

# Nanosoportes magnéticos en tratamiento de material lignocelulósico

Sócrates Palacios-Ponce<sup>1,2</sup>, Anna Iliná<sup>1\*</sup>, Jaquelina Sánchez-Ramírez<sup>1,3</sup>, Sandra Pacios-Michelena<sup>1</sup>, María J. Negro<sup>4</sup>, Mercedes Ballesteros<sup>4</sup>, José M. Oliva<sup>4</sup>, José Martínez<sup>1</sup>, Elda P. Segura-Ceniceros<sup>1</sup>, Rodolfo Ramos<sup>5</sup>, Georgina Michelena-Álvarez<sup>6</sup>, Cristóbal Aguilar<sup>1</sup>

1. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V., Saltillo, Coahuila, México. \*annailina@uadec.edu.mx
2. Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.
3. Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo, No. 140, Saltillo, Coahuila, México.
4. CIEMAT, División de Energía Renovable, Unidad de Biocombustibles, 28040, Madrid, España
5. CONACYT-Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V., Saltillo, Coahuila, México.
6. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). P. O. Box 4026, Habana 10400, Cuba.

## RESUMEN

El presente trabajo demuestra la posibilidad de obtener los biopreparados inmovilizados en nanopartículas magnéticas (magnetita) recubiertas con quitosán (NPMQ), los cuales tienen potencial aplicación para el desarrollo de las tecnologías de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Se obtuvo la isoterma de adsorción de esporas de la cepa *Trichoderma* sp. – productora de las enzimas celulolíticas a 30 °C, 200 rpm, durante 1.5 h. A partir de la isoterma de adsorción de las esporas de *Trichoderma* a 30 °C, se estima una capacidad máxima de adsorción 5.00E+09 esporas/g NPMQ. La producción de enzimas celulolíticas, que utilizan como sustrato la cáscara de plátano, no fue afectada por la presencia de soporte magnético. Sin embargo, no se logró el reuso de hongo inmovilizado. Se realizó la inmovilización del preparado celulolítico (Sigma) de acuerdo con la técnica de unión covalente mediada por activación de soporte con aldehído glutárico. La reacción de sacarificación de fibra de agave (*Agave atrovirens*) se llevó a cabo con una carga enzimática de 15 FPU g<sup>-1</sup> (en presencia de 0.25 g de agave pretratado en autoclave), a pH 4.8, 50 °C y 160 rpm, durante un período de 100 h. La hidrólisis de biomasa de *Agave atrovirens* con el preparado inmovilizado, mostró rendimientos cercanos al de la enzima libre; además, de la posibilidad de reutilizar la enzima inmovilizada hasta por 4 ciclos. Las nanopartículas magnéticas son una alternativa viable para ser aplicadas en procesos biotecnológicos. La atención debe enfocarse en la búsqueda de los soportes con mayor resistencia a las condiciones de la fermentación y lograr mantener las propiedades magnéticas del soporte.

**Palabras clave:** biocatalizadores en obtención de bioetanol, inmovilización, nanopartículas magnéticas.

## ABSTRACT

The present study demonstrates the possibility to obtain biopreparations immobilized in magnetic nanoparticles (magnetite) coated with chitosan (NPMQ) which have potential application for the development of technologies for bioethanol obtaining from lignocellulosic residues. The spore adsorption isotherm of the *Trichoderma* sp. – as a strain which produces the cellulolytic enzymes, was obtained at 30 °C, 200 rpm for 1.5 h. From the adsorption isotherm of *Trichoderma* sp. spores at 30 °C, a maximum adsorption capacity at 5.00E + 09 spores / g NPMQ was estimated. The production of cellulolytic enzymes, using the banana peel

as substrate, was not affected by the presence of magnetic support. However, immobilized fungus reuse was not achieved. The immobilization of the cellulolytic enzymes (Sigma) was carried out according to the covalent binding technique mediated by activation of support with glutaraldehyde. The saccharification reaction of Agave fiber (*Agave atrovirens*) was carried out with an enzymatic load of 15 FPU g<sup>-1</sup> (in the presence of 0.25 g of agave pre-treated in an autoclave), at pH 4.8, 50 °C and 160 rpm, during a period of 100 h. The hydrolysis of biomass of *Agave atrovirens* with the immobilized preparation showed yields close to that of the free enzyme, in addition to the possibility of reusing the immobilized enzyme for up to 4 cycles. Magnetic nanoparticles are a viable alternative to be applied in biotechnological processes. The attention must be focused on the search of the supports with greater resistance to the fermentation conditions, managing to maintain the magnetic properties of the support.

**Key words:** biocatalysts in obtaining bioethanol, immobilization, magnetic nanoparticles.

## INTRODUCCIÓN

La importancia que actualmente tienen los temas de corte energético a nivel mundial, obliga a la sociedad científica a realizar una búsqueda permanente de aquellas alternativas que se presenten como opciones económicas a los hidrocarburos.

El bioetanol es un biocombustible de gran importancia, su tecnología de obtención, a partir de residuos de industria agroalimenticia (es decir, biomasa lignocelulósica), se considera como alternativa para la obtención de este, a partir de fuentes de almidón. La obtención de etanol de segunda generación comprende la etapa de pre-tratamientos, para deslignificación de biomasa y descristalización de celulosa. Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de sacarificación de celulosa que utiliza las enzimas celulolíticas (endo-, exocelulasas y glucanasas) y, finalmente, la fermentación para convertir los azúcares a etanol, como parte de la actividad microbiana (1). La innovación de los procesos de la obtención de las enzimas y su aplicación repetida, es decir en varios ciclos de hidrólisis de celulosa, es la clave para lograr mayor eficiencia y factibilidad económica de la tecnología de producción de etanol de segunda generación. La inmovilización de los biocatalizadores es la herramienta que permite facilitar el reuso de estos y disminuir el costo de procesos biotecnológicos y acortando el tiempo de las fermentaciones (2). La aplicación de nanopartículas magnéticas facilita la recuperación de los biocatalizadores del medio de reacción bajo el campo magnético externo y proporciona, en el caso de celulasas, un sistema con menor problema de difusión hacia sustrato insoluble, al comparar con los soportes microestructurados (2).

El presente trabajo interinstitucional resume la experiencia de aplicación de nanopartículas magnéticas (magnetita), recubiertas con quitosán (NPMQ), en diferentes procesos biotecnológicos de aprovechamiento de residuos lignocelulósicos: la obtención de enzimas celulolíticas e hidrólisis de biomasa celulósica. Los objetivos del estudio realizado son: 1) obtener isothermas de adsorción de esporas de la cepa fúngica del género *Trichoderma* sobre nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán (NPMQ) y aplicar el biocatalizador para la obtención de enzimas celulolíticas en la fermentación por adhesión a superficie, comparando con la fermentación sumergida en presencia de extracto de cáscara de plátano (CP); 2) obtener y caracterizar el preparado de complejo celulolítico inmovilizado en NPMQ para evaluar su actividad en el proceso de sacarificación de fibra de pencas de Agave.

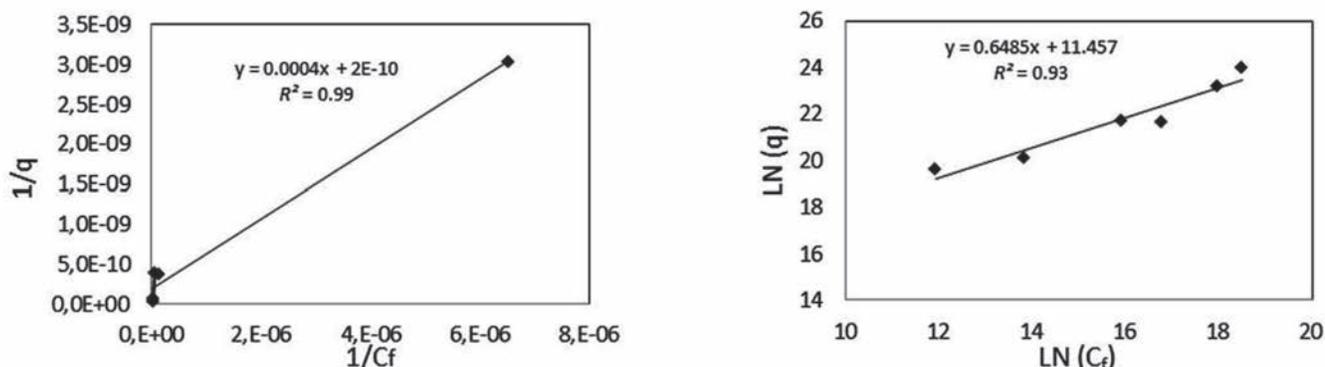
## MATERIALES Y MÉTODOS

La síntesis de NPMQ se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Osuna *et al.* (3). La caracterización de preparados se llevó a cabo mediante microscopía electrónica y rayos X. Las isothermas de adsorción de esporas de *Trichoderma* sp. fueron obtenidas en solución salina en

presencia de diferentes concentraciones de inóculo a 30 °C, 200 rpm, durante 1.5 h., la floculación magnética del preparado inmovilizado se realizó con Imán de neodimio (12,300 gauss) adquirido en INNOVATEC, SA DE CV (Monterrey, México). La producción de las celulasas se llevó a cabo utilizando la cepa *Trichoderma reesei* RUT C30 (ATCC56765) de la colección de la Unidad de Bio-combustibles de la División de Energías Renovables, CIEMAT, Madrid, España. La fermentación se realizó en el medio Mandels con 3 % (p/v) de cáscara de plátano (CP), en 250 mL de Erlenmeyer. El pH se mantuvo a 6.0. El medio se inoculó con esporas libres e inmovilizadas (a  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). La actividad se evaluó en las muestras centrifugadas y filtradas con o papel filtro Whatman No.1, en calidad de sustrato, con 20  $\mu\text{L}$  de extracto y 40  $\mu\text{L}$  de tampón de citrato a 50 °C y 120 rpm. La concentración de azúcares liberados se evaluó espectrofotométricamente a 540 nm en la reacción con DNS (4). La actividad se expresó como U/mL, unidad considerada como la cantidad de enzima que permitió liberar 1  $\mu\text{mole}$  de azúcares reductores (glucosa) por minuto. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon los valores medios. La inmovilización de celulasas (Sigma) fue realizada de acuerdo a la técnica de unión covalente, mediada por activación de soporte con aldehído glutárico. La actividad de enzima inmovilizada se determinó con carboximetilcelulosa como sustrato (5).

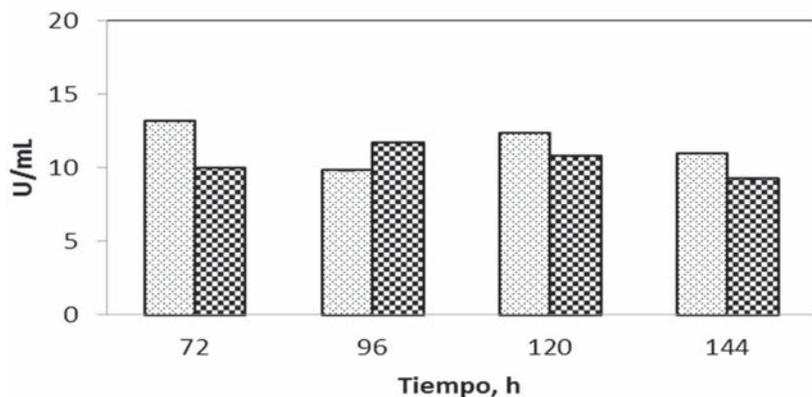
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron las nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosán. Las características de estas se describen en trabajo previo (3). Según la microscopía electrónica y el análisis de rayos X, las nanopartículas contenían una capa muy delgada de quitosán y un núcleo de magnetita / maghemita con un diámetro de 8.49-9.5 nm. Se logró obtener la isoterma de adsorción de esporas de hongo *Trichoderma sp.* (T211) a 30 °C, que se ajusta al modelo de Langmuir con un mayor coeficiente  $R^2$  (figura 1). A partir de esta se estima una capacidad máxima de adsorción de  $5.00\text{E}+09$  esporas/g NPMQ. No hay reportes previos sobre la inmovilización de esporas de hongos en nanomateriales magnéticos.

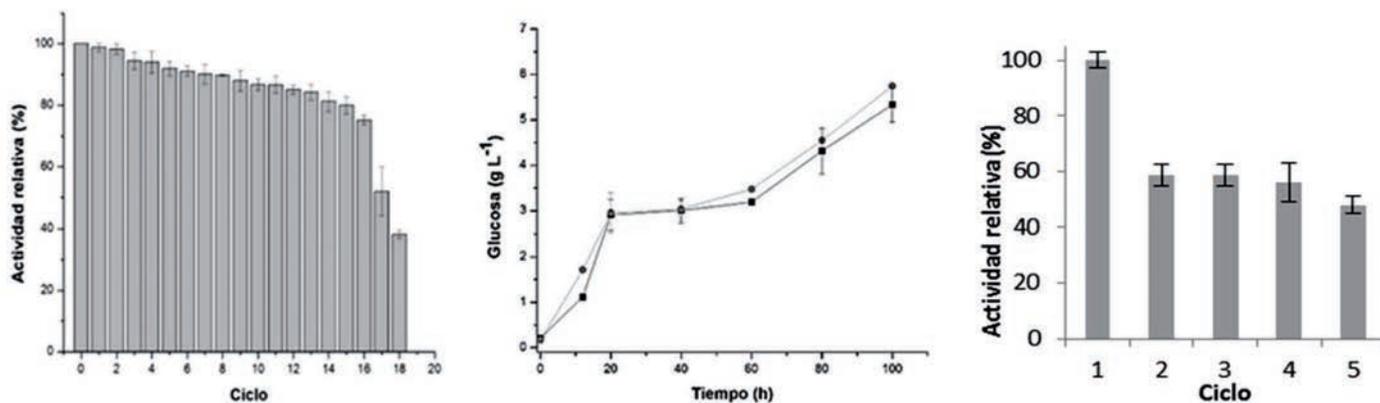


**Figura 1.** Linearización del isoterma de adsorción de esporas de *Trichoderma spp.* (T211) en nanopartículas magnéticas, recubiertas con quitosán en coordenadas de Langmuir (izquierda) y en coordenadas de Freundlich (derecha).

Los resultados obtenidos (figura 2) demuestran que la presencia del sistema magnético nanoestructurado no condujo al efecto positivo sobre la actividad de la celulasas. Probablemente, la presencia de biomasa de CP afectó la formación de biopelículas, por lo que no se mejoró la producción de celulasas.



**Figura 2.** Actividad celulasa de *Trichoderma reesei* RUT C30 libre (■) e inmovilizado (■). (La concentración de cáscara de plátano de 3 %, de inóculo de  $10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Izquierda, - Actividad relativa de celulasas inmovilizadas en NPMQ, después de repetidos ciclos de aplicación en reacción con carboximetilcelulosa, como sustrato; Medio, - Liberación de glucosa a partir de fibra de pencas de *Agave atrovirens*, en presencia de celulasas libre (●) e inmovilizadas (■) en NPMQ; Derecha, - Actividad relativa en la hidrólisis de la fibra de pencas de *Agave atrovirens* durante reuso de preparado inmovilizado.

Las nanopartículas magnéticas aplicadas en el ensayo de inmovilización de celulasas eran de un diámetro promedio de 8.49 nm y de 10.02 nm, antes y después de la inmovilización del complejo celulolítico. Se inmovilizó un 67 % de proteína. La enzima inmovilizada retuvo alrededor del 37 % de la actividad inicial, mostró una mayor tolerancia a pH, estabilidad térmica y de almacenamiento que la enzima libre. Sin embargo, el valor de  $K_m$  se incrementó de 0.7  $\mu\text{M}$  a 5.3  $\mu\text{M}$ , lo que significa que la afinidad de la enzima a sustrato (carboximetilcelulosa) es menor en el caso de enzima inmovilizada; esto, probablemente, se debe al cambio de conformación de la enzima, provocado por la inmovilización en NPMQ (5).

El preparado inmovilizado retuvo hasta el 80 % de su actividad, durante 15 ciclos de hidrólisis de carboximetilcelulosa (figura 3, izquierda). Lo anterior demuestra que la unión de la celulasa al nanosoporte es fuerte y permite utilizarla en operaciones de reciclaje, hasta por 15 ciclos, sin tener una pérdida considerable de actividad catalítica (figura 3, izquierda). Los catalizadores nanoestructurados mostraron capacidad para la hidrólisis de celulosa presente en biomasa lignocelulósica de agave (figura 3, medio). La hidrólisis de biomasa de pencas de *Agave atrovirens*, con el preparado inmovilizado, mostró rendimientos cercanos al obtenido con la enzima libre; además, se demostró la posibilidad de reutilizar la enzima inmovilizada hasta por 4 ciclos (figura 3, derecha).

## CONCLUSIONES

Los biocatalizadores (hongo y enzimas) fueron inmovilizados en NPMQ. Los catalizadores nanoestructurados inmovilizados mostraron capacidad para la producción de celulasas e hidrólisis de celulosa. La principal ventaja es la fácil separación del nanocompuesto, con un campo magnético externo que permite el reuso de biocatalizadores en procesos biotecnológicos, lo que podría reducir el costo del proceso y abrir potencial para una posible aplicación en la generación de etanol celulósico. Los estudios posteriores deben enfocarse en la obtención de los materiales magnéticos nanoestructurados, con una mayor resistencia a las condiciones de procesos biotecnológicos, para lograr una aplicación más prolongada de estos en diferentes ciclos de procesos efectuados. Los parámetros a mejorar son: propiedades magnéticas y menor interacción con los componentes del medio con una mayor afinidad a los biocatalizadores.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT: proyecto PDCPN 2013-01-213844, Cátedras CONACYT No. 729 y becas de postgrado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez-Ramírez, J.; Iliná A.; Segura-Ceniceros, E.P.; Aguilar, C.N.; Medina-Morales, M.A.; & Martínez-Hernández, J.L. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 67:2, 915. 2014.
2. Sánchez-Ramírez, J.; Martínez-Hernández, J.L.; Segura-Ceniceros, E. P.; Contreras- Esquivel, J. C.; Medina-Morales, M. A.; Aguilar, C. N.; & Iliná, A. Quimica Nova, 37: 3, 504. 2014.
3. Osuna, Y.; Gregorio-Jauregui, K. M.; Gaona, L. G.; De la Garza, R. I. M.; Iliná, A.; Barriga, C. E. D.; Saade, H.; & Lopez, R. G. (2012). Journal of Nanomaterials, Article ID 327562. 2012.
4. Wi ,S.G., Cho, E.J.;Lee, D-S.; Lee, S.J.; Lee, Y.J.; Bae, H-J. Biotechnology for Biofuels, 8:1. 2015.
5. Mao, X.; Guo, G.; Huang, J.; Du, Z.; Huang, Z.; Ma, L.; Li ,P.; & Gu, L. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81: 189. 2006.