


INMOVILIZACIÓN DE CELULASA SOBRE UNA MATRIZ DE QUITINA-QUITOSANA

Sheila Romo¹, Conrado Camacho², Leissy Gómez², Reynaldo Villalonga-Santana³, Juan Úbeda-Iranzo¹,
María Arevalo-Villena¹, Ana Isabel Briones-Pérez¹, Héctor L. Ramírez² 

hectorl.ramirez@umcc.cu, hlperez2003@gmail.com

¹Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Castilla, Ciudad Real, España; ²Centro de Biotecnología, Universidad de Matanzas, Cuba; ³Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, España

● Resumen

Celulasa suministrada por la firma Biochemika fue inmovilizada sobre un soporte de quitina-quitosana mediante el empleo de la absorción física y el enlace covalente a la matriz con glutaraldehído. La concentración óptima de glutaraldehído para el enlace a la matriz fue de 0,25 % (v/v) y un tiempo de reacción de ½ h. Las condiciones óptimas para el proceso de inmovilización por absorción fueron: pH= 4,5, concentración de proteína= 170 µ/mL y un tiempo de incubación de 4 h. Se evaluaron varias características de las enzimas inmovilizadas con respecto a su contraparte nativa como pH óptimo, termoestabilidad y reuso. Como resultado del proceso de modificación las enzimas inmovilizadas incrementaron su termoestabilidad. El pH óptimo de las enzimas inmovilizadas se desplaza hacia la región ácida como resultado de la modificación. La celulasa inmovilizada mediante el enlace covalente sobre la matriz de quitina-quitosana retiene un 60 % de la actividad después de 15 ciclos de reuso.

Palabras clave: inmovilización, quitosana, celulasa, absorción, covalente.

● Abstract

Cellulase from Biochemika were immobilized for physics absorption and covalent bond with glutaraldehyde in the support chitin-chitosan. The optimal concentration of glutaraldehyde for bond enzyme to the support was 0,25 % with reaction time ½ hour. The best conditions for the physics absorption were: pH= 4,5, protein concentration = 170 µ/mL and incubation time= 4 hours. Various characteristics of immobilized cellulases such as the pH optimum, thermal stability, and reuse were evaluated. The modification process increased the thermostability of enzymes after physics adsorption on support and covalent attachment respectively. The pH optimum of enzymes change for the acid region for modification. The cellulase immobilized by covalent attachment to the chitosan-coated chitin support, retained about 60 % of its initial activity after 15 cycles of reuse.

Keywords: cellulase, immobilized, covalent bond, physics absorption, chitin-chitosan.

● Introducción

Las enzimas constituyen herramientas fundamentales en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. Las enzimas son ampliamente utilizadas como catalizadores en numerosos procesos industriales

/1, 2/, en el análisis químico y clínico /3, 4/, en el procesamiento de alimentos /5, 6/, en la agricultura /7/ y en la biotecnología /8/. Otra aplicación importante de estas biomoléculas lo constituye su uso como fármacos para la enzimoterapia de numerosas enfermedades /9, 10/.

En algunas de estas, en especial en enfermedades genéticas hereditables, se ha comprobado que pueden estar causadas por una deficiencia o ausencia total de una o más enzimas /11/.

Sin embargo, la utilización de las enzimas como catalizadores en procesos industriales a gran escala se ha visto limitada por los altos costos de producción y su baja estabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento. Durante su uso, la estabilidad de las mismas decrece debido a cambios en el pH, temperatura, cambios conformacionales como resultado de la fricción, la presión osmótica impuesta por el ambiente que la rodea y el efecto acumulativo de todos estos factores como función del tiempo de duración de utilización de las mismas.

En segundo lugar como las enzimas son solubles la recuperación de las mismas de la mezcla de sustrato y producto para el reuso no es económicamente rentable, por lo que los procesos enzimáticos son costosos /12/. Por estas razones los métodos para la inmovilización de enzimas juegan un papel fundamental en el incremento de los esfuerzos por reemplazar los procesos enzimáticos convencionales por procesos que empleen preparaciones enzimáticas inmovilizadas.

La inmovilización de enzimas es una estrategia empleada comúnmente para incrementar la estabilidad de las mismas, permite su reutilización, facilita la separación de los productos obtenidos por la reacción enzimática del medio de reacción y como resultado de su uso los procesos enzimáticos son más económicos /13/.

Numerosas metodologías se han empleado en la inmovilización de enzimas, pero para su clasificación se dividen en dos grandes grupos: métodos físicos y químicos. Los métodos físicos se basan en interacciones no covalentes que se establecen entre la enzima y el soporte. Los métodos químicos consisten en el establecimiento de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte /14/.

El uso de glutaraldehído como reactivo para activar la superficie de soportes y enlazar covalentemente enzimas a los mismos es una estrategia de inmovilización en fase sólida ampliamente utilizada /15, 16/. Matrices como:

agarosa /16/, nylon /17/, perlita /18/ y quitosana /19/, se han utilizado con buenos resultados para inmovilizar enzimas después de ser activadas con glutaraldehído. La síntesis de nuevos soportes para la aplicación de esta metodología a la inmovilización de enzimas tiene una especial importancia para la tecnología enzimática.

La quitina es un homopolímero lineal formado por unidades de $\beta(1,4)$ de N-acetil-D-glucosamina, con una estructura similar a la celulosa, pero a diferencia de esta presenta un grupo acetamido sustituyendo el hidroxilo en el carbono dos /20/.

Como consecuencia de la desacetilación de la quitina se obtiene una familia de compuestos agrupados bajo el nombre de quitosanas. Este tipo de compuestos esta formado por unidades de $\beta(1,4)$ de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina /21/.

La aplicación de estos polímeros en la inmovilización de enzimas en fase sólida se ha visto favorecida por el hecho de que estos presenta las siguientes características: son biopolímeros, baratos, biocompatibles, biodegradables, se puede preparar de diferentes formas físicas, son inertes, y disponen de grupos reactivos con los cuales se puede inmovilizar las enzimas por enlace covalente o por absorción /14, 22, 23/.

Las celulasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces $\beta(1-4)$ de la celulosa. Generalmente en la naturaleza estas enzimas se presentan como un sistema multienzimático: endoglucanasa (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa /24/. Estas enzimas tienen amplia aplicación en las industrias de los alimentos /25/, del papel /26/, la textil /27/ y la agricultura /24/. Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en el estudio de la producción de energía renovable a partir de la biomasa celulotítica existente en el planeta lo que reduciría la emisión de dióxido de carbono y el calentamiento global /28/.

Su uso se ha visto limitado por su baja estabilidad ante el efecto de valores extremos de pH y temperatura. Para mejorar su estabilidad se han aplicado diferentes metodologías de inmovilización como: la unión a alcohol polivinílico /24/, formulación

en forma de liposomas /28/, unión covalente a quitosana /29/ y absorción sobre silicatos /30/. Sin embargo a pesar de la aplicación de estos procedimientos la utilización práctica de esta enzima se ve limitada por baja actividad específica, susceptibilidad ante la acción de diferentes factores estresantes y la dificultad para su reuso.

El principal objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la inmovilización de celulasa sobre la matriz de quitina-quitosana sintetizada en nuestro laboratorio. Además se estudiara la influencia que sobre las propiedades de la enzima ejercerá el proceso de absorción o de unión covalente sobre la matriz.

● Métodos experimentales

Materiales

Quitina de carapacho de langosta (grado de desacetilación = 10 %) (tamaño de particular = 30 μm) fue suministrada por la Empresa "Mario Muñoz" (Habana, Cuba). La quitosana fue preparada por desacetilación de la quitina /31/.

El peso molecular fue de $M_w = 2,1 \cdot 10^4$ y el grado de desacetilación = 90 %. La celulasa fue suministrada por Biochemika, y el resto de los reactivos empleados en este trabajo son de grado analítico.

Síntesis del soporte quitina-quitosana

1 g de quitina fue dispersado en 10 mL de agua destilada, y se añadió glutaraldehído hasta una concentración final de un 5 % (v/v). Se mantuvo la reacción a 25 °C por 4 h bajo agitación y oscuridad. Pasado este tiempo, el sólido se lava con agua destilada hasta eliminar el aldehído en las aguas de lavado y se resuspende el sólido en 20 mL de agua.

La quitina activada se mezcla con una solución de quitosana al 1% (m/v) y se mantiene por agitación entre 4 y 6 h. Transcurrido este tiempo se añade NaBH_4 al medio de reacción hasta una concentración de 200 mM, y se mantiene la agitación por 16 h. Finalmente, el sólido se recupera por filtración y se lava abundantemente con agua destilada y se resuspende en 20 mL de agua destilada.

Inmovilización de la enzima por absorción y por formación de enlace covalente

200 mg del soporte quitina-quitosana (Q-QSA) se dispersaron en 10 mL de tampón acetato 100 mM pH 4,5 y se mezclaron con 2,4 mg de celulasa durante 4 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo se lavo el conjugado formado con tampón acetato 100 mM pH 4,5 para eliminar del medio de reacción la proteína no absorbida.

200 mg del soporte quitina-quitosana (Q-QSA) se dispersaron en 10 mL de tampón acetato 100 mM pH 4,5 y se mezclaron con 2,4 mg de celulasa durante 3 ½ h a 4 °C. Después, esta solución se incubó con glutaraldehído al 0,25 % (v/v) durante ½ h bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, el conjugado formado se lavó con tampón acetato 100 mM pH 4,5 para eliminar el exceso de proteína y glutaraldehído.

Ensayos

La actividad enzimática de la celulasa nativa y la modificada fue determinada por la adición de 100 μL de solución enzimática a 400 μL de una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % (m/v) en tampón acetato 50 mM pH 5,5.

Los 100 μL de solución enzimática del conjugado obtenido contiene la misma cantidad de proteína que los 100 μL de la enzima nativa utilizada en el ensayo. Después de 30 min a 37 °C la reacción se detiene por la adición del ácido 3,5 dinitrosalicílico y los azúcares reductores se determinan colorimétricamente /32/. La concentración de celulasa se determino utilizando el método de Bradford /33/.

pH óptimo

La actividad hidrolítica de las enzimas nativas e inmovilizadas hacia la CMC se determinó a 37 °C durante 30 min en los siguientes tampones: 100 mM ácido cítrico/ Na_2HPO_4 , pH 2,0-2,5; 100 mM acetato de sodio/ácido acético, pH 3,0-6,0 y 100 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 , pH 6,5-7.

Termoestabilidad

La enzima nativa y las modificada se incubaron a temperaturas entre 50 °C y 90 °C en solución tampón de acetato de sodio 50 mmol/L, pH 4,5.

Transcurrido 10 min de incubación, se extrae una alícuota, se enfría rápidamente y se determina la actividad enzimática.

Determinación del reuso de las enzimas inmovilizadas

La capacidad de reuso de las enzimas inmovilizadas se determinó mediante la determinación de la capacidad de hidrólisis de CMC (1 %) disuelta en tampón acetato 50 mM pH 4,5. Un volumen de 25 mL de este sustrato fue puesto en contacto con las preparaciones enzimáticas durante 1 h a 40 °C con una agitación de 120 rpm. Transcurrido este tiempo se separa el sustrato hidrolizado por centrifugación y se añade un nuevo volumen de sustrato sin hidrolizar para realizar un nuevo ciclo. La actividad de la enzima

se expresa en por ciento de actividad residual y se compara contra la actividad inicial en el primer ciclo.

Resultados y discusión

La optimización del proceso de inmovilización conllevó al estudio de la influencia del pH y de la concentración de proteínas sobre el mismo (figuras 1 A y B). Los parámetros óptimos para realizar este proceso fueron pH= 4,5, c=170 µ/mL, y se tomó como tiempo máximo de contacto 4 h. Bajo estas condiciones, se determinó que el rendimiento de inmovilización fue de 11,2 mg de proteína por gramo de soporte. Estas mismas condiciones de reacción fueron empleadas para la unión covalente de la celulasa a la matriz de Q-QSA.

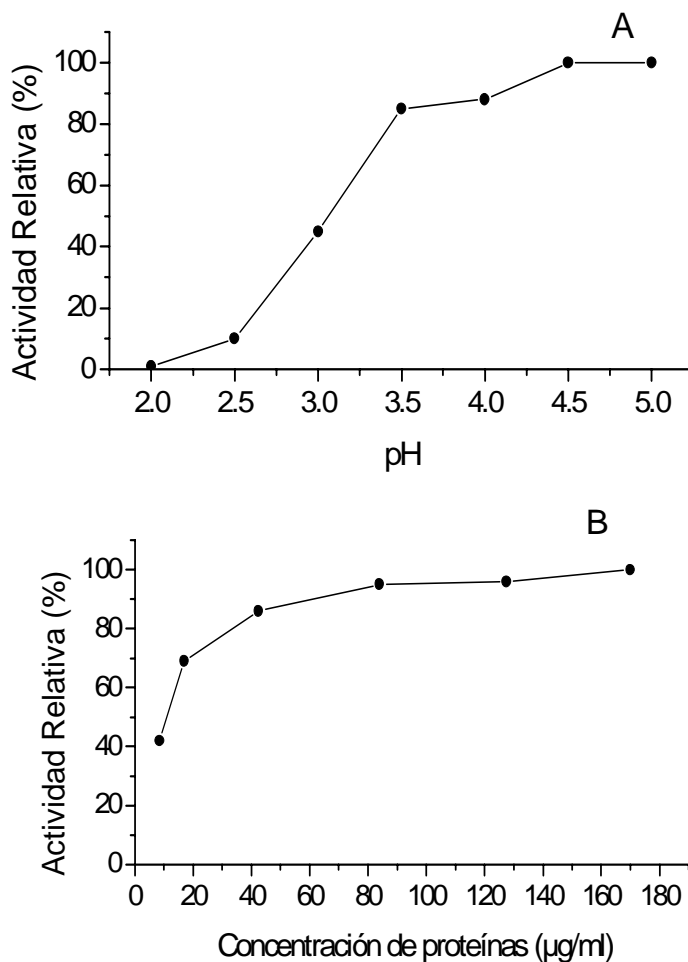


Fig.1 A. Determinación del pH óptimo para la inmovilización de la celulasa sobre la matriz de quitina-quitosana; B. Determinación de la concentración óptima de proteína para la inmovilización de la celulasa sobre la matriz quitina-quitosana.

En el caso de la utilización de glutaraldehído como agente entrecruzante para unir la enzima a la matriz se hizo un estudio de la determinación de la

concentración óptima de este reactivo en el medio de reacción. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos.

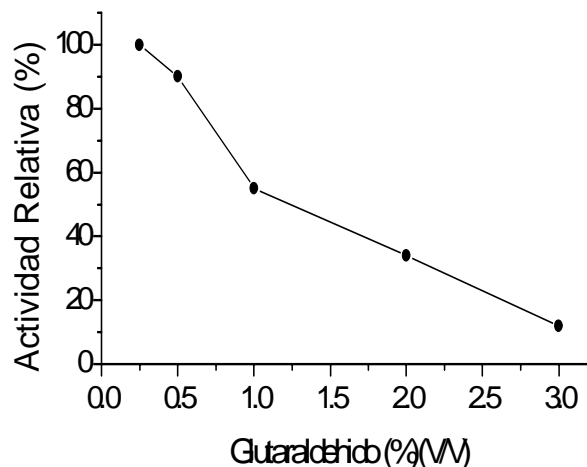


Fig. 2 Influencia de la concentración de glutaraldehído sobre la actividad de la celulasa inmovilizada de forma covalente sobre la matriz de quitina-quitosana.

En el gráfico se puede apreciar que la concentración óptima es de 0,25 % (v/v) del glutaraldehído en el medio reacción para unir covalentemente la enzima a la matriz y preservar la actividad enzimática.

En resultados que próximamente los autores de este trabajo publicaran determinaron que con esta matriz para la enzima pectinasa la concentración óptima de glutaraldehído es de un 1 %.

En la figura 3 se puede apreciar la estabilidad térmica de la enzima nativa y las inmovilizadas después, de incubar las preparaciones enzimáticas durante 10 min a las diferentes temperaturas.

El análisis de este gráfico nos permite apreciar que a 80°C la enzima nativa perdió completamente su actividad, mientras que la celulasa enlazada covalentemente a la matriz retiene un 55 % de actividad y la celulasa absorbida retiene un 51 % de actividad.

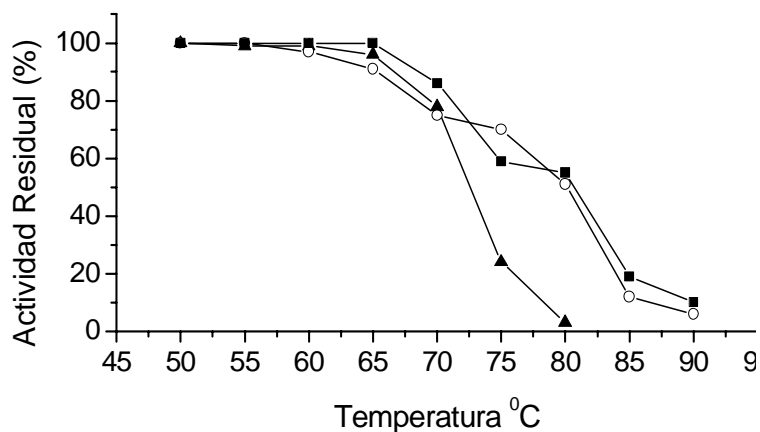


Fig. 3 Termoestabilidad de la celulasa sin inmovilizar (▲), la celulasa inmovilizada por absorción sobre la matriz de quitina-quitosana (○) y la celulasa inmovilizada de forma covalente por la adición de glutaraldehído (◼).

Las enzimas inmovilizadas son más estables que la nativa a altas temperaturas. La estabilidad térmica de las formas inmovilizadas se puede deber a la poca flexibilidad de las mismas, por su absorción o formación de enlaces covalentes con las matrices, lo que impide cambios conformacionales que inactiven su estructura proteica /34/.

En la figura 4 se muestra el gráfico de pH óptimo de la enzima nativa y de las inmovilizadas. En esta figura podemos apreciar que el pH óptimo para la enzima nativa y las modificadas no es el mismo.

Esto se debe a que la interacción del biocatalizador con la matriz de quitina-quitosana afecta el equilibrio de ionización de los aminoácidos esenciales del sitio activo de la misma y, por lo tanto, provoca cambio en esta propiedad.

Resultados similares a estos han obtenido Lei y col. al modificar pectinasa con partículas de sílica recubiertas con quitosana. Estos autores plantean que debido a la naturaleza polielectrolítica de la quitosana esta provoca que las enzimas modificadas con este polímero en ocasiones cambien su pH óptimo hacia la región ácida /34/.

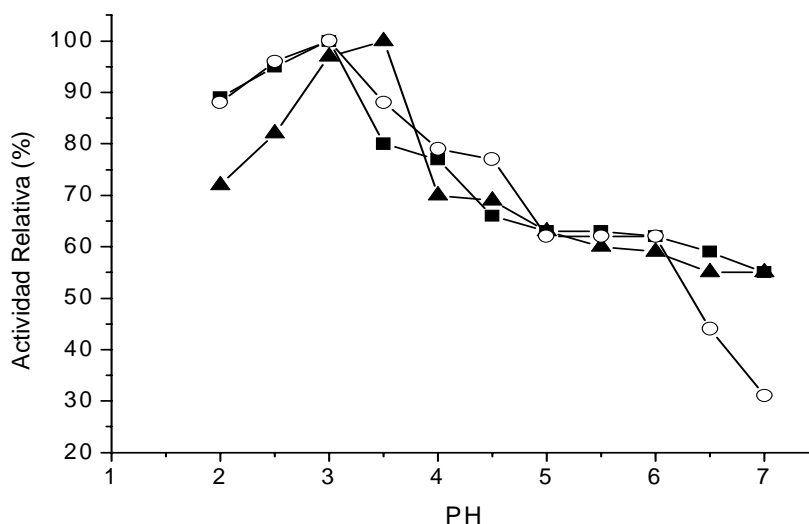


Fig. 4 pH óptimo de la celulasa sin inmovilizar (▲), la celulasa inmovilizada por absorción sobre la matriz de quitina-quitosana (○) y la celulasa inmovilizada de forma covalente por la adición de glutaraldehído (◻).

El reuso de los biocatalizadores inmovilizados fue estudiado debido a que este factor es esencial para la aplicación práctica de los mismos. En la figura 5 se muestra los ciclos de reuso para la enzima inmovilizada por absorción y por formación de enlace covalente.

Los resultados obtenidos para ambas preparaciones enzimáticas muestran mejores resultados que los obtenidos por Wu y col. /36/, que inmovilizaron celulasa sobre membranas de alcohol polivinílico, y después de seis ciclos de reuso, la enzima modificada retenía un 36 % de la actividad original.

Para la enzima inmovilizada en este trabajo por absorción después de seis ciclos de reuso, se retiene

un 54 % de actividad y la inmovilizada de forma covalente retiene un 76 % de la actividad original.

De los dos métodos empleados, los mejores resultados se obtuvieron en la que se utilizó glutaraldehído que retiene un 58 % de la actividad original después de quince ciclos de reuso.

El soporte de quitina- quitosana empleado en este trabajo se puede sintetizar de manera sencilla, es barato y resistente ante la acción de factores degradantes como: microorganismos, temperatura y pH. En este trabajo se analizaron los parámetros óptimos para la inmovilización de celulasa mediante absorción y la formación de enlace covalente utilizando glutaraldehído sobre este soporte.

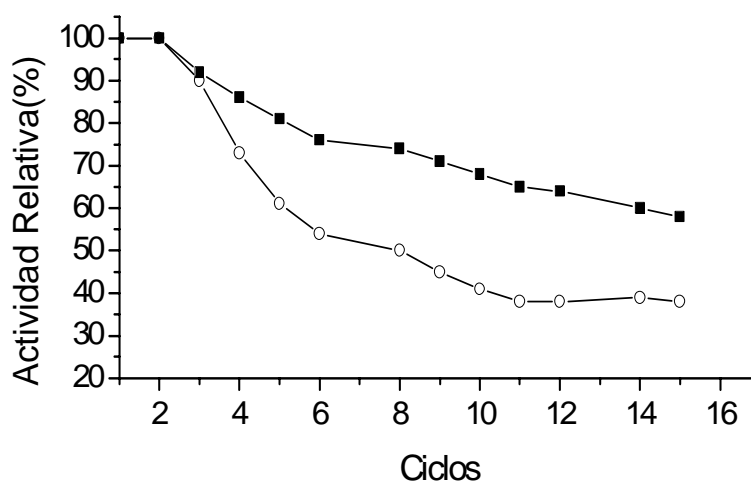


Fig. 5 Ciclos de reuso de la celulasa inmovilizada por absorción sobre la matriz de quitina-quitosana (o) y la celulasa inmovilizada de forma covalente por la adición de glutaraldehído (■).

Como resultado de la inmovilización la enzima nativa mostro un corrimiento de su pH óptimo hacia la zona ácida y un incremento de su termoestabilidad.

Además las enzimas inmovilizadas mostraron una buena estabilidad operacional en la hidrólisis de CMC.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo expresan su agradecimiento por el financiamiento a la Junta de Castilla La Mancha a través del proyecto «Inmovilización de enzimas para su aplicación en la industria agroalimentaria» (POII10-0085-5338). Además al CITMA de la Provincia de Matanzas por el financiamiento de esta investigación a través del proyecto: "Inmovilización de pectinasas por absorción sobre matrices de polisacáridos naturales" (20016674).



Bibliografía

- RANGANATHAN, S. V.; S. L. NARASIMHAN; K. MUTHUKUMAR. "An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel". *Biores. Tech.* 99: 3975-3981, 2008.
- IDRIS, A.; N. A. MOHD ZAIN; M. S. SUHAIMI. "Immobilization of Baker's Yeast invertase in PVA-Alginate Matrix Using Innovative Immobilization Technique". *Process Biochem.* 43: 331-338, 2008.
- HUDSON, E. P.; R. K. EPPLER; D. S. CLARK. "Biocatalysis in Semi-Aqueous and Nearly Anhydrous Conditions". *Current Opinion in Biotech.* 16: 637-643, 2005.
- YILDIZ, H. B. *et al.* "Immobilization of Tyrosinase and Alcohol Oxidase in Conducting Copolymers of Thiophene Functionalized". *Int. J. Biol. Macrom.* 41: 332-337, 2007.
- TUNCAGIL, S.; S. KIRALP; S. VARIS; L. TOPPARE. "Immobilization of Invertasa on a Conducting Polymer of 1-(4-Nitrophenil)-2,5-di(2-thienyl)-1H-Pyrrole". *React. Func. Polym.* 68: 710-717, 2008.
- DIZGE, N.; O. GUNAYDIN; F. YILMAZ; A. TANRISEVEN. "Immobilization of Invertasa Onto Poly(3-Methylthienylmethacrylate)/Poly(3-Thiopheneacetic Acid) Matrix". *Biochem. Eng. J.* 40: 64-71, 2008.
- VALLEJO, V. *et al.* "Immobilization of Recombinant Invertase (re-INVB) from *Zymomonas mobilis* on D-Sorbitol Cinnamic Ester for Production of Invert Sugar". *J Agric Food Chem.* 56: 1392-7, 2008.
- SASAKI, E. *et al.* "Preparation of Microcapsules by Electrostatic Atomization". *J. of Electrostatics* 66: 312-318, 2008.
- KHAN, A. A.; M. A. ALZOHAIY. "Recent Advances and Applications of Immobilized Enzymes Technologies: a Review". *Res. J. Biol. Sci.* 5: 565-575, 2010.
- VERONESE, M. F.; G. PASUT. "PEGylation, Succesfull Approach to Drug Delivery". *Drugs Disc. Today.* 10: 1451-1458, 2005.
- BOERSMA, Y. L.; M. J. DROGE; W. J. QUAX. "Selection Strategies for Improved Biocatalyst". *FEBS J.* 274: 2181-2195, 2007.
- KOTWAL, S. M.; V. Shankar. "Immobilized invertase". *Biotech. Adv.* 27: 311-322, 2009.
- TORABI, S. *et al.* "Covalent attachment of Cholesterol Oxidase and Horseradish Peroxidase on Perlite Through silanization: Activity, stability and co-immobilization." *J. Biotech.* 131: 111-120 (2007).

14. CETINUS, S.; H. OZTOP. "Immobilization of Catalase on Chitosan film". *Enzyme. Microb. Techn.* 26: 497–501, 2000.
15. BRYJAK, J.; P. KRUCZKIEWICZ; W. REKUC; A. PECZYNSKA-CZOCH. Laccase Immobilization on Copolymer of Butyl Acrylate and Ethylene Glycol Dimethacrylate". *Biochem. Eng. J.* 35: 325–332, 2007.
16. LÓPEZ-GALLEGO, F.; L. BETANCOUR; C. MATEO; A. HIDALGO *et al.* "Enzyme stabilization by Glutaraldehyde Crosslinking of Adsorbed Proteins on Aminated Supports". *J. Biotech.* 119: 70–75, 2005.
17. PAHUJANI, Sh.; Sh. KANWAR; G. CHAUHAN; R. Gupta. "Glutaraldehyde Activation of Polymer Nylon-6 for Lipase Immobilization: Enzyme characteristics and stability". *Bioresource Tech.* 99: 2566-2570, 2008.
18. TORABI, S.; Kh. KHAJEH; S. GHASEMPURA; N. GHAEMIA *et al.* "Covalent Attachment of Cholesterol Oxidase and Horseradish Peroxidase on Perlite Through Silanization: Activity, stability and co-immobilization". *J. Biotech.* 131:111–120, 2007.
19. JIANG, D. *et al.* "Immobilization of Pycnoporus Sanguineus Laccase on Magnetic Chitosan Microspheres." *Biochem. Eng. J.* 25: 15–23, 2005.
20. RAIMUNDA, F.; S. P. CAMPANA-FILHO. "Characteristics and Properties of Carboxymethylchitosan". *Carboh. Polym.* 75: 214–221, 2009.
21. GHAFFARI, A. *et al.* "Preparation and Characterization of Free Mixed-Film of Pectin/Chitosan/Eudragit_RS Intended for Sigmoidal Drug Delivery". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67: 175–186, 2007.
22. GÓMEZ, L.; H. L., RAMÍREZ; M. L. VILLALONGA; R. VILLALONGA. "Immobilization of Chitosan-Modified Invertase on Alginate-Coated Chitin Support Via Polyelectrolyte Complex Formation". *Enzyme Microb. Technol.* 38: 22-27, 2006.
23. FORESTI, M.; M. FERREIRA. "Chitosan-Immobilized Lipases for the Catalysis of Fatty Acid Esterifications". *Enzyme Microb. Technol.* 40: 769-777, 2007.
24. DINCER, A.; A. TELEFONCU. "Improving the Stability of Cellulase by Immobilization on Modified Polyvinyl Alcohol Coated Chitosan Beads". *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45: 10–14, 2007.
25. TENKANEN, M.; M. L. NIKU-PAAVOLA; M. LINDER; L. VIIKARI. "Cellulases in Food Processing". *Food Sci. Eng.* 122: 771–789; 2003.
26. SARKAR, J. M.; D. R. COSPER; E. J. HARTING. "Applying Enzymes and Polymers to Enhance the Freeness of Recycled Fiber". *Tappi J.* 78: 89–95 (1995).
27. CAVACO PAUL, A.; L. ALMEIDA; D. BISHOP. "Hydrolysis of Cotton Cellulose by Engineered Cellulases from *Trichoderma reesei*". *Text. Res. J.* 68: 273–280, 1998.
28. LI, Ch.; M. YOSHIMOTO; K. FUKUNAGA, K. NAKAO. "Characterization and Immobilization of Liposome-Bound Cellulase for Hydrolysis of Insoluble cellulose." *Biores. Technol.* 98: 1366–1372 (2007).
29. DARIAS, R.; R. VILLALONGA. "Functional Stabilization of Cellulase by Covalent Modification with Chitosan". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 489-493; 2001.
30. SINEGANI, A.; G. EMTIAZI; H. SHARIATMADARI. "Sorption and Immobilization of Cellulase on Silicate Clay Minerals". *J. Colloid Interface Sci.* 290: 39–44, 2005.
31. KURITA, K.; T. SANNAN; Y. IWAKURA. "Studies on Chitin, 4: Evidence for Formation of Block and Random Copolymers of N-Acetyl-D-Glucosamine and D-Glucosamine by Hetero- and Homogeneous hydrolyses". *Makromol. Chem.* 178: 3197-3202, 1977.
32. BERNFELD, P. "Amylases α and β ". *Methods Enzymol.* 1:149–58, 1955.
33. BRADFORD, M. M. "A rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.
34. TARDIOLI, P.; G. ZANIN; F. MORAES. "Characterization of Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin Glucanotransferas Immobilized on Glyoxyl-Agarose". *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1270–1278, 2006.
35. LEI, Z.; S. BI. "The Silica-Coated Chitosan Particle from a Layer-by-Layer Approach for Pectinase Immobilization". *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1442–1447, 2007.
36. WU, L., X. YUAN, J. SHENG. "Immobilization of Cellulase in Nanofibrous PVA Membranes by Electrospinning". *J. Membr. Sci.* 250: 167-173, 2005.