

INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN Y POR UNIÓN COVALENTE DE CELULASAS EN ZEOLITA

Martínez Rodríguez, G.A.¹, Rojas Contreras, J.A.¹, Zazueta Álvarez, D.E.¹, Vázquez Ortega, P.G.¹

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Durango. Departamento de
Ingenierías Química-Bioquímica.

22040319@itdurango.edu.mx

Biotecnología

Resumen

La β -glucosidasa, una enzima hidrolítica esencial para la conversión de celobiosa a glucosa tiene aplicaciones relevantes en la generación de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. No obstante, el uso de enzimas solubles presenta desafíos, principalmente debido a su falta de estabilidad. En consecuencia, se ha propuesto la inmovilización por adsorción y unión covalente en soportes porosos como la zeolita, estrategia que permite prevenir su desnaturalización y facilitar su reutilización. En la presente investigación se determinaron las condiciones ideales de inmovilización por adsorción y unión covalente en zeolita natural y sintética de la enzima β -glucosidasa. Para lograr esto, se aplicó un diseño estadístico Box-Behnken donde las variables independientes fueron el pH, fuerza iónica y cantidad de soporte, empleando como respuesta el rendimiento de inmovilización (%). Como resultado, la β -glucosidasa recombinante fue exitosamente inmovilizada en zeolita mediante los métodos de adsorción y unión covalente, logrando rendimientos cercanos al 100 %. La adsorción mostró una eficiencia y actividad de recuperación superiores, siendo el pH un factor crítico en ambos procesos. Se seleccionó la adsorción en zeolita sintética como el método óptimo de inmovilización.

Palabras clave: Inmovilización, β -glucosidasa, zeolita, adsorción, unión covalente

I. Introducción

Las enzimas son cada día más utilizadas como catalizadores en procesos industriales ya que presentan varias ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos. La β -glucosidasa una enzima utilizada para la hidrólisis de celulosa que convierte los dímeros de celobiosa a monómeros de glucosa por medio del ataque nucleofílico a los enlaces β -1,4. Forma parte de un sistema de celulasas encargadas de la degradación de polímeros más complejos como los materiales lignocelulósicos. Sin embargo, el uso de estas enzimas de forma libre trae consigo grandes desventajas, debido a su baja estabilidad en procesos industriales y los altos costos al no poder recuperarse. Es por ello, que se han desarrollado estrategias como la inmovilización para impedir su degradación, mejorar su actividad catalítica y reusabilidad. Para llevar a cabo el proceso de inmovilización se requiere de un soporte al cual la enzima se una por medio de



interacciones iónicas o uniones covalentes, estos métodos no generan cambios en la especificidad y favorecen la actividad enzimática.

II. Metodología

2.1 Materiales

2.1.1 Material biológico

- a) La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) fue obtenida del cepario de Biotecnología Microbiana-UPIDET.
- b) El coctel enzimático de celulasas C0615 se adquirió de Sigma-Aldrich de grado reactivo.

2.1.2 Material de prueba

- a) La zeolita sintética fue adquirida de Merck, también conocida como zeolita sintética A de estructura tipo LTA, contiene tamaños de poros uniformes de 0.3 nm y un tamaño de partícula de 0.1 mm.
- b) La zeolita natural fue obtenida de la región del Mezquital del estado de Durango y fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de los Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas-UJED, está compuesta en un 40% por Clinoptilolita de estructura tipo HEU, cuyos tamaños de poro van de 0.4–0.72 nm y tiene un tamaño de partícula de 0.1 mm.

2.2 Producción y caracterización de β -glucosidasa recombinante

2.2.1 Inducción de *E. coli* en medio mínimo (M9)

Una colonia aislada de células de *E. coli* BL21 (DE3) se depositó en 10 mL de medio M9 con kanamicina (1 μ L/mL). El medio se incubó en agitación a 37°C y 250 rpm durante 12 h. La inducción se inició con una DO₆₀₀ de 0.1 y se llevó a cabo la cinética de crecimiento a 250 rpm y 37°C. Seguido, se analizaron las muestras cada hora hasta obtener D.O.₆₀₀ igual a 0.5. Posterior a esto se indujo el microorganismo adicionando IPTG 1 mM. Durante el desarrollo de la cinética, se tomaron muestras cada 30 min por 4 h, las cuales se analizaron para determinar la concentración celular y para análisis por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.

2.2.2 Cuantificación de la concentración proteica y de la actividad enzimática

La concentración proteica se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad enzimática se determinó mediante el uso del sustrato sintético p-NPG.



2.3 Curso de inmovilización por adsorción de β -glucosidasa recombinante en zeolita sintética y natural

Para llevar a cabo la inmovilización por adsorción en zeolita natural y sintética se propuso un diseño estadístico de superficie de respuesta tipo Box Behnken, teniendo como factores experimentales el pH, la fuerza iónica y la cantidad de soporte.

2.4 Curso de inmovilización por unión covalente de β -glucosidasa recombinante en zeolita sintética y natural

El curso de inmovilización se realizó en base al método modificado de Talebi *et al.*, 2016. Las corridas de inmovilización tanto en zeolita sintética como natural se realizaron de acuerdo con el diseño estadístico Box Behnken.

III. Resultados y discusión

La producción de la enzima β -glucosidasa se realizó mediante la inducción con IPTG de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pITD-01 (Vázquez-Ortega *et al.*, 2022) que contiene el gen sintético de 1,434 pb que codifica para una β -glucosidasa recombinante de *Trichoderma reesei*. La proteína de 57 kDa cuenta con una etiqueta de 6 histidinas y 6 lisinas con fines de purificación e inmovilización respectivamente (Figura 1).

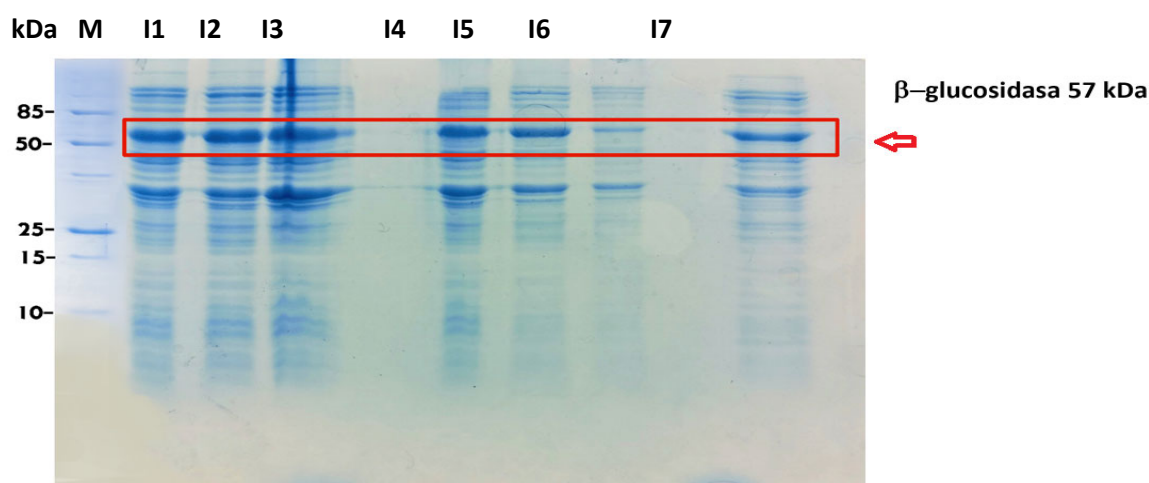


Figura 1. Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de β -glucosidasa en *E. coli* mediante inducción con IPTG. Carriles I1 a I7, muestras de proteínas de la fracción soluble obtenidas a partir de cultivos inducidos. M: Marcador de peso molecular.

Se logró obtener la enzima en la fracción soluble de la muestra, asimismo, se cuantificó la concentración proteica y se verificó la actividad enzimática. Los resultados de la actividad enzimática se muestran en la Tabla 1.



Tabla 1. Concentración proteica y actividad enzimática de β -glucosidasa en extracto crudo posterior a la lisis celular por ultrasonido.

Muestra	Concentración proteica (mg/mL)	Actividad enzimática (U/mL)
β -glucosidasa en extracto crudo	0.917 \pm 0.036	0.191 \pm 0.38

3.1 Optimización del proceso de inmovilización por adsorción

Los resultados de los parámetros de inmovilización por adsorción en zeolita natural se observan en la Tabla 2. En este proceso, el rendimiento de inmovilización varió del 75 – 99 %. En un trabajo previo reportado por Ramírez-Ramírez *et al.*, 2022 la β -glucosidasa, se inmovilizó en zeolita sintética obteniendo rendimientos de inmovilización del 86.97 % sumado a un incremento de actividad enzimática del 70 % con respecto a su actividad inicial. Pota y colaboradores, lograron un 80 % de rendimiento de inmovilización de β -glucosidasa en nanopartículas de SiO₂ al optimizar la relación de enzima y soporte (Pota *et al.*, 2023). No obstante, la inmovilización de la enzima experimentó cambios significativos que van desde el 3 al 110 % de eficiencia y la actividad recuperada osciló entre el 3 % y el 91 %. Los porcentajes bajos predominaron en todas las ejecuciones, indicando una pérdida de actividad enzimática conforme variaban las condiciones del proceso. Se observó que, a pesar de que el rendimiento de inmovilización fue óptimo a pH 6 y 7, la eficiencia de inmovilización y la actividad recuperada disminuyeron considerablemente.

Tabla 2. Parámetros de inmovilización por adsorción en zeolita natural.

Corrida	pH	Fuerza iónica (mM)	Cantidad de soporte (mg)	Actividad inmovilizada (U/mL)	Rendimiento de inmovilización (RI) %	Eficiencia de inmovilización (EI) %	Actividad recuperada (AR) %
1	6	100	100	0.754	95.511	3.500	3.343
2	7	75	100	0.877	98.685	4.385	4.328
3	6	50	150	0.862	96.988	4.462	4.328
4	6	75	125	0.401	99.439	7.331	7.290
5	7	75	150	1.603	97.903	4.072	3.986
6	7	100	125	0.560	97.826	4.714	4.611
7	6	75	125	0.461	93.502	7.522	7.034
8	6	100	150	0.750	96.740	12.777	12.360
9	5	50	125	0.166	75.214	86.591	65.128
10	7	50	125	0.339	90.080	7.008	6.313
11	6	75	125	0.671	97.694	14.559	14.223
12	5	75	150	0.217	83.965	80.382	67.493
13	6	50	100	0.675	97.336	24.693	24.035
14	5	75	100	0.123	83.038	110.671	91.899
15	5	100	125	0.253	83.666	45.007	37.656



3.2 Optimización de las condiciones de inmovilización por unión covalente

Después de analizar los parámetros de inmovilización por unión covalente en zeolita natural (Tabla 3), se observó una actividad máxima de 0.584 U/mL con una eficiencia de inmovilización del 8.39 % y un rendimiento de inmovilización del 8.39 %, mientras que se registró una actividad mínima de 0.056 U/mL con una eficiencia del 346.66 % y un rendimiento del 84.74 %. Los valores elevados de rendimiento indican que la totalidad de la enzima se inmovilizó con éxito en el soporte, mientras que los bajos porcentajes de eficiencia sugieren una pérdida de actividad enzimática o una disminución al final del proceso debido a posibles efectos estéricos o cambios conformacionales en la estructura de la enzima provocados por la inmovilización (Sheldon & van Pelt, 2013).

Tabla 3. Parámetros de inmovilización por unión covalente de β -glucosidasa recombinante en zeolita natural.

Corrida	pH	Fuerza iónica (mM)	Cantidad de soporte (mg)	Actividad inmovilizada (U/mL)	Rendimiento de inmovilización (RI) %	Eficiencia de inmovilización (EI) %	Actividad recuperada (AR) %
1	9	150	125	0.256	79.045	15.317	12.107
2	7	150	100	0.436	87.462	15.751	13.776
3	9	100	100	0.391	100.000	8.100	8.100
4	9	200	150	0.276	99.728	14.188	14.150
5	9	150	125	0.072	99.479	130.890	130.208
6	7	100	125	0.380	97.113	31.318	30.414
7	9	100	150	0.183	92.030	29.278	26.945
8	8	150	150	0.277	100.000	20.924	20.924
9	9	200	100	0.277	100.000	2.993	2.993
10	7	200	125	0.422	78.692	64.879	51.055
11	8	200	125	0.056	84.746	346.667	293.785
12	9	150	125	0.211	94.435	101.071	95.447
13	8	100	125	0.338	100.000	4.688	4.688
14	8	150	100	0.584	100.000	8.398	8.398
15	7	150	150	0.446	100.000	17.597	17.597

En cuanto a la inmovilización en zeolita sintética (Figura 2) se puede destacar la obtención de una actividad inmovilizada máxima de 0.495 U/mL con una eficiencia de inmovilización del 60.88 % y un rendimiento del 84.88 %, mientras que se obtuvo una actividad mínima de 0.066 U/mL con una eficiencia del 120.90 % y un rendimiento del 100 %, suceso similar a lo ocurrido con zeolita natural. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la inmovilización de enzimas en extractos crudos es posible ya que estas mantienen su actividad enzimática y las proteínas de la mezcla se



dispersan en el soporte sin interaccionar las unas con las otras (Guisan *et al.*, 2020), además, esto ha servido como método de purificación ya que las enzimas tienen gran afinidad por el soporte (Lu *et al.*, 2022) y han demostrado tener una tasa catalítica mayor que en su forma pura (Huang *et al.*, 2022), de esta forma se puede evitar la purificación que resulta costosa y con bajos rendimientos a pesar de que se trabaja con enzimas recombinantes.

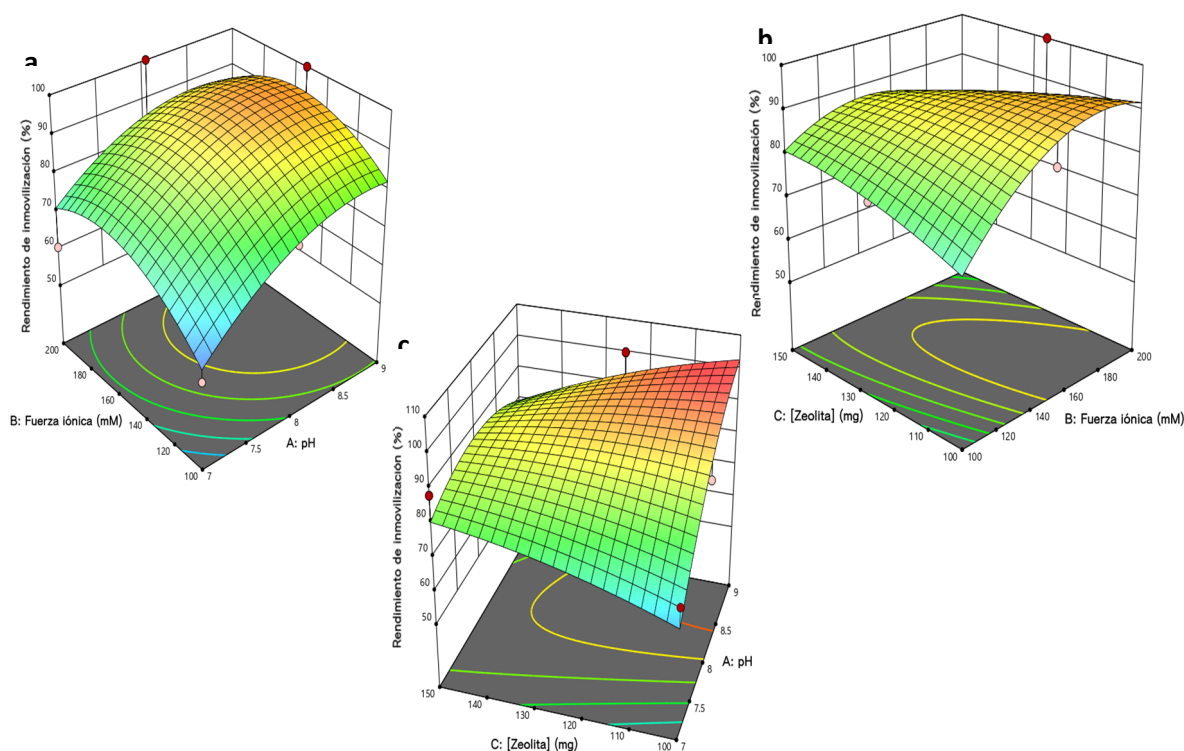


Figura 2. Superficie de respuesta tridimensional para la inmovilización de β -glucosidasa en zeolita sintética. a) fuerza iónica vs pH; b) zeolita vs fuerza iónica; c) zeolita vs pH.

IV. Conclusión

La β -glucosidasa recombinante en extracto crudo se inmovilizó exitosamente bajo los métodos de adsorción y unión covalente en zeolita natural y sintética, con rendimientos de inmovilización cercanos al 100 %, así como una eficiencia de inmovilización y actividad recuperada mayores al 100 % por el método de adsorción. Además, los rendimientos de inmovilización fueron mayores por unión covalente, pero hubo pérdida de actividad enzimática a comparación de la adsorción debido a efectos estéricos.



V. Referencias

- 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)
- Guisan, J. M., López-Gallego, F., Bolivar, J. M., Rocha-Martín, J., & Fernandez-Lorente, G. (2020a). One-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Immobilized “Native Enzymes.” In J. M. Guisan, J. M. Bolivar, F. López-Gallego, & J. Rocha-Martín (Eds.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (4th ed., Vol. 2100, pp. 83-92). Humata. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_4
- Huang Mariam, I., Deng, Y., Chen, Q., Yang, C., Zhu, Y., Chen, Z., Wang, J., Hu, K., He, G., & Li, D. (2022). The effect of Nano-calcium carbonate on β -glucosidase immobilized by alginate and chitosan. *Green Synthesis and Catalysis*. <https://doi.org/10.1016/j.gresc.2022.03.006>
- Lu, S., Zou, K., Guo, B., Pei, J., Wang, Z., Xiao, W., & Zhao, L. (2022). One-step purification and immobilization of thermostable β -glucosidase on Na-Y zeolite based on the linker and its application in the efficient production of baohuoside I from icariin. *Bioorganic Chemistry*, 121, 105690. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105690>
- Pota, G., Gallucci, N., Cavasso, D., Krauss, I. R., Vitiello, G., López-Gallego, F., Costantini, A., Paduano, L., & Califano, V. (2023). Controlling the Adsorption of β -Glucosidase onto Wrinkled SiO₂ Nanoparticles To Boost the Yield of Immobilization of an Efficient Biocatalyst. *Langmuir*, 39(4), 1482-1494. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02861>
- Ramírez-Ramírez, L. G., Zazueta-Álvarez, D. E., Fileto-Pérez, H. A., Reyes-Jáquez, D., Núñez-Núñez, C. M., la Rosa, J. de D. G. De, López-Miranda, J., & Vázquez-Ortega, P. G. (2022). Improvement in the Thermostability of a Recombinant β -Glucosidase Immobilized in Zeolite under Different Conditions. *Molecules*, 27(13), 4105. <https://doi.org/10.3390/molecules27134105>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Talebi, M., Vaezifar, S., Jafary, F., Fazilati, M., & Motamedi, S. (2016). Stability improvement of immobilized α -amylase using nano pore zeolite. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(1), 33-38. <https://doi.org/10.15171/ijb.1261>
- Vázquez-Ortega, P. G., López-Miranda, J., Rojas-Contreras, J. A., Iliina, A., Soto-Cruz, N. O., & Páez-Lerma, J. B. (2022b). Expression of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Escherichia coli* using a synthetic optimized gene and stability improvements by immobilization using magnetite nano-support. *Protein Expression and Purification*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106009>

