, atrapamiento, encapsulación y entrecruzamiento (Fig. 1). A continuación se describen los principales aspectos de los métodos mencionados anteriormente.

### 2.1.1 Adsorción

Este método de inmovilización es relativamente simple y barato. No implica una modificación química de la enzima inmovilizada, por lo que mantiene de manera aceptable su actividad (Castro y col. 2013). Su principal desventaja es que en algunos casos puede ocurrir un desprendimiento de la enzima del soporte debido a las condiciones de proceso (Kirkkopru y col. 2006; Brady y Jordaan, 2009).

Las interacciones que se llevan a cabo entre la enzima y el material utilizado como soporte son, la mayoría de las veces, de carácter reversible. Las fuerzas de atracción que predominan en la inmovilización por adsorción son diversas, entre las que se encuentran las de van der Waals, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. Estas interacciones son de carácter débil aunque lo suficientemente grandes en cantidad para asegurar una unión adecuada con el soporte (Bickerstaff, 1997). El proceso de adsorción es altamente dependiente de las interacciones moleculares que se llevan a cabo entre la superficie del material utilizado como soporte y la enzima, por lo que las propiedades de carga y polaridad del biocatalizador a inmovilizar tienen que ser tomadas en cuenta para asegurar una unión adecuada de éste con el soporte (Moehlenbrock y Minteer, 2011).

### 2.1.2 Unión covalente

La unión de enzimas a través de enlaces covalentes con un soporte insoluble es una de las metodologías de inmovilización más empleadas, ya que lo que se busca es evitar el desprendimiento de la enzima del soporte. La gran ventaja de la utilización de esta metodología es la estabilidad del enlace formado entre el soporte y la enzima, la cual usualmente queda unida a través de varios puntos de su estructura, confiriéndole rigidez y por lo tanto aumentando la estabilidad del sistema a la temperatura, pH, fuerza iónica, solventes orgánicos y proteólisis (Brena y Batista-Viera, 2006; Homaei y

col. 2013).

Las enzimas poseen una gran variedad de grupos funcionales capaces de unirse vía covalente a los grupos químicos presentes en la superficie del soporte, entre los que destacan el grupo amino ( $-NH_2$ ), carboxilo ( $-COOH$ ) y sulfhidrilo ( $-SH$ ) de sus cadenas laterales. Es muy importante que los grupos funcionales del sitio activo de la enzima no participen en el enlace covalente formado con el soporte, ya que esto provocaría una disminución significativa en la actividad enzimática.

La principal desventaja de la inmovilización covalente de enzimas radica en que esta metodología es más costosa y compleja comparada con otras, ya que el soporte utilizado necesita ser activado químicamente con reactivos químicos específicos previo al procedimiento de inmovilización. No obstante lo anterior, la gran estabilidad estructural y el mínimo desprendimiento de la enzima del soporte justifican, en muchos de los casos, su utilización (Novick y Rozzell 2005).

### 2.1.3 Atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento difiere de la adsorción y unión covalente en que las moléculas de enzima están libres en solución, pero restringidas en movimiento por el “enrejado” formado por un gel. Generalmente se utilizan polímeros orgánicos para formar dichos enrejados (Bickerstaff, 1997; Sheldon, 2007).

La forma más usual para llevar a cabo esta inmovilización es mezclando a la enzima de interés con una solución de algún material polimérico, el cual es posteriormente insolubilizado o entrecruzado mediante cambios de pH o el uso de polímeros multivalentes. Además de la simplicidad metodológica de esta forma de inmovilización de enzimas, otra gran ventaja es la protección de la enzima del contacto directo con el ambiente minimizando así aquellos factores que afectan la actividad enzimática como las burbujas de aire y el contacto con solventes hidrofóbicos (Alloue y col. 2008; Brady y Jordaan, 2009).

La principal limitante de la utilización de esta metodología es que el enrejado polimérico formado puede en ocasiones provocar problemas de transferencia de masa; es decir, el enrejado, siendo una barrera, puede llegar a disminuir la interacción adecuada entre la enzima y el sustrato, teniendo así una implicación directa en la cinética de reacción (Bickerstaff, 1997; Brena y Batista-Viera, 2006).

#### 2.1.4 Encapsulación

La encapsulación de enzimas es una metodología similar a la de atrapamiento debido a que la enzima inmovilizada está confinada en una matriz polimérica. En la encapsulación, los materiales utilizados como soporte presentan poros por lo que son semipermeables (Moehlenbrock y Minteer 2011).

Un aspecto determinante para aplicar de manera exitosa la encapsulación de enzimas es la elección adecuada del tamaño de poro del soporte. Si el tamaño de poro es el adecuado, tanto el sustrato como el producto podrán entrar y salir, respectivamente, a través de la cápsula semipermeable la cual seguirá reteniendo a la enzima por tener un mayor tamaño que los poros de la cápsula (Novick y Rozzell 2005).

La principal ventaja de este método es que la enzima inmovilizada presenta una alta actividad ya que esta ocluida en la cápsula en forma soluble. Esta metodología puede presentar problemas de difusión debido a que en algunos casos los productos formados de la reacción enzimática pueden acumularse de manera rápida causando el rompimiento de la cápsula. Otra limitante de la encapsulación es que no puede ser aplicada para catalizar procesos donde el sustrato sea de alto peso molecular, ya que estos pueden presentar problemas de transferencia a través de la cápsula (Bickerstaff, 1997; Novick y Rozzell, 2005; Brady y Jordaan, 2009).

#### 2.1.5 Entrecruzamiento

Algunos autores consideran a este método de inmovilización como libre de soporte debido a que implica la interacción de las enzimas entre ellas mismas, formando grandes complejos tridimensionales. La formación de estas estructuras se logra por métodos físicos o químicos (Novick y Rozzell, 2005; Brady y Jordaan, 2009).

El entrecruzamiento de enzimas a través de métodos químicos es el más utilizado. Para ellos se utilizan reactivos como el glutaraldehído, el cual es capaz de unir a la enzimas entre ellas mismas a través de enlaces covalentes. La capacidad de entrecruzar enzimas utilizando glutaraldehído, radica en que este compuesto se une covalentemente a los grupos amino libres localizados en la superficie de moléculas de enzima “vecinas”, provocando la formación de enlaces covalentes inter- e intra- moleculares (Sheldon, 2011).

El entrecruzamiento libre de soporte raramente se utiliza para inmovilizar enzimas ya que presenta limitantes como la falta de propiedades mecánicas

y baja estabilidad de los agregados moleculares enzimáticos formados (Bickerstaff, 1997). En años recientes se desarrolló una nueva clase de enzimas inmovilizadas libres de soporte conocidas como CLEAs por sus siglas en inglés (cross-linked enzyme aggregates). Lo que caracteriza a esta metodología es que a través de una precipitación selectiva (por ejemplo con sulfato de amonio) se puede alcanzar la purificación y la inmovilización de las enzimas en un solo paso (Cao y col., 2000; Sheldon, 2011). De acuerdo a Cui y Jia (2013) el uso de CLEAs es un método muy atractivo para la inmovilización de enzimas debido a su simplicidad y a que presenta la posibilidad de utilizar extractos enzimáticos crudos; además, permite la co-inmovilización de diferentes enzimas.

#### 2.1.6 Inmovilización de enzimas en nanomateriales

Si bien la inmovilización de enzimas en nanomateriales no representa por sí misma una metodología para inmovilizar enzimas, resulta de gran importancia su mención debido a que en años recientes se ha demostrado que los sistemas catalíticos a nanoescala poseen gran potencial de aplicación en diversas áreas relacionadas con la biotecnología (Ansary y Husain, 2012).

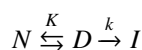
La principal ventaja de utilizar estructuras a nanoescala para inmovilizar enzimas, radica en que se reducen de manera importante las limitantes relacionadas con la difusión de sustratos y productos, además de que se maximiza la unión de la enzima con el soporte debido a que el nanomaterial posee una gran superficie de contacto (Jia y col., 2003). Por lo tanto, actualmente existe mucho interés en la utilización de materiales nanoestructurados como soportes para inmovilizar enzimas (Huang y col., 2007).

Los procedimientos desarrollados para inmovilizar enzimas en nanomateriales están basados en los conceptos y mecanismos de los métodos tradicionales de inmovilización de enzimas anteriormente mencionados. Por ejemplo, la unión de enzimas a la superficie de nanopartículas fue uno de los primeros procedimientos utilizados y sigue siendo muy aplicado en la actualidad. Otras formas de inmovilización son el atrapamiento de enzimas en materiales nanoporosos por adsorción física o por uniones químicas en dichos nanomateriales (Wang, 2006).

## 2.2 Inmovilización de enzimas como estrategia para aumentar la estabilidad proteica

En lo concerniente a proteínas, el término estabilidad se refiere a la resistencia que posee la estructura proteica hacia factores adversos tales como el calor y otros agentes desnaturizantes. Se considera que una proteína es estable cuando preserva su integridad molecular, y con ello su función biológica, a pesar de haber sido expuesta a un agente desnaturizante. Las enzimas, al ser en su mayoría proteínas, poseen una estabilidad limitada, por lo que experimentan reacciones de desnaturización durante su extracción, almacenamiento y aplicación en la industria (Iyer y Ananthanarayan, 2008).

De acuerdo a Fágáin (1995), existen dos definiciones muy útiles para entender la estabilidad proteica *in vitro*: la estabilidad *termodinámica* y la estabilidad *cinética*. La estabilidad termodinámica (o *conformacional*), se relaciona con la resistencia que presenta la conformación plegada de la proteína hacia la desnaturización; mientras que la estabilidad cinética (o *a largo plazo*), representa la resistencia que ofrece la estructura proteica a una inactivación irreversible (ejemplo: mantenimiento de la actividad biológica). Ambos tipos de estabilidad, pueden representarse de acuerdo al siguiente esquema:



Donde N representa a la estructura nativa de la proteína, D a la estructura desnaturizada e I a la estructura proteica inactivada de forma irreversible. La transición reversible de N hacia D corresponde a la estabilidad termodinámica, mientras que la transición irreversible de D a I representa a la estabilidad cinética.

Relacionado a lo antes expuesto, la inmovilización de enzimas se considera como una metodología que permite la obtención de “enzimas estables” (Janeček, 1993; Cowan y Fernandez-Lafuente, 2011), o expresado en términos de estabilidad proteica, el proceso de inmovilización puede llegar a favorecer la estabilidad *conformacional* y *a largo plazo* de las enzimas que se encuentran unidas a un soporte sólido. De manera más específica, Singh y col. (2013) explican que la estabilidad de las enzimas inmovilizadas depende directamente de efectos relacionados con cambios conformacionales de la estructura proteica, sobre todo a nivel de estructura terciaria. Además, el hecho de que la interacción entre el sustrato y la enzima inmovilizada se lleve a cabo en un microambiente muy diferente al de la enzima libre, puede provocar efectos estabilizantes en los sistemas catalíticos (Brena y Batista-Viera, 2006). En la Fig. 2, se muestran los principales efectos estabilizantes que causa la inmovilización de enzimas en soportes sólidos (Novick y Rozzel 2005; Mateo y col. 2007).

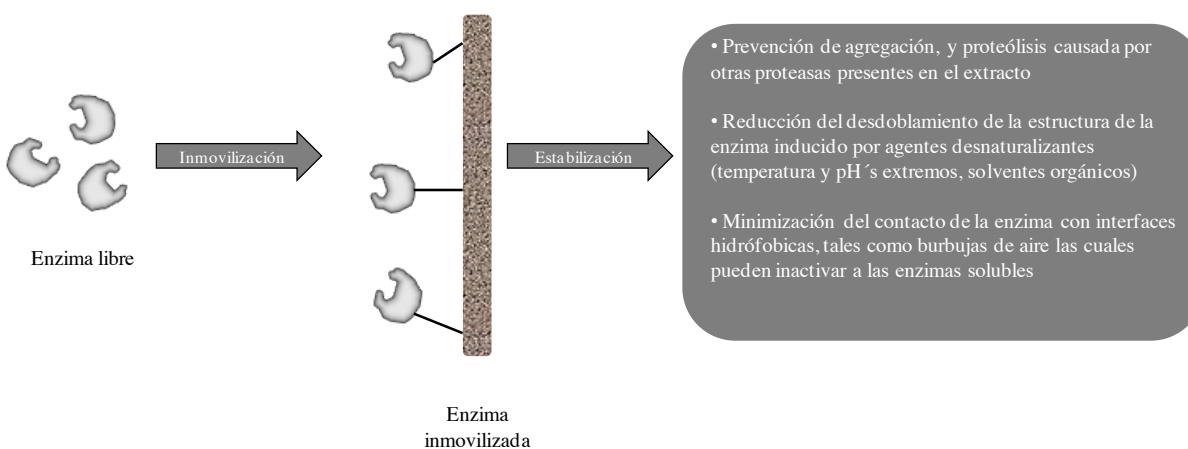


Fig. 2. Efectos estabilizantes causados por la inmovilización de enzimas en soportes sólidos.

## 3 Quitina y quitosano: Estructura química, fuentes de obtención y propiedades funcionales

a poseer características estructurales y propiedades fisicoquímicas muy interesantes y diferentes a las que presentan algunos polímeros sintéticos. Debido a lo anterior, estas macromoléculas de origen natural poseen un amplio rango de aplicación en diversas áreas (Kurita, 2006).

La quitina es un polisacárido estructural que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en el exoesqueleto de artrópodos (crustáceos e insectos) y en la pared celular de algunos hongos y otros organismos (Díaz-Rojas y col., 2006).

Kurita (2006), menciona que desde el punto de vista químico la quitina es un polímero de glucosas que se encuentran unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4), diferenciándola de la celulosa en que posee un grupo acetamida como sustituyente en el carbono número 2 (Fig. 3a). El principal derivado de la quitina es el quitosano, el cual estructuralmente se considera como la forma desacetilada de la quitina (Fig. 3b).

La materia prima más utilizada para la obtención industrial de quitina y quitosano son los desechos generados por la industria pesquera (caparzones de crustáceos, principalmente). De acuerdo a Ravi-Kumar (2000), Oregon, Washington, Virginia (EEUU) y Japón son los mayores productores de quitina y quitosano en el mundo, mientras que países como Noruega, México y Chile poseen una gran cantidad de recursos marinos que no son explotados en su totalidad para este propósito.

La quitina y el quitosano son materiales altamente atractivos y con un gran potencial de aplicación en campos tan diversos como la industria cosmética, biomédica, ambiental y de alimentos, entre otros. La diversidad de sus aplicaciones se debe a que se obtienen fácilmente y de manera económica a partir de desechos de la pesca, a que son biodegradables, biológicamente compatibles y no tóxicos. En la Tabla 1 se muestran las principales propiedades funcionales de la quitina y el quitosano, así como sus distintos campos de aplicación (Ravi-Kumar, 2000; Khor y Lim, 2003; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Krajewska, 2004; Bautista-Baños y col., 2006; Kurita, 2006; Rinaudo, 2006; Harish-Prashanth y Tharanathan, 2007; Honarkar y Barikani, 2009; Hernández-Ochoa y col., 2011).

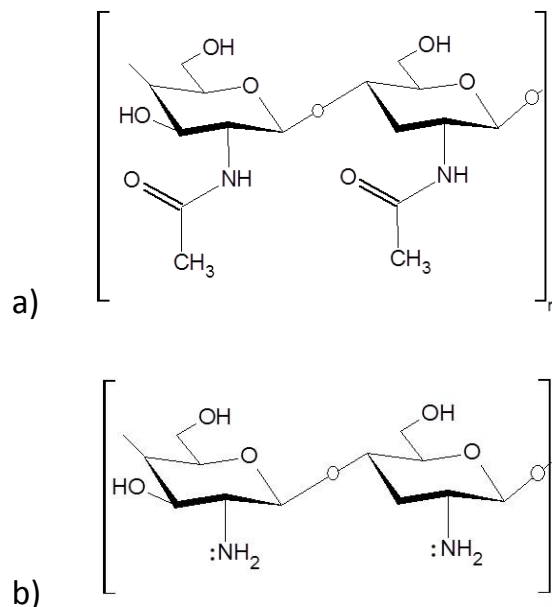


Fig. 3. Estructura química de la quitina (a) y el quitosano (b).

#### 4 Quitina y quitosano como soportes de inmovilización de enzimas

Como se mencionó anteriormente, existe una gran variedad de metodologías disponibles para inmovilizar enzimas, así como de materiales utilizados como soportes. Generalmente, tanto la metodología de inmovilización como el soporte se eligen de manera empírica, pero siempre con el objetivo de que se retenga al máximo la actividad enzimática y su estabilidad operacional (Bickerstaff, 1997).

Entre las principales características que debe tener un material para ser utilizado como soporte en la inmovilización de enzimas destacan las siguientes: alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reaccionar con las enzimas o susceptibles a modificaciones químicas, fácil preparación en diferentes formas físicas, no ser tóxicos y presentar compatibilidad fisiológica si es requerido. Esto último, para aplicaciones en biomedicina o industria de alimentos principalmente. La quitina y el quitosano cumplen con la mayoría de las características mencionadas anteriormente debido al origen natural y características estructurales de estos biopolímeros (Krajewska, 2004).

Tabla 1. Principales propiedades funcionales y aplicaciones de la quitina y el quitosano

Propiedad funcional	Principales aplicaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioactividad               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Actividad anti-colesterolémica</li> <li>– Control de peso (efecto fibra dietaria)</li> <li>– Actividad anti-oxidante</li> <li>– Actividad anti-microbiana</li> <li>– Estimulante sistema inmune</li> <li>– Actividad anti-proliferativa</li> <li>– Capacidad cicatrizante</li> <li>– Capacidad humectante</li> </ul> </li> <li>• Carácter policationico               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Capacidad de adsorción</li> <li>– Quelante de metales</li> </ul> </li> <li>• Capacidad de formación de geles y películas</li> <li>• Reactividad de grupos funcionales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingredientes en alimentos funcionales</li> <li>• Fabricación de empaques activos de alimentos</li> <li>• Aditivos antimicrobianos en industria textil</li> <li>• Control de enfermedades en hortalizas</li> <li>• Biomedicina               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Materiales de curación aceleradores del proceso de cicatrización</li> <li>– Regeneración de tejidos</li> </ul> </li> <li>• Industria cosmética</li> <li>• Reducción de contaminantes en aguas residuales (fenoles, metales pesados)</li> <li>• Recuperación de metales valiosos</li> <li>• Inactivación de metalo-enzimas que causan deterioro en alimentos</li> <li>• Clarificación de jugo</li> <li>• Fabricación de resinas cromatográficas</li> <li>• Inmovilización de enzimas</li> <li>• Fabricación de membranas de diálisis y fluidos dentales</li> <li>• Sistemas de liberación controlada de medicamentos y moléculas bio-activas</li> </ul>

La quitina posee una gran disponibilidad de grupos hidroxilo, además de ser un sólido prácticamente inerte e insoluble en agua. Por su parte, el quitosano presenta grupos hidroxilo y aminos capaces de ser modificados químicamente. La presencia de grupos amino en su forma primaria ( $-\text{NH}_2$ ), le proporciona al quitosano la característica de ser un polielectrolito catiónico ( $\text{pK} \approx 6.5$ ), por lo que es soluble en medio ácido, en particular a pH's por debajo de 6.5. Esta característica de solubilidad le confiere, bajo ciertas condiciones, la capacidad de formar geles y membranas que presentan propiedades mecánicas aceptables (Agulló y col., 2003; Krajewska, 2004).

Otro aspecto interesante de la quitina y particularmente del quitosano, es que pueden servir de base para diseñar materiales compuestos creando con

ello estructuras de inmovilización con propiedades muy específicas. Algunos ejemplos de este tipo de estructuras son las microesferas de poliestireno cubiertas de quitosano (Talbert y Hotchkiss, 2012) y nanopartículas magnéticas de quitosano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Ju y col., 2012), entre otros.

Es importante mencionar que además de la quitina y el quitosano existen otros polisacáridos de origen natural que pueden ser utilizados como soportes en la inmovilización de enzimas, entre los que destacan el alginato, la carragenina, la celulosa, el almidón y la pectina. Sin embargo, estos polisacáridos no poseen de forma individual las propiedades funcionales de la quitina y el quitosano, por lo que en muchos estudios se propone el uso de materiales compuestos para mejorar las propiedades



de los soportes de inmovilización, creando sistemas de inmovilización del tipo alginato-pectina, quitosano-alginato y alginato-almidón, entre otros (Al-Adhami y col., 2002; Girigowda y col., 2006; Matto y Husain, 2006; Matto y Husain, 2009; Flores-Maltos y col., 2011).

Haciendo referencia a lo antes expuesto, Tanaka y col. (1984) mencionan que los geles de alginato al poseer poros muy grandes pueden presentar fugas de enzima de los soportes a base de este polisacárido. Una estrategia útil para reducir este problema es la formación de complejos poli-electrolíticos entre el alginato como polímero aniónico y el quitosano como polímero catiónico. De esta manera, el soporte de inmovilización al estar “recubierto” por el quitosano minimiza las fugas de enzima (Azarnia y col., 2010). En otro estudio, Betigeri y Neau (2002) compararon la influencia del tipo de polímero (quitosano y alginato) en las fugas y actividad enzimática de una lipasa inmovilizada por atrapamiento. Los autores encontraron que el soporte de alginato presentó mayores fugas de enzima del soporte y una reducida actividad enzimática al compararla con las esferas de quitosano.

## 5 Inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano

Las proteasas catalizan reacciones de hidrólisis proteica es decir, rompen enlaces peptídicos mediante la acción de moléculas de agua (Barberies y col., 2008). Este grupo de enzimas son ampliamente utilizadas en diversas áreas de la industria, por lo que varios grupos de investigación realizan estudios que revelan el gran potencial de aplicación que poseen las proteasas inmovilizadas en comparación con su contraparte soluble. A continuación se discutirán los efectos que imparte la inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano sobre la estabilidad bioquímica y operacional de los sistemas catalíticos inmovilizados.

### 5.1 Estabilidad a la temperatura

La temperatura es un factor de suma importancia en todos los procesos que son catalizados por enzimas, debido a que estas biomoléculas poseen una temperatura óptima en la cual su efecto catalítico es el máximo. Esta actividad se ve

afectada de manera negativa a temperaturas mayores o menores a la temperatura óptima, debido a que la estructura proteica puede pasar de un estado nativo a un estado desnaturalizado. Generalmente, la mayoría de las enzimas son desnaturalizadas a altas temperaturas (60-70°C), a causa de que el calor provoca un debilitamiento de las fuerzas intramoleculares responsables de la preservación de la estructura terciaria de la proteína (Illanes y col., 2008).

Un aspecto de sumo interés en el campo de la tecnología enzimática es el mejoramiento de la termoestabilidad de las enzimas. Las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo a altas temperaturas poseen mayor velocidad de catálisis, favoreciendo además la transferencia de masas debido a que al aumentar la temperatura se incrementa la solubilidad del sustrato y se disminuye la viscosidad del medio de reacción (Bruins y col., 2001; Matsumoto y Ohasi, 2003).

A este respecto, la inmovilización es una de las estrategias más utilizadas para estabilizar térmicamente a las enzimas. Varios autores coinciden en que la formación de interacciones covalentes y/o no covalentes entre la enzima y el soporte de inmovilización incrementa la rigidez conformacional de la estructura proteica, y por ende, su resistencia a ser desnaturalizada por un tratamiento térmico (Hanefeld y col., 2009; Datta y col., 2013; Singh y col., 2013).

A manera de ejemplo, Altun y Cetinus (2007), inmovilizaron pepsina en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído, encontrando que a 50°C la pepsina inmovilizada retuvo alrededor del 100% de su actividad, mientras que la pepsina libre retuvo solo el 60% a la misma temperatura. Adicionalmente se encontró que la temperatura óptima de la pepsina inmovilizada fue alrededor de 10°C mayor que la de la pepsina libre. En otro estudio, Singh y col. (2011) inmovilizaron una cisteína-proteasa en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído, encontrando que la enzima inmovilizada retuvo más del 80% de su actividad a temperaturas superiores a los 70°C, mientras que la proteasa soluble mostró el mismo comportamiento pero a temperaturas no mayores a 65°C. En otra investigación realizada por Zhang y col. (2008), se inmovilizó tripsina covalentemente en esferas de quitosano observándose que no existió un cambio significativo en la temperatura óptima de reacción de la enzima libre con respecto a la inmovilizada, pero esta última presentó una mayor estabilidad térmica a 55°C que la tripsina soluble. De forma

similar, Manrich y col. (2008) observaron una marcada termoestabilidad de tripsina inmovilizada en geles de quitosano activados con glicidol.

Debido a su alta reactividad, el quitosano puede ser modificado químicamente y/o interactuar con otros compuestos para crear materiales compuestos que pueden influir positivamente en la estabilidad a la temperatura de las enzimas inmovilizadas. En relación a lo anterior, Liu y col. (2005), inmovilizaron tripsina en nanopartículas de quitosano modificado hidrofóbicamente, observando que después de 100 minutos de reacción a 50°C, la tripsina inmovilizada perdió tan solo el 30% de su actividad, mientras que bajo las mismas condiciones la tripsina libre perdió el doble de su actividad enzimática.

La estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas en materiales a base de quitosano reportada en los trabajos de investigación antes discutidos, también puede ser explicada desde un punto de vista termodinámico. Por ejemplo, bajo condiciones normales de temperatura una molécula de enzima sin inmovilizar se encuentra en su estado nativo (N) y en equilibrio con su estado desnaturalizado (D). Conforme la temperatura aumenta por arriba de la temperatura óptima de catálisis, la enzima tiende a desdoblarse en un proceso cooperativo y con ello se da la transición al estado D, viéndose afectada negativamente su función (Iyer y Ananthanarayan, 2008). En cambio, si la enzima

se encuentra inmovilizada en un soporte sólido, la transición hacia el estado D a altas temperaturas se puede ver disminuida. En la Fig. 4 se presenta un esquema que ilustra como los enlaces covalentes formados entre el soporte de inmovilización y la enzima pueden influir positivamente en la estabilidad térmica de la estructura proteica.

De acuerdo a lo antes expuesto, es posible aseverar que los procesos de inmovilización aplicados incrementan la estabilidad térmica de las proteasas, lo que a su vez les confiere una mayor posibilidad de ser aplicadas en procesos industriales donde se requieran altas temperaturas.

## 5.2 Estabilidad al pH

Las propiedades de carga de los materiales utilizados como soportes de inmovilización de enzimas tienen un efecto sobre el pH óptimo y estabilidad estructural de las enzimas. Dicho efecto se encuentra relacionado con el desarrollo de un gradiente de iones  $\text{OH}^-$  y/o  $\text{H}^+$  entre el solvente y el soporte de inmovilización. El gradiente de iones es generado por las propiedades de carga de la superficie del soporte y la concentración de iones en la solución, dando como resultado la generación de un "pH localizado" en la superficie del soporte y que difiere del valor de pH de la solución (Talbert y Goddard, 2012).

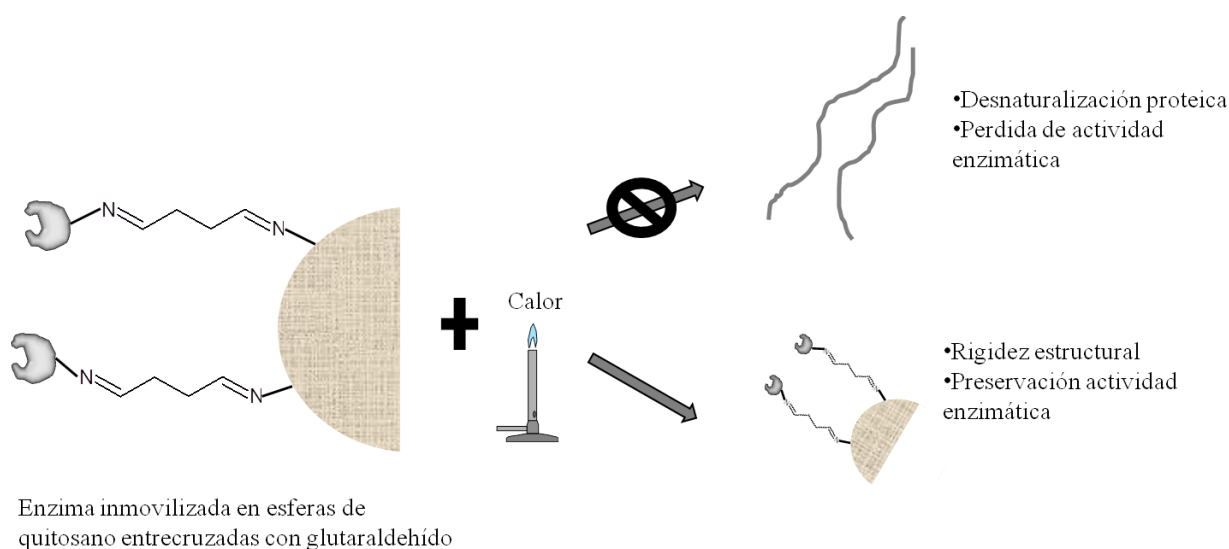


Fig. 4. Efecto de la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte sobre la estabilidad térmica de una enzima inmovilizada.

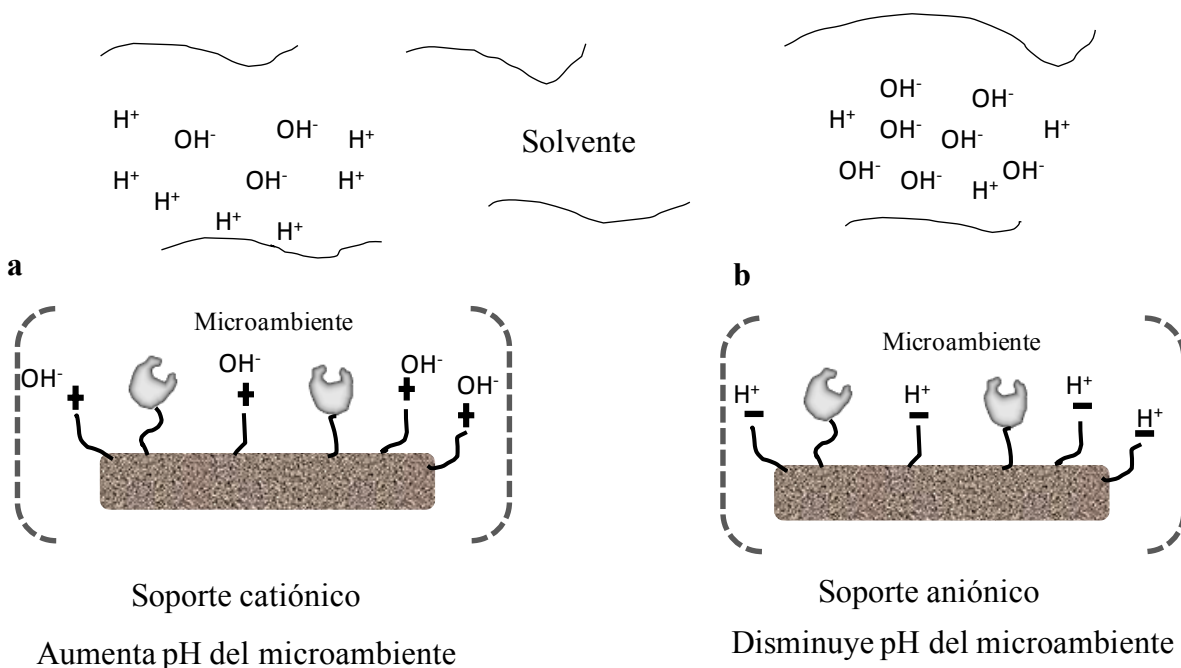


Fig. 5. Efecto de las propiedades de carga de los materiales utilizados como soporte en el pH del microambiente de las enzimas inmovilizadas (a) soporte catiónico (b) soporte aniónico.

A manera de ejemplo, si una enzima es inmovilizada en un material que posee características catiónicas, el pH del microambiente será mayor que el pH del solvente (debido a la atracción de iones  $\text{OH}^-$  de la solución), causando que el pH óptimo y estabilidad de la enzima se desplace hacia valores de bajo pH (Bissett y Sternberg, 1978; Krajewska y col., 1990). El comportamiento opuesto, sucede en soportes cuyos materiales poseen características aniónicas (Figura 5).

En relación a lo anterior, varios estudios han reportado que los grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) del quitosano le confieren a este material un carácter catiónico por lo que las enzimas inmovilizadas en materiales a base de este polisacárido presentan su máxima actividad a valores de pH más bajos con respecto a la enzima libre o soluble. Como el trabajo de Ju y col. (2012), quienes inmovilizaron  $\alpha$ -quimotripsina en nanopartículas magnéticas de quitosano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , observando que el máximo de actividad catalítica del sistema inmovilizado ocurre en un rango de pH entre 8 y 10 manteniendo más del 55% de su actividad a pH 4. En contraparte, la enzima libre presentó su máxima actividad a valores de pH entre 9 y 10; sin embargo, a pH 6 la actividad enzimática se perdió casi por completo. En otra investigación Tang y col. (2006), reportaron que la actividad enzimática de una proteasa neutra inmovilizada en nanopartículas

de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio se mantiene cerca del 100% a pH 6, mientras que la enzima libre perdió cerca del 40% de su actividad al mismo pH. Resultados similares a los antes citados fueron obtenidos por Kilinc y col. (2002) y Xi y col. (2005), al inmovilizar papaína en partículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído y tripsina en esferas de quitosano con núcleo de sílica gel, respectivamente.

Por otro lado, se ha reportado que en algunos casos al inmovilizar enzimas en matrices de quitosano activadas con agentes bifuncionales como el glutaraldehído, el cual induce reacciones de entrecruzamiento entre la enzima inmovilizada y el soporte, el efecto de desplazamiento del pH óptimo de catálisis hacia zonas ácidas no es significativo. Dicho comportamiento se atribuye a que los grupos amino del quitosano están muy poco disponibles para protonarse debido a que interactúan con los agentes entrecruzadores utilizados (Altun y Cetinus 2007; Dhananjay y Mulimani, 2008).

### 5.3 Parámetros cinéticos de las proteasas inmovilizadas

El proceso de inmovilización de enzimas puede llegar a provocar un efecto en parámetros cinéticos como la

constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ). De manera general se ha reportado que el proceso de inmovilización provoca que las enzimas tengan una menor afinidad por su sustrato (presentan un aumento en su  $K_m$ ) y presenten una disminución en su valor de  $V_{max}$  (Cooney, 2011). Cetinus y Öztop (2003), mencionan que la pérdida de afinidad por el sustrato de las enzimas inmovilizadas puede deberse, principalmente, a que el soporte genera un impedimento estérico hacia el sitio activo de la enzima provocando una inadecuada transferencia del sustrato hacia dicho sitio. Además, el incremento en la  $K_m$  puede ser también una consecuencia de los cambios conformacionales que sufre la enzima al unirse al soporte de inmovilización. De manera similar, la disminución en el valor de  $V_{max}$  observado en las enzimas inmovilizadas puede deberse a que ciertos aminoácidos importantes en el sitio activo participen en la unión de la enzima con el soporte (Bhandari y col., 2009).

Son varios los trabajos que muestran el efecto de la inmovilización sobre las variables cinéticas antes mencionadas. Li y col. (2012) encontraron que el valor de  $K_m$  aumenta casi el doble al inmovilizar una proteasa neutra en esferas de quitosano modificadas químicamente (carboxi-metil-quitosano y N-succinil-quitosano) con respecto a la enzima libre. En otro estudio, Bacheva y col. (2008) reportaron que el valor de  $K_m$  aumentó aproximadamente 9 veces comparándolo con la  $K_m$  de la enzima soluble al inmovilizar subtilisina (serina-proteasa) en películas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. En este mismo estudio, el valor de  $V_{max}$  de la enzima inmovilizada fue aproximadamente 100 veces menor con respecto a la enzima sin inmovilizar. Liu y col. (2005) inmovilizaron tripsina en nanopartículas de quitosano modificado hidrofólicamente con ácido linoléico y explican que dicha disminución del  $K_m$  de la enzima inmovilizada está más relacionada con la rigidez conformacional causada por el proceso de inmovilización que con la limitación en la transferencia de sustrato al sitio activo de la enzima, la cual se sabe es disminuida en sistemas de inmovilización a nanoescala. De la misma manera, otros autores han observado el efecto antes mencionado sobre las variables cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  al inmovilizar proteasas en materiales a base de quitosano. Como ejemplo están los resultados obtenidos por Ahmed y col. (2007) y Sangeetha y Abraham (2008).

Aun y cuando en varios estudios se han reportado los efectos negativos que causa el proceso de

inmovilización sobre  $K_m$  y  $V_{max}$ , existen otros trabajos en los cuales dicho proceso aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato y causa además un incremento en su  $V_{max}$  (Benkhelifa y col., 2005; Zhang y col., 2008; Veselova y col., 2009; Singh y col., 2011).

#### 5.4 Estabilidad operacional de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

La forma más usual para evaluar la estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas es determinando: a) la capacidad que poseen éstas de retener su actividad catalítica después de varios ciclos de uso, b) la capacidad de las enzimas inmovilizadas en reactores para operar de forma continua y c) su estabilidad al almacenamiento (Novick y Rozzell, 2005). A continuación se discuten los efectos de la inmovilización sobre la estabilidad operacional de los sistemas catalíticos inmovilizados.

##### 5.4.1. Capacidad de reutilización y operación continua en reactores

Desde el punto de vista económico, la capacidad de reutilización de las enzimas inmovilizadas representa una gran ventaja con respecto al uso de enzimas en forma soluble, ya que en el caso de las últimas, éstas son desechadas después de un solo uso, agregándole un mayor costo financiero al proceso de interés debido a que la obtención de enzimas en forma pura requiere también de una alta inversión monetaria (Li y col., 2006).

De acuerdo a Dwevedi y Kayastha (2009), el uso repetido del sistema catalítico provoca que la fuerza de los enlaces establecidos entre la enzima y el soporte se debilite provocando pérdidas en actividad debido al desprendimiento de la enzima del soporte. Además, la alta frecuencia de interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima causa que dicho sitio se distorsione resultando en una disminución en la eficiencia catalítica.

Por lo anterior, el tipo de enlace formado entre la enzima y el soporte de inmovilización debe de ser lo suficientemente estable para evitar desprendimientos de la enzima y con ello mantener la eficiencia catalítica del sistema durante varios ciclos de uso. A este respecto en la Tabla 2 se observa que para el caso de las proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano, la actividad proteolítica puede ser mantenida en al menos un 60% con respecto a su actividad inicial después de varios ciclos de uso.

Tabla 2. Estabilidad operacional y aplicaciones de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

Enzima	Características de inmovilización	Aplicación	Estabilidad operacional	Referencia
Pepsina y "rapidase" (proteasas ácidas)	Inmovilización covalente en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído (GA)	Hidrólisis continua de gluten de trigo en bio-reactor para la generación de péptidos con propiedades espumantes	El rendimiento del proceso se mantuvo a más del 70% durante la operación continua del bio-reactor. La vida media de la actividad enzimática fue de 45 días. No se observó contaminación microbiana durante el periodo de operación	Motoi y col. (2004)
Proteasa XIX	Inmovilización covalente en esferas de quitosano entrecruzadas con (GA)	Hidrólisis continua de caseína en bio-reactor tipo Torus	La hidrólisis de caseína fue mayor para la proteasa inmovilizada y empacada en el reactor Torus (grado de hidrólisis de 25%) que para la proteasa libre en reactor de tanque agitado (grado de hidrólisis de 12%)	Benkhelifa y col. (2005)
Proteasa neutra	Inmovilización covalente en esferas de carboxi-metil-quitosano entrecruzadas con GA	Producción de quitosano de bajo peso molecular	La actividad residual de la proteasa inmovilizada fue del 79 % después de 30 días de almacenamiento a 25°C, mientras que bajo las mismas condiciones de almacenamiento la proteasa libre no presentó actividad enzimática. Retención del 78% de actividad enzimática después de 10 ciclos de uso repetido en la hidrólisis de solución de quitosano	Li y col. (2006)

Tripsina	Inmovilización por adsorción a esferas de sílica gel recubiertas de quitosano funcionalizadas con metales ( $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ )	Fabricación de resina cromatográfica para purificación de proteínas por afinidad a metales	Retención del 80% de actividad enzimática de la tripsina inmovilizada en esferas funcionalizadas con $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ después de almacenamiento a 25°C. La tripsina libre preservó alrededor del 20% de actividad bajo la misma condición de almacenamiento	Wu y col. (2006)
Pepsina porcina	Inmovilización covalente en esferas de quitosano activadas con GA	Coagulación de leche	La pepsina soluble registró pérdida de actividad después de 5 días de almacenamiento a 5°C, mientras que la enzima inmovilizada retuvo el 100% de actividad enzimática después de 30 días bajo las mismas condiciones de almacenamiento. Retención del 95% de actividad después de 3 ciclos de uso.	Altun y Cetinus, (2007)
Tiol-proteasa	Inmovilización de la enzima en esferas de quitosano entrecruzadas con GA	Catálisis en medios acuosos no convencionales; etanol y dimetil sulfoxido (DMSO)	Retención del 100% de actividad de la enzima inmovilizada a concentraciones del 15% de etanol y DMSO con respecto a la enzima libre, la cual registró pérdidas del 40% y 20% en actividad al incubarse en etanol y DMSO respectivamente	Bhandari y col. (2009)
Aminopeptidasa	Inmovilización cápsulas de alginato recubiertas con quitosano	Aceleración del proceso de maduración de queso Cheddar	No determinada	Azarnia y col. (2010)

Papaína	Inmovilización por adsorción en membranas de nylon recubiertas con quitosano y queladas con metales	Fabricación de resina cromatográfica para purificación de papaína por afinidad a metales ( $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , y $\text{Co}^{2+}$ )	El ciclo de elución de papaína fue realizado tres veces sobre la misma resina, observándose que la capacidad de adsorción de la enzima se mantuvo casi al 100% después de los tres ciclos de uso	He y col. (2010)
L-metioninasa	Inmovilización covalente en hojuelas de quitina activadas con GA	Producción continua de metanotiol ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ )	Retención del 60% de actividad enzimática después de tres ciclos de reacción.	El-Sayed y Shindia, (2011)
Tripsina	Inmovilización covalente en microesferas de quitosano	Resina cromatográfica para purificación por afinidad de inhibidor de tripsina	La actividad de la tripsina inmovilizada disminuyó 12.5% después de 20 días de almacenamiento a 25°C, mientras que la actividad de la tripsina libre disminuyó 52.6% bajo las mismas condiciones. Capacidad para realizar seis operaciones sucesivas de separación cromatográfica, manteniendo el 90% de la actividad enzimática inicial después de los seis ciclos de operación.	Zhang y col. (2011)
$\alpha$ - quimotripsina	Inmovilización covalente en nanopartículas magnéticas de quitosano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	Síntesis de péptidos	La enzima inmovilizada retuvo el 60% de su actividad original después de 12 ciclos de uso.	Ju y col. (2012)
Tripsina	Inmovilización en nano-cápsulas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato	Suplementación de dietas para acuicultura	No determinada	Kumari y col. (2013)

Los resultados altamente aceptables de capacidad de reutilización mostrados en la Tabla 2, pueden estar relacionados con el que en la mayoría de los casos se utiliza glutaraldehído para la inmovilización de las proteasas a través de un entrecruzamiento de tipo covalente entre los grupos amino presentes en el soporte y en las enzimas (Fig. 4). El entrecruzamiento del quitosano con glutaraldehído provoca que los geles formados posean una mayor estabilidad y durabilidad (Krajewska y col., 2004; Altun y Cetinus, 2007).

Como se explicó anteriormente, una de las ventajas principales que ofrece la inmovilización de enzimas en soportes sólidos es que estas pueden ser empacadas en un reactor generando con ello procesos continuos de catálisis sin ocasionar pérdidas de la enzima al final del proceso. Existen pocos estudios relacionados con la hidrólisis continua de proteínas con la ayuda de bioreactores que contengan proteasas inmovilizadas. Motoi y col. (2004), consideran que este tipo de hidrólisis se ve limitada por la fácil degradación de la estructura proteica debido a la contaminación microbiana; y además, a que el gran tamaño molecular de los sustratos de origen proteico generalmente ocasiona problemas de impedimento estérico que reducen la capacidad de hidrólisis de las proteasas inmovilizadas.

En relación a las limitantes antes expuestas, Motoi y col. (2004) implementaron un sistema catalítico compuesto de un bioreactor empacado con pepsina inmovilizada covalentemente en esferas de quitosano para la hidrólisis de gluten. En otro estudio, Benkhelifa y col. (2005) desarrollaron un reactor tipo Torus para llevar a cabo la hidrólisis de caseína con la ayuda de una proteasa XIX de *Aspergillus sojae* inmovilizada en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. En la Tabla 2 se muestran las eficiencias en la hidrólisis y capacidad de operación continua de las proteasas inmovilizadas en los estudios antes citados.

#### 5.4.2. Estabilidad al almacenamiento

De acuerdo a Gianfreda y Scarfi (1991), las proteasas presentan una gran inestabilidad al almacenamiento debido a que este tipo de enzimas se hidrolizan entre ellas mismas; dicho de otra manera, presentan autólisis. De lo anterior deriva que la inmovilización de enzimas sea una de las estrategias más utilizadas para estabilizar a estas macromoléculas durante un almacenamiento prolongado basándose en la premisa de que el proceso de inmovilización reduce la flexibilidad conformacional de la enzima y por ende

se reduce la velocidad del proceso autolítico. Aunado a lo anterior, Mateo y col. (2007) explican que la inmovilización de enzimas en un soporte sólido poroso ocasiona que las moléculas de enzima se dispersen por completo en el soporte y por lo tanto, la posibilidad de autólisis o de proteólisis ocasionada por enzimas proteolíticas presentes en el extracto (diferentes a la enzima de interés) es disminuida debido a que estas últimas también se encuentran unidas al soporte.

Tomando en cuenta que los materiales a base de quitina y quitosano presentan porosidad y gran afinidad por las proteínas, la estabilidad al almacenamiento de las proteasas inmovilizadas en estos polisacáridos se ve notablemente mejorada incluso a temperaturas de almacenamiento de 25°C. En la Tabla 2 se muestran porcentajes de retención de actividad enzimática con respecto al tiempo de almacenamiento de proteasas inmovilizadas en quitina y quitosano.

#### 5.5 Aplicaciones de sistemas catalíticos constituidos de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

En la Tabla 2 se muestran algunas aplicaciones de los sistemas catalíticos conformados por proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano. Se observa que estos sistemas pueden ser utilizados como herramientas biotecnológicas en diversas áreas de la industria tales como procesos de separación cromatográfica, producción de compuestos bio-activos, procesos relacionados con la industria alimentaria y catálisis en medios no convencionales, entre otros. A continuación se discuten algunas de las aplicaciones de proteasas inmovilizadas en quitina y quitosano.

En un estudio realizado por Azarnia y col. (2010), se encapsuló una aminopeptidasa en una matriz compuesta de alginato recubierta con quitosano. El sistema catalítico fue aplicado en la maduración de queso Cheddar como una alternativa al método tradicional de maduración que consiste en la adición directa de las enzimas a la leche y que implica una pérdida de alrededor del 90% de las enzimas adicionadas durante la fabricación del queso. Los resultados de esta investigación indican que la velocidad de maduración del queso Cheddar fue aumentada significativamente con respecto al queso control. El análisis sensorial de los quesos indicó que el queso madurado con la enzima encapsulada poseía



mayor sabor y aroma que el queso madurado con la enzima libre y los panelistas no detectaron ningún efecto sensorial negativo en los quesos que contenían las cápsulas de alginato-quitosano.

En un estudio reciente, Kumari y col. (2013) encapsularon tripsina en nanocápsulas de quitosano para la suplementación de una dieta dirigida al cultivo de carpa hindú (*Labeo rohita*). De acuerdo a los autores, la suplementación de enzimas proteolíticas exógenas en la dieta es requerida en ciertas condiciones de enfermedad tanto en humanos como en animales; sin embargo, tal aplicación se ve limitada por la inestabilidad que presentan las enzimas a ciertas condiciones de pH, temperatura, susceptibilidad a inhibidores y a la posibilidad de que la inadecuada administración de estas enzimas cause daño a nivel intestinal. Los resultados de esta investigación indicaron que la dieta suplementada con el sistema nanoencapsulado de liberación prolongada de tripsina tuvo un mejor efecto que la dieta suplementada con la enzima libre en la digestibilidad y actividad proteolítica intestinal de carpa hindú.

Dentro del campo de la biotecnología un aspecto de gran relevancia es la purificación de enzimas. En este respecto el quitosano ha sido considerado como una de las matrices cromatográficas con mayor potencial por lo que su uso para estos fines ha aumentado en años recientes (Gupta y Jabrail 2006). Por ejemplo, He y col. (2010) desarrollaron un sistema cromatográfico consistente de una resina de nylon recubierta con quitosano y funcionalizada con metales ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Co}^{2+}$ ) con la finalidad de purificar papaína a gran escala. Los autores reportaron que utilizando la resina de afinidad a metales lograron purificar a la papaína en un solo paso cromatográfico con incrementos en pureza del orden de 26.2, 20.5, 27, y 23.2 para  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Co}^{2+}$  respectivamente.

## Conclusiones

Dentro de la amplia variedad de polímeros naturales utilizados como soportes para inmovilizar enzimas, la quitina y el quitosano se colocan como una de las mejores opciones debido a las propiedades funcionales de estos polisacáridos. Por otro lado, las proteasas son enzimas que poseen gran importancia desde el punto de vista de su aplicación industrial por lo que su inmovilización puede potencializar aún más la capacidad catalítica de este tipo de enzimas.

La inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano es una estrategia que

permite aumentar la estabilidad de la estructura proteica y por ende disminuir su desnaturalización a altas temperaturas. De igual forma, mejora su estabilidad al almacenamiento debido a que el proceso de inmovilización disminuye considerablemente la autoproteólisis. Tomando en cuenta el efecto estabilizante de la inmovilización sobre la actividad proteolítica, resulta de gran interés el realizar estudios encaminados al diseño de bioreactores que permitan la hidrólisis continua y específica de sustratos de origen proteico para la generación de hidrolizados que posean propiedades funcionales y sensoriales mejoradas (p. ej. capacidad espumante, antihipertensiva, antioxidante, reducción de sabor amargo, etc.).

La reactividad química de la quitina y el quitosano permite el diseño de una extensa gama de sistemas catalíticos en los cuales las proteasas pueden ser inmovilizadas de forma covalente, iónica, por atrapamiento o por encapsulación. Además, estos polisacáridos pueden ser combinados con una extensa variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos permitiendo tanto el diseño de estructuras de inmovilización con propiedades muy específicas como el diseño de estructuras catalíticas desde la escala macro hasta el orden nanométrico. Aunado a lo anterior, las características de compatibilidad biológica de la quitina y el quitosano pueden permitir el diseño de soportes de inmovilización de proteasas para ser utilizados en aplicaciones donde el ser humano sea el usuario final, como lo son las relacionadas con la industria alimentaria y farmacéutica.

## Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Politécnica de Sinaloa, por el apoyo brindado para la realización de estudios de doctorado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.).

## Referencias

- Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V. y Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 3, 521-530.
- Ahmed, S. A., Saleh, S. A. y Abdel-Fattah, A. F. (2007). Stabilization of Bacillus

- licheniformis ATCC 21415 alkaline protease by immobilization and modification. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1, 313-322.
- Al-Adhami, A. J., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B. y Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. *Process Biochemistry* 37, 1387-1394.
- Alloue, W. A. M., Destain, J., El Medjoub, T., Ghalfi, H., Kabran, P. y Thonart, P. (2008). Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150, 51-63.
- Altun, G.D. y Cetinus, S.A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry* 100, 964-971.
- Ansari, S. A. y Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances* 30, 512-523.
- Azarnia, S., Lee, B. H., St-Gelais, D., Champagne, C. P. y Kilcawley, K. N. (2010). Effect of free or encapsulated recombinant aminopeptidase of *Lactobacillus rhamnosus* S93 on acceleration of cheddar cheese ripening. *Food Biotechnology* 24, 135-149.
- Bacheva, A., Isakov, M., Lysogorskaya, E., Macquarrie, D. y Philippova, I. Y. (2008). Biocomposite of subtilisin Carlsberg with chitosan as an effective biocatalyst for hydrolysis and synthesis of peptides. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 343, 334-338.
- Barberies, S., Guzmán, F. e Illanes, A. (2008). Proteases as Catalysts for Peptide Synthesis. En: *Enzyme biocatalysis: Principles and Applications*. (A. Illanes, ed.), Pp. 257. Springer Verlag, Berlin.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez-del Valle, M., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. y Wilson, C. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25, 108-118.
- Beilen, J. B. v. y Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 338-344.
- Benkhelifa, H., Bengoa, C., Larre, C., Guibal, E., Popineau, Y. y Legrand, J. (2005). Casein hydrolysis by immobilized enzymes in a torus reactor. *Process Biochemistry* 401, 461-467.
- Betigeri, S. S. y Neau, S. H. (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials* 23, 3627-3636.
- Bhandari, S., Gupta, V.K. y Singh, H. (2008). Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Biocatalysis and Biotransformation* 27, 71-77.
- Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. En: *Immobilization of Enzymes and Cells* (G.F. Bickerstaff, ed.) Pp. 1-11. Humana Press, Totowa.
- Bissett, F. y Sternberg, D. (1978). Immobilization of *Aspergillus beta-glucosidase* on chitosan. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 750-755.
- Brady, D. y Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters* 31, 1639-1650.
- Brena, B.M. y Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes. A literature survey. En: *Immobilization of enzymes and cells*. (J.M. Guisan ed.) pp. 15-30. Humana Press, Towota.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E. y Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90, 155-186.
- Cao, L., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000). Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters* 2, 1361-1364.
- Castro, A., González, I., Tzompantzi, F. y Viniegra-González, G. (2013). Influence of the type of support and immobilization on the activity and stability of laccase enzyme (*Trametes versicolor*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 241-255.

- Çetinus, Ş.A. y Öztop, N.H. (2003). Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 889-894.
- Chiou, S. H., Hung, T. C., Giridhar, R. y Wu, W. T. (2007). Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 37, 265-275.
- Cooney, M.J. (2011). Kinetic measurements for enzyme immobilization. En: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology*. (S.D. Minter, ed.), Pp. 207-225). Springer Science, New Jersey.
- Cowan, D. A. y Fernandez-Lafuente, R. (2011). Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 494, 326-346.
- Cui, J. D. y Jia, S. R. (2013). Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* doi:10.3109/07388551.2013.795516
- Datta, S., Christena, L. R. y Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 31, 1-9.
- Dhananjay, S. y Mulimani, V. (2008). Optimization of immobilization process on crab shell chitosan and its application in food processing. *Journal of Food Biochemistry* 32, 521-535.
- Díaz-Rojas, E.I., Argüelles-Monal, W.M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J. y Goycoolea, F.M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience* 6, 340-347.
- Dwevedi, A. y Kayastha, A. M. (2009). Stabilization of  $\beta$ -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 682-688.
- El-Sayed, A. y Shindia, A. (2011). Characterization and immobilization of purified *Aspergillus flavipes*-methioninase: continuous production of methanethiol. *Journal of Applied Microbiology* 111, 54-69.
- Fágáin, C. Ó. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1252, 1-14.
- Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E. y Castro, P. M. L. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International* 439, 2221-2233.
- Flores-Maltos, A., Rodríguez-Durán, L. V., Renovato, J., Contreras, J. C., Rodríguez, R. y Aguilar, C. N. (2011). Catalytic properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. *Enzyme research* doi:10.4061/2011/768183
- Gianfreda, L. y Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry* 100, 97-128.
- Girigowda, K. y Mulimani, V. (2006). Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by  $\kappa$ -carrageenan-entrapped  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 437-442.
- Gupta, R., Beg, Q. y Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 591, 15-32.
- Gupta, K. y Jabrail, F. H. (2006). Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydrate Research* 341, 744-756.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. y Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* 38, 453-468.
- Harish Prashanth, K. y Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology* 18, 117-131.
- He, Z.Y., Christopher, B.W., Zhou, Y.T., Nie, H.L. y Zhu, L.M. (2010). Papain adsorption on chitosan-coated nylon-based immobilized metal ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) affinity

- membranes. *Separation Science and Technology* 45, 525-534.
- Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L. y Quintero-Ramos, A. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 455-463.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. y Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*. DOI 10.1007/s12154-013-0102-9
- Honarkar, H. y Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 140, 1403-1420.
- Huang, X.J., Ge, D. y Xu, Z.K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal* 43, 3710-3718.
- Illanes, A., Altamirano, C. y Wilson, L. (2008). Homogeneous enzyme kinetics. En: *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. (A. Illanes, ed.), Pp. 140-148. Springer Verlag, Berlin.
- Iyer, P. V. y Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* 43, 1019-1032.
- Janeček, S. (1993). Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry* 28, 435-445.
- Jia, H., Zhu, G. y Wang, P. (2003). Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology and Bioengineering* 84, 406-414.
- Ju, H.Y., Kuo, C.H., Too, J.R., Huang, H.Y., Twu, Y.K., Chang, C.M. J., Liu, Y. C. y Shieh, C.J. (2012). Optimal covalent immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78, 9-15.
- Khor, E. y Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24, 2339-2349.
- Kilinc, A., Onal, S. y Telefoncu, A. (2002). Stabilization of papain by modification with chitosan. *Turkish Journal of Chemistry* 26, 311-316.
- Kirk, O., Borchert, T. V. y Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 345-351.
- Kirkkopru, I., Alpaslan, C., Omay, D. y Güvenilir, Y. (2006). Use of different adsorbents for sorption and *Bacillus polymyxa* protease immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 132, 1034-1040.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 126-139.
- Krajewska, B., Leszko, M. y Zaborska, W. (1990). Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 48, 337-350.
- Kumari, R., Gupta, S., Singh, A. R., Ferosekhan, S., Kothari, D. C., Pal, A. K. y Jadhao, S. B. (2013). Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-like enzyme in fish gastrointestinal tract. *PLoS one* 8, 1-12.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science* 26, 1921-1971.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology* 8, 203-226.
- Langmuir, I. y Schaefer, V.J. (1938). Activities of urease and pepsin monolayers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 1351-1360.
- Li, J., Cai, J., Zhong, L. y Du, Y. (2012). Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 87, 2697-2705.
- Li, J., Du, Y., Sun, L., Liang, H., Feng, T., Wei, Y. y Yao, P. (2006). Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers. *Journal of Applied Polymer Science* 101, 3743-3750.

- Liu, C.G., Desai, K.G. H., Chen, X.G. y Park, H.J. (2005). Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 535, 1728-1733.
- Macquarrie, D. J. y Hardy, J. J. (2005). Applications of functionalized chitosan in catalysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44, 8499-8520.
- Mahmoud, D. A. y Helmy, W. A. (2009). Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (Review Article). *Journal of Applied Sciences Research* 5, 2466-2476.
- Manrich, A., Galvão, C., Jesus, C. D., Giordano, R. C. y Giordano, R. L. (2008). Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 54-61.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451-1463.
- Matsumoto, M. y Ohashi, K. (2003). Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* 14, 75-77.
- Matto, M. y Husain, Q. (2006). Entrapment of porous and stable concanavalin A-peroxidase complex into hybrid calcium alginate-pectin gel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1316-1323.
- Matto, M. y Husain, Q. (2009). Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 164-170.
- Moehlenbrock, M.J. y Minteer, S.D. (2011). Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. En: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*. (S.D. Minteer, ed.) Pp. 1-7 Springer Science: Clifton.
- Motoi, H., Fukudome, S. y Urabe, I. (2004). Continuous production of wheat gluten peptide with foaming properties using immobilized enzymes. *European Food Research and Technology* 219, 522-528.
- Mourya, V. e Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers* 68, 1013-1051.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. y Lehninger, A.L. (2008). *Principles of Biochemistry*. Quinta edición. Freeman and Company, New York.
- Nelson, J. y Griffin, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society* 38, 1109-1115.
- Nelson, J. y Hitchcock, D.I. (1921). The activity of adsorbed invertase. *Journal of the American Chemical Society* 43, 1956-1961.
- Novick, S.J. y Rozzell, J.D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. En: *Microbial Enzymes and Biotransformations*, (J.L. Barredo ed.) Pp. 247-271. Humana Press, Totowa.
- Rasmussen, R. S. y Morrissey, M. T. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research* 52, 237-292.
- Ravi Kumar, M.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46, 1-27.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
- Sangeetha, K. y Emilia Abraham, T. (2008). Investigation on the development of sturdy bioactive hydrogel beads. *Journal of Applied Polymer Science* 107, 2899-2908.
- Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 467-477.
- Sheldon, R.A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349, 1289-1307.

- Singh, A.N., Suthar, N., Singh, S. y Dubey, V.K. (2011). Glutaraldehyde activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6256-6262.
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. y Lee, J.K. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1232-1277.
- Synowiecki, J. y Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 145-171.
- Talbert, J. N. y Goddard, J. M. (2012). Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93, 8-19.
- Talbert, J. N. y Hotchkiss, J. H. (2012). Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78, 78-84.
- Tanaka, H., Matsumura, M. y Veliky, I. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 53-58.
- Tang, Z.X., Qian, J.Q. y Shi, L.-E. (2006). Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Process Biochemistry* 415, 1193-1197.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases. An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90, 1-11.
- Tischer, W. y Wedekind, F. (1999). Immobilized enzymes: methods and applications. En: *Biocatalysis-from Discovery to Application* (W.D. Fessner, A. Archelas, D. C. Demirjian, R. Furstoss, H. Griengl, K. E. Jaeger, E. Morís-Varas, R. Öhrlein, M. T. Reetz, J.-L. Reymond, M. Schmidt, S. Servi, P. C. Shah, W. Tischer y F. Wedekind, eds.), Pp. 95-126. Springer, Berlin.
- Veselova, I., Kireiko, A. y Shekhovtsova, T. (2009). Catalytic activity and the stability of horseradish peroxidase increase as a result of its incorporation into a polyelectrolyte complex with chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45, 125-129.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 574-579.
- Wohlgemuth, R. (2010). Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 713-724.
- Wu, J., Luan, M. y Zhao, J. (2006). Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. *International Journal of Biological Macromolecules* 39, 185-191.
- Xi, F., Wu, J., Jia, Z. y Lin, X. (2005). Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochemistry* 408, 2833-2840.
- Zhang, B., Zhang, L., Wang, D.F. y Sun, J.P. (2011). Improvement of purification of trypsin inhibitor from wild soybean (Glycine Soja Sieb. & Zucc.) using chitosan resin-immobilized trypsin. *Journal of Food Biochemistry* 356, 1660-1670.
- Zhang, J., Zhang, S. y Wang, Y.S. (2008). Stability of  $\beta$ -galactosidase immobilized on composite microspheres of artemisia seed gum and chitosan. *Polymer Composites* 29, 9-14.
- Zhang, L., Zhang, B., Lin, H., Liu, P. P., Yu, L. N. y Wang, D. F. (2008). Preparation of trypsin-immobilised chitosan beads and their application to the purification of soybean trypsin inhibitor. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2332-2339.
- Zohuriaan-Mehr, M. J. (2005). Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review. *Iranian Polymer Journal* 14, 235-265.