

## INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Jaquelina Sánchez-Ramírez, José Luis Martínez-Hernández, Elda Patricia Segura-Ceniceros, Juan Carlos Contreras-Esquivel, Miguel Angel Medina-Morales, Cristobál Noé Aguilar y Anna Iliná\*

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V. Col. República Oriente, C.P. 25000 Saltillo, Coahuila, México

Recebido em 07/06/2013; aceito em 01/11/2013; publicado na web em 03/02/2014

IMMOBILIZATION OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES IN MAGNETIC NANOPARTICLES. Due to the need for more efficient, economical and environmentally-friendly technological processes, the use of enzymes has increased. However, reuse of enzymatic hydrolytic complex is required. The immobilization of enzymes provides a basis for stability and allows their reuse reflected in aspects of economic feasibility. Magnetic nanoparticles are a promising supports since their magnetic character allows retrieval by applying an external magnetic field. This article presents an analysis and discussion of methods of biocatalyst immobilization, emphasizing lignocellulolytic enzymes immobilized in magnetic nanoparticles and their applications for the production of high-value compounds such as bioethanol.

Keywords: immobilization; lignocellulolytic enzymes; magnetic nanoparticles.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de seguridad energética y mitigación del cambio climático han llevado a la necesidad de adoptar los procesos de obtención de fuentes de energía alternativas, renovables y menos contaminantes, como el aprovechamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol de segunda generación. Sin embargo, se presentan dificultades tecnológicas para la conversión de biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables,<sup>1</sup> debido a la compleja estructura de la materia prima. Las moléculas de lignocelulosa son altamente resistentes a la hidrólisis enzimática, debido a que la celulosa, hemicelulosa y lignina – sus principales componentes, están unidos entre sí por enlaces covalentes, puentes intermoleculares y fuerzas de Van der Waals,<sup>2</sup> lo que confiere resistencia e insolubilidad a la celulosa cristalina,<sup>3</sup> disminuyendo la adsorción de las celulasas en el sustrato.

Para que sea eficaz la hidrólisis enzimática, se requiere realizar un pretratamiento que desintegre la matriz lignocelulósica, reduzca la cristalinidad de la celulosa y aumente la proporción de celulosa amorfa. Otro fin es el de eliminar o remover lignina con el objetivo de tener mayor acceso a las moléculas a hidrolizar y aumentar así el rendimiento de azúcares fermentables. Actualmente el pretratamiento y la hidrólisis de celulosa se realizan con catalizadores químicos y biológicos. Para aumentar la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis, los catalizadores químicos (ácidos, bases u oxidativos) se combinan con métodos térmicos<sup>4</sup> en condiciones fuertes de reacción por lo que se consume gran cantidad de energía y frecuentemente se forman compuestos tóxicos que pueden inhibir la fermentación subsecuente, por lo que son poco viables económicamente y de alto impacto ambiental.<sup>5</sup> Una alternativa es el pretratamiento biológico, que pretende depolimerizar la pared celular de la planta y romper el complejo lignina/carbohidratos con la aplicación de basidiomicetos, productores de enzimas lignocelulolíticas; sin embargo, son poco utilizados debido a que requieren periodos prolongados (2-5 semanas) y son poco eficientes.<sup>5,6</sup>

Debido a la necesidad de procesos tecnológicos más eficientes y amigables con el medio ambiente, actualmente es de gran interés

tecnológico el uso de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, hemicelulasas, ligninasas, etc.), por su especificidad al sustrato y por no generar compuestos tóxicos, aunque presentan ciertas desventajas como su alto costo y difícil separación del producto final. Con el fin de aumentar su estabilidad, actividad y capacidad de reutilización, se han desarrollado diversos métodos de inmovilización. Actualmente existen diversas técnicas de inmovilización de enzimas, lo cual permite seleccionar el método más adecuado para la aplicación deseada. Hoy en día ha aumentado el interés por el uso de enzimas inmovilizadas en nanopartículas magnéticas, ya que es una alternativa que permite su recuperación a través de un campo magnético externo, con esto se prolongan los ciclos de aplicación sucesiva y el tiempo de vida útil. Es un proceso novedoso, utilizado actualmente para una amplia gama de aplicaciones, pero hasta la fecha hay pocos antecedentes de la inmovilización de enzimas lignocelulolíticas y de su aplicación.

El objetivo del presente artículo es analizar y discutir los avances, retos, ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización de biocatalizadores, haciendo énfasis en enzimas lignocelulolíticas empleando como soporte nanopartículas magnéticas y sus aplicaciones para la producción de bioetanol.

## ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que tienen la capacidad de facilitar y acelerar reacciones químicas. El empleo de enzimas presenta una serie de ventajas como son: no propician reacciones secundarias indeseables debido a su gran especificidad al sustrato, presentan alta actividad catalítica y llevan a cabo reacciones regioselectivas y estereoselectivas. Además actúan a bajas concentraciones, en condiciones experimentales poco agresivas.<sup>7-10</sup>

Las enzimas lignocelulolíticas son producidas por algunos microorganismos en condiciones de crecimiento específicas, utilizando sustratos de bajo valor comercial, como residuos agroindustriales o agroalimentarios, tal es el caso del restrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña, etc.<sup>11,12</sup> Existen diversos complejos enzimáticos lignocelulolíticos, tales como: celulasas (glucanasas,  $\beta$ -glucosidasas), hemicelulasas (xilanasas, acetil-esterasas, etc.) y ligninasas (lacasas, lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas).<sup>12</sup>

\*e-mail: anna\_ilina@hotmail.com

## Celulasas

La celulosa es un polímero lineal compuesto de cadenas largas de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4, con un alto grado de polimerización (10,000 unidades), con regiones amorfas (no cristalinas y fácilmente hidrolizables) y altamente cristalinas que lo hacen altamente resistente a la hidrólisis y conversión a azúcares fermentables.<sup>13</sup> Se ha demostrado que este polímero puede ser hidrolizado por diversos métodos fisicoquímicos y térmicos,<sup>4</sup> así como por procesos enzimáticos, donde la bioconversión de celulosa es llevada a cabo por celulasas, que son un conjunto de hidrolasas que pueden convertir la celulosa en  $\beta$ -glucosa (Figura 1).

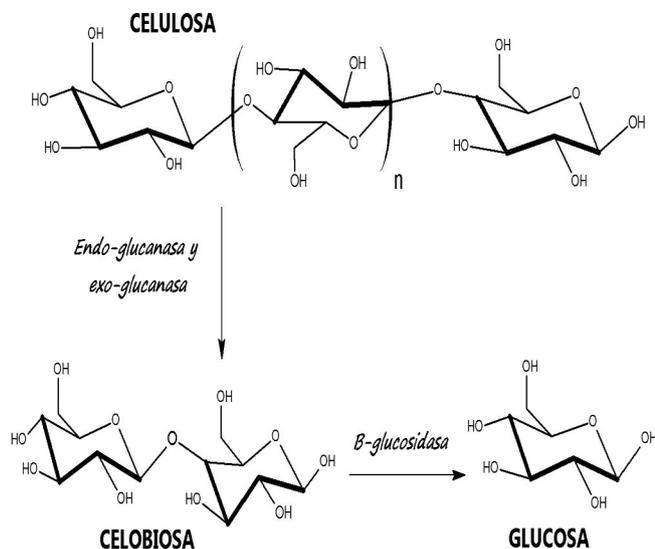


Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa

Las celulasas son producidas principalmente por hongos aeróbicos tales como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani*,<sup>14</sup> etc. y bacterias mesofílicas como *Cellulomonas sp.*, *Clostridium thermocellum*, etc. Su acción implica una operación secuencial y sinérgica de un grupo de enzimas que incluye: endoglucanasa (endo- $\beta$ -1,4-glucanasa ( $C_x$ ), 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), exoglucanasa (celobiohidrolasa, exo- $\beta$ -1,4-glucanasa ( $C_1$ ), 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasas (celobiasa ( $C_b$ ),  $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21),<sup>15</sup> las cuales actúan para obtener una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa. La endoglucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces internos  $\beta$ -1,4 glucosídicos presentes entre las unidades de glucosa de la celulosa. Su acción es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasa. Las exo  $\beta$ -1,4 glucanasa fragmentan la cadena 1,4  $\beta$ -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, generando celobiosa o glucosa. Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente la  $\beta$ -1,4 glucosidasa convierte los fragmentos de celobiosa a glucosa para evitar la inhibición por celobiosa.<sup>1</sup>

En los ensayos de laboratorio para valorar la actividad del complejo celulolítico, es decir la actividad celulosa total (FPasa), se utiliza como sustrato papel filtro. La actividad de endoglucanasa (CMCasa) se utiliza carboximetilcelulosa como sustrato, en ambas

determinaciones se cuantifica la liberación de azúcares reductores. La actividad  $\beta$ -1,4 glucosidasa se puede medir adicionando como sustratos celobiosa o salicina, cuantificando la liberación de azúcares reductores, o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*-NPG), midiendo espectrofotométricamente la liberación de *p*-nitrofenol.<sup>16</sup>

Actualmente las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil para el ablandamiento de algodón y desteñido de mezclilla, en el mercado de los detergentes para el cuidado del color y anti-deposición. Dentro de la industria alimentaria, son empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y en la industria de la pasta kraft y de papel se usan para la eliminación de tinta.<sup>17</sup> Actualmente, las celulasas han adquirido notable importancia en la industria bioenergética para hidrolizar biomasa lignocelulósica con la finalidad de emplearse en la producción de etanol celulósico, por lo que ha aumentado la demanda de celulasas con altas actividades y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura, pH, etc.<sup>18</sup> Para aumentar su estabilidad, las celulasas pueden ser inmovilizadas sobre sustratos sólidos, que además permiten su reutilización o uso continuo, haciendo que el proceso sea económicamente viable.<sup>19</sup>

## Hemicelulasas

La hemicelulosa está formada por polímeros constituidos de azúcares como: pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos (ácido galacturónico y glucurónico).<sup>20</sup> Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina. Es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina.<sup>21</sup> Puede ser hidrolizada a azúcares monoméricos y ácido acético. Las hemicelulasas son hidrolasas o esterasas y se clasifican de acuerdo a su acción sobre sustratos distintos.<sup>22</sup>

La biodegradación de hemicelulosa requiere la acción sinérgica de xilanasas y de algunas enzimas accesorias. Las xilanasas degradan la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa. Las endo- $\beta$ -D-xilanasas, rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, la glucuronidasa remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa y las  $\beta$ -xilosidasas actúan sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa.<sup>3,23</sup>

La xilanasas, se ha aplicado en diversos procesos industriales: el destintado y pretratamiento de blanqueo de la pulpa, producción de xilooligosacáridos, clarificación de jugos y vinos, extracción de saborizantes y pigmentos, acondicionamiento de piensos, etc.<sup>24</sup>

## Ligninasas

La lignina es un polímero aromático tridimensional amorfo de unidades de fenilpropano, se origina por la polimerización oxidativa de alcoholes cinámicos hidroxilados (*p*-cumaril, coniferil, sinapil). Es ópticamente inactivo e insoluble en agua, por lo que su degradación es difícil.<sup>13,21,25</sup> La lignina representa una barrera física que limita la hidrólisis de la celulosa, por lo que su degradación es de gran interés.

En la biodegradación enzimática de lignina actúan de manera sinérgica enzimas oxidativas: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. Éstas son producidas principalmente por hongos de pudrición blanca.<sup>6</sup>

La lacasa es una enzima oxidoreductasa o polifenol oxidasa que pertenece a la familia de las multicobre azul oxidasas, implica la transferencia de hidrógeno y átomos de oxígeno o electrones desde el sustrato a otra molécula, cataliza la oxidación de compuestos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, reduciendo el oxígeno molecular a agua (Figura 2). Su rol biológico está relacionado con la degradación de lignina, de taninos y de xenobióticos orgánicos.<sup>26-28</sup>

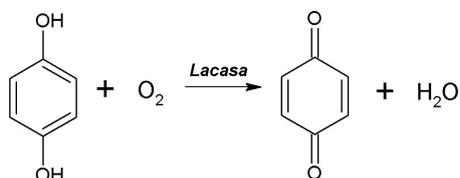


Figura 2. Reacción típica de las lacasas sobre sustratos fenólicos

La lacasa tiene además potencial para la bioremediación de contaminantes ambientales (clorofenoles e hidrocarburos aromáticos de la industria petroquímica), tratamiento de aguas residuales, deslignificación de papel,<sup>29</sup> decoloración de colorantes en la industria textil<sup>27</sup> y como pretratamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol. Moilanen *et al.*<sup>30</sup> demostraron que el uso de lacasas, tiene potencial en la biodegradación parcial de lignina para mejorar la hidrólisis de abeto (*Picea abies*), aumentando en un 12% el rendimiento en la hidrólisis con celulasas comerciales.

La lignina peroxidasa es otra enzima implicada en la degradación de la lignina, oxida los compuestos aromáticos por la abstracción o “sustracción” de un electrón de un núcleo aromático. Debido a su alto potencial de óxido-reducción, oxida además los núcleos aromáticos no fenólicos a radicales catiónicos.<sup>31,32</sup>

Por otro lado, la manganeso peroxidasa tiene la capacidad para unirse al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) y oxidar Mn-II liberando Mn-III, oxida fenoles a radicales fenólicos. Ambas peroxidases tienen un grupo hemo como cofactor, y emplean peróxido de hidrógeno como primer aceptor de electrones.<sup>31,32</sup>

## MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

A pesar de las conocidas ventajas del uso de enzimas, por razones técnicas y económicas, su empleo en condiciones de procesos industriales no se ha generalizado. Debido a su alto costo, problemas de estabilidad y difícil separación del producto final, a menudo requieren ser inmovilizadas sobre un soporte.<sup>33,34</sup>

La inmovilización consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos. Combina la actividad elevada y específica de biomoléculas activas, como las enzimas, con la estabilidad química y mecánica del soporte.<sup>35</sup> Proporciona una base para lograr la aplicación repetida de la enzima y tiene eficacia

funcional (aumento de estabilidad).<sup>36-39</sup> Algunos inconvenientes que pueden presentarse con la inmovilización son: alteración de la conformación de la enzima, pérdida de actividad enzimática, pueden presentarse fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte y el incremento de costo. A pesar de que los preparados inmovilizados son de alto costo, la recuperación de la enzima del medio de reacción y el desarrollo de operaciones en continuo disminuyen los costos del proceso.<sup>40-42</sup> No existe un método de inmovilización válido para todas las enzimas, por lo que el tipo de enzima, así como las características y aplicaciones deseadas se deben considerar para seleccionar el método más adecuado. Las enzimas pueden ser inmovilizadas por retención física o unión química (Figura 3).

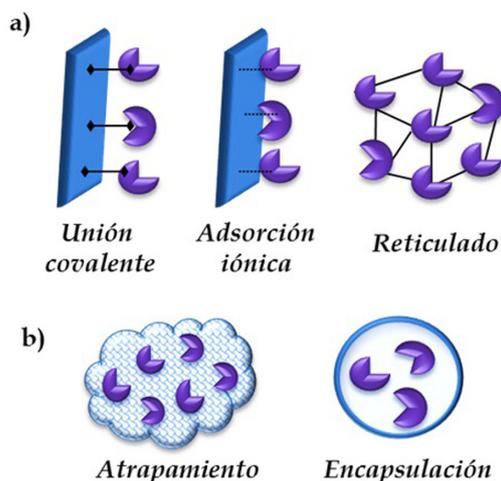


Figura 3. Métodos de inmovilización de enzimas: a) Unión química, b) Retención física

Se busca que el método de inmovilización no afecte la afinidad de la enzima por el sustrato y la estabilidad del biocatalizador en un amplio rango de pH y temperatura, además que sea fácilmente separable del medio. Desde el punto de vista industrial, las propiedades esenciales son: la sencillez, rentabilidad y estabilidad de los preparados inmovilizados.<sup>34</sup> Los métodos más representativos son descritos en la (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de inmovilización de enzimas<sup>36,39,41</sup>

Método	Fundamento	Ventaja	Desventaja
<i>Retención física</i>			
<i>Atrapamiento</i>	Retención en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (poliacril-amida, colágeno, alginato, etc.).	La enzima no sufre alteraciones químicas. Proporciona mayor estabilidad.	La enzima puede desprenderse del soporte.
<i>Encapsulación</i>	Cubierta de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima.	Se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas.	Rotura de las capsulas.
<i>Unión química</i>			
<i>Unión covalente a soporte</i>	Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las enzimas. Ej. Nanopartículas.	La unión enzima-soporte es muy fuerte. Mayor estabilidad.	Pérdida de actividad enzimática. Requiere la protección del centro activo de la enzima para evitar su alteración.
<i>Adsorción iónica a soporte</i>	Unión mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.	Retención de actividad enzimática, preparación sencilla.	La unión soporte-enzima es muy débil, se forman derivados poco estables.
<i>Reticulado o entrecruzamiento</i>	Reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.	Gran estabilidad de la enzima debido a la rigidez de la estructura.	Pérdida de actividad enzimática.

Los métodos de inmovilización de biocatalizadores por atrapamiento o adsorción son más sencillos y económicos, pero presentan pérdidas de actividad a largo plazo ya que la unión enzima-soporte es muy débil. En el caso de enzimas lignocelulolíticas, pueden presentarse problemas de difusión. Por otro lado, los métodos de unión covalente son más difíciles de preparar y costosos, pero permiten obtener biocatalizadores más estables y duraderos<sup>36</sup> y son los más utilizados para inmovilizar enzimas lignocelulolíticas.

Para la elección del soporte y el tipo de enlace se debe tomar en cuenta: la inercia, fuerza física, estabilidad, presencia de grupos funcionales necesarios para unirse a los grupos de la enzima,<sup>41</sup> capacidad para aumentar la especificidad enzima/actividad, reducir la inhibición con el producto y contaminación microbiana.<sup>43</sup> Un requerimiento importante, es que no debe interferir con la estructura del sitio activo de la enzima, ya que podría comprometer su actividad biológica.<sup>44</sup> Existen numerosos tipos de soportes, los cuales pueden ser de diferente origen: naturales u orgánicos (celulosa, quitosán, dextrano, alginato, etc.), inorgánicos (zeolitas, sílice, carbón, óxidos de metales, etc.) y polímeros sintéticos (cloruro de vinilo, poliestirenos, alcohol polivinílico, poliuretano, etc.)<sup>39</sup> y ser aplicados en diferentes tamaños de partícula, incluyendo nanodimensiones.

La inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en diversos soportes ha sido anteriormente reportada. Algunos soportes utilizados para la inmovilización de celulasas son: microesferas de quitosán,<sup>45</sup> partículas de sílice no porosas,<sup>46</sup> partículas magnéticas de sílice dopadas de oro,<sup>47</sup> perlas de alcohol de polivinilo modificado recubiertas con quitosán,<sup>48</sup> liposomas de fosfatidilcolina con bandas de quitosán,<sup>49</sup> nanopartículas magnéticas (NPM) de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ /poli (vinil alcohol),<sup>50</sup> carbón activado,<sup>51</sup> RhC películas de poliestireno<sup>52</sup> y nanotubos de carbón.<sup>53,54</sup>

Das *et al.*<sup>55</sup> aplicaron un sistema de celobiasa inmovilizada (hidroliza el enlace de la molécula de celobiosa, para obtener moléculas de glucosa) en material sol-gel de sílice mesoporosa. Éste mostró una eficiencia de hidrólisis de hasta 74-81%. Cuando se volvió a utilizarse en varios lotes, las muestras inmovilizadas conservaron su actividad enzimática, revelando así un gran potencial en la hidrólisis enzimática de la biomasa para la generación de etanol de celulosa, ya que conduce a la reducción global de costos del proceso.

La inmovilización de la enzima lacasa sobre diferentes soportes ha sido ampliamente reportada,<sup>29</sup> ejemplos de soportes empleados para este propósito son: el quitosán,<sup>56,57</sup> perlas de alginato-Cu,<sup>58</sup> oro nanoporoso,<sup>59</sup> matriz sol-gel de diglicerisilano (DGS)<sup>60</sup> y membranas de polipropileno.<sup>61</sup>

Es de gran interés evaluar nuevas alternativas de soportes y métodos de inmovilización que además de permitir la fácil y completa recuperación del preparado inmovilizado, aumenten la interacción de la enzima con la biomasa lignocelulósica ya que se trata de un sustrato insoluble, por lo que la superficie de contacto enzima/sustrato es pequeña, por lo anterior crece el interés en las nanopartículas magnéticas.

## NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Recientemente la nanotecnología ha experimentado un importante auge en la búsqueda de nuevos y más eficientes procesos. Los nanomateriales son aquellos que poseen dimensiones en la escala nanométrica (1-100 nm).<sup>62</sup> Incluyen los nanocristales, nanotubos de carbono y/o silicio, nanoanillos y las nanopartículas (NP).<sup>63</sup> En comparación con partículas de tamaño micrométrico, las nanopartículas proporcionan una mayor área de superficie funcional para aumentar la carga de enzima. Además tienen el potencial para reducir limitaciones de difusión aumentando la solubilidad y mejorar su biodisponibilidad.<sup>64-66</sup> Las nanopartículas son preferibles, ya que no

tienden a deformar la estructura de la enzima dado por el aumento de la interacción enzima-soporte.<sup>28</sup> Adicionalmente presentan resistencia a la temperatura y a la irradiación.<sup>67</sup>

En los últimos años, los materiales magnéticos y nanoestructurados han atraído gran atención debido a sus propiedades físicas, químicas y estructurales únicas,<sup>68</sup> por lo cual sido empleados como soportes en la inmovilización de enzimas y otras biomoléculas, obteniendo así nanoconjugados funcionales.

En estos materiales existen campos magnéticos de origen atómico, producidos por un dipolo o momento magnético y están unidos por una fuerza cohesiva, conocida como "energía de intercambio",<sup>69</sup> lo que permite la separación de los nanocompuestos (Figura 4). La eficiencia de la separación magnética depende de la calidad de las nanopartículas magnéticas y de la estabilidad de la unión entre el soporte magnético y componentes "no-magnéticos".<sup>70</sup>



Figura 4. Efecto de un campo magnético externo en fluidos ferromagnéticos

Diversas composiciones de NPM pueden ser sintetizadas, que incluyen óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ); ferritas de cobalto, manganeso, níquel y magnesio,  $\text{FePt}$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , cobalto, hierro, níquel,  $\text{-Fe}$ ,  $\text{CoPt}$ , y  $\text{FeCo}$ .<sup>71,72</sup>

Los métodos de síntesis de NPM pueden ser por coprecipitación, descomposición térmica, síntesis hidrotermal y con el uso de la microemulsión para la síntesis de nanopartículas de alta calidad.<sup>68</sup> El más representativo es por coprecipitación, que consiste en agregar sales de los cationes metálicos constituyentes en medio alcalino fuerte y/o en presencia de un agente reductor. Requiere bajas temperaturas de síntesis, es fácil y rápido, produce nanopartículas que forman suspensiones estables en el agua, los valores de magnetización de saturación se obtienen en el rango de 30 a 50 emu  $\text{g}^{-1}$ , los rendimientos de síntesis son altos y escalables y una vez fijadas las condiciones de síntesis, su calidad es totalmente reproducible. Osuna *et al.*<sup>73</sup> obtuvieron un alto rendimiento en reacciones de precipitación ( $\approx 97\%$ ), en la síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosán en una etapa que comprende la coprecipitación en presencia de un bajo contenido de quitosán.

Las desventajas que presentan los métodos de coprecipitación son: la distribución de tamaño y control de forma son relativamente limitados, y las NPM son poco estables en condiciones ambientales, por lo que pueden oxidarse.<sup>74</sup>

En términos de control de morfología de las nanopartículas, la descomposición térmica es el mejor método,<sup>68</sup> que además permite obtener altos rendimientos y escalables, sin embargo técnicamente es complicado, ya que requiere altas temperaturas de reacción (100-300 °C) y una atmósfera inerte.<sup>74</sup>

El método de microemulsión comprende el uso de una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles,

donde el microdominio de cualquiera o de ambos líquidos se estabiliza por una película interfacial de moléculas de tensoactivo. Se utiliza para sintetizar nanopartículas monodispersas con diversas morfologías en condiciones suaves de reacción (20-50 °C), sin embargo, requiere una gran cantidad de disolvente, se obtienen bajos rendimientos y la síntesis es complicada.<sup>74</sup>

El método hidrotérmico, permite la síntesis de nanopartículas de buena calidad de una manera sencilla y permite controlar la forma, pero se requieren altas temperaturas de reacción (220 °C), alta presión y periodos largos de reacción y los rendimientos son bajos, por lo que a la fecha es poco explorado.<sup>74</sup>

Actualmente, los métodos de coprecipitación y descomposición térmica son los más estudiados y escalables,<sup>72, 74-76</sup> sin embargo, la selección del método de obtención se relaciona con las propiedades y rutas de la aplicación. La búsqueda de las condiciones necesarias para sintetizar nanopartículas magnéticas con el tamaño, forma, grupos funcionales y estabilidad necesaria, es el reto a vencer.

Las características relevantes que se consideran en la selección y aplicación de nanopartículas magnéticas como soportes son:

**Rango de tamaño:** El tamaño de las nanopartículas magnéticas les permite colocarse en una dimensión comparable a diversas entidades biológicas como son: células (10-100 µm) virus (20-450 nm) o proteínas (5-50 nm), por lo que tienen la capacidad de aproximarse e incluso interactuar con ellas.<sup>77</sup> El uso de NPM de tamaño de 10-20 nm tiene ciertas ventajas al comparar con unos de un mayor diámetro.<sup>74</sup> Las reducidas dimensiones hacen posible que presenten ciertas propiedades físicas interesantes, tales como el superparamagnetismo, la cinética de nucleación, el comportamiento de tipo vidrio de espín, entre otros.

**Transferencia de masa:** La inmovilización de enzimas en soportes conduce a que el proceso catalítico adquiera las propiedades de un proceso heterogéneo debido a la presencia de más de una fase. Los sistemas de nanopartículas magnéticas se caracterizan por baja resistencia a la transferencia de masa, lo que representa una ventaja para los sistemas catalíticos en términos de difusión.

**Geometría y área superficial:** Las NPM presentan una alta área superficial específica, es decir una apreciable fracción de sus átomos en la superficie y presentan estados de energía discretos. El área superficial específica por gramo de una NP (*S*) es igual al producto del área (*A*) dividida entre la densidad por volumen (*d·v*).

En la aplicación de nanopartículas como soportes para la inmovilización de enzimas el número de grupos funcionales aptos para ser implicados es proporcional al área superficial específica total por unidad de volumen, por lo que las nanopartículas de áreas elevadas ofrecen la posibilidad de funcionar como soportes eficientes, tienen mayor capacidad de interacción con otros materiales y una mayor reactividad.<sup>72</sup> Específicamente los óxidos de hierro, presentan una elevada área superficial específica, mayor de 100 m<sup>2</sup>/g, lo que los hace sorbentes efectivos para una amplia gama de moléculas, iones y gases disueltos.<sup>78</sup>

**Coercitividad y magnetización:** NPM con diámetros menores de 30 nm son generalmente superparamagnéticas. El comportamiento superparamagnético se caracteriza por el hecho de que la curva de magnetización no presenta una curva de histéresis, lo cual significa que en ausencia de un campo magnético externo (dipolo magnético inducido), estas partículas tienen magnetización cero, por lo que tienen menos tendencia a aglomerarse y pueden ser fácilmente dispersados en un disolvente.<sup>72</sup> La cantidad de magnetización que se retiene cuando no hay un campo impulsor se llama remanencia y la cantidad para desmagnetizarlo se llama coercitividad, ambos son parámetros importantes en la evaluación de un preparado magnético.<sup>78</sup> Es importante mantener las NPM separadas y con el tamaño apropiado para preservar el superparamagnetismo, ya que la aglomeración hace que sus propiedades magnéticas se pierdan o disminuyan.

Actualmente se mantiene un gran interés por el uso de las nanopartículas magnéticas a base de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y magueta (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ya que son convenientes para una amplia gama de aplicaciones debido a las siguientes ventajas: su pequeño tamaño, elevada área superficial específica, alta estabilidad y baja resistencia a la transferencia de masa. Desde el punto de vista biológico, permiten una menor contaminación de la enzima y facilitan la prevención del crecimiento microbiano,<sup>74, 79, 80</sup> son de baja toxicidad y se les considera biocompatibles.<sup>81</sup> Actualmente el óxido de hierro es el único material de nanopartículas que ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. Su principal ventaja o la más conocida es su fácil y rápida separación de la mezcla de reacción por la aplicación de un campo magnético externo,<sup>28, 62, 82</sup> por lo que disminuyen los costos de separación.<sup>72</sup>

Las partículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), pueden obtenerse por el método de coprecipitación, haciendo reaccionar soluciones de Fe (II) y Fe (III), en presencia de iones hidroxilo, de acuerdo a la siguiente reacción:



El tener una gran área superficial de trabajo, hace a las nanopartículas magnéticas propensas a la oxidación por el aire, a la pérdida de estabilidad y de sus propiedades magnéticas. La estabilidad es un requerimiento importante para la aplicación de NPM en biocatálisis, por lo cual se desarrollan estrategias de protección o recubrimiento para estabilizarlas químicamente, protegerlas de la degradación (durante o después de la síntesis), reducir su aglomeración e incluso para su funcionalización con otras nanopartículas o ligandos diferentes, haciéndolas más susceptibles para aplicaciones biológicas (biocompatibles). Los recubrimientos pueden ser poliméricos (poli-alcohol vinílico, poliamidas, quitosán, o- Carboximetil-quitosán, etc.) o no poliméricos (oro, SiO<sub>2</sub> o carbono).<sup>71, 72, 74, 81</sup>

En la Tabla 2 se presentan ejemplos de funcionalización de nanopartículas, aplicadas en la inmovilización de biomoléculas con el propósito de estabilizar el sistema nanoestructurado. Por ejemplo, una opción viable es el uso de la sílice (SiO<sub>2</sub>), debido a que proporciona

**Tabla 2.** Materiales magnéticos funcionalizados aplicados en sistemas de inmovilización enzimática<sup>28</sup>

Materiales magnéticos funcionalizados	Descripción de propiedades
<i>Micro- y nano compósitos de partículas magnéticas y sílice</i>	Revestimiento de sílice mejora estabilidad química y puede prevenir su agregación, proporciona biocompatibilidad y propiedades hidrofílicas en medio acuoso.
<i>Atrapamiento de NPM en matrices poliméricas</i>	Se logra el efecto de estabilización y adsorción de nanopartículas y enzimas, la generación de efectos estéricos y la prevención de la opsonización en condiciones biológicas.
<i>NPM recubiertas con quitosán u otros compuestos poliméricos</i>	Estabilización de NPM, formación de grupos funcionales para unión de enzimas mediada por enlace covalente o por adsorción.
<i>NPM silanizadas con amino-silanos</i>	Modifica la superficie de NP con los grupos amino lo que se aplica para absorber o unir químicamente las enzimas.
<i>Perlas magnéticas recubiertas de oro</i>	Exhiben características metálicas e inercia química. Exhiben efectos de resonancia de plasmones aplicados en el desarrollo de biosensores enzimáticos.

los grupos funcionales y ayuda prevenir la aglomeración por un tiempo suficiente.<sup>28</sup>

En el caso de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro éstas mantienen su comportamiento superparamagnético, mientras que la coraza tiene grupos funcionales específicos unidos a su superficie los cuales juegan un papel crucial en su utilidad final.<sup>77</sup>

Los polisacáridos a menudo son incorporados para mejorar su biocompatibilidad, debido a que son hidrófilos, generalmente no son tóxicos, poseen grupos químicos funcionales en su estructura y pueden servir para la creación de sistemas multifuncionales a través de la adición de grupos reactivos y bioactivos en la superficie de los materiales compuestos, aumentando de esta forma la gama de aplicaciones.<sup>77</sup>

El quitosán, que es un polisacárido compuesto de unidades glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, es ideal como recubrimiento, debido a su hidrofilia, biocompatibilidad, biodegradabilidad.<sup>83</sup> Además presenta propiedades químicas importantes ya que es un compuesto policatiónico, que forma hidrogeles y presenta grupos reactivos (-OH y -NH<sub>2</sub>).<sup>84</sup>

Gregorio-Jáuregui<sup>78</sup> obtuvo nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán en una sola etapa utilizando el método de coprecipitación química de sales inorgánicas, para precipitar nanopartículas esféricas, con diámetros de 10-11 nm, magnetización de saturación de 70 emu g<sup>-1</sup> y propiedades superparamagnéticas.

La funcionalización de la superficie de nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con quitosán ha sido anteriormente reportada,<sup>84</sup> lo que ha permitido una mayor actividad y capacidad de reuso en algunos sistemas de celulasas inmovilizadas.<sup>48,49</sup> De acuerdo a Braun,<sup>85</sup> esto puede lograrse por medio de la reacción con glutaraldehído entre los grupos amino libres de quitosán y la molécula de enzima para formar enlaces covalentes.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se procede a caracterizar los preparados mediante diversas técnicas: difracción de rayos X (DRX), para dilucidar la estructura y composición relativa de sustancias orgánicas e inorgánicas. Esta última puede confirmarse con espectroscopia de infrarrojo para identificar compuestos. Para determinar el tamaño y la morfología de las partículas se emplea el método de microscopía electrónica de barrido (SEM). Además se realizan curvas de magnetización en función de un campo magnético externo. Análisis termo gravimétrico (TGA) puede realizarse para estimar la cantidad de compuestos orgánicos presentes en las nanopartículas, por pérdida de peso con respecto al tiempo.

Hoy en día las nanopartículas magnéticas tienen diversas aplicaciones biotecnológicas en diversos campos<sup>86</sup> tales como: la biomedicina ( $\beta$ -Galactosidasa- hidrólisis de lactosa),<sup>87</sup> el diagnóstico (colesterol oxidasa- análisis de colesterol en suero),<sup>88</sup> la biotecnología ambiental (NPM de lacasa- bioremediación de contaminación ambiental),<sup>89</sup> la energía, el sector alimentario,<sup>90</sup> análisis de biomarcadores en la detección de virus<sup>91</sup> y en el desarrollo de biosensores enzimáticos (biosensores de lacasa- determinación de catecol y degradación de bisfenol A).<sup>86</sup>

## INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM)

### Inmovilización de celulasas

Recientemente se ha reportado la inmovilización de celulasas sobre nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> la cual ha permitido aumentar o mantener su actividad y estabilidad por varios ciclos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Inmovilización de celulasas sobre nanopartículas magnéticas

Enzima	Sustrato	Cantidad de enzima inmovilizada	Actividad enzimática (%) después de inmovilizar	Parámetros operacionales	Ref.
<i>NPM de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 nm) con alcohol polivinílico aplicado por microemulsión</i>					
Celulasa (R-10)	Papel Filtro	Enzima inmovilizada 3.58 ± 0.23 mg.	Actividad específica de 8.13 ± 1.72 U mg <sup>-1</sup> , actividad retenida 91%.	Mantiene 40% de su actividad después de 4 ciclos.	50
<i>NPM (8±3 nm) de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con recubrimiento iónico por autoensamblaje electrostático capa por capa</i>					
Celulasa de <i>Trichoderma viride</i> (Sigma-Aldrich)	CMC	95%.	Actividad CMCasa disminuye al inmovilizar, mejora a 80 °C, 0.1 U (μmol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ).	Temperatura óptima de 60 °C. Resistencia a pH alcalino.	92
<i>NPM (13.28 nm) de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> activadas con carbodiimida</i>					
Preparado enzimático Celulasa (Genecor)	Celulosa microcristalina	~ 90% con cargas de enzima bajas (1-2 mg).	Punto de saturación de 0.02 (mg enzima unida mg <sup>-1</sup> NPM), alcanza un valor máximo de 62.7 U mg <sup>-1</sup>	Aumento en la estabilidad térmica. Mayor actividad a 50 °C, y pH de 4 a 5. Reuso por 6 ciclos.	93
<i>NPM (11.5 nm) de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> funcionalizadas por unión covalente vía glutaraldehído</i>					
Preparado enzimático de Celulasa (74.07 FPU g <sup>-1</sup> )	Sustrato lignocelulósico (SLC): Restrojo de maíz pretratado (vapor), pulpa de bagazo blanqueado.	>40% de proteína fue retenida.	>40% de actividad se mantuvo (FPasa).	Mayor actividad a pH de 4 a 6 (4.5 óptimo). Temperatura óptima aumentó a 50- 60 °C. Mayor estabilidad durante almacenamiento. Hidrólisis de SLC, retiene 60% de su actividad después de 6 ciclos.	94
<i>NPM de sílice activadas con cloruro de cianuro y poliglutaraldehído</i>					
$\beta$ -glucosidasa (Megazyme)	p-NFG		104.7 U g <sup>-1</sup> NPM (con cloruro de cianuro) y 82.2 U g <sup>-1</sup> (con poliglutaraldehído).	Aumento de la estabilidad térmica a 65 °C. Reuso por 4 ciclos.	95

CMC: Carboximetilcelulosa. FPasa: actividad sobre papel filtro; CMCasa – sobre CMC. p-NFG: p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido.

**Tabla 4.** Inmovilización de lacasas sobre nanopartículas magnéticas

Enzima	Soporte	Sustrato	Cantidad de enzima inmovilizada	Actividad después de inmovilizar	Parámetros operacionales	Ref.
Lacasa (64kDa, 35 U/mg).	NPM de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recubiertas de quitosán vía glutaraldehído (~ 100 nm). Hc: 10.27 Oe.	ABTS	28% de proteína unida	480 U g <sup>-1</sup> de soporte	pH óptimo de 3. Temperatura óptima de 45 °C. Retiene su actividad después de 10 ciclos.	97
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	NPM de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> con sílica mesoporosa (~287 nm). Estructura tridimensional tipo "warmhole". Hc: 3.46 Oe.	Catecol	72.6 mg g <sup>-1</sup> de partícula	81.5%	Retuvo el 86.6% de su actividad inicial después de 10 ciclos, pH óptimo de 3.	98

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Hc: Coercitividad en Oerstedts después de inmovilizar.

Algunos autores reportan pérdida de actividad después del proceso de inmovilización,<sup>92-95</sup> lo cual puede atribuirse a la desnaturación de proteínas, inhibición por producto intermedio o a la unión de grupos funcionales clave dentro del sitio activo lo que disminuye las interacciones con el sustrato y la actividad.<sup>93</sup> Xu *et al.*<sup>94</sup> obtuvieron preparados enzimáticos que mantuvieron en un 40% la actividad enzimática después de inmovilizar. Además demostraron que la inmovilización de la celulasa extendió la temperatura óptima (en un rango de 50-70 °C) y el rango de pH (de 3.5 a 6), también mejoró la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada.

Para incrementar la estabilidad operacional de enzimas y convertir el proceso industrialmente viable, Cho *et al.*<sup>47</sup> sugieren la inmovilización de celulasas en NPM de sílice dopadas con oro. Se demostró un significativo incremento en la termoestabilidad de enzimas en comparación con la enzima libre y se mantuvo una actividad residual de 85% después de 7 ciclos catalíticos.

### Inmovilización de enzimas ligninolíticas

La enzima lacasa ha sido exitosamente inmovilizada en diversos tipos de soportes.<sup>29,96-98</sup> Wang *et al.*<sup>96</sup> reportan la inmovilización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus* mediante su adsorción en una matriz magnética no-porosa (tamaño micrométrico) recubierta por un polímero multifuncional, realizada en presencia de iones de cobre. El proceso se caracterizó por una mayor adsorción en el punto isoeléctrico de la enzima (pH 3) y una actividad de 68% de la enzima libre aplicada para la inmovilización.

A la fecha existen pocos reportes de su inmovilización en nanopartículas magnéticas,<sup>97,98</sup> los cuales han permitido mejorar la estabilidad de la enzima y su reutilización, algunos ejemplos son mostrados en la (Tabla 4).

### Inmovilización de otras enzimas lignocelulolíticas

A la fecha no existen reportes de inmovilización de xilanasas sobre NPM, sin embargo, se han obtenido buenos resultados en su inmovilización sobre oro nanoporoso,<sup>24</sup> obteniendo un biocatalizador muy activo y estable, con la capacidad de retener el 60% de la actividad inicial, incluso después de 10 ciclos. Por otro lado, Dhiman *et al.*<sup>99</sup> reportan la inmovilización de xilanasas de *Pholiota adiposa* sobre nanopartículas de SiO<sub>2</sub> y su uso en la obtención de xilooligosacáridos. Al comparar con la enzima libre, el preparado inmovilizado retuvo 97% de su actividad incluso después de 17 ciclos y aumento en un 45% la producción de xilooligosacáridos.

El uso de los preparados de enzimas lignocelulolíticas inmovilizadas sobre NPM ha permitido realizar operaciones continuas en la hidrólisis enzimática de sustratos comerciales (CMC, celulosa microcristalina, etc.) y algunos sobre biomasa lignocelulósica.<sup>94,95</sup>

En ambos casos se mejora el rendimiento de azúcares fermentables, debido a la capacidad de reuso y retención de actividad por varios ciclos de los preparados enzimáticos.

### CONCLUSIONES

El empleo de enzimas lignocelulíticas inmovilizadas presenta ventajas tecnológicas y económicas frente a las enzimas solubles, principalmente por su mayor estabilidad, ahorro de energía, capacidad de rehusó y separación del producto final. Un novedoso y prometedor soporte para su inmovilización, son las nanopartículas magnéticas debido a que se aumenta el área de superficie por unidad de volumen y se disminuyen limitaciones de difusión, lo que favorece la biodegradación de biomasa lignocelulósica. Así mismo, su carácter magnético ofrece una solución a los problemas de separación del biocatalizador, siendo manipuladas y recuperadas fácilmente aplicando un campo magnético externo.

A la fecha existen algunos reportes de la inmovilización de enzimas lignocelulíticas sobre NPM, enfocados principalmente a la caracterización de los preparados inmovilizados. Sin embargo, actualmente no existen reportes de la aplicación de enzimas inmovilizadas sobre NPM, en el proceso global de obtención de bioetanol.

Es un área de oportunidad científica y tecnológica, el mejorar y/o optimizar las técnicas de inmovilización de enzimas lignocelulíticas, lo que permitirá ofrecer nuevas perspectivas para su aplicación en el pretratamiento e hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol lignocelulósico.

### REFERENCIAS

- Zhang, Y.; Himmel, M. J.; *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 452.
- Kumar, S.; Gupta, R.; Lee, Y. Y.; Gupta, R. B.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1337.
- Saha, B. C. En *Lignocellulose Biodegradation*; Saha, B. C.; Hayashi, K., eds.; American Chemical Society Symposium Series: Washington, 2004.
- Hendriks, A. T. W.; Zeeman, G.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 10.
- Gupta, R.; Mehta, G.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C.; *Biodegradation* **2011**, *22*, 797.
- Singh, B. D.; *Biotechnology: Expanding horizons*, Kalyani Publishers: India, 2009.
- Pandey, A.; Larroche, C.; Soccol, C. R.; En *Advances in fermentation technology*; Dussap, C. G., ed.; Editorial Asiatech publisher: New Delhi, 2008.
- González-Bacero, J.; Rodríguez, J. H.; Monte, A. M. D.; *Revista Colombiana de Biotecnología* **2010**, *12*, 124.
- Medina-Morales, M. A.; Lara, L. F.; Aguilar, C. N.; De la Garza-Toledo, H.; *Acta Química Mexicana* **2011**, *6*, 35.
- Miletić, N.; Nastasović, A.; Loos, K.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 126.
- Hsieh, C.; Yang, F. C.; *Bioresour. Technol.* **2004**, *91*, 105.

12. Graminha, E. B. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirota, R. D. P. B.; Balsalobre, M. A. A.; Da-silva, R.; Gomez, E.; *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *144*, 1.
13. Castro-Martínez, C.; Valverde-González, M. L.; Paredes-López, O.; *Ide@s CONCYTEG* **2009**, 1246.
14. Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van-Zyl, W. H.; Pretorius, I. S.; *Microbiol. Mol. Biol.* **2002**, *66*, 506.
15. Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Lidén, G.; *Biotechnol. Biofuels* **2008**, *1*.
16. Dashtban, M.; Maki, M.; Leung, K. T.; Mao, C.; Qin, W.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *4*, 302.
17. Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 345.
18. Sun, Y.; Cheng, J.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 1.
19. Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1549.
20. Saha, B. C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 279.
21. Ballesteros, M.; *Investigación y Ciencia* **2006**, 78.
22. Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; DelaRubia, T.; Martínez, J.; *Int. Microbiol.* **2002**, *5*, 53.
23. Biely, P. En *Hemicellulose and hemicellulases*; Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. P., eds.; Portland Press: London, 1993.
24. Yan, X.; Wang, X.; Zhao, P.; Zhang, Y.; Xu, P.; Ding, Y.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *161*, 1.
25. Fengel, D.; Wegener, G. W.; *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter: Berlin, 1984.
26. Andreu-Navarro, A.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *713*, 1.
27. Gutiérrez, A.; Rencoret, J.; Cadena, E. M.; Rico, A.; Barth, D.; DelRío, J. C.; Martínez, Á. T.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *119*, 114.
28. Netto, C. G. C.; Toma, H. E.; Andrade, L. H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85-86*, 71.
29. Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M. A.; Moldes, D.; *Biotechnol. Adv.* **2012**.
30. Moilanen, U.; Kellock, M.; Galkin, S.; Viikari, L.; *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *49*, 492.
31. Gayosso, M.; Leal, E.; Rodríguez, R.; *Revista Iberoamericana* **2004**, *23*, 76.
32. Pinzón, C.; *Tesis de Maestría*, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2004.
33. Silva, S. R.; González, A. E. B.; Villar, J. C. G.; *Congreso Iberoamericano de Investigación de Celulosa y Papel*, Universidad de Chile, 2002.
34. Cao, L.; *Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Application and Design*, Wiley-VCH: Baden-Württemberg, 2005.
35. Fajardo-Ochoa, R.; Osuna-Castro, J.; Velázquez-Mendoza, C.; Escalante-Minakata, P.; Ibarra-Junquera, V.; *Acta Química Mexicana* **2011**, *3*, 42.
36. Arroyo, M.; *Ars Pharmaceutica* **1998**, *39*, 23.
37. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
38. Husain, Q.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30*, 41.
39. Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S.; *3 Biotech* **2012**, doi 10.1007/s13205-012-0071-7.
40. Spahn, C.; Minter, S. D.; *Recent Patents on Engineering* **2008**, *2*, 195.
41. Elnashar, M. M.; *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2010**, *1*, 61.
42. Tran, D. N.; Balkus, K. J.; *ACS Catalysis* **2011**, *1*, 956.
43. Singh, P.; Gupta, N.; Anthwal, A.; Pandey, A. En *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*; Singh, P.; Pandey, A., eds.; Springer: Dordrecht, 2009.
44. Mitchell, D. T.; Lee, S. B.; Trofin, L.; Li, N.; Nevanen, T. K.; Soderlund, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11864.
45. Mao, X.; Guo, G.; Huang, J.; Du, Z.; Huang, Z.; Ma, L.; Li, P.; Gu, L.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 189.
46. Afsahi, B.; Kazemi, A.; Kheirolloom, A.; Nejati, S.; *Scientia Iranica* **2007**, *14*, 379.
47. Cho, E. J.; Jung, S.; Kim, H. J.; Lee, Y. G.; Nam, K. C.; Lee, H.-J.; Bae, H.-J.; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 886.
48. Dinçer, A.; Telefoncu, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *45*, 10.
49. Li, C.; Yoshimoto, M.; Fukunaga, K.; Nakao, K.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1366.
50. Liao, H.; Chen, D.; Yuan, L.; Zheng, M.; Zhu, Y.; Liua, X.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 600.
51. Daoud, F. B. O.; Kaddour, S.; Sadoun, T.; *Colloids Surf. B* **2010**, *75*, 93.
52. Hirsh, S. L.; Bilek, M. M. M.; Nosworthy, N. J.; Kondyurin, A.; Dos-Remedios, C. G.; McKenzie, D. R.; *Langmuir* **2010**, *26*, 14380.
53. Alkhatib, M.; Abd, R. M.; Alam, M. Z.; Saleh, H. M.; *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 18811.
54. Abd, R. M.; Nour, A. H.; *Int. J. Phys. Sci.* **2012**, *7*, 841.
55. Das, S.; Berke-Schlessel, D.; Hai-Feng, J.; McDonough, J.; Wei, Y.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 49.
56. Araújo, J. H. B.; Uemura, V. O.; Moraes, F. F.; Barbosa, A. M.; Zanin, G. M.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48*, 1.
57. Zhang, J.; Liu, X.; Xu, Z.; Chen, H.; Yang, Y.; *Int. Biodeter. Biodegr.* **2008**, *61*, 351.
58. Phetsom, J.; Khammuang, S.; Suwannawong, P.; Sarnthima, R.; *J. Biol. Sci.* **2009**, *9*, 573.
59. Huajun, Q.; Caixia, X.; Xirong, H.; Yi, D.; Yinbo, Q.; Peiji, G.; *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 2521.
60. Montereali, M. R.; Seta, L. D.; Vastarella, W.; Pilloton, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 189.
61. Georgieva, S.; Godjevargova, T.; Mita, D. G.; Diano, N.; Menale, C.; Nicolucci, C.; Carratelli, R.; Mita, L.; Golovinsky, E.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 210.
62. Gubin, S. P.; Koksharov, Y.; Khomutov, G. B.; *Russ. Chem. Rev.* **2005**, *74*, 489.
63. Ali, M.; Winterer, M.; *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 85.
64. Mozafari, M. R.; Khosravi-Darani, K.; Borazan, G. G.; Cui, J.; Parda-khty, A.; Yurdugul, S.; *Int. J. Food Prop.* **2008**, *11*, 833.
65. Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P.; *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 639.
66. Xie, T.; Wang, A.; Huang, L.; Li, H.; Chen, Z.; Wang, Q.; Yin, X.; *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 4724.
67. Moghaddam, A. B.; Nazari, T.; Badraghi, J.; Kazemzad, M.; *Int. J. Electrochem. Sci.* **2009**, *4*, 247.
68. Zhao, F.; Zhang, B.; Feng, L.; *Mater. Lett.* **2012**, *68*, 112.
69. Dussán, M. K.; *Tesis de Maestría*, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia, 2008.
70. Rossi, L. M.; Garcia, M. A. S.; Vono, L. L. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1959.
71. Gao, J. H.; Gu, H. W.; Xu, B.; *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1097.
72. Beveridge, J.; Stephens, J.; Williams, M.; *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2011**, 251.
73. Osuna, Y.; Gregorio-Jauregui, K. M.; Gaona-Lozano, J. G.; De la Garza-Rodríguez, I. M.; Ilyna, A.; Barriga-Castro, E. D.; Saade, H.; López, R. G.; *Journal of Nanomaterials* **2012**, *Vol. 2012*, 7 pages.
74. Lu, A.; Salabas, E. L.; Schuth, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222.
75. Hong, R.; Li, J.; Wang, J.; Li, H.; *China Particuology* **2007**, *5*, 186.
76. Oliveira, L. C. A.; Fabris, J. D.; Pereira, M. C.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 123.
77. Gregorio-Jauregui, K. M.; Rivera-Salinas, J. E.; Saade-Caballero, H.; López-Campos, R. G.; Martínez-Hernández, J. L.; Ilyna, A. En *Química Hoy, tópicos selectos de investigación*, U. A. de C.: Coahuila, 2012.
78. Gregorio-Jauregui, K. M.; *Tesis de Doctorado*, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila., Coahuila, México, 2012.
79. Bornscheuer, U. T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336.
80. Liu, X.; Lei, L.; Li, Y.; Zhu, H.; Cui, Y.; Hu, H.; *Biochem. Eng. J.* **2011**, *56*, 142.

81. Wei, Y.; Han, B.; Hu, X.; Lin, Y.; Wang, X.; Deng, X.; *Procedia Eng.* **2012**, *27*, 632.
82. Sharma, A.; Qiang, Y.; Antony, J.; Meyer, D.; Kornacki, P.; Paszczynsk, A.; *IEEE Trans. Magn.* **2007**, *43*, 2418.
83. Belessi, V.; Zboril, R.; Tucek, J.; Mashlan, M.; Tzitzios, V.; Petridis, D.; *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 3298.
84. Li, G.-y.; Jiang, Y.-r.; Huang, K.-l.; Ding, P.; Chen, J.; *J. Alloys Compd.* **2008**, *466*, 451.
85. Braun, J.; Le-Chaun, P.; Le-Goffic, F.; *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33*, 242.
86. Ansari, S. A.; Husain, Q.; *Biotechnol Adv.* **2012**, *30*, 512.
87. Ansari, S. A.; Husain, Q.; *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2107.
88. Kouassi, G. K.; Irudayaraj, J.; McCarty, G.; *J. Nanobiotechnol.* **2005**, *3*, 1.
89. Kalkan, N. A.; Aksoy, E. A.; Aksoy, S.; Hasirci, N.; *Nanotr6 Conference*, 2009.
90. Franzreb, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 505.
91. Bhinder, S. S.; Dadra, P.; *Asian J. Chem.* **2009**, *21*, 167.
92. Khoshnevisan, K.; Bordbar, A. K.; Zare, D.; Davoodi, D.; Noruzi, M.; Barkhi, M.; M. Tabatabaei; *Chem. Eng. J.* **2011**, *171*, 669.
93. Jordan, J.; Kumar, C. S. S.; Theegala, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 139.
94. Xu, J.; Huo, S.; Yuan, Z.; Zhang, Y.; Xu, H.; Guo, Y.; Liang, C.; Zhuang, X.; *Biocatal. Biotransform.* **2011**, *29*, 71.
95. Alfrén, J.; Hobley, T.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169*, 2076.
96. Wang, F.; Guo, C.; Liu, H.-Z.; Liu, C.-Z.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 97.
97. Fang, H.; Huang, J.; Ding, L.; Li, M.; Chen, Z.; *J. Wuhan Univer. Technol.* **2009**, *24*, 42.
98. Wang, F.; Guo, C.; Yang, L.; Liu, C.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8931.
99. Dhiman, S.; Jagtap, S.; Jeya, M.; Haw, J.-R.; Kang, Y.; Lee, J.-K.; *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 1307.