

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Producción de Azúcares Reductores a partir de Celulosa  
Inmovilizada en  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$**

**Andrea Belén Mora Rodríguez**

**Ingeniería Química**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero Químico

Quito, 04 de mayo de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Producción de Azúcares Reductores a partir de Celulosa Inmovilizada en  
 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$**

**Andrea Belén Mora Rodríguez**

**Nombre del profesor, Título académico**

**José Mora, PhD, José Álvarez, PhD**

Quito, 04 de mayo de 2020

## **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Andrea Belén Mora Rodríguez

Código: 00131695

Cédula de identidad: 1718614314

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

Se estudió la inmovilización por afinidad de celulasa sobre micropartículas magnéticas (MPM) con el fin de establecer un método en el que la enzima pueda ser reutilizada en la hidrólisis y así reducir los costos de producción de azúcares reductores. El calcio fue utilizado como ligando entre el soporte sólido y la celulasa, debido a que participa como co-factor en la actividad enzimática. Por lo que, se prepararon tres tipos de soportes magnéticos con diferentes formulaciones, que fueron micropartículas de magnetita, magnetita-Ca 4.5-1 y magnetita-Ca 4.5-2, se inmovilizó la celulasa en solución a 500, 700 y 900 ppm en cada tipo de superficie con Buffer a pH 6 por 3 horas a 30°C; y se realizó la hidrólisis de celulosa catalizada por enzima libre e inmovilizada en solución a 700 ppm con Buffer a pH 5 por un periodo de 1, 2, 3 y 72 horas a 40°C. Las propiedades magnéticas de los tres soportes permitieron una óptima separación de la enzima inmovilizada del medio mediante la presencia de un campo magnético externo. Por otro lado, las micropartículas de magnetita-Ca 4.5-1, inmovilizaron 108 mg celulasa/g MPM, siendo el soporte con el que se logró mayor adsorción de enzima en su superficie. No obstante, no se presenció actividad enzimática con la celulasa inmovilizada en el soporte de magnetita y magnetita-Ca; mientras que con la celulasa libre se hidrolizó apenas el 50% de celulosa en un periodo de 72 horas, lo que probablemente significa que la enzima previa a la inmovilización se encontraba parcialmente desnaturalizada y, en consecuencia, no fue posible obtener azúcares reductores después de la hidrólisis.

**Palabras clave:** Inmovilización por afinidad, celulasa, magnetita, calcio, ligando, co-factor, hidrólisis, celulosa.

## ABSTRACT

Cellulase immobilization on magnetic microparticles, via metal affinity immobilization, was studied in order to establish a method to reuse the enzyme in hydrolysis, and thus decrease the production costs of reducing sugars. Calcium was selected as ligand between the solid support and cellulase, because it participates as co-factor in enzymatic activity. Therefore, three different formulations of magnetic supports were prepared, which corresponded to magnetite, magnetite-Ca 4.5-1, and magnetite-Ca 4.5-2 microparticles. Then, cellulase in solution (500, 700 and 900 ppm), was immobilized on each type of surface with buffer at pH 6 for 3 hours at 30°C; and the cellulose hydrolysis catalyzed by free and immobilized enzyme in solution (700 ppm), was carried out with buffer at pH 5 for a period of 1, 2, 3 and 72 hours at 40°C. Magnetic properties of the three supports allowed an optimal separation of the immobilized enzyme from the medium through the presence of an external magnetic field. On the other hand, the magnetite-Ca 4.5-1 microparticles immobilized 108 mg cellulase/ g MPM, and comparing with the two mentioned supports, it was the one that adsorbed the greatest amount of enzyme. However, no enzymatic activity was observed with the cellulase immobilized on the magnetite and magnetite-Ca support; while with free cellulase only 50% cellulose was hydrolyzed in 72 hours of reaction, which probably means that the enzyme prior to immobilization, was partially denatures, and consequently, it was not possible to obtain reducing sugars after hydrolysis.

**Keywords:** Metal affinity immobilization, cellulase, magnetite, calcium, ligand, co-factor, hydrolysis, cellulose.

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	9
2.	METODOLOGÍA .....	12
2.1.	Preparación de partículas magnéticas en presencia y ausencia de calcio .....	12
2.1.1.	Análisis morfológico de las partículas magnéticas.....	13
2.2.	Inmovilización de celulasa en partículas magnéticas .....	13
2.2.1.	Análisis de proteínas.....	13
2.3.	Hidrólisis celulosa para determinar la actividad de celulasa libre e inmovilizada ..	15
2.3.1.	Determinación de cantidad de azúcares reductores producidos.....	15
2.3.2.	Rendimiento teórico de la celulosa.....	16
2.4.	Análisis estadístico.....	16
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
3.1.	Análisis morfológico de las partículas magnéticas .....	17
3.2.	Inmovilización enzimática .....	18
3.3.	Hidrólisis enzimática .....	21
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	23
5.	REFERENCIAS.....	25
ANEXO A: Curva de calibración de absorbancia medida en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm, con respecto a la concentración de celulasa disuelta en agua. ..28		
ANEXO B: Curva de calibración de absorbancia medida en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm, con respecto a la concentración de celulasa disuelta en Buffer Fosfato de Sodio Dibásico 30 mM a pH 6. ....29		
ANEXO C: Curva de calibración de la absorbancia medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480.6 nm, con respecto a la concentración de glucosa.....30		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proporciones molares entre hierro-calcio. ....	13
<b>Tabla 2.</b> Hidrólisis con celulasa libre e inmovilizada a 40 °C con pH 5 y a una concentración de 700 ppm.....	22

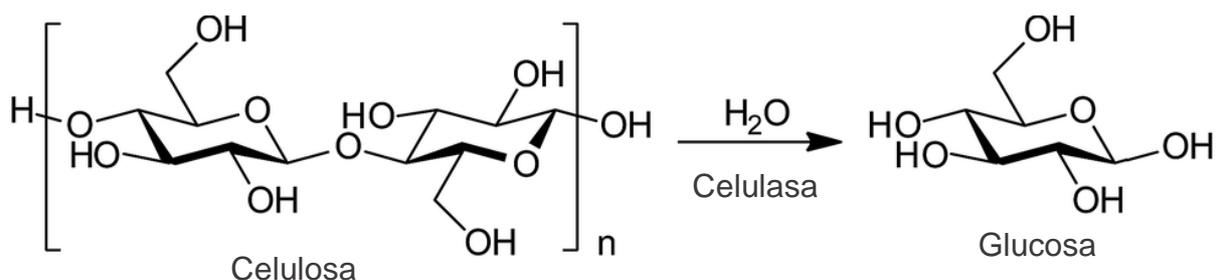
## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hidrólisis de celulosa en presencia del biocatalizador celulasa. ....	10
<b>Figura 2.</b> Micrografías electrónicas de micropartículas magnéticas en presencia y ausencia de calcio (a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; (b) Fe-Ca 4.5-1 y (c) Fe-Ca 4.5-2. Ampliación: 200X. Barra de calibración: 100 µm. ....	17
<b>Figura 3.</b> Propiedades magnéticas de las micropartículas en medio acuoso (a) Micropartículas suspendidas libremente y (b) Micropartículas en presencia de campo magnético, señaladas por la flecha roja.....	18
<b>Figura 4.</b> Cantidad de celulasa inmovilizada, representada como mg de enzima por masa de micropartículas (MPM), en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el sustrato y concentraciones de enzima en solución. ....	19
<b>Figura 5.</b> Eficiencia de la inmovilización de celulasa en los tres soportes magnéticos con respecto a las tres concentraciones de celulasa en solución. ....	20

## 1. INTRODUCCIÓN

La celulosa es el carbohidrato más abundante en la biomasa vegetal y es el componente estructural principal de las plantas superiores; por ejemplo, en el caso del algodón viene a conformar el 90% de su estructura o en la madera que lo conforma en un 50% (Yukanis, 2007). Este componente es un polisacárido formado por cadenas no ramificadas de moléculas de D-glucosa que se encuentran unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4' (Ansell & Mwaikambo, 2009). La posible degradación de esta estructura, genera la producción de azúcares reductores, que han sido muy utilizados industrialmente, ya que tienen una amplia aplicación en varios bio-procesos tales como el aumento de azúcares asimilables de los forrajes, los cuales permiten mejorar la digestión del ganado (Ferrer et al., 2011); también son la fuente principal en los procesos de fermentación, por ejemplo, para la obtención de etanol y otros metabolitos (Abbaszadeh & Hejazi, 2019). Por otro lado, se los puede convertir en sorbitol, el cual funciona como edulcorante y es recomendado para pacientes con diabetes, puesto que no necesitan insulina para metabolizar este polialcohol (Fernández, 2005).

La separación de las moléculas de glucosa se logra mediante la reacción de hidrólisis, en donde se coloca la celulosa en presencia de agua, y con la ayuda de un bio-catalizador específico, es posible romper los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4'. En esta reacción, el hidrógeno de la molécula de agua se une al oxígeno de la glucosa enlazado al carbono anomérico que está en posición ecuatorial, mientras que el grupo hidroxilo se une al carbono 4 de la glucosa (Yukanis, 2007), permitiendo la separación del polisacárido; esto se puede ver en la Figura 1. El biocatalizador usado por excelencia es la enzima celulasa, la cual es una proteína que interactúa con la celulosa mediante su sitio activo, que es la zona en donde el sustrato se une a la enzima para que pueda ser catalizado (Hamid et al., 2015).



**Figura 1.** Hidrólisis de celulosa en presencia del biocatalizador celulasa.

A pesar de que la celulasa libre es comúnmente utilizada en la obtención de azúcares reductores, por el hecho de que la reacción se la realiza en fase líquida, tanto los productos finales como la celulasa se van a encontrar disueltos en el medio, y debido a que la enzima libre tiende a ser inestable ante manipulaciones físicas o químicas, su proceso de purificación es muy complejo; entonces al resultar difícil recuperarla, se opta por descartarla, lo cual hace que este proceso sea costoso (Khoshnevisan et al., 2019). Tomando en cuenta lo mencionado, a lo largo del tiempo se han desarrollado distintas técnicas de inmovilización de enzimas que han permitido mejorar sus características, como el aumento de la estabilidad enzimática con respecto al pH y la temperatura (Guzik et al., 2014). Se ha conseguido mayor facilidad al momento de separar las enzimas del medio, por ende, también los costos de purificación del sustrato disminuyen al evitar que las enzimas queden disueltas en la solución y es posible su reutilización (Spahn & Minteer, 2008).

La adsorción física es un tipo de inmovilización simple, que corresponde a la unión de la enzima con un soporte inerte orgánico o inorgánico, pero por ser inerte se generan fuerzas débiles y a cualquier cambio de pH, fuerza iónica o temperatura, la celulasa se tiende a liberar fácilmente; por lo tanto, es una estrategia que se utiliza normalmente en pruebas de concepto (Chakraborty & Hashmi, 2017). Otro tipo de inmovilización de celulasa que es comúnmente utilizada a nivel industrial es el entrecruzamiento, en este se genera la agregación física de moléculas de celulasa en estructuras intermoleculares mediante la implementación de reactivos

bifuncionales, los cuales se unen con los aminoácidos que componen la enzima por el hecho de ser moléculas que tienen como mínimo dos extremos reactivos; estos agentes bifuncionales se clasifican de acuerdo a los reactivos que se encuentren en sus extremos y corresponden a homobifuncionales y heterobifuncionales (Reis et al., 2019). La partícula de soporte en este tipo de inmovilización puede ser a sí misma, a otro material o a otra enzima; sin embargo, el problema es que tiende a disminuir significativamente su actividad relativa (Minteer, 2016). Por otro lado, la inmovilización de celulasa por afinidad es un tipo de inmovilización poco explorado; esta técnica corresponde a la participación de los cationes Fe(II) y (III), Cu (II), Ni (II), Co (II) y (III), Zn (II), Ca (II) y Al (III), que son quelados por grupos aminas y carboxilos en el soporte y luego se unen a la enzima (Abbaszadeh & Hejazi, 2019).

La inmovilización de enzimas por afinidad es un método adecuado para la inmovilización de celulasa, por el hecho de que los iones metálicos presentan ciertas ventajas como, una alta estabilidad química y física, alta capacidad de adsorción y costos bajos (Abbaszadeh & Hejazi, 2019). Un material que ha sido de interés en esta área es la magnetita, la cual contiene los iones Fe (II) y (III), que tiene propiedades magnéticas y, además de ser afines con la enzima, sirven como un soporte sólido para una buena distribución de la celulasa en la superficie de las partículas y sus propiedades magnéticas permiten la fácil separación del medio, mediante un campo magnético externo (Simon et al., 2018), por lo que la enzima puede ser recuperada y reutilizada en repetidos ciclos para la hidrólisis de celulosa. Por otro lado, el Ca (II) es un ion metálico que también es afín con la celulasa y al mismo tiempo es conocido como un estimulador de enzimas extracelulares, es decir que permite aumentar la actividad enzimática, actuando como co-factor, creando un enlace entre la celulasa y la celulosa (Gomaa, 2012).

En este sentido, el presente trabajo está enfocado en la inmovilización de celulasa en una superficie sólida de magnetita-Ca, la cual es preparada mediante el método de

co-precipitación de las sales de hierro y calcio. Dicha celulosa inmovilizada será utilizada para la hidrólisis de celulosa y se realizará una estandarización de las condiciones necesarias para realizar la reacción.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Preparación de partículas magnéticas en presencia y ausencia de calcio

Las partículas magnéticas se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por Carrera (2020), en donde se prepararon tres relaciones molares distintas con respecto al hierro-calcio. Primero, se dejó burbujear gas nitrógeno en agua destilada durante 30 minutos, de la cual se tomaron 100 mL y se mezclaron con 4.32 g (0.160 M) de cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) y 2.08 g (0.075 M) de sulfato de hierro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) durante 4 horas. Se agregó 1.39 g (0.059 M) de nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y se dejó agitar durante 1.5 horas. Se preparó una solución de 0.30 g/mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), se le agregó a la mezcla hasta llegar a un pH cercano a 10 (aproximadamente 12 mL) y se dejó agitar durante 1 hora. El precipitado se filtró y se lavó una vez con agua destilada nitrogenada y se secó inmediatamente por 3 horas a 150 °C. Finalmente se calcinó la muestra a 550 °C por 6 horas, se realizaron dos lavados más con agua destilada nitrogenada y se secó nuevamente por 45 minutos a 90 °C.

Las concentraciones molares de los reactivos iniciales del precipitado variaron dependiendo de la relación molar de hierro-calcio que se quiso preparar, tal como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Proporciones molares entre hierro-calcio.*

<b>Fe-Ca</b>	<b>FeSO<sub>4</sub> [M]</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> [M]</b>	<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [M]</b>	<b>Total [M]</b>
1-0	0.094	0.200	0.000	0.294
4.5-1	0.075	0.160	0.059	0.294
4.5-2	0.066	0.140	0.088	0.294

### **2.1.1. Análisis morfológico de las partículas magnéticas.**

Los tres tipos de partículas magnéticas fueron observados por un microscopio electrónico de barrido (SEM). Primero se colocó una mínima porción de cada tipo de partículas sobre cintas de carbono y éstas fueron ingresadas al microscopio. En seguida, las micrografías se visualizaron mediante el monitor del microscopio y se realizó una ampliación de 200X con una barra de calibración de 100  $\mu\text{m}$ .

### **2.2. Inmovilización de celulasa en partículas magnéticas**

La inmovilización de celulasa se hizo de acuerdo con la metodología descrita por Abbaszadeh & Hejazi (2019). En primer lugar, se agregaron 10.8 mg de partículas magnéticas junto con 10 mL de buffer fosfato de sodio dibásico 30 Mm, pH 6, y con 2 mL de tres diferentes concentraciones de solución de celulasa (500, 700 y 900 ppm). Se agitó lentamente a 50 rpm, durante 3 horas a 30 °C y se extrajo el primer sobrenadante. Luego, se realizaron dos lavados con agua destilada y, de igual forma, se extrajeron los dos sobrenadantes restantes; los cuales fueron usados la cuantificación de proteínas.

#### **2.2.1. Análisis de proteínas.**

La cantidad de celulasa inmovilizada por partículas magnéticas se calculó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Inicialmente, en microplacas de 96 pocillos se agregaron 30  $\mu\text{L}$

de cada sobrenadante con 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford; para cada muestra se utilizaron 4 pocillos. Después, se incubó durante 20 minutos y se midió la absorbancia en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. Para esto, previamente se realizó una curva de calibración con celulasa, con la que se determinó la ecuación de la recta y se transformó la absorbancia medida para cada sobrenadante, a términos de concentración (mg/mL).

Para determinar la eficiencia de inmovilización y la cantidad de celulasa inmovilizada, primero se promediaron las cuatro concentraciones que se midieron en el lector de ELISA, para cada sobrenadante y se prosiguió a aplicar la siguiente fórmula:

$$E_{SD} = C_{SD1}V_{SD1} + C_{SD2}V_{SD2} + C_{SD3}V_{SD3} \quad (1)$$

En donde,

$E_{SD}$ : Enzima libre en los tres sobrenadantes (mg).

$C_{SD1}$ : Concentración de enzima libre en el sobrenadante 1 (mg/mL).

$V_{SD1}$ : Volumen del sobrenadante 1 (mL).

$C_{SD2}$ : Concentración de enzima libre en el sobrenadante 2 (mg/mL).

$V_{SD2}$ : Volumen del sobrenadante 2 (mL).

$C_{SD3}$ : Concentración de enzima libre en el sobrenadante 3 (mg/mL).

$V_{SD3}$ : Volumen del sobrenadante 3 (mL).

Posterior a esto, se determinó la eficiencia de inmovilización mediante la siguiente fórmula:

$$\eta_I = \frac{(C_{E0}V_{E0}) - E_{SD}}{C_{E0}V_{E0}} \times 100 \quad (2)$$

En donde,

$\eta_I$ : Eficiencia de inmovilización de celulasa (%).

$C_{Eo}$ : Concentración inicial de celulasa (mg/mL).

$V_{Eo}$ : Volumen inicial de celulasa (mL).

Finalmente, se determinó la cantidad de celulasa inmovilizada en la superficie de los soportes, mediante la siguiente ecuación:

$$Q_I = \frac{(C_{Eo}V_{Eo}) - E_{SD}}{m_{MPM}} \quad (3)$$

En donde:

$Q_I$ : Cantidad de celulasa inmovilizada (mg celulasa/ g MPM).

$m_{MPM}$ : masa de micropartículas magnéticas para la inmovilización (g).

### 2.3. Hidrólisis celulosa para determinar la actividad de celulasa libre e inmovilizada

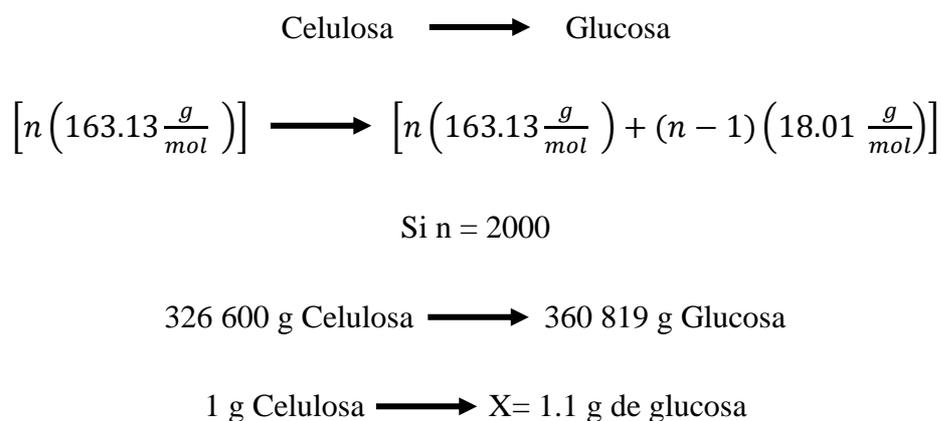
La actividad enzimática se midió en base a la cantidad de azúcares reductores obtenidos al final de la hidrólisis, mediante el método descrito por Miller (1959). Se agregó 1 mL de solución de celulasa al 1% (p/v), 1 mL de enzima libre o inmovilizada (con la mejor concentración que se obtuvo en la inmovilización), y 1 mL de buffer Fosfato de Sodio Dibásico 30mM a pH 5. Se incubó a 40 °C por 1, 2, 3 y 72 h con agitación leve y constante.

#### 2.3.1. Determinación de cantidad de azúcares reductores producidos.

La cantidad de azúcares reductores se midió agregando 1 mL de muestra después de la hidrólisis con 1 mL de ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) en un tubo de ensayo, al cual se lo colocó en baño maría con agua hirviendo por 5 minutos. Después, se diluyó 100  $\mu$ L de la muestra en 3 mL de agua destilada y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480.6 nm. Para esto, también se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de glucosa como patrón (ANEXO C).

### 2.3.2. Rendimiento teórico de la celulosa.

La cantidad de azúcares reductores que se deberían obtener de la celulosa después de la reacción de hidrólisis se determinaron de manera teórica, mediante su estequiometría. El peso molecular de la celulosa es  $n(163.13 \text{ g/mol})$ , debido a que no se conoce exactamente la cantidad de moléculas que tiene la cadena polimérica, se asumieron diferentes valores de “n” para determinar un valor aproximado de su rendimiento; se empezó con un valor de 2000 y se determinó que se puede obtener 1.1 g de glucosa por cada gramo de celulosa utilizado (Esquema 1). En este sentido, si  $n < 2000$ , entonces la cantidad de glucosa se acercará a la cantidad de celulosa utilizada, y para valores muy grandes de n se tiene que considerar que la cantidad de glucosa aumenta ligeramente con la cantidad de moléculas de agua consumidas en el proceso.



**Esquema 1.** Determinación de la cantidad teórica de glucosa.

### 2.4. Análisis estadístico

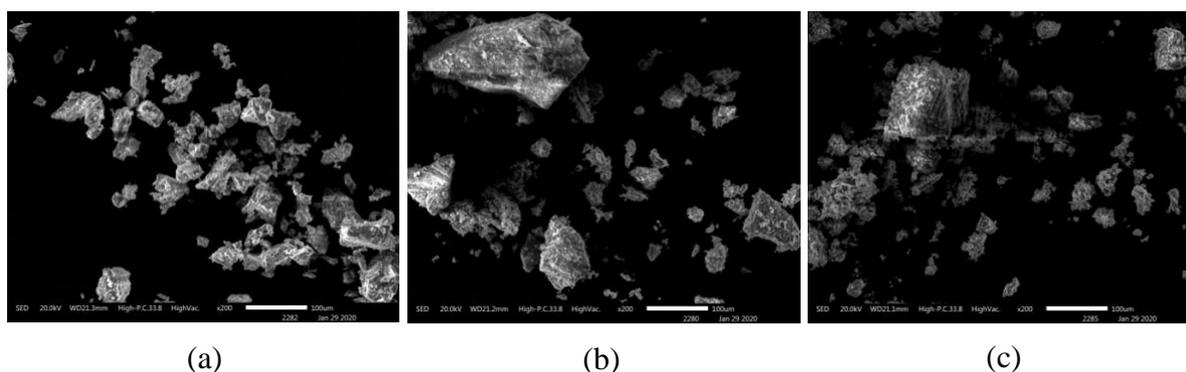
Todos los experimentos se hicieron por triplicado ( $n=3$ ), y los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Efectos y diferencias significativas se determinaron a través de un análisis de varianza, ANOVA, junto con la prueba de comparación de pares por Tukey, con 95% de confianza.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, se prepararon partículas magnéticas en presencia y ausencia de calcio, sobre los cuales se realizó la inmovilización de celulosa y, de esta manera, poder seleccionar un potencial protocolo para su futura implementación en la reacción de hidrólisis de celulosa.

#### 3.1. Análisis morfológico de las partículas magnéticas

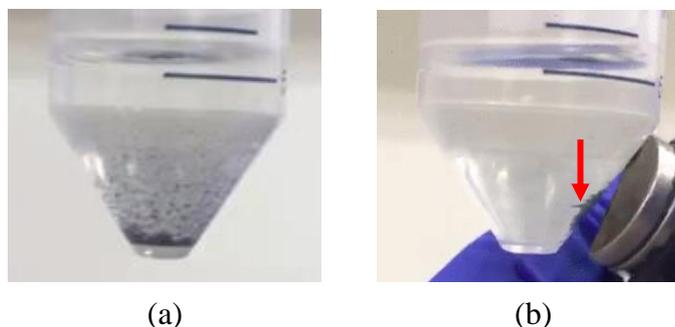
Los tres soportes de magnetita hechos con diferentes proporciones de Fe-Ca que fueron observados mediante SEM, se muestran en la Figura 2. A pesar de que el tamaño de las partículas varía según su composición, se puede visualizar que los tres tipos de partículas se encuentran por debajo de  $100\ \mu\text{m}$ , lo que quiere decir que los soportes de inmovilización pueden ser catalogados como micropartículas.



**Figura 2.** Micrografías electrónicas de micropartículas magnéticas en presencia y ausencia de calcio (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; (b) Fe-Ca 4.5-1 y (c) Fe-Ca 4.5-2. Ampliación: 200X. Barra de calibración:  $100\ \mu\text{m}$ .

Las partículas de magnetita pura tienen un tamaño más uniforme a comparación de aquellas en presencia de calcio, lo cual significa que el calcio tiene efecto sobre la formación de estas, probablemente haciendo que algunas partículas se aglomeren entre sí para formar una más grande. Otra observación que se pudo notar en la morfología de las partículas es que las micropartículas de magnetita pura tienen una superficie más lisa, mientras que cada vez que

aumenta la concentración de calcio, la superficie se torna aparentemente porosa, tal como se puede observar en la Figura 2 (c).



**Figura 3.** Propiedades magnéticas de las micropartículas en medio acuoso

(a) Micropartículas suspendidas libremente y (b) Micropartículas en presencia de campo magnético, señaladas por la flecha roja.

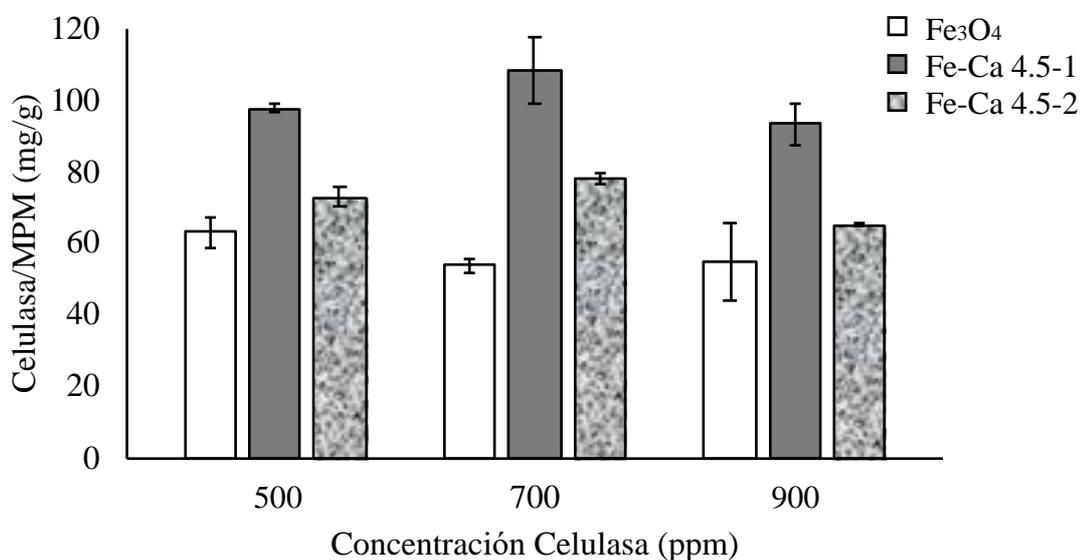
Por otro lado, las propiedades magnéticas de los tres soportes no se vieron afectadas por estar dentro de un medio acuoso. En la Figura 3 se puede observar que las micropartículas que se encontraban dispersas en el buffer respondieron efectivamente a la presencia del campo magnético externo. Por lo cual, se consiguió optimizar el método de separación de la celulasa inmovilizada del medio.

### 3.2. Inmovilización enzimática

La inmovilización de celulasa se realizó en los tres diferentes soportes magnéticos y para poder determinar la cantidad máxima de enzima que las partículas magnéticas pueden adherir hacia su superficie, se prepararon tres concentraciones de celulasa que fueron 500, 700 y 900 ppm. La concentración de celulasa después de la inmovilización se determinó mediante una curva de calibración que se encuentra en el ANEXO A y B.

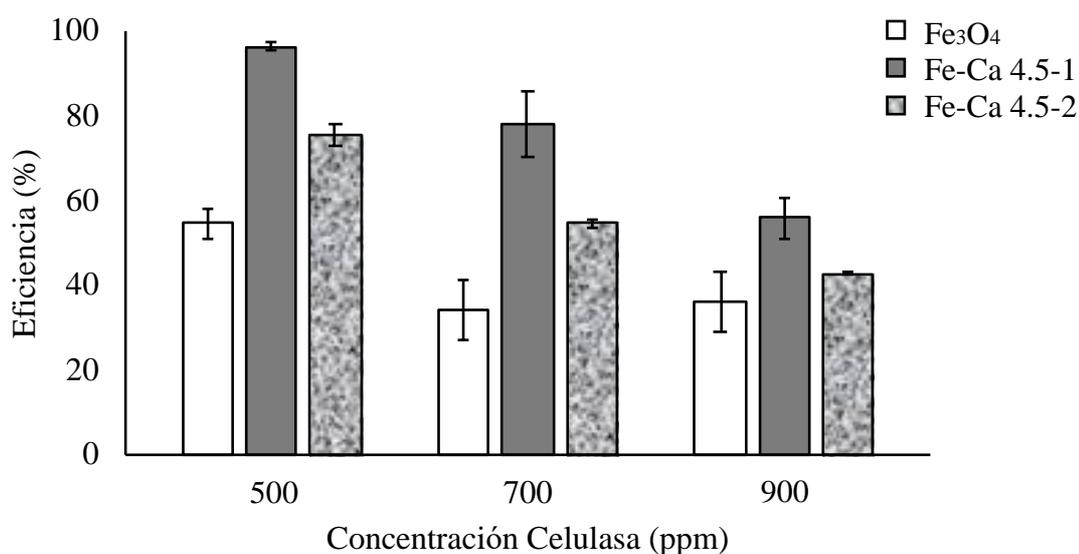
En la Figura 4 se tiene la cantidad de celulasa inmovilizada por micropartículas magnéticas (MPM) en función de las tres concentraciones de celulasa que se prepararon. En

este caso, fue posible comparar la participación del calcio y su efecto como ligando entre la enzima y las partículas magnéticas, en donde se puede notar un incremento en la inmovilización enzimática cuando la magnetita se encuentra en presencia de calcio. Sin embargo, al existir un exceso de calcio en la composición de las partículas, la inmovilización de celulasa va decreciendo, lo cual significa que se convierte en un inhibidor para la adsorción de la enzima; es por esto, que se puede decir que hay una tendencia a existir un óptimo de concentración inicial de la enzima. A partir del análisis estadístico realizado en ANOVA y Tukey, no existieron diferencias estadísticas significativas en las diferentes concentraciones de celulasa; mientras que, entre los tres tipos de soporte si se evidenciaron diferencias estadísticas significativas, siendo las micropartículas de Fe-Ca con relación 4.5-1, las que mayor cantidad de enzima inmovilizaron.



**Figura 4.** Cantidad de celulasa inmovilizada, representada como mg de enzima por masa de micropartículas (MPM), en presencia de diferentes concentraciones de calcio en el sustrato y concentraciones de enzima en solución.

Por otro lado, en la Figura 5 se presenta la eficiencia de inmovilización enzimática en los tres tipos de micropartículas en función de las tres concentraciones de celulasa preparadas. Se puede observar que en el caso de las partículas de Fe-Ca 4.5-1, se consiguió adherir a su superficie casi el 100% de la celulasa, cuando la concentración de la misma fue de 500 ppm; sin embargo, conforme aumentaba la concentración enzimática, la eficiencia disminuía; es decir, que la cantidad máxima que las micropartículas pudieron inmovilizar fue alrededor de 1 mg de celulasa. En este caso, tanto para las concentraciones de celulasa, como para los tres soportes magnéticos, existieron diferencias estadísticas significativas; siendo la concentración de 500 ppm de celulasa con la que se logró obtener un máximo de inmovilización, y la de 900 ppm con la que obtuvo una concentración mínima de inmovilización.



**Figura 5.** Eficiencia de la inmovilización de celulasa en los tres soportes magnéticos con respecto a las tres concentraciones de celulasa en solución.

En comparación a los resultados obtenidos, en la investigación realizada por Abbaszadeh y Hejazi (2019), el soporte para la inmovilización de celulasa (C) consistió en nanopartículas de magnetita (MNP) usando el cobre (Cu) como ligando; en donde lograron

inmovilizar 107 mg C/g MNP de una solución de celulasa de 700 ppm sobre la superficie del soporte de magnetita y cobre con relación molar 1-2. Mientras que, en este caso, se inmovilizó una cantidad muy similar a la mencionada, sobre la superficie de las micropartículas de FeCa con relación molar 4.5-1 de una solución de celulasa de 700 ppm. Lo que significa que el calcio resultó ser un buen ligando entre la enzima y el soporte magnético, ya que al tratarse de partículas de tamaño micro, es decir que van a tener menor área superficial que las partículas a nanoescala (Simon et al., 2018), se consiguió una eficiencia similar.

### **3.3. Hidrólisis enzimática**

Se realizó la reacción de hidrólisis de celulosa catalizada por celulasa libre e inmovilizada para poder determinar si la actividad relativa de la enzima adherida en los soportes magnéticos es eficiente; y también para poder evaluar el efecto que tiene el calcio sobre la actividad de celulasa; es decir, si este participa como un cofactor, inhibidor o no altera su función catalítica. Los soportes, en donde se inmovilizó la enzima, que se consideraron relevantes para comparar la catálisis de la hidrólisis de celulosa fueron las micropartículas de magnetita y las micropartículas de magnetita con calcio en relación 4.5-1, ya que fue el soporte con el que se consiguió adherir mayor cantidad de celulasa.

En la Tabla 2, se puede observar que la cantidad de azúcares que se produjeron a las 72 horas de reacción fue de 1,59 mg/ml. Por otro lado, en el caso de la enzima inmovilizada sobre los soportes de magnetita en presencia y ausencia de calcio, no fue posible observar actividad enzimática debido a que la producción de azúcares no fue detectable, incluso en el periodo de 72 horas de reacción.

**Tabla 2**

*Hidrólisis con celulasa libre e inmovilizada a 40 °C con pH 5 y a una concentración de 700 ppm.*

Tipo de soporte	Concentración Azúcares [mg/ml]			
	1 h	2 h	3 h	72 h
Enzima Libre	0,116	0,222	0,303	1,59
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0	0	0	0
FeCa 4.5-1	0	0	0	0

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la Tabla 2, se creería que el soporte de magnetita estaba inhibiendo la actividad enzimática; no obstante, en una investigación previa se inmovilizó celulasa en nanopartículas de magnetita pura y se evidenció actividad enzimática significativa (Abraham et al., 2014), infiriendo que los componentes de las partículas magnéticas no le afectan a la enzima.

Asimismo, en la investigación de Abbaszadeh y Hejazi (2019) se demostró que la enzima inmovilizada en magnetita con cobre también presenta actividad enzimática. Se especuló que el soporte magnético realizado en esta investigación necesitaba la presencia de un cofactor para estimular a la enzima, pero que tal vez el que se estaba usando, es decir el calcio, no era el adecuado y estaba inhibiéndola. Por lo cual, se hicieron ensayos adicionales, en donde las micropartículas de magnetita pura se las cargó también con cobre, se inmovilizó la celulasa y se realizó la reacción de hidrólisis por 72 horas; sin embargo, la concentración de azúcares al final de la reacción también fue de 0 mg/ml. Lo que significa que el calcio no era el componente que estaba inhibiendo a la enzima. Cabe mencionar que, en un estudio realizado

anteriormente, la celulasa fue inmovilizada en alginato de calcio y se consiguió aumentar la actividad enzimática con respecto a la enzima libre; además también midieron la actividad enzimática de la celulasa inmovilizada en presencia de metales iónicos y se determinó que el calcio participa como un co-factor (Imran et al., 2018).

Finalmente, se analizó la cantidad de azúcares reductores obtenidos en el tiempo de 72 horas de la hidrólisis de celulosa catalizada por celulasa libre. Para esto, primero fue importante conocer el rendimiento teórico de la celulosa al momento de ser hidrolizada, para determinar la cantidad máxima de productos que se esperarían obtener de la reacción. Se plantearon distintos valores para “n”, se reemplazaron en las ecuaciones y de acuerdo a lo establecido en el Esquema 1, teóricamente se hidrolizaría el 100% de celulosa. Por lo tanto, de acuerdo con la cantidad de azúcares reductores que se presentan en la Tabla 2, después de 72 horas se logró hidrolizar alrededor del 50% de la celulosa. Esto quiere decir que la cantidad de azúcares reductores obtenida fue relativamente baja, ya que en investigaciones previas el tiempo óptimo de hidrólisis fue de 48 horas (Abraham et al., 2014; Ramos et al., 1993). Por estas razones, se puede deducir que, posiblemente, la enzima se encontraba parcialmente desnaturalizada y al inmovilizarla su configuración cuaternaria fue modificada significativamente, resultando en un alto grado de inhibición enzimática, evitando la unión del sustrato al sitio activo (Wagner et al., 1987).

#### **4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Las propiedades magnéticas de las micropartículas de magnetita en presencia y ausencia de calcio permitieron una factible separación del medio acuoso mediante un campo magnético externo. Además, se estableció que el mejor soporte de inmovilización fueron las micropartículas de magnetita en presencia de calcio con relación 4.5-1, con lo cual se determinó

que el calcio participa como ligando entre la enzima y el soporte magnético. Sin embargo, en la hidrólisis de celulosa no se pudo observar actividad enzimática con la celulasa inmovilizada, lo que probablemente conlleva a concluir que la enzima se encontraba parcialmente desnaturalizada antes de someterla a la inmovilización, ya que en la hidrólisis con la celulasa libre se obtuvo una baja concentración de azúcares reductores. Por lo tanto, para pruebas futuras se deberían realizar ensayos con una celulasa que presente una alta actividad enzimática. En este caso determinar una mejoría en la actividad enzimática luego de la inmovilización, se recomienda llevar a cabo estudios de cinética enzimática.

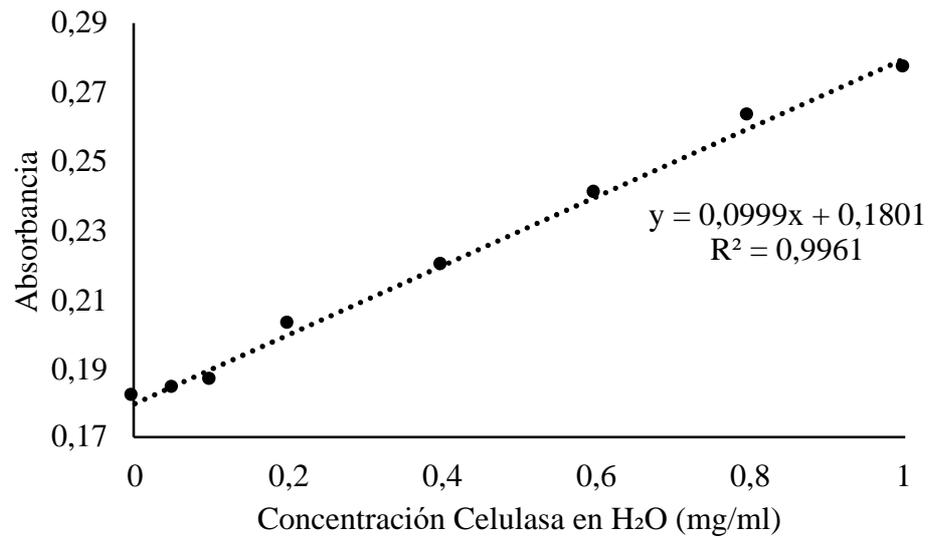
## 5. REFERENCIAS

- Abbaszadeh, M., & Hejazi, P. (2019). Metal affinity immobilization of cellulase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with copper as ligand for biocatalytic applications. *Food Chemistry*, 290(July 2018), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.117>
- Abraham, R. E., Verma, M. L., Barrow, C. J., & Puri, M. (2014). Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-90>
- Ansell, M. P., & Mwaikambo, L. Y. (2009). The structure of cotton and other plant fibres. In *Handbook of Textile Fibre Structure* (Vol. 2). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845697310.1.62>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chakraborty, M., & Hashmi, M. S. J. (2017). An Overview of Biosensors and Devices. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10316-9>
- Devlin, T. M. (2015). *Bioquímica : libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté.
- Fernández, J. (2005) Estructura y función de los hidratos de carbono: azúcares, almidón, glucógeno, celulosa. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Ferrer, M., León, M., Michelena, G., Dustet, J., Duque, A., Ibañez, M. & Tortoló, K. (2011) Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. La Habana: Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.

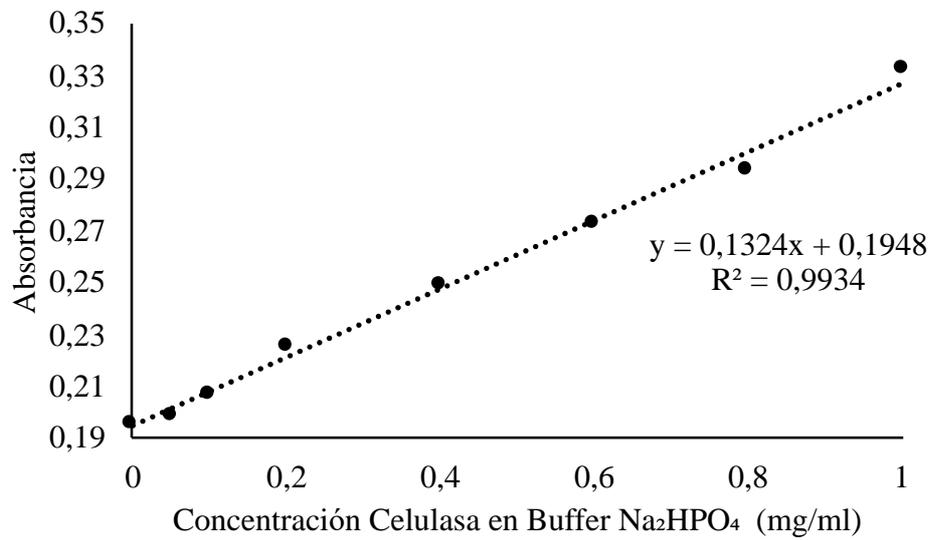
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *Journal of Microbiology*, *50*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. *Molecules*, *19*(7), 8995–9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
- Hamid, S. B. A., Islam, M. M., & Das, R. (2015). Cellulase biocatalysis: key influencing factors and mode of action. In *Cellulose* (Vol. 22, Issue 4, pp. 2157–2182). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0672-5>
- Imran, M., Hussain, A., Anwar, Z., Zeeshan, N., Yaseen, A., Akmal, M., & Idris, M. (2018). Immobilization of Fungal Cellulase on Calcium Alginate and Xerogel Matrix. *Waste and Biomass Valorization*, *11*(4), 1229–1237. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0443-2>
- Khoshnevisan, K., Poorakbar, E., Baharifar, H., & Barkhi, M. (2019). Recent Advances of Cellulase Immobilization onto Magnetic Nanoparticles: An Update Review. *Magnetochemistry*, *5*(2), 36. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5020036>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minteer, S. D. (2016). Cell-Free Biotechnologies. In *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00016-9>
- Pinos, C. (2020) Efecto de diferentes tratamientos químicos sobre la producción de azúcares reductores y etanol en la fermentación alcohólica de la cáscara de la mazorca del cacao. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

- Ramos, L. P., Breuil, C., & Saddler, J. N. (1993). The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90111-E](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90111-E)
- Reis, C. L. B., de Sousa, E. Y. A., de França Serpa, J., Oliveira, R. C., & Dos Santos, J. C. S. (2019). Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. In *Química Nova* (Vol. 42, Issue 7, pp. 768–783). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>
- Simon, P., Lima, J. S., Valério, A., De Oliveira, D., Araújo, P. H. H., Sayer, C., De Souza, A. A. U., & Guelli U De Souza, S. M. A. (2018). Cellulase immobilization on poly(methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *35*(2), 649–657. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160094>
- Spahn, C., & Minter, S. (2008). Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, *2*(3), 195–200. <https://doi.org/10.2174/187221208786306333>
- Wagner, R., Gonzales, D. H., Podesta, F. E., & Andreo, C. S. (1987). Changes in the quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. *European Journal of Biochemistry*, *164*(3), 661–666. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11177.x>
- Yukanis Bruice, P. (2007). *Fundamentos de Química Orgánica*. México: Pearson Education.

**ANEXO A: Curva de calibración de absorbancia medida en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm, con respecto a la concentración de celulasa disuelta en agua.**



**ANEXO B: Curva de calibración de absorbancia medida en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm, con respecto a la concentración de celulasa disuelta en Buffer Fosfato de Sodio Dibásico 30 mM a pH 6.**



**ANEXO C: Curva de calibración de la absorbancia medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480.6 nm, con respecto a la concentración de glucosa.**

