

# BIOSORCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRITA DE MANGANESO A *RHODOTORULA TORULOIDES* PARA LA MEJORA DE PROCESOS BIOCATALÍTICOS DE PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS INTRA Y EXTRACELULARES

ARHEMI B. MINOR  
VALDÉS<sup>1</sup>

DANIEL I. MARTÍNEZ  
DENA<sup>1</sup>

HÉCTOR G. DE LEÓN  
CALVILLO<sup>1</sup>

NAYRA OCHOA VIÑALS<sup>1</sup>

DANIA ALONSO ESTRADA<sup>1</sup>

ARIAL GARCÍA CRUZ<sup>2</sup>

JOSÉ L. MARTÍNEZ  
HERNÁNDEZ<sup>1</sup>

ANNA ILINÁ<sup>1</sup>

RODOLFO RAMOS  
GONZÁLEZ<sup>3</sup>

1. Facultad de Ciencias  
Químicas, Unidad Sureste,  
UAdeC.

2. Tecnológico Nacional de  
México, Saltillo, Coah.

3. CONAHCYT, UAdeC.

Correspondencia  
rodolfoamos@uadec.edu.mx  
ORCID: 000-0003-0501-907X

BIOSORPTION OF MAGNETIC MANGANESE FERRITE NANOPARTICLES TO *RHODOTORULA TORULOIDES* FOR THE IMPROVEMENT OF BIOCATALYTIC PROCESSES FOR THE PRODUCTION AND EXTRACTION OF INTRA AND EXTRACELLULAR METABOLITES

## RESUMEN

En el presente estudio se analizaron procesos bionanotecnológicos de obtención de invertasa extracelular y carotenos dentro de membranas de levadura *Rhodotorula toruloides*. Se sintetizaron y se caracterizaron (mediante difracción de rayos X, DLS, magnetometría, TEM) las NPM de ferrita de manganeso recubiertas con quitosano ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ) y funcionalizadas mediante unión covalente con bioligandos de afinidad a la invertasa y carotenos, Con A y caseína, respectivamente. Se analizaron cinética e isoterma de adsorción de la levadura en las  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ . El equilibrio de la adsorción se observó después de 2 h de interacción. La isoterma se ajustó al modelo de Freundlich. Se observó un aumento en la producción de enzima invertasa y carotenoides en fermentación por adhesión a superficie (FAS) con 1 mg/mL y 2 mg/mL de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ , respectivamente. Se comprobó la capacidad de biomasa inmovilizada en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  para producir la invertasa en diferentes ciclos de fermentación. La invertasa se purificó mediante adsorción en NPM con concanavalina A obteniendo catalizador inmovilizado con mejores propiedades operacionales. Se definieron las condiciones para la desorción de enzima con metil-alfa-D-manopiranosido. Los carotenos fueron extraídos utilizando NPM con caseína. Se demostró que el tratamiento con la hipertermia magnética es un método novedoso para la ruptura

de células y la liberación de metabolitos intracelulares. Las NPM funcionalizadas son una herramienta prometedora para innovar procesos de producción y purificación de metabolitos de interés biotecnológico.

**Palabras clave:** biofuncionalización de materiales nanoestructurados; interacción de *R. toruloides* y sus metabolitos con nanopartículas funcionalizadas; hipertermia magnética inducida; separación y extracción magnética.

## ABSTRACT

*The study analyzed bionanotechnological processes for obtaining extracellular invertase and carotenes within Rhodotorula toruloides yeast membranes. Chitosan-coated manganese ferrite NPMs ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ) and functionalized by covalent bonding with invertase and carotene affinity bioligands, Con A and casein, respectively, were synthesized and characterized (by X-ray diffraction, DLS, magnetometry, TEM). The adsorption kinetics and isotherm of the yeast on the  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  were analyzed. The adsorption equilibrium was observed after 2 h of interaction. The isotherm was fitted to the Freundlich model. An increase in the production of invertase enzyme and carotenes was observed in surface attachment fermentation (SAF) with 1 mg/mL and 2 mg/mL of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ , respectively. The capacity of biomass immobilized in  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  to produce invertase in different fermentation cycles was verified. Invertase was purified by adsorption on NPM with concanavalin A, obtaining an immobilized catalyst with better operational properties. The conditions for enzyme desorption with methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside were defined. Carotenoids were extracted using NPM with casein. Treatment with magnetic hyperthermia was shown to be a novel method for cell disruption and release of intracellular metabolites. Functionalized NPM is a promising tool to innovate processes for producing and purifying metabolites of biotechnological interest.*

**Keywords:** biofunctionalization of nanostructured materials; interaction of *R. toruloides* and their metabolites with functionalized nanoparticles; induced magnetic hyperthermia; magnetic separation and extraction.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de nanomateriales en el ámbito de procesos biotecnológicos es un campo en desarrollo activo que abarca aspectos muy variados. La mayor parte de estudios se enfocan a la aplicación de sistemas nanoestructurados como soportes para la inmovilización de enzimas y proteínas (Perçin y col., 2024), mejorando sus propiedades operacionales (Ahmad y col., 2022). Sin embargo, hay pocos estudios sobre la innovación en procesos de fermentación y procedimientos de extracción basándose en separación magnética de biomasa y moléculas biológicas que interactúan con conjugados de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con moléculas biológicas (Taghizadeh y col., 2022). La biofuncionalización de nanomateriales magnéticos comprende la modificación de la superficie de nanopartículas con biocompuestos que proporcionan grupos disponibles para adsorción de moléculas y/o estructuras biológicas o para activación (como -OH o -NH<sub>2</sub> en el caso de quitosano). Esto facilita la unión de ligandos de afinidad mediante enlaces covalentes, como la interacción de heparina con lipasas, monosacáridos con lectinas, así como en el presente estudio concanavalina A (Con A) afín a la invertasa y caseína con carotenos. La innovación de procesos de fermentación por adhesión a superficie (FAS) de NPM implica a menudo el aumento en la producción de metabolitos extracelulares y enzimas, reúso de biomasa en varios ciclos de la fermentación, simplifica la separación de productos y biocatalizadores.

El uso de los bionanomateriales magnéticos bajo campo magnético inducido en la hipertermia magnética como la herramienta emergente en los procesos de liberación de los metabolitos intracelulares es un área novedosa y no estudiada en el ámbito biotecnológico. Se conoce uso de hipertermia magnética en tratamiento de cáncer con el uso de resonancia magnética (Szwed & Marczak, 2024), pero no en procesos biotecnológicos de purificación. Dado que el costo de purificación representa el 50-80% del costo final del producto biotecnológico (Savvidou y col., 2022) utilizar ligandos de afinidad en la biofuncionalización de nanomateriales para técnicas de extracción magnética podría ser un avance importante. Esta estrategia podría reemplazar la cromatografía de afinidad, permitiendo procesar

grandes volúmenes de extractos crudos y reducir la cantidad de agua utilizada en la purificación.

En el presente estudio los conceptos de aplicación de bionanomateriales magnéticos en fermentación por adhesión a superficie, hipertermia magnética inducida y extracción magnética selectiva se muestran en el caso de procesos bionanotecnológicos de obtención de invertasa extracelular y carotenos contenidos en las membranas de levadura *R. toruloides* (recientemente aislada de melaza de caña de azúcar e identificada a nivel molecular).

El problema central que aborda esta investigación está relacionado con la innovación de procesos de la producción de carotenos e invertasa de *R. toruloides* y su extracción mediante métodos novedosos basados en la presencia de nanopartículas magnéticas funcionalizadas. En la actualidad existe controversia en cuanto al beneficio y factibilidad del uso de bionanomateriales en la obtención de productos biotecnológicos de valor agregado. El estudio realizado ayuda a promover y consolidar este enfoque dentro del campo. La separación y purificación de biomoléculas es un tema relevante que ha encontrado diversas dificultades con las técnicas convencionales, las cuales requieren de procesos de lisis celular y filtración, aumentando los costos del proceso, y la utilización de solventes apolares, los cuales son caros y poco amigables con el ambiente. Es por esto que las metodologías actuales podrían ser mejoradas con el uso de bionanoconjugados. La utilización de NPM para la extracción de productos de interés biotecnológico es una de las "promesas" más viables de la bionanotecnología, a pesar de esto, son relativamente pocos los estudios exitosos reportados a la fecha (Flieger y col., 2024). Debido a esto el desarrollo de bionanomateriales para la extracción de invertasa y carotenos en una levadura poco explorada hace ciertamente meritoria la generación de conocimientos nuevos.

Los objetivos del presente estudio son obtener y caracterizar los nanosistemas magnéticos funcionalizados con biomoléculas para la posible innovación de los procesos de producción y extracción de carotenos e invertasa (metabolitos intra- y extracelulares) de *R. toruloides* mediante fermentación por adhesión a superficie de nanoestructuras magnéticas, hipertermia magnética inducida y separación magnética mediada por interacción con ligandos de

afinidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE MANGANESO FUNCIONALIZADAS CON QUITOSANO, CON CASEÍNA Y CON CONCAVALINA A

Se sintetizaron nanopartículas de ferrita de manganeso recubiertas con quitosano ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ) mediante el método de coprecipitación en un solo paso. Se mezclaron  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en una relación molar 2:1 (p/p) y el quitosano al 0.125% (p/v), 300 rpm a 70 °C y se ajustó el pH 9 con NaOH (8 M). La mezcla se sometió a tratamiento hidrotermal durante 5 h. Luego se recolectó el precipitado con un magneto, se lavó hasta obtener pH neutro y se secó a 28 °C. Para la unión covalente de ligandos de afinidad, las  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  se activaron con periodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) a 20 mM, 120 rpm por 30 min, en oscuridad (Crăciunescu y col., 2021). Para la funcionalización de las NPM con caseína ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@Cas}$ ) y con concanavalina A ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$ ), las  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  activadas se mezclaron con la solución de caseína o Con A a 1 mg/mL, a 25 °C y 100 rpm. La concentración de proteínas no inmovilizadas se evaluó por el método de Bradford (Bradford, 1976), en las muestras obtenidas después de precipitación de bionanoconjugado con el magneto cada 1 h.

### CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La difracción de rayos X se evaluó en un difractómetro Rigaku Ultima IV con radiación  $\text{CuK}\alpha$  y los tamaños de cristalitos se estimaron mediante la ecuación de Scherrer. Las propiedades magnéticas se analizaron en un magnetómetro vibratorio de Quantum Design, modelo 6000. Tamaño hidrodinámico de bionanoconjugados se estimó por dispersión dinámica de luz (DLS) en un NANO-flex 180° DLS. La morfología y el análisis elemental de las NMP se realizaron con un HRTEM FEI Titan y espectroscopía EDX.

### CARACTERIZACIÓN DE INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS DE LEVADURA Y $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$

Se preparó el inóculo de *R. toruloides* en caldo YPD a 30 °C y 200 rpm por 24 h. Se realizó el ensayo cinético con 5 mL de solución salina

(NaCl a 0.9%) con una concentración celular de  $1.4 \times 10^{+07}$  y 10 mg/mL de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ , a 200 rpm y 30 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Las células libres se contaron cada 30 min después de la precipitación magnética del complejo nanopartículas y biomasa. Se determinó el tiempo de equilibrio. Las células inmovilizadas en las NPM se estudiaron por microscopía (SEM). La isoterma de adsorción se obtuvo variando la concentración de las células, a 30 °C, 200 rpm separando las células adsorbidas con imán después de 3 h con 10 mg/mL de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ . Las células fueron contadas antes y después de la adsorción.

#### PRODUCCIÓN DE INVERTASA Y CAROTENOIDES A PARTIR DE *R. TORULOIDES* EN FS Y FAS

El medio de fermentaciones contenía: sacarosa (70 g/L), extracto de levadura (3.0 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4 g/L), y  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (1.5 g/L). Los procesos se realizaron a 30 °C y 200 rpm por 144 h para producción de carotenoides y 36 h para la producción de invertasa, tiempos correspondientes a mayor producción. La FAS se realizó con la adición de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  a diferentes concentraciones. El crecimiento fue evaluado por el conteo de las células en cámara de Neubauer con inóculo inicial de  $2.2 \times 10^6$  células/mL. La actividad invertasa se evaluó mediante la técnica de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico (DNS) (Fulaz y col., 2021). En la FS la biomasa de levadura se separó por centrifugación a 12500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se consideró extracto enzimático crudo. En FAS la biomasa inmovilizada se separó con un campo magnético, y luego se centrifugó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). El contenido total de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) se determinó espectrofotométricamente por la metodología descrita por Zheng y col. (2021).

#### REÚSO DE CÉLULAS DE *R. TORULOIDES* PRECIPITADAS CON $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ EN FAS

Se realizó la FAS en condiciones óptimas de producción de invertasa. Se recuperaron las células inmovilizadas utilizando un imán cada 36 h, el sobrenadante se separó por decantación, y se añadió medio fresco correspondiente a otro ciclo de fermentación. Además, considerando que durante la fermentación la interacción entre las NPM y las células puede sufrir cambios, se incrementó la concentración de

NPM adicionando 0.25 mg/mL en cada ciclo de reúso. La actividad enzimática se determinó en cada ciclo de reúso (Fulaz y col., 2021). La concentración de células libres e inmovilizadas se evaluó mediante conteo en cámara Neubauer.

#### EXTRACCIÓN DE INVERTASA CON $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@CONA}$

Para inmovilizar la invertasa de *R. toruloides*, se mezclaron 5 mL de extracto crudo con 0.20 g de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q@Con A}$  a 25 °C, 150 rpm por 30 min. El precipitado se lavó con solución de acetato de sodio 10 mM a pH 5.5 para eliminar la enzima débilmente unida y se almacenó a 4 °C. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y actividad enzimática por DNS (Fulaz y col., 2021). La desorción de invertasa se realizó adicionando el bionanoconjugado en la solución 1 M de metil- $\alpha$ -D-manopiranosido (MMP) con 0.68 M NaCl a 120 rpm por 1 h a 50 °C (condiciones definidas como mejores para desorción – resultados de ensayos no se presentan).

#### EXTRACCIÓN DE CAROTENOS CON $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@CAS}$

Los estudios de adsorción de carotenos se realizaron con diferentes concentraciones de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@Cas}$  en 2 ml de extracto de carotenoides. Aplicando un campo magnético se precipitó el nanoconjugado con caroteno extraído. La fracción no extraída se cuantificó mediante las mediciones espectrofotométricas a 450 nm, cada 10 min durante 2 h. Se calculó la cantidad de caroteno adsorbido (mg/g de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@Cas}$ ). La recuperación de carotenos de complejo con caseína se logró adicionando 0.5 mL de hexano.

#### HIPERTERMIA MAGNÉTICA INDUCIDA

Perfiles de calentamiento a diversas concentraciones de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  se evaluaron en las suspensiones de *R. toruloides* ( $10^9$  células/mL) adicionando  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  a 1, 2, 5 y 10 mg/mL. Se empleó un sistema de calentamiento por inducción a bajas frecuencias y un termómetro óptico. Se realizaron tres ciclos de hipertermia de 20 min cada ciclo a 10 V y 231 kHz. Se realizó conteo celular en la cámara de Neubauer con azul de tripano a 0.4 % (p/v).

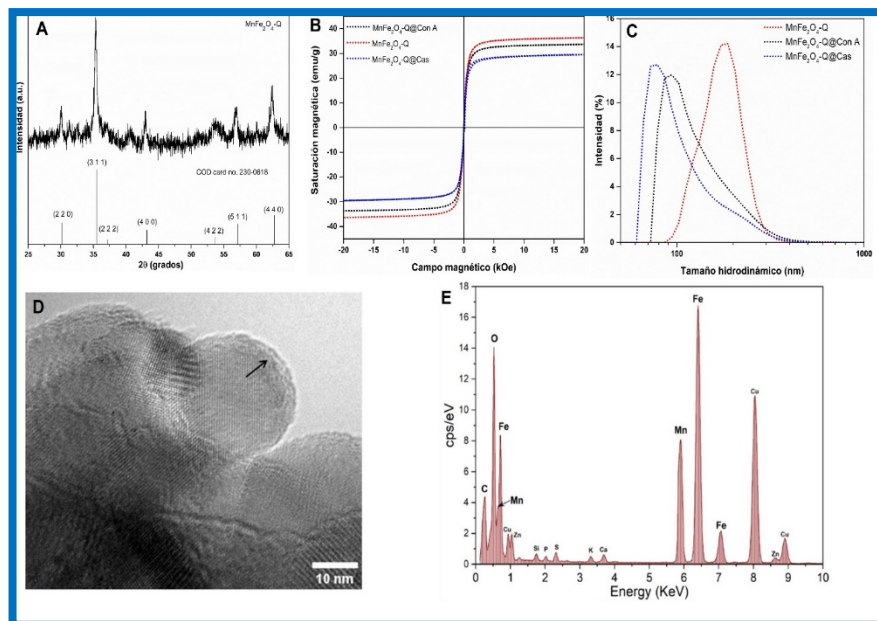
#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron usando ANOVA y la prueba de rango de

Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , y se graficaron con el software Origin 2024.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

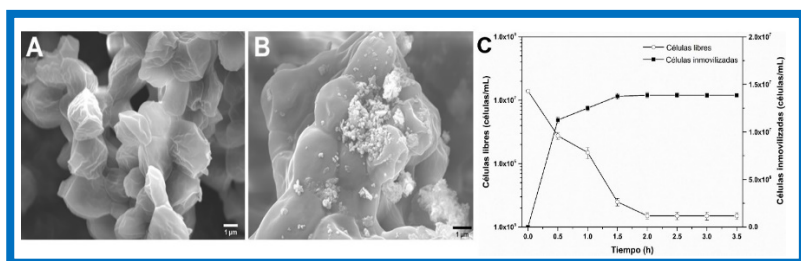
La Figura 1 muestra la caracterización de NPM funcionalizadas. Los patrones de difracción de rayos X (Figura 1A) corresponden a los picos de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  indexado a los planos (1 1 1), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0), confirmando la estructura cúbica y monofásica de espinela (COD No.2300618). El tamaño de la cristalita calculado en el pico de mayor intensidad fue de 20 nm. La Figura 1B muestra las curvas de histéresis, con valores de saturación magnética ( $M_s$ ) de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@Cas}$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$  de 36, 29, y 34 emu/g, respectivamente. Los tamaños hidrodinámicos promedio (Figura 1C), son 167 nm para  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ , 79 nm para  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@Cas}$  y 101 nm para  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$ . La Figura 1D muestra imágenes HRTEM del material recubierto de quitosano, revelando partículas irregulares con un diámetro promedio de  $\sim 22$  nm, que coincide con lo calculado por DRX. En la superficie de la NPM se observa una fase amorfa de quitosano (marcada con una flecha) con un espesor de 2 nm. La Figura 1E muestra el espectro EDX de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  confirmando la presencia de picos correspondientes a manganeso, hierro, oxígeno y carbono, consistente con la estructura de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  con recubrimiento de quitosano y relación atómica de Fe/Mn de 2.03, cercana al valor estequiométrico de  $\text{Fe/Mn} = 2$ .



**Figura 1.** Caracterización de las nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  funcionalizadas: (A) patrones XRD de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ; (B) Magnetización de NPM funcionalizadas; (C) tamaño hidrodinámico de NPM funcionalizadas; (D) micrografía HRTEM de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ ; (E) espectro EDX de la composición elemental de la  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$

#### CARACTERIZACIÓN DE INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS DE LEVADURA Y $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$

La interacción de la  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  y *R. toruloides* se visualizó mediante el SEM (Figura 2). Las células libres tienen superficie lisa y formas ovaladas (Figura 2A), mientras que las células inmovilizadas en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  tienen una apariencia rugosa con NPM adheridas en varias partes de la superficie celular (Figura 2B). La Figura 2C presenta las cinéticas de cambio de concentración de células libres e inmovilizadas en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  alcanzando equilibrio después de 2 h de interacción.



**Figura 2.** Micrografías SEM de células de *R. toruloides* (A); células de *R. toruloides* después de la adsorción en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  (B); cinéticas de la adsorción de *R.*

*toruloides* en MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Q (C).

El comportamiento sigue una cinética de primer orden, con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) más cercano a 1 en la función lineal de primer orden (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros determinados en el análisis de la cinética e isoterma de adsorción de *R. toruloides* en MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-.

| Modelos                                   | Ecuaciones                                                        | Parámetros                   | MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Q                                    |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Cinética de pseudo primer orden           | $\ln(C_t) = \ln C_i - k_1 t$                                      | Función lineal               | $y = -2.294x + 16.264$<br>$R^2 = 0.971$<br>$k_1 = 2.94 \text{ h}^{-1}$ |
| Cinética de pseudo segundo orden          | $\frac{1}{C_t} = k_2 t + \frac{1}{C_i}$                           | Función lineal               | $y = 3\text{E-}06x - 1\text{E-}06$<br>$R^2 = 0.850$                    |
| Freundlich<br>[Ln $q_e$ versus Ln $C_e$ ] | $n q_e = \ln K_F + \left(\frac{1}{n}\right) \ln C_e$              | $K_F$<br>$n$<br>$1/n$        | 1.25E+08<br>2.99<br>0.33                                               |
| Langmuir<br>[1/ $q_e$ versus 1/ $C_e$ ]   | $\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max} K_L C_e}$ | $K_L$<br>$q_{\max}$<br>$R^2$ | 2.50E-06<br>5.00E+09<br>0.781                                          |

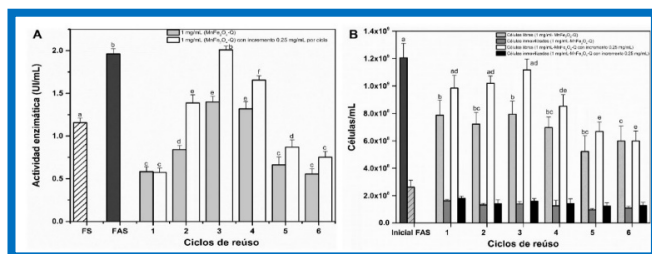
\*Donde  $C_t$  es la concentración de biomasa en el tiempo  $t$ ;  $t$  es el tiempo de incubación;  $C_e$  es la concentración de células en equilibrio (células/mL);  $k_1$  y  $k_2$  son constantes cinéticas de primer y segundo orden respectivamente;  $q_e$  es la cantidad de biomasa adsorbida en NPM por unidad de peso en el equilibrio (células/g);  $q_{\max}$  es la capacidad máxima de adsorción;  $K_L$  es la constante de equilibrio de Langmuir;  $K_F$  y  $1/n$  son las constantes de Freundlich, para la capacidad de adsorción y la intensidad. Los valores de  $1/n$  indican la fuerza de adsorción, cuando  $1/n < 1$ , la adsorción es un proceso químico (parámetros  $1/n$  y  $K_F$  se calcularon a partir de la pendiente y la intersección del gráfico de Freundlich).

El análisis de isoterma de adsorción a 30°C en coordenadas de Langmuir y Freundlich (Tabla 1) demostró que la isoterma se ajusta al modelo de Freundlich ( $R^2=0.988$ ) lo que corresponde a la adsorción en una superficie heterogénea en multicapas (Giese y col., 2020).

#### PRODUCCIÓN DE INVERTASA DE *R. TORULOIDES* EN FS Y FAS CON REÚSO DE CÉLULAS PRECIPITADAS CON MNFE<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Q EN FAS

La producción de invertasa por *R. toruloides* en ambos sistemas de fermentación alcanza su máxima actividad a las 36 h. En FS, la actividad enzimática fue de  $1.33 \pm 0.05$  UI/mL, mientras que en FAS

con 1 mg/mL fue de  $1.88 \pm 0.04$  UI/mL (Figura 3A). Los cambios en la actividad invertasa se relacionan con la cantidad de biomasa al final de la fermentación. En FS se obtuvo  $6.1 \times 10^8$  células/mL, en FAS  $1.2 \times 10^9$  células/mL en suspensión libre y  $2.6 \times 10^8$  células/mL inmovilizadas (Figura 3B). Estos datos muestran una mayor proliferación de células en FAS. Las células inmovilizadas se utilizaron como inóculo para posteriores ciclos de la FAS. Análisis de resultados de reúso de biomasa inmovilizada muestra que la actividad invertasa y concentración celular varían en diferentes ciclos de fermentación (Figura 3 A y B). La actividad detectada en el primer ciclo de reúso fue menor en comparación con FAS inicial y FS (Figura 3A). Se observó un aumento en la actividad en los ciclos 2 y 3 con una diferencia significativa en cada ciclo de reúso sin adición y con adición de nanopartículas. La mayor actividad en los ciclos de reúso se observó en el ciclo 3 con adición de nanopartículas, sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a valor inicial observado en FAS. Después del tercer ciclo de reúso, la actividad disminuyó.



**Figura 3.** (A) Actividad invertasa en FS y diferentes ciclos de FAS de *R. toruloides* con MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Q a 1 mg/mL (barras grises) y 1 mg/mL con adición de 0.25 mg/mL en cada ciclo de reúso (barra blanca). (B) Concentraciones de células libres e inmovilizadas en FAS: inicial (primeras barras negra y gris claro rayada, respectivamente) y diferentes ciclos de reúso de biomasa con MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Q a 1 mg/mL (barras grises claro y oscuras, respectivamente) y 1 mg/mL con adición de 0.25 mg/mL en cada ciclo de reúso (barras blancas y negras, respectivamente).

Sin embargo, en ningún ciclo de reúso se logró obtener las concentraciones de biomasa similares a la fermentación inicial (Figura 3B). La adición de 0.25 mg/mL de NPM se reflejó en mayores niveles de la concentración de células libres, pero no inmovilizadas. Se observaron mayores niveles de concentración de levadura libre hasta el tercer ciclo de reúso, con diferencias estadísticas con y sin aumento de NPM. Después del tercer ciclo, se observó una disminución en los niveles de concentración de levadura sin una diferencia significativa entre los ciclos 5 y 6. Las tendencias cambiantes en la concentración

de células libres se correlacionan con la actividad enzimática (Figura 3A y B). Los resultados obtenidos muestran que en varios ciclos de FAS la interacción entre levadura y las NPM sufre un cambio que se refleja en las respuestas de crecimiento y producción de invertasa.

#### PRODUCCIÓN DE CAROTENOS A PARTIR DE *R. TORULOIDES* EN FS Y FAS

El contenido de carotenos de *R. toruloides* se determinó a las 144 h. La adición de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  en concentración de 1 a 2 mg/mL aumentó el contenido de carotenos y de biomasa en comparación con FS. Se logró un aumento de 2.48 veces en comparación con el control en presencia de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$  a 2 mg/mL (Tabla 2).

**Tabla 2.** Parámetros de la fermentación de *R. toruloides* con de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q}$ .

| NPM (mg/mL) | Biomasa (g/L)      | Carotenos Totales ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|-------------|--------------------|---------------------------------------|
| 0           | $14.30 \pm 0.23^a$ | $93.5 \pm 9.2^a$                      |
| 0.5         | $12.50 \pm 1.32^a$ | $102.3 \pm 7.3^a$                     |
| 0.75        | $14.20 \pm 0.10^a$ | $139.1 \pm 12.7^{bc}$                 |
| 1.0         | $17.80 \pm 1.13^b$ | $168.7 \pm 15.3^{bc}$                 |
| 1.25        | $18.60 \pm 1.97^b$ | $152.3 \pm 21.8^{bc}$                 |
| 1.5         | $19.10 \pm 1.19^b$ | $162.1 \pm 11.9^{bc}$                 |
| 2.0         | $18.70 \pm 0.35^b$ | $275.5 \pm 6.1^c$                     |
| 5.0         | ND                 | ND                                    |

#### EXTRACCIÓN DE INVERTASA CON NANOSITEMA FUNCIONALIZADO CON CONCAVALINA A

La invertasa se inmovilizó mediante adsorción en el  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$ . La Tabla 3 muestra el rendimiento de inmovilización y la actividad de la invertasa de *R. toruloides* inmovilizada.

**Tabla 3.** Características de la inmovilización de invertasa en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$

| Nanosistema magnético                    | Enzima inmovilizada (%) | Actividad enzimática (UI/mL) | Enzima inmovilizada (mg proteína/g soporte magnético) |
|------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-Con A}$ | 88.4                    | 1.37                         | 2.4                                                   |

La invertasa inmovilizada en  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Q-@ConA}$  por adsorción puede ser utilizada en 25 ciclos catalíticos con disminución en actividad de

45%, mejora la estabilidad térmica y de almacenamiento, sin cambios significativos en pH y temperatura óptimos, y un ligero aumento en  $K_m$  (resultados no mostrados). Bajo las condiciones de elución de la invertasa del nanosistema magnético funcionalizado, se logró una desorción del 92 %. El método de extracción tuvo un rendimiento de 70% y factor de purificación de 23.4.

#### EXTRACCIÓN DE CAROTENOS CON NANOSISTEMA FUNCIONALIZADO CON CASEÍNA

Se evaluaron tres concentraciones de  $MnFe_2O_4$ -Q-@Cas para evaluar la capacidad para adsorción de los carotenos producidos por *R. toruloides*. La Tabla 4 muestra que cuanto mayor es la concentración de soporte magnético, mayor es la capacidad de adsorción. El estudio se llevó a cabo durante 2 h, sin embargo, el tiempo puede ser reducido hasta 45 min ya que a partir de este tiempo no hubo cambios en la absorbancia. Aumentando la concentración de  $MnFe_2O_4$ -Q-@Cas se logró extraer un 73.1 % de pigmentos.

**Tabla 4.** Adsorción de carotenos de *R. toruloides* con diferentes concentraciones de  $MnFe_2O_4$ -Q-@Cas

| $MnFe_2O_4$ -Q-@Cas<br>(g/mL) | Tiempo<br>(min) | Capacidad de<br>adsorción<br>(mg/g) | Caroteno<br>adsorbido<br>(%) |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 0.015                         | 120             | 4.19                                | 27.1                         |
| 0.03                          | 120             | 9.53                                | 54.3                         |
| 0.06                          | 120             | 12.77                               | 73.1                         |

## CONCLUSIONES

Se observaron los avances de investigación en materia de biorremediación de metales pesados en aguas residuales industriales por efecto de las BRS, en cuyos resultados demostraron la efectividad de aplicar este tipo de tratamiento biológico para la descontaminación de efluentes residuales. Si bien todas estas publicaciones en la literatura reportan diversos mecanismos de acción por parte de las BRS sobre los metales, el proceso de bio-precipitación promete ser uno de los mecanismos más efectivos para tal fin, puesto que la mayoría de los trabajos analizados en esta revisión han mencionado

sus ventajas con respecto a otros procesos. Por lo tanto, las proyecciones sobre la bio-precipitación de metales pesados causada por las BRS sugieren que continúe el desarrollo de este tipo de investigaciones, para dar soluciones tecnológicas y a su vez ecológicas, al grave problema de metales pesados en agua residual a nivel industrial.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado través de la beca nacional de posgrado con el número 1000741. Asimismo, por el apoyo técnico al programa de posgrado de doctorado Ciencia y Tecnología de Materiales perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por proveer las instalaciones, las herramientas electrónicas y los recursos necesarios para realizar esta revisión bibliográfica.

## REFERENCIAS

- Bagheri Novair, S., Biglari Quchan Atigh, Z., Asgari Lajayer, B., Shu, W., & Price, G. W. (2024). The role of sulphate-reducing bacteria (SRB) in bioremediation of sulphate-rich wastewater: Focus on the source of electron donors. *Process Safety and Environmental Protection*, 184: 190–207. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2024.01.103>
- Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2004). Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Research*, 38(11), 2726–2736. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.023>
- Castro, C., Urbieto, M. S., Plaza Cazón, J., & Donati, E. R. (2019). Metal biorecovery and bioremediation: Whether or not thermophilic are better than mesophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, 279: 317–326. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.02.028>
- Clyde, E. J., Champagne, P., Jamieson, H. E., Gorman, C., & Sourial, J. (2016). The use of a passive treatment system for the mitigation of acid mine drainage at the Williams Brothers Mine (California): Pilot-scale study. *Journal of Cleaner Production*, 130: 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.145>
- Das, M., & Adholeya, A. (2015). Potential Uses of Immobilized Bacteria, Fungi, Algae,

and Their Aggregates for Treatment of Organic and Inorganic Pollutants in Wastewater. *ACS Symposium Series*, 1206: 319–337. <https://doi.org/10.1021/BK-2015-1206.CH015>

Fakhri Heravi, M. R., Gharibi, H., Jaafari, J., Mesdaghinia, A., & Mahvi, A. H. (2017). Performance evaluation of sulfate reducing bacteria in removing lead, chromium and nickel by anaerobic packed bed reactor. *Desalination and Water Treatment*, 59: 154–159. <https://doi.org/10.5004/DWT.2016.1743>

Gopi Kiran, M., Pakshirajan, K., & Das, G. (2017). An overview of sulfidogenic biological reactors for the simultaneous treatment of sulfate and heavy metal rich wastewater. *Chemical Engineering Science*, 158: 606–620. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.11.002>

Gopi Kiran, M., Pakshirajan, K., & Das, G. (2018). Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: Mechanism and process optimization. *Journal of Environmental Management*, 218: 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.020>

Huang, Z., Wei, Z., Jiao, H., Chen, Z., Wu, Z., & Huang, W. (2022). Mechanistic insights into bio-stabilization of lead (II) in flue gas by a sulfate-reducing bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 450: 137564. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.137564>

Kolluru, S. S., Agarwal, S., Sireesha, S., Sreedhar, I., & Kale, S. R. (2021). Heavy metal removal from wastewater using nanomaterials-process and engineering aspects. *Process Safety and Environmental Protection*, 150: 323–355. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2021.04.025>

Li, R., Wang, B., Niu, A., Cheng, N., Chen, M., Zhang, X., Yu, Z., & Wang, S. (2022). Application of biochar immobilized microorganisms for pollutants removal from wastewater: A review. *Science of The Total Environment*, 837: 155563. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155563>

Li, X., Lan, S. ming, Zhu, Z. ping, Zhang, C., Zeng, G. ming, Liu, Y. guo, Cao, W. cheng, Song, B., Yang, H., Wang, S. fan, & Wu, S. hua. (2018). The bioenergetics mechanisms and applications of sulfate-reducing bacteria in remediation of pollutants in drainage: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158: 162–170. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.04.025>

Mehrotra, T., Dev, S., Banerjee, A., Chatterjee, A., Singh, R., & Aggarwal, S. (2021). Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5): 105920. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105920>

Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., & Livingston, A. (2000). Microbial Sulfate Reduction in a Liquid-Solid Fluidized Bed Reactor. In *Biotechnol Bioeng*

(Vol. 70).

- Nogueira, E. W., Gouvêa de Godoi, L. A., Marques Yabuki, L. N., Brucha, G., & Zamariolli Damianovic, M. H. R. (2021). Sulfate and metal removal from acid mine drainage using sugarcane vinasse as electron donor: Performance and microbial community of the down-flow structured-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 330: 124968. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124968>
- Peng, W., Li, X., Lin, M., Gui, H., Xiang, H., Zhao, Q., & Fan, W. (2020). Biosafety of cadmium contaminated sediments after treated by indigenous sulfate reducing bacteria: Based on biotic experiments and DGT technique. *Journal of Hazardous Materials*, 384: 121439. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121439>
- Peng, Z. Xiong, HE, H. Jun, Yang, C. Ping, Zeng, G. Ming, Wen, S., Yan, Z., Xiang, H. Hong, Cheng, Y., Tarre, S., & Green, M. (2017). Biological treatment of wastewater with high concentrations of zinc and sulfate ions from zinc pyrrithione synthesis. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 27(11): 2481–2491. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(17\)60275-9](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(17)60275-9)
- Prat, G. (2005). *Microbiología Clínica : Vol. XII*. Editorial Medical Panamericana.
- Priyadarshane, M., & Das, S. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1): 104686. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2020.104686>
- Rahman, Z. (2020). An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. *Journal of Hazardous Materials*, 396: 122682. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122682>
- Sharma, P., Pandey, A. K., Kim, S. H., Singh, S. P., Chaturvedi, P., & Varjani, S. (2021). Critical review on microbial community during in-situ bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. *Environmental Technology and Innovation*, 24: 1826. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101826>
- Silveira Martins, S.C., Martins, C.M., Cidrão Guedes Fiúza, L.M., Tédde Santaella, S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28): 4412–4418. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>
- Singleton, P. (2004). *Bacterias en biología, biotecnología y medicina*. Acribia Editorial.
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S., & Panda, R. C. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future

perspectives. *Journal of Molecular Liquids*, 290: 111197. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111197>

Vareda, J. P., Valente, A. J. M., & Durães, L. (2019). Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. *Journal of Environmental Management*, 246, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.126>

Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology and Innovation*, 14: 100369 Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>

Xu, H., Qin, C., Zhang, H., & Zhao, Y. (2024). New insights into long-lasting Cr(VI) removal from groundwater using in situ biosulfidated zero-valent iron with sulfate-reducing bacteria. *Journal of Environmental Management*, 355: 120488. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2024.120488>

Yang, W., Wen, J., Zhou, Y., Cheng, W., & Zheng, Y. (2024). Simultaneous removal of cadmium and arsenic co-contamination by iron/sulfur-modified zeolites combined with sulfate-reducing bacteria. *Journal of Water Process Engineering*, 67: 106236. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2024.106236>

Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360: 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.10.226>

Zamora-Ledezma, C., Negrete-Bolagay, D., Figueroa, F., Zamora-Ledezma, E., Ni, M., Alexis, F., & Guerrero, V. H. (2021). Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 22). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>

Zhang, H., Su, M., Li, M., Yan, J., Tang, J., Gong, C., Chen, D., Xiao, T., & Chen, Y. (2019). Efficient removal of Pb (II) ions from aqueous solution by novel PVA-sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria. *Desalination and Water Treatment*, 138: 280–290. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.23256>

Zhang, M., & Wang, H. (2016). Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. *Minerals Engineering*, 92: 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.02.00>