

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

---

# TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

---

PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LA LIPASA B DE  
*Candida antarctica* INMOVILIZADA EN SOPORTES  
MAGNÉTICOS.

ACTIVIDAD SINTÉTICA EN DISOLVENTES  
ORGÁNICOS

**Alumna: Quesada Ganuza, Ane**

**Fecha: Junio 2014**

**Directora**  
Dra. María Jesús Llama Fontal

**Curso Académico**  
2013/14

<b>SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. BODIESEL</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. LIPASAS</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. LIPASA B DE <i>Candida antarctica</i></b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. REACTIVOS Y PRODUCTOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2. SÍNTESIS DE MNP</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2.1. Funcionalización de MNP-OH para obtener MNP-NH<sub>2</sub></b> .....	<b>12</b>
<b>3.2.2. Caracterización de las nanopartículas</b> .....	<b>12</b>
3.2.2.1. Caracterización morfológica y distribución de tamaños .....	<b>12</b>
3.2.2.2. Propiedades magnéticas .....	<b>13</b>
<b>3.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLEAS MAGNÉTICAS DE CALB: INMOVILIZACIÓN DE CALB EN MNPS</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4.1. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando diferentes donadores alquilo</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.2. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación en reactor mecánico y sonorreactor</b> .....	<b>17</b>
3.4.2.1. Análisis del transcurso de las reacciones .....	<b>18</b>
<b>3.4.3. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación con distintos ácidos grasos y agitación mecánica</b> .....	<b>19</b>
3.4.3.1. Análisis del transcurso de las reacciones .....	<b>20</b>
<b>3.4.4. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación con distintos aceites no comestibles y agitación mecánica. Producción de biodiesel</b> .....	<b>20</b>
3.4.4.1. Análisis del transcurso de las reacciones .....	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLEAS MAGNÉTICAS DE CALB</b> .....	<b>21</b>

4.1.1. Caracterización morfológica y distribución de tamaños. -----	21
4.1.2. Caracterización magnética -----	23
4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA -----	25
4.2.1. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando distintos donadores alquilo -----	25
4.2.2. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación en reactor mecánico y sonorreactor -----	26
4.2.3. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando distintos ácidos grasos como sustrato	27
4.2.4. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación utilizando distintos aceites como sustratos	29
5. CONCLUSIONES -----	31
6. BIBLIOGRAFÍA -----	32

**SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS**

APTS	Aminopropiltriétoxissilano
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CLEA	Agregados de enzimas entrecruzados
FFA	Ácidos grasos libres
Hc	Coercitividad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
mCLEA	CLEA magnéticas de alta actividad específica
MNP	Nanopartículas magnéticas
MNP-NH <sub>2</sub>	MNP con grupos amino en la superficie
MNP-OH	MNP con grupos hidroxilo en la superficie
Mr	Remanencia magnética
Ms	Saturación magnética
PBS	Tampón fosfato salino 150 mM, pH 7,4
TLC	Cromatografía en capa delgada
v/v	Volumen/volumen
V <sub>máx</sub>	Velocidad máxima



## 1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo se centra en la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* en nanopartículas magnéticas y la posterior caracterización cinética de su actividad sintética en medios orgánicos para la producción de biodiesel.

### 1.1. BIODIESEL

La historia del biodiesel comienza en 1893, cuando Rudolph Diesel, el padre del motor diésel, puso en marcha el primer motor de este tipo. Más tarde, en 1900, Diesel ganó el Grand Prix en la Feria Mundial de París con su motor impulsado por un biodiesel de aceite de cacahuete. En 1903, además, comenzó la producción del Modelo T de Henry Ford, diseñado para utilizar etanol como combustible.

Diesel creía que la utilización de biodiesel era el futuro de la automoción: *“el uso de aceites vegetales como combustibles para motor puede parecer insignificante hoy en día, pero estos aceites pueden convertirse, con el transcurso del tiempo, en combustibles tan importantes como el petróleo y el carbón lo son hoy en día”*

Sin embargo, a partir de 1920, los fueles basados en petróleo comenzaron a ganar terreno, debido a su mayor eficiencia, menor precio y mejor disponibilidad. De esta forma, el mercado de los biofueles quedó relegado hasta que las distintas crisis del petróleo (1973, 1979, 1990) unidas a la creciente preocupación por la polución y la conservación del medio ambiente, además de al aumento de la población y por tanto de la demanda de combustibles, llevaron a devolver la mirada a estos fueles. Fue en esta época cuando comenzó, principalmente en EEUU y Brasil, la producción a gran escala de biocombustibles de primera generación, basados en la utilización de excedentes agrícolas como el maíz y la caña de azúcar para la producción de bioetanol y aceites de maíz y grasas animales para la producción de biodiesel.

Posteriormente, debido en gran medida a la crítica social que suponía la utilización de materias primas que podrían destinarse a alimentación humana en un planeta en el que gran parte de la población sufre constantes hambrunas, el uso de estas materias primas ha comenzado a ser sustituido por otras, dando comienzo a la producción de bioetanol y biodiesel de segunda generación, esto es, a biocombustibles obtenidos a partir de

fuentes no utilizables como alimentación humana: residuos lignocelulósicos y aceites no comestibles, y más recientemente, aceite producido por microalgas.

En los últimos 10 años, los fueles líquidos basados en biomasa se han convertido en uno de las fuentes de energía más importantes del planeta. En los Estados Unidos, se espera que para el año 2022 el 11% de la demanda de fueles para transporte sea cubierta por biocombustibles. En la Unión Europea, para el año 2020 el 10% de todo el combustible consumido por los medios de transporte debe provenir de fuentes renovables, y en Brasil el 20-25%.

Los biofueles se presentan como una doble solución a los problemas de dependencia de fueles de procedencia extranjera y a los problemas medioambientales. (Ridley *et.al.*, 2012).

El biodiesel es un fuel renovable, biodegradable y no tóxico que puede obtenerse de aceites vegetales comestibles (de primera generación), no comestibles (de segunda generación), grasas animales o de aceites de microalgas (de tercera generación).

La producción clásica de biodiesel ha sido la síntesis química, basada en catálisis ácida o alcalina, debido a su alta conversión y velocidad de reacción. Sin embargo, las complicaciones y el coste de los procesos downstream y los problemas medioambientales asociados con esta producción química han llevado a la búsqueda de métodos de producción alternativos (Bisen *et al.* 2010). La utilización de la catálisis enzimática para la producción de este combustible y en particular la utilización de lipasas es una alternativa prometedora al método químico tradicional, ya que produce un producto de alta pureza y permite una separación rápida y sencilla del glicerol que aparece como subproducto, además disminuye la temperatura de reacción y la toxicidad (Gross *et al.*, 2010).

Sin embargo, el uso de enzimas a escala industrial está limitado por tres razones principales: el alto precio de los enzimas, su fácil inactivación y la escasa optimización de las tecnologías para su empleo a escala industrial. Con la inmovilización de los enzimas pueden solventarse los dos primeros problemas, dado que la inmovilización supone habitualmente un aumento significativo de la estabilidad del enzima frente a la inactivación espontánea y las condiciones extremas de reacción (pH, temperatura, disolventes orgánicos, fuerza iónica...). Además, la inmovilización del enzima

permite recuperarlo con facilidad, permitiendo su reutilización en consecutivos ciclos catalíticos.

## **1.2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS**

Los enzimas son biocatalizadores biológicos responsables de disminuir la energía de activación de las reacciones bioquímicas. Catalizan una gran variedad de reacciones, con una alta eficiencia, selectividad y especificidad.

La utilización de enzimas en la industria ha estado limitada por su alto precio y su pérdida de actividad debida tanto a una pérdida natural como en respuesta a cambios en el ambiente, como pH o temperatura.

La inmovilización de enzimas ha conseguido dar solución en gran medida a estos problemas, ya que permite su reutilización al ser más fáciles de recuperar del medio de cultivo (Vakhlu y Kour, 2006) y aumenta su estabilidad ante cambios en el ambiente. Además, la inmovilización permite un control más preciso de la transformación y permite reacciones en continuo y multietapas.

Sin embargo, la utilización de enzimas inmovilizados también conlleva algunas limitaciones con respecto a la utilización de enzimas libres, como es la pérdida de actividad, problemas de transferencia de masa y de difusión y modificaciones en las propiedades catalíticas del enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno (Arroyo, 1998).

Existen muchos métodos distintos de inmovilización de enzimas, como son la adsorción a un soporte sólido, el atrapamiento en mallas tridimensionales porosas, la microencapsulación en membranas semipermeables o la unión covalente tanto a un soporte sólido como por entrecruzamiento del enzima consigo mismo y otros elementos como nanopartículas o proteínas inertes.

Dentro de este último tipo de inmovilización por enlaces covalentes destacan dos técnicas recientes: los CLECs (Cross-linked Enzyme Crystals) obtenidos mediante purificación, cristalización y entrecruzamiento del enzima y las CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates) obtenidas por entrecruzamiento de enzimas agregados. Este entrecruzamiento puede darse entre moléculas de enzima puro, entre moléculas de



enzima y proteína inerte y entre moléculas de enzima y algún elemento funcional, como puede ser la unión covalente de enzimas a nanopartículas magnéticas (MNPs).

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) son un tipo de partículas de tamaño nanométrico, es decir, aquellas partículas inferiores en tamaño a los 10-20 nm (Hosokawa et al., 2007). Se componen de magnetita y maghemita, y debido a su pequeño tamaño presentan superparamagnetismo.

El uso de este tipo de nanopartículas de óxido de hierro ha aumentado en los últimos años debido sobre todo a sus propiedades únicas, como la facilidad de control del tamaño de partícula, su gran área superficial, su superficie modificable y su facilidad de recuperación mediante un campo magnético.

Los nanomateriales magnéticos son muy interesantes para su uso en inmovilización de enzimas con interés industrial, debido a sus propiedades superparamagnéticas.

El superparamagnetismo es la tendencia de los espines a alinearse paralelamente a un campo magnético. Cuando no existe ningún campo magnético externo, los espines están orientados al azar, es decir, no existe magnetización residual, pero cuando existe un campo magnético externo tienden a alinearse paralelamente al campo.

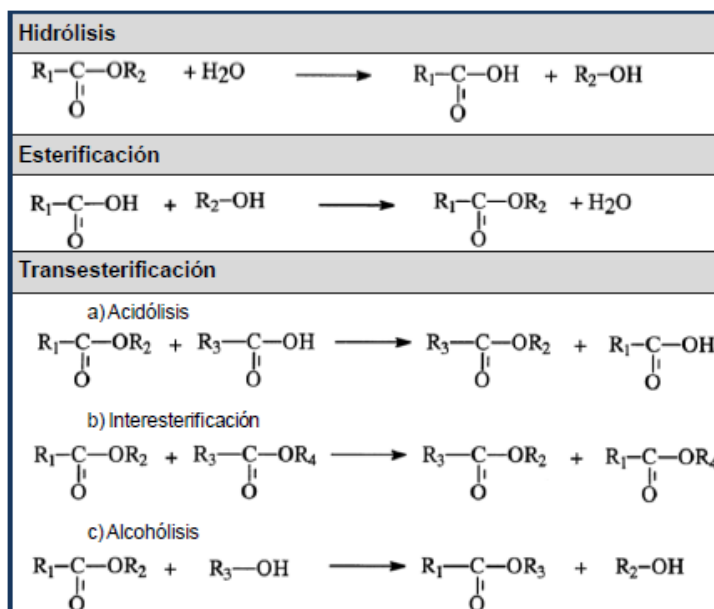
Debido a esto, un enzima inmovilizado en este tipo de nanopartículas se moverá libre en el reactor mientras no se le aplique ningún campo magnético, pero se agregará cuando se le aplique, por lo que podrá ser fácilmente recuperado.

### **1.3. LIPASAS**

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas cuya función biológica es la hidrólisis de ésteres, especialmente la hidrólisis de triacilglicéridos de cadena larga. Esta reacción produce glicerol y ácidos grasos libres, además de mono y di acilglicéridos.

Las lipasas normalmente cuentan con un oligopéptido helicoidal que tapa el sitio activo. Esta tapa, cuando interacciona con una interfase hidrofóbica como una gota lipídica, sufre un cambio de posición, dejando al descubierto el sitio activo y dejando libre acceso al sustrato.

Dependiendo del medio en el que se encuentren, las lipasas son capaces de catalizar reacciones muy diversas: reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación (Malcata *et al.*, 1992; Villeneuve *et al.*, 2000).



**Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas en medios acuosos y microacuosos.** Adaptado de Villeneuve *et al.* (2000).

Esta variedad de reacciones son muy interesantes desde un punto de vista biotecnológico (Sharma *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2006), ya que todas producen productos de interés industrial. Las lipasas son muy interesantes como biocatalizadores industriales distintas áreas: fueles, detergentes, panadería, fabricación de queso, limpieza de superficies o procesamiento de pieles o papel (Reetz ,2002).

La trans/esterificación, que es la reacción en la que nos centraremos, es el proceso de intercambio de radicales acilo entre un ácido y un éster (acidólisis), entre ésteres (interesterificación) o entre un éster y un alcohol (alcohólisis). Los productos de estas reacciones son también interesantes, y entre ellos se encuentra el biodiesel (Akoh *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2008), producto de la esterificación entre un éster y un alcohol. La catálisis de la reacción de esterificación por el enzima es posible debido a la utilización de solventes orgánicos (Trodler *et al.* 2008).

Las lipasas más empleadas en síntesis orgánica son la lipasa pancreática porcina expresada en *Pseudomonas cepacia* (Amano lipase PS, PCL) la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) (Bornscheuer, 2006). Esta última lipasa es la utilizada en este trabajo.

#### **1.4. LIPASA B DE *Candida antarctica***

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es un biocatalizador muy eficiente que realiza hidrólisis en medios acuosos y esterificación en disolventes orgánicos. Se utiliza mucho a nivel industrial debido a su alta enantioselectividad, amplia cantidad de sustratos y por su gran estabilidad térmica y estabilidad en disolventes orgánicos. Es quizás la lipasa más empleada en biotecnología para la síntesis de muchos productos como formulaciones de cosmética, fragancias, lubricantes y biodiesel.

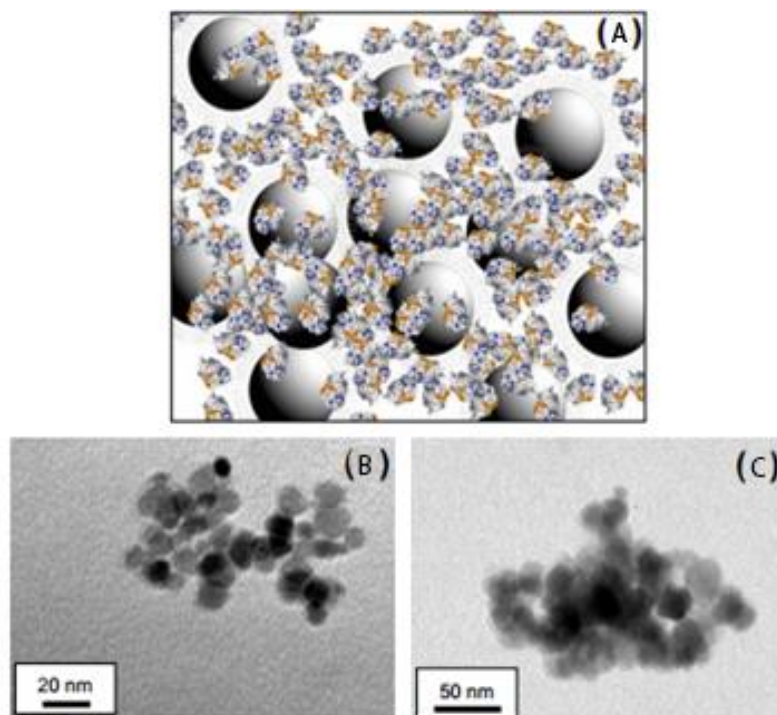
La CALB pertenece a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, con una tríada catalítica muy conservada de Ser, His, y Asp/Glu. A diferencia de la mayoría de las lipasas, la CALB no tiene una tapa en el sitio activo, y no muestra activación por interfase.

La CALB muestra una gran estabilidad en todo tipo de solventes y su estructura es independiente del medio, debido en gran medida a que este enzima no sufre cambios conformacionales. Sin embargo, su flexibilidad sí es dependiente del medio, disminuyendo en gran medida en solventes orgánicos (Trodler *et al.*, 2008).

CALB, en disolución, tiene un pH óptimo de actividad de 7 y es estable entre 3,5 y 9,5. La temperatura de desnaturalización varía entre 50°C y 60°C, dependiendo del pH.

Este enzima normalmente se emplea inmovilizado, ya que esto aumenta su estabilidad. La forma de inmovilización de la CALB más empleada es la comercializada por Novozymes como Nocozym 435 (N435), que consiste en una inmovilización a una resina acrílica macroporosa. Sin embargo, existen numerosas formas de inmovilización de este enzima.

En este trabajo se presenta la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* en nanopartículas magnéticas (**Figura 2B**) mediante entrecruzamiento en agregados enzimáticos (**Figura 2A y 2C**). Posteriormente, se estudian las propiedades cinéticas del enzima inmovilizado para la producción de biodiesel a partir de diferentes sustratos.



**Figura 2. Distintas representaciones de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada.** (A) Representación de la inmovilización del enzima en Cross-linked Enzyme Aggregates (mCLEA-enzyme). (B) Análisis mediante TEM de la forma y tamaño de las MNPs desnudas. (C) Análisis mediante TEM de las mCLEA-CALB.

## 2. OBJETIVOS

Este proyecto se basa en la caracterización de un biocatalizador obtenido mediante unión covalente de la lipasa B de *Candida antarctica* sobre nanopartículas magnéticas y su posterior entrecruzamiento para formar agregados: mCLEAs de CALB. El objetivo principal es la caracterización del biocatalizador y de su actividad enzimática de síntesis de biodiesel en medios orgánicos.

Los objetivos que se propone alcanzar son los siguientes:

1. Síntesis y funcionalización de MNPs.
2. Inmovilización de CALB a MNPs para la obtención de CLEAs.
3. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación utilizando como donadores de grupos alquilo etanol y metanol.
4. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación en reactores de agitación mecánica y sonorreactor.
5. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación con distintos ácidos grasos.

6. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación con distintos aceites no comestibles.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos y productos utilizados se enumeran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Reactivos y productos utilizados durante la realización del proyecto.**

<b>Casa comercial (Ciudad, País)</b>	<b>Producto</b>
<b>Merck (Darmstadt, Alemania)</b>	Bicarbonato sódico
	Carbonato sódico
	Cloruro sódico
	Glutaraldehido
	Metanol grado HPLC
	n-Hexano grado HPLC
	Placas de gel de Sílice 60
<b>Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca)</b>	Lipozyme © CALB L
<b>Panreac (Barcelona, España)</b>	Cloruro potásico
	Fosfato dipotásico
	Fosfato monopotásico
<b>Quimivita (Barcelona, España)</b>	Ácido acético
	Ácido clorhídrico
	Hidróxido amónico
	Etanol
	Metanol
<b>Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)</b>	APTS
	Borohidruro de sodio

---

	Cloruro férrico
	Cloruro ferroso
	Etil-acetato
	p-Nitrofenil acetato (p-NPA)
	Tritón X-100
<hr/>	
TCI (Tokio Chemical Industry Co) (Tokio, Japón)	Ácido oleico
	Ácido linoleico
	Ácido linolénico

---

### 3.2. SÍNTESIS DE MNP

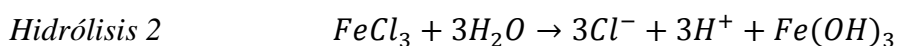
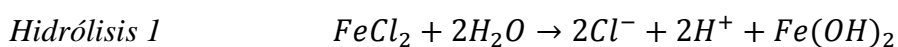
El objetivo de la síntesis de MNP es la obtención de nanopartículas magnéticas en cuya superficie haya numerosos grupos amino, que posteriormente se funcionalizarán. Para la obtención de estas nanopartículas, en primer lugar se deben sintetizar MNP-OH mediante coprecipitación de sales de hierro en medio alcalino (Morales *et al.* 1999).

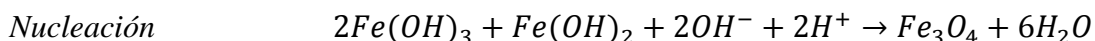
Sobre 450 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.42M se bombea, a un caudal de 5 mL/min, una disolución de 50 mL de  $\text{FeCl}_2$  0.33M y  $\text{FeCl}_3$  0.66M. Este proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente y bajo una vigorosa agitación mecánica (400 rpm) con una varilla de vidrio utilizando un Agitador RZR 2102 (Heidolph, Schwabach, Alemania).

Una vez añadida completamente la disolución de sales de hierro se mantuvo la agitación durante 30 minutos.

Todas las disoluciones utilizadas se realizaron con agua ultrapura miliQ burbujeada con  $\text{N}_2$ , para provocar el desplazamiento del  $\text{O}_2$ , además este burbujeo se aplicó a ambas disoluciones durante todo el transcurso de la síntesis de MNPs.

Durante este proceso, los cloruros de hierro se hidrolizan y se forman hidróxidos que en presencia de amonio coprecipitan formando magnetita. Las reacciones que se dan para la formación de magnetita son las siguientes (Racuciu *et al.* 2009):





El precipitado negro obtenido tras la reacción se decantó con un imán y se lavó tres veces con agua desionizada y otras dos veces con tampón PBS (tampón fosfato salino 150 mM, pH 7.4).

### 3.2.1. Funcionalización de MNP-OH para obtener MNP-NH<sub>2</sub>

Para obtener nanopartículas con grupos amino en superficie a partir de las MNP con grupos hidroxilo en su superficie resultantes de la síntesis (Shen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002), se incubaron las MNP-OH (300 mg) con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS, 2% v/v) a 70°C con una agitación de 200 rpm durante 24 horas.

La concentración de nanopartículas se calculó secando a vacío un volumen conocido de las mismas en un equipo Savant (Automatic Environmental SpeedVac Apparatus).

Las nanopartículas se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### 3.2.2. Caracterización de las nanopartículas

#### 3.2.2.1. Caracterización morfológica y distribución de tamaños

La caracterización cristalográfica y la identificación de la composición se realizaron con un difractómetro PANalytical Xpert PRO.

El tamaño del cristalito se calculó a partir de la anchura a media altura de los máximos de difracción empleando la ecuación de Scherrer, dicha ecuación relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción  $B$  con el tamaño del cristalito  $D$ .

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

La constante  $K$ , al considerarse partículas esféricas, toma el valor de 0.89  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación X utilizada (0.54 nm);  $\beta$  es el ensanchamiento neto del pico de difracción expresado en radianes  $2\theta$  pudiéndose determinar a partir de las ecuaciones de Warren y Scherrer:

$$\beta^2 = \beta^2_{obs} - \beta^2_{ins} \text{ (Warren)} \quad (2)$$

$$\beta = \beta_{obs} - \beta_{ins} \text{ (Scherrer)} \quad (3)$$

Siendo  $\beta_{obs}$  la anchura observada (experimental) y  $\beta_{ins}$  la anchura instrumental.

### 3.2.2.2. Propiedades magnéticas

Para la caracterización magnética de las nanopartículas (MNP-OH y MNP-NH<sub>2</sub>) sintetizadas se realizaron ciclos de histéresis a 300 K, utilizando un electroimán de campos moderados.

Para calcular la saturación magnética se utilizaron los datos a esta temperatura, a pesar de que para conocer la máxima saturación magnética se asume que el alineamiento del dipolo magnético es perfecto, cosa que solo ocurre a 0 K.

La coercitividad ( $H_c$ ) y la remanencia ( $M_r$ ) se calcularon a partir de los datos tomados a temperatura ambiente, debido a que el electroimán tiene mejor resolución a campos más bajos.

A partir de las curvas de histéresis se puede hacer una aproximación al tamaño del núcleo magnético de las partículas.

Se realizó un ajuste empleando las ecuaciones de Langevín a partir del modelo superparamagnético no interaccionante. La expresión aplicable al caso de nuestras nanopartículas es la siguiente:

$$M(H) = M_s \left( \frac{emu}{g} \right) \int_0^l L \left( \frac{\mu_0 M_s (Am^{-1}) V H (Am^{-1})}{k_B T} \right) f(D) dD \quad (4)$$

Donde  $f(D)$  es la distribución de diámetros de la población de partículas;  $M_s$  (emu/g) es la imanación de saturación macroscópica a 2 K, aunque en nuestro caso la medida se realizó a 300 K;  $M_s$  ( $Am^{-1}$ ) la imanación de la partícula;  $\mu_0$  la permeabilidad magnética en el vacío; y  $k_B$  la constante de Boltzmann. El volumen crítico  $V$  se determina para cada temperatura, dada por:

$$V_c = \frac{25k_B T}{K} \quad (5)$$

Donde  $K$  es la constante de anisotropía magnética.



Se supuso que las partículas eran esféricas y que el componente principal era magnetita (magnetización a 480 kA/m).

### **3.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLEAs MAGNÉTICAS DE CALB: INMOVILIZACIÓN DE CALB EN MNPS**

Para la obtención de mCLEAs (agregados enzimáticos entrecruzados) de CALB se unió el enzima a las nanopartículas con grupos amino previamente sintetizadas mediante inmovilización de tipo covalente.

Entre cada diferente etapa del proceso de inmovilización, para eliminar los reactivos sobrantes se realizaron tres lavados con PBS durante 10 minutos. Además, todo el proceso se realizó utilizando agitación giratoria a 30rpm (Intelli-Mixer RM-2).

En primer lugar, a 2 mg de nanopartículas con grupos amino se le añadió 0.2 mg de enzima CALB, y a la mezcla de ambas 2 mL de sulfato amónico 3.6 M como precipitante de la proteína. Una vez transcurridos 5 minutos de incubación se añadieron 0.248 mL de glutaraldehído 2.5 M como agente entrecruzante, tras lo cual se incubó la mezcla durante 24 horas.

Tras la incubación se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 minutos al material magnético que quedaba atraído por el imán.

En este punto el enzima ya está inmovilizado sobre las nanopartículas y las mCLEAs formadas, pero se deben reducir las bases de Schiff formadas y bloquear los grupos aldehído que hayan podido quedar libres para que el complejo se estabilice, por lo que se incubó la preparación con NaBH<sub>4</sub> (1 mg/mL) en tampón carbonato-bicarbonato (100 mM, pH 10) durante 2 horas.

Para eliminar las interacciones inespecíficas una vez completado el proceso de inmovilización, se realizaron varios lavados de las mCLEAs con 2 M de NaCl y detergente Tritón X-100 al 1% v/v (Mateo et al. 2000).

### **3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Se midió la velocidad inicial de la reacción de trans/esterificación en medios orgánicos utilizando distintos sustratos. A partir de estos datos de velocidad inicial se obtuvieron los parámetros cinéticos de la reacción.

1. Comparación de las velocidades iniciales y obtención de los parámetros cinéticos de la reacción utilizando dos alcoholes distintos como donadores de grupos alquilo: etanol y metanol. Selección de uno de los dos alcoholes.
2. Comparación de las velocidades iniciales y obtención de los parámetros cinéticos de la reacción utilizando dos agitaciones distintas: mecánica y por ultrasonidos. Selección de uno de los dos métodos de agitación.
3. Comparación de las velocidades iniciales de la reacción y obtención de los parámetros cinéticos utilizando agitación mecánica con distintos ácidos grasos. Producción de biodiesel.
4. Comparación de las velocidades iniciales y obtención de parámetros cinéticos utilizando agitación mecánica con distintos aceites, utilizando aceite de oliva como control. Producción de biodiesel.

Todas las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo empleando 2 mg de mCLEAs como biocatalizador, durante un tiempo máximo de 24h. La temperatura de reacción, el disolvente, y la concentración de alcohol se mantuvieron constantes.

- Temperatura: la temperatura utilizada para todas las reacciones fue una temperatura constante de 30°C, ya que se determinó en estudios anteriores que esta temperatura permitía alcanzar una buena conversión a velocidad de reacción razonable y con un bajo coste energético.
- Disolvente: se empleó ter-butanol como disolvente, ya que se había probado como el más adecuado y el que generaba mejores resultados.
- Concentración de alcohol: en todas las reacciones se mantuvo constante la concentración de alcohol para poder medir la actividad y parámetros cinéticos respecto del otro sustrato del enzima: el ácido graso o aceite correspondiente.

Las velocidades iniciales para cada concentración de ácido graso o aceite se obtuvieron hallando la pendiente de la desaparición de sustrato respecto al tiempo. Para ello sólo se tuvo en cuenta la zona lineal al representar la concentración de sustrato vs tiempo.

El biocatalizador se almacenó a una concentración de 2 mg/mL en PBS. Se realizaron tres lavados con ter-butanol previos a la reacción con el objetivo de eliminar todo el PBS y sustituirlo por el disolvente orgánico.

### 3.4.1. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando diferentes donadores alquilo

Se procedió a la determinación de la actividad enzimática del enzima inmovilizado, midiendo la velocidad inicial de la reacción de esterificación en medios orgánicos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo con las condiciones detalladas en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Condiciones de reacción que se mantuvieron constantes en todos los ensayos.**

<b>Biocatalizador</b>	<b>2 mg de mCLEAs</b>
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>Disolvente</b>	Ter-butanol
<b>Concentración de alcohol</b>	3 M
<b>Agitación</b>	Mecánica

Se modificaron las condiciones que aparecen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Condiciones cambiadas en cada uno de los ensayos.**

<b>Concentración de ácido graso (mM)</b>	1000, 800, 600, 400, 200, 50
<b>Toma de muestras (tiempo de reacción (min))</b>	0, 15, 30, 45, 60.
<b>Alcohol</b>	Etanol, Metanol.

Se compararon las velocidades iniciales y los parámetros cinéticos de la reacción con cada alcohol con el objetivo de seleccionar aquel con el cual la reacción se lleve a cabo de forma más eficiente.

Las reacciones se llevaron a cabo mediante agitación mecánica en un brazo agitador RM-2L intelli mixer de ELMI, con una inclinación de giro de 30° y 99 rpm.

Las reacciones llevadas a cabo con ambos alcoholes se estudiaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC) empleando un sistema cromatográfico compuesto por 2 bombas Waters™ 510, un inyector automático Waters™ 717, un detector de diodos Waters™ 996, una

estación de trabajo Waters™ Millenium 2010 v.2.10 (Waters™ Corporation, Milford, MA, EEUU) y una columna Tracer Lichrosorb RP18, 250 mm × 4 mm d.i., de 10 μm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro. Se inyectaron 10 μL por muestra a un flujo de 1 mL/min. La bomba A contenía una mezcla de acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) y la bomba B metanol. Se empleó un gradiente lineal desde 75 % de B al 100 % de B en 15 min. Los compuestos se detectaron siguiendo la absorbancia a 205 nm a temperatura ambiente. El análisis cuantitativo se realizó a partir de una calibración con muestras patrón de ácido oleico y su éster correspondiente en concentraciones conocidas. .

### 3.4.2. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación en reactor mecánico y sonorreactor

Se procedió a la determinación de la actividad enzimática del enzima inmovilizado, midiendo la velocidad inicial de la actividad de esterificación en medios orgánicos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo con las condiciones detalladas en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Condiciones de reacción que se mantuvieron constantes durante todos los ensayos.**

<b>Biocatalizador</b>	<b>2 mg de mCLEAs</b>
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>Disolvente</b>	Ter-butanol
<b>Alcohol</b>	Metanol
<b>Concentración de alcohol</b>	3 M
<b>Ácido graso</b>	Ácido Oleico

Se modificaron las variables indicadas en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Condiciones variadas en cada uno de los ensayos**

<b>Agitación</b>	<b>Concentración de ácido graso (mM)</b>	<b>Toma de muestras (tiempo de reacción (min))</b>
<b>Mecánica</b>	1000, 800, 600, 400, 200, 50	0, 15, 30, 45, 60
<b>Ultrasonidos</b>	1000, 800, 600, 400, 200, 50	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30

Se compararon las velocidades iniciales de la reacción utilizando en primer lugar agitación mecánica y en segundo lugar agitación por ultrasonidos.

Para las reacciones llevadas a cabo mediante agitación por ultrasonidos, se utilizó un sonorreactor Ultrasonic reactor (UTR200, Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Germany), a una frecuencia de 24kHz y una potencia de 100W.

La temperatura de la reacción se controló y se fijó a 30°C mediante refrigeración por recirculación de agua.

Para las reacciones llevadas a cabo mediante agitación mecánica se utilizó un brazo agitador RM-2L intelli mixer de ELMI, con una inclinación de giro de 30° y 99 rpm.

#### 3.4.2.1. Análisis del transcurso de las reacciones

Se determinó la conversión de ácidos grasos y la producción de ésteres alquilados a lo largo del tiempo tomando alícuotas de 10 µL a intervalos definidos.

En la reacción llevada a cabo con el sonorreactor las alícuotas se tomaron directamente sobre 990 µL de metanol, con el objetivo de parar la reacción, ya que debido a esta agitación la separación de las mCLEAs del resto de la muestra es lenta.

Las reacciones llevadas a cabo en ambos tipos de reactores se estudiaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC), siguiendo el mismo método explicado en el apartado anterior.

Los compuestos se detectaron siguiendo la absorbancia a 205 nm a temperatura ambiente. El análisis cuantitativo se realizó a partir de una calibración con muestras patrón de los correspondientes ácidos grasos y ésteres etílicos en concentraciones conocidas.

### 3.4.3. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación con distintos ácidos grasos y agitación mecánica

Se procedió a la determinación de la actividad enzimática del enzima inmovilizado, midiendo la actividad inicial de la actividad de esterificación en medios orgánicos utilizando como sustratos distintos ácidos grasos. Se utilizó agitación mecánica.

Todas las reacciones se llevaron a cabo con las condiciones detalladas en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Condiciones de reacción que se mantuvieron constantes durante todos los ensayos.**

<b>Biocatalizador</b>	<b>2 mg de mCLEAs</b>
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>Disolvente</b>	Ter-butanol
<b>Alcohol</b>	Metanol
<b>Concentración de alcohol</b>	3 M

Se modificaron las variables indicadas en la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Parámetros variados en cada uno de los ensayos.**

<b>Ácido graso</b>	<b>Concentración de ácido graso (mM)</b>	<b>Toma de muestras (tiempo de reacción (min))</b>
<b>Oleico, linoleico, linolénico</b>	1000, 800, 600, 400, 200, 50	0, 15, 30, 45, 60

Se compararon las velocidades iniciales con las distintas concentraciones de ácido graso en cada uno de ellos y posteriormente se obtuvieron los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  para la reacción con cada uno de los ácidos grasos.

### 3.4.3.1. Análisis del transcurso de las reacciones

Se determinó la conversión de ácidos grasos y la producción de ésteres alquilados a lo largo del tiempo tomando alícuotas de 10 $\mu$ L a intervalos definidos.

Las reacciones se llevaron a cabo mediante agitación mecánica en un brazo agitador RM-2L intelli mixer de ELMI, con una inclinación de giro de 30° y unas rpm de 99.

Las reacciones llevadas a cabo en ambos tipos de reactores se estudiaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC), siguiendo el mismo método explicado en el apartado anterior.

Los compuestos se detectaron siguiendo la absorbancia a 205 nm a temperatura ambiente. El análisis cuantitativo se realizó a partir de una calibración con muestras patrón de los correspondientes ácidos grasos y ésteres etílicos en concentraciones conocidas.

### 3.4.4. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación con distintos aceites no comestibles y agitación mecánica. Producción de biodiesel

Se procedió a la determinación de la actividad enzimática del enzima inmovilizado, midiendo la actividad inicial de la reacción de trans/esterificación en medios orgánicos utilizando como sustratos distintos aceites no comestibles. Como control se utilizó aceite de oliva.

Se modificaron las variables indicadas en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Parámetros variados en cada uno de los ensayos.**

Aceite	Concentración de aceite (mM)	Tiempo de toma de muestras (min)
Oliva, soja no refinada	1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80	0, 15, 30, 45, 60

Se compararon las velocidades iniciales con las distintas concentraciones de aceite en cada uno de ellos y posteriormente se obtuvieron los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  para la reacción de cada uno de los ácidos grasos.

#### 3.4.4.1. Análisis del transcurso de las reacciones

Se determinó la conversión de aceite y la aparición de ésteres alquilados a lo largo del tiempo tomando alícuotas de 10 $\mu$ L a intervalos de tiempo definidos.

Las reacciones se llevaron a cabo mediante agitación mecánica en un brazo agitador RM-2L intelli mixer de ELMI, con una inclinación de giro de 30° y una rpm de 99.

El progreso de las reacciones se evaluó por cromatografía en capa delgada (Thin Layer Chromatography, TLC) en placas de gel de sílice 60.

Previa a adición de la muestra a la placa estas se activaron durante 30 minutos a 100°C y se cargaron distintos volúmenes de muestra en cada calle, dependiendo de la concentración de aceite inicial de cada una. La fase móvil fue n-hexano:etil acetato (93:7, v:v). Una vez terminada la TLC, las placas se secaron y tiñeron por inmersión en una bandeja con Azul de Coomassie R-350 durante 10 minutos. Las señales correspondientes a los sustratos y productos de reacción fueron identificadas utilizando el programa *TLC Analyzer* usando muestras patrón de los correspondientes ácidos grasos y ésteres metílicos.

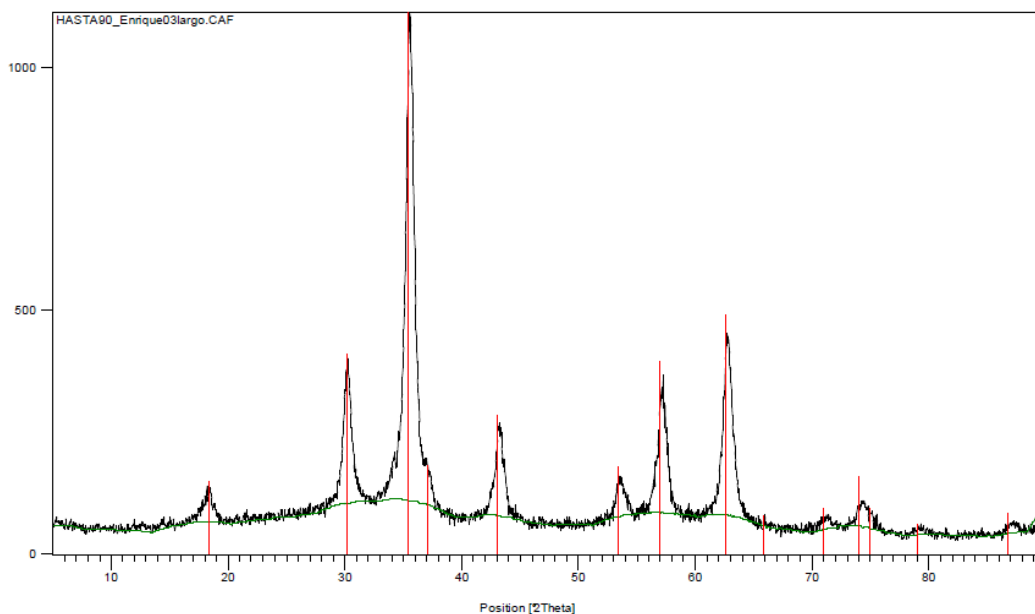
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLEAS MAGNÉTICAS DE CALB

#### 4.1.1. Caracterización morfológica y distribución de tamaños

Los resultados de la caracterización cristalográfica y la identificación de fases de las nanopartículas sintetizadas con grupos hidroxilo y amino, obtenidas mediante difracción de rayos X pueden verse en la **Figura 3**.





**Figura 3. Difractograma experimental medido con rendija automática (ADS).** Los máximos de difracción (en rojo) corresponden a la magnetita analizada. Difractograma correspondiente a MNP-OH.

La única fase identificada en la muestra es la magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_2$ . Además se comprobó mediante un imán el carácter fuertemente magnético de las muestras.

La figura corresponde al difractograma experimental medido, con rendija automática (ADS) y los máximos de difracción (en rojo) correspondientes a la magnetita.

Aplicando la ecuación de Scherrer y considerando el ensanchamiento del pico tanto según Scherrer como según Warren obtenemos el tamaño medio del cristalito (**Tabla 9**).

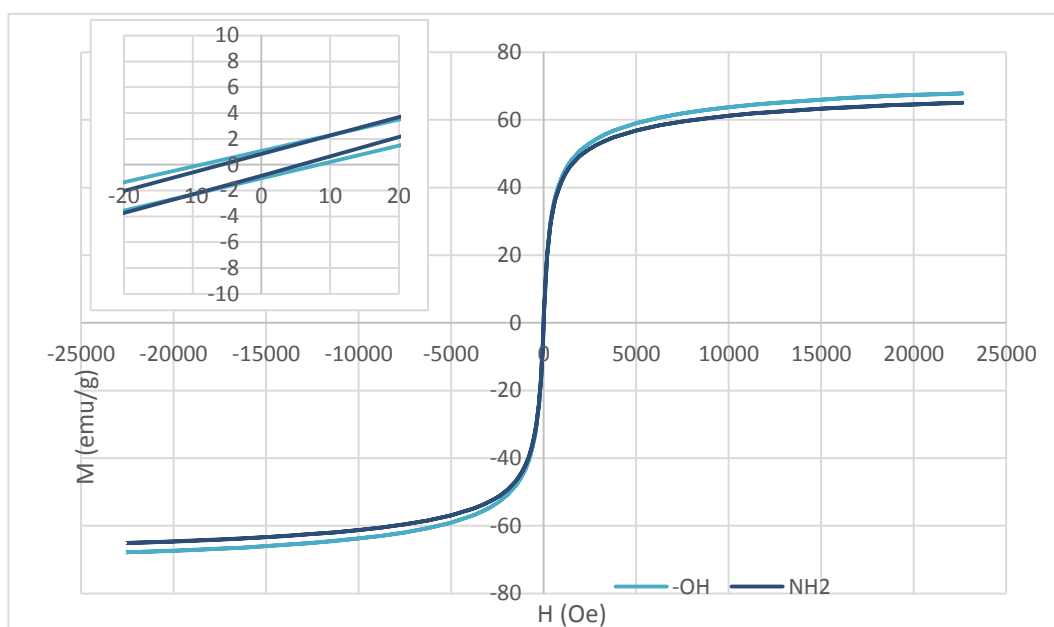
**Tabla 9. Tamaño medio del cristalito de las MNP-OH obtenida relacionando, a partir de la ecuación de Scherrer, la anchura a media altura de los máximos de difracción con el tamaño de los cristalitos.**

Muestra	Tamaño medio del cristalito (Ecuación de Scherrer, ensanchamiento de Scherrer)	Tamaño medio del cristalito (Ecuación de Scherrer, ensanchamiento de Warren)
MNP-OH	96 Å	87 Å
MNP-NH <sub>2</sub>	89 Å	82 Å

#### 4.1.2. Caracterización magnética

Se realizó la caracterización magnética para las nanopartículas con grupos OH en superficie y para las nanopartículas con grupos NH<sub>2</sub> en superficie. La caracterización se realizó en un magnetómetro SQUID (MPMS-7T, Quantum Design).

Las curvas de histéresis realizadas muestran un comportamiento muy cercano al superparamagnetismo en ambas nanopartículas (**Figura 4**) ya que en ausencia de campo magnético apenas conservan magnetismo, y por tanto, tanto la remanencia como la coercitividad son prácticamente nulas.



**Figura 4.** Curva de histéresis obtenida mediante magnetómetro SQUID (MPMS-7T, Quantum Design) de dos muestras de nanopartículas. La curva nombrada como OH corresponde a las MNP-OH y la nombrada como NH<sub>2</sub> corresponde a las MNP-NH<sub>2</sub>.

Puede observarse una saturación magnética de unos 70 emu/g, en vez de los 80-90 emu/g que daría si el ensayo se hubiera realizado a 2 K en vez de a una temperatura de 300 K. Teniendo esto en cuenta se puede concluir que el componente mayoritario de las MNP es la magnetita.

A partir de las curvas de histéresis se obtuvieron diferentes parámetros para cada tipo de nanopartícula sintetizado (**Tabla 10**).

Tabla 10. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de histéresis de las MNP-OH y las MNP-NH<sub>2</sub>.

Tipo MNP	Ms (emu/g)	Hc (Oe)	Mr (emu/g)
MNP-OH	67.87	0.28	1.11
MNP-NH <sub>2</sub>	65.09	0.87	0.87

Saturación magnética (Ms), coercitividad (Hc) y remanencia (Mr) determinadas a partir de las curvas de histéresis obtenidas a 300K.

Puede observarse una ligera disminución de la saturación magnética y la remanencia al funcionalizar la superficie de las nanopartículas con grupos amino, si bien no es un cambio realmente significativo. Esta disminución es debida al cambio del grupo funcional en la superficie de la nanopartícula.

A partir de un ajuste a una función de Langevin, se calculó el diámetro promedio de las nanopartículas (MNP-NH<sub>2</sub>). La **Figura 5** muestra un diámetro medio de nanopartícula de unos 9.5 nm con una dispersión de  $\pm 6$  nm. Estos datos se corresponden con los obtenidos a partir de la ecuación de Scherrer, relacionando la anchura a media altura de los máximos de difracción con el tamaño de los cristalitas.

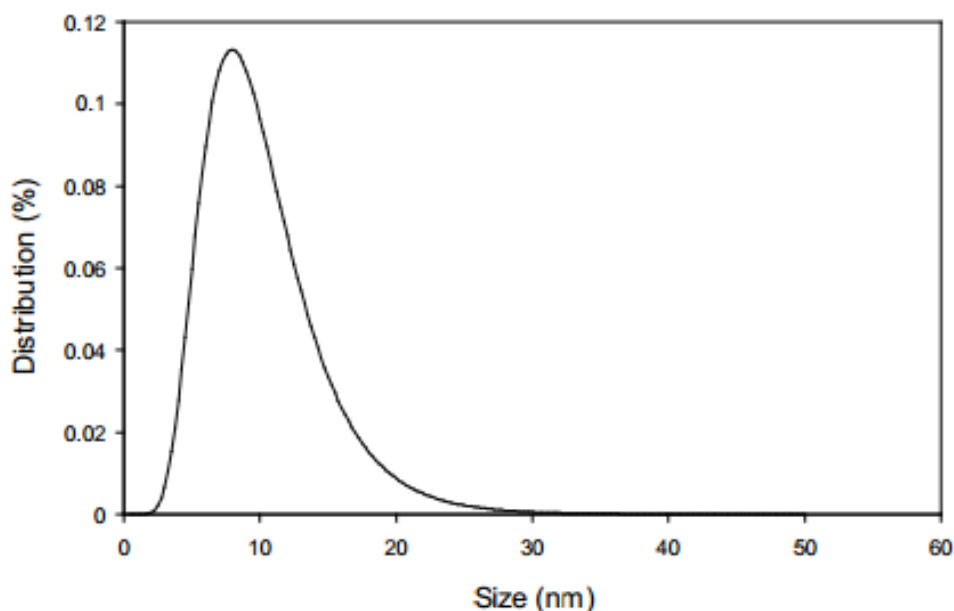


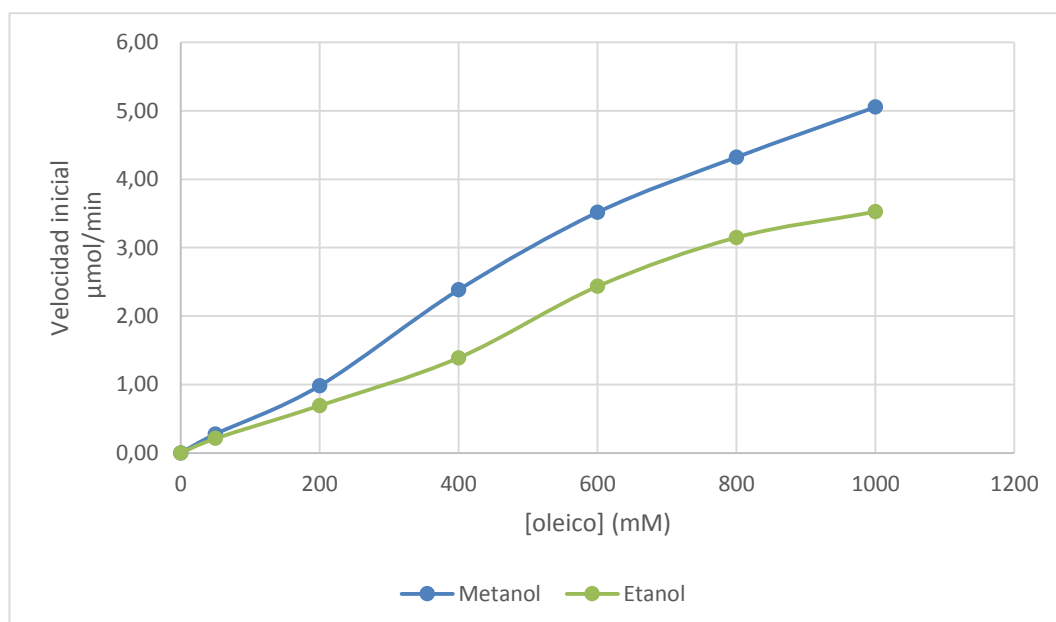
Figura 5. Distribución de tamaño de las MNP-NH<sub>2</sub> mediante ajuste a la función de Langevin.

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 4.2.1. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando distintos donadores alquilo

Estas reacciones de esterificación se llevaron a cabo empleando un solo ácido graso, el ácido oleico, y dos alcoholes distintos como donadores de grupos alquilo, el etanol y el metanol, con el objetivo de determinar cuál de ellos era el más adecuado y el mejor para optimizar la reacción. La reacción se llevó a cabo mediante agitación mecánica.

Como puede verse en la **Figura 6**, se obtuvieron mayores velocidades iniciales en el caso de la reacción con metanol como sustrato que en el caso de la utilización de etanol.



**Figura 6. Representación de las velocidades iniciales de reacción.** Comparación de las velocidades iniciales de reacción frente a la concentración de ácido graso utilizando dos alcoholes donadores de grupos alquilo distintos.

Como puede observarse en la **Tabla 11**, las velocidades máximas alcanzables con cada uno de los dos alcoholes significativamente distintas, siendo mucho mayor la correspondiente a la reacción llevada a cabo como metanol como donador de grupos alquilo.

Los siguientes estudios se realizaron, por tanto, utilizando metanol como donador de grupos alquilo y se descartó la utilización de etanol.

**Tabla 11. Comparación de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por las mCLEAs de CALB utilizando dos alcoholes distintos como donadores de grupos alquilo.**

	V <sub>máx</sub> (μmol/min)	K <sub>m</sub> (M)
Metanol	79.97	14.12
Etanol	10.14	2.37

#### **4.2.2. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación en reactor mecánico y sonorreactor**

La reacción de esterificación se llevó a cabo utilizando el catalizador inmovilizado, ácido oleico y metanol como sustratos y dos reactores con agitaciones distintas: un sonorreactor, con agitación por ultrasonidos; y un reactor mecánico o brazo, con agitación mecánica.

Tal y como se explica en el apartado anterior, los datos de velocidades iniciales se obtuvieron a partir de las pendientes de la desaparición de ácido graso frente al tiempo, para cada una de las concentraciones de ácido graso.

Como puede verse en la **Figura 7**, las velocidades iniciales fueron mayores para todas las concentraciones en el caso de las reacciones llevadas a cabo en el sonorreactor. Además puede verse en la **Tabla 12** que los dos parámetros cinéticos obtenidos son más favorables en el caso del sonorreactor: la velocidad máxima alcanzable era mayor en el caso del sonorreactor, además de tener una K<sub>m</sub> más baja. A pesar de los datos obtenidos, en las reacciones posteriores se continuó utilizando la agitación mecánica, debido principalmente a que la agitación por sonorreactor hacía muy difícil la recuperación de las mCLEAs de CALB en un tiempo razonable para su reutilización en reacciones o ciclos posteriores, por lo que, a pesar de dar una velocidad de reacción mayor, eliminaba una de las ventajas más importantes del uso de biocatalizadores inmovilizados en la industria.

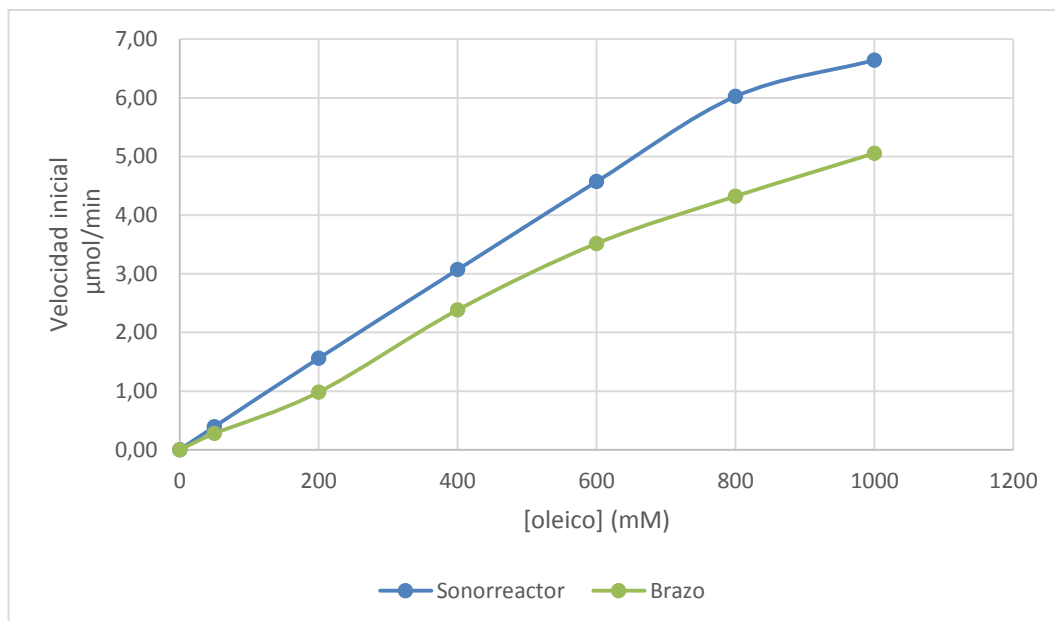


Figura 7. Comparación de las velocidades iniciales de la reacción frente a la concentración de ácido oleico utilizando dos reactores distintos: sonorreactor y reactor de agitación mecánica(brazo).

Tabla 12. Comparación de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por las mCLEAs de CALB utilizando dos reactores con distinto mecanismo de agitación.

	V <sub>máx</sub> (μmol/min)	K <sub>m</sub> (M)
<b>Brazo</b>	79.97	14.12
<b>Sonorreactor</b>	82.78	10.33

#### 4.2.3. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación utilizando distintos ácidos grasos como sustratos

Estas reacciones de esterificación se llevaron a cabo empleando distintos ácidos grasos: oleico, linoleico y linolénico. Se utilizó metanol como donador de grupos alquilo, además, todas las reacciones fueron catalizadas empleando 2 mg de mCLEAs. El disolvente empleado fue el ter-butanol.

La técnica empleada para analizar los datos fue la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que permite la separación e identificación de los distintos compuestos.

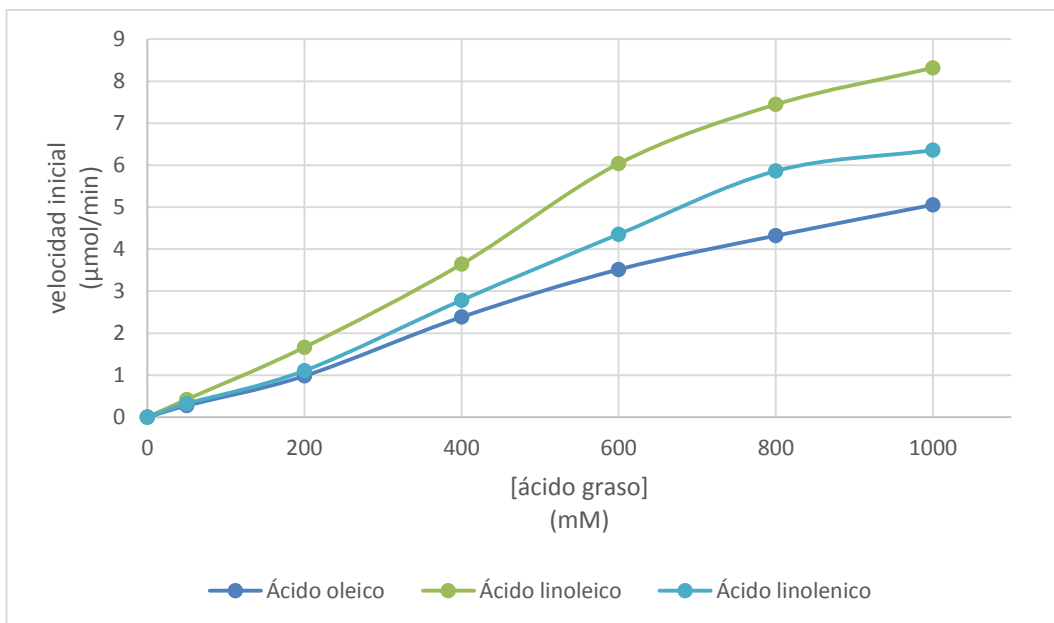


Figura 8. Comparación de las velocidades iniciales de la reacción de esterificación frente a la concentración de ácido graso, utilizando tres ácidos grasos distintos.

Tabla 13. Comparación de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por mCLEAs de CALB utilizando tres ácidos grasos distintos como sustratos.

	V <sub>máx</sub> (μmol/min)	K <sub>m</sub> (M)
Linoleico	406.36	58.8
Linolénico	85.07	8.69
Oleico	79.97	14.12

Como puede observarse en la **Figura 8** y en la **Tabla 13** los tres ácidos grasos presentan unas velocidades iniciales similares a bajas concentraciones, pero el biocatalizador alcanza su velocidad máxima a diferentes concentraciones de cada ácido graso.

El enzima presenta una mayor velocidad máxima en el caso del ácido linoleico, seguido por el ácido linolénico y por último el ácido oleico.

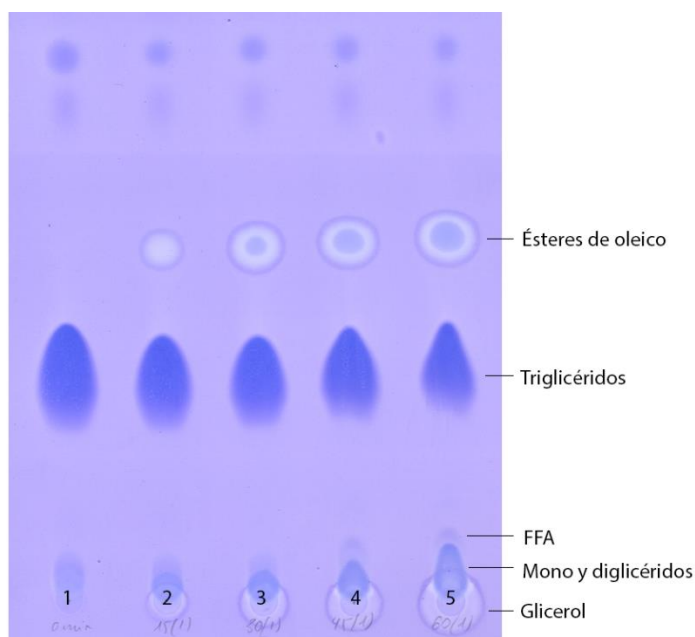
#### 4.2.4. Determinación y comparación de los parámetros cinéticos de la reacción de transesterificación utilizando distintos aceites como sustratos

Las reacciones de transesterificación, con mCLEAs de CALB como biocatalizador, se realizaron utilizando dos aceites distintos: oliva como control y soja no refinada como aceite no comestible.

Las distintas alícuotas tomadas a tiempos de reacción definidos se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) (**Figura 9**), y posteriormente estas mediante *TLC Analyzer*.

Como puede verse en la **Figura 10** las velocidades iniciales fueron mayores en el caso de la reacción llevada a cabo con aceite de oliva, y aumentaron a medida que aumentaba la concentración de aceite.

La velocidad máxima de la reacción es también mayor en el caso del aceite de oliva, a pesar de ser la constante de Michaelis mucho mayor también en este caso.



**Figura 9. Placa de TLC de reacción con aceite de oliva.** (1) Muestra control de la reacción. (2) Muestra a 15 minutos. (3) Muestra de la reacción a 30 minutos. (4) Muestra a 45 minutos. (5) Muestra a 60 minutos.



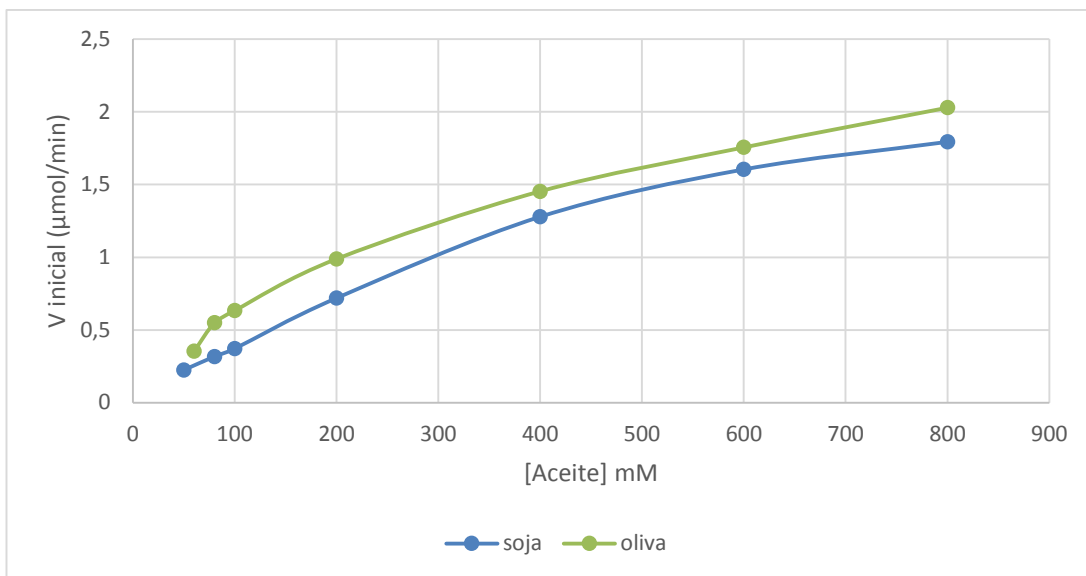


Figura 9. Comparación de las velocidades iniciales de la reacción de transesterificación frente a la concentración de aceite.

Tabla 14. Comparación de los parámetros cinéticos de la reacción utilizando dos aceites distintos.

	V <sub>máx</sub> (μmol/min)	K <sub>m</sub> (mM)
Aceite de oliva	3.00	661.1
Aceite de soja	2.54	297.6

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos anteriormente se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se realizó la síntesis de nanopartículas magnéticas y la posterior inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* a estas.
- Se seleccionó el metanol como mejor donador de grupos alquilo para la reacción de trans/esterificación catalizada por las mCLEAs de CALB por dar mejores resultados: mayores velocidades iniciales y mayor velocidad máxima.
- Se eligió la agitación mecánica como el mejor método de agitación para la realización de la reacción a pesar de que la agitación por ultrasonidos mostró mejores resultados de velocidades iniciales y parámetros cinéticos, debido a que la recuperación de las mCLEAs tras la agitación en sonorreactor era poco eficiente, y por tanto, se perdía una de las ventajas más importantes de la inmovilización del enzima, su reutilización.
- Se observó una mayor velocidad de reacción en el caso del ácido linoleico, seguida por el ácido linolénico, siendo la velocidad de reacción más lenta la del ácido oleico.
- Por último se ensayó la velocidad de reacción de transesterificación con dos aceites distintos: oliva y soja no refinado. Se obtuvo una mayor velocidad de reacción en el caso del aceite de oliva.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Akoh, C. C., S.-W. Chang, G.-C. Lee, and J.-F. Shaw. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8995-9005.

Arroyo, M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39: 23-39.

Bisen P. S., Sanodiya B. S., Thakur G. S., Baghel R. K., Prasad G. B. K. S. 2010. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Lett*. 32:1019-1030.

Bornscheuer, U. T., and R. J. Kazlauskas. 2006. *Hydrolases in Organic Synthesis*. Second edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany). ISBN: 978-3-527-31029-6.

Gross, R. A., M. Ganesh, and W. Lu. 2010. Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations. *Trends in Biotechnology* 28: 435-443.

Hasan, F., A. A. Shah, and A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.

Hosokawa, M., K. Nogi, M. Naito, and T. Yokoyama. 2007. *Nanoparticle technology handbook*. Elsevier Ltd, Amsterdam (The Netherlands). ISBN: 978-0-444-53122-3.

Liu, Z. L., Y. J. Liu, K. L. Yao, Z. H. Ding, J. Tao, and X. Wang. 2002. Synthesis and magnetic properties of Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Materials Synthesis and Processing* 10: 83-87.

Malcata, F. X., H. R. Reyes, H.S. García, J. Charles, G. Hill, and C. H. Amundson. 1992. Kinetics and mechanism of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 426-446.

Mateo, C., G. Fernández-Lorente, O. Abian, R. Fernández-Lafuente, and J. M. Guisán. 2000. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 1:739-745.

- Morales, M. d. P., S. Veintemillas-Verdaguer, M. I. Montero, C. J. Serna, A. Roig, Ll. Casas, B. Martínez, and F. Sandiumenge. 1999. Surface and internal spin casting in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemistry of Materials* 11:3068-3064.
- Racuciu, M. 2009. Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Current Applied Physics*. 9:1062-1066
- Ranganathan, S. V., S. L. Narasimhan, and K. Muthukumar. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*. 99: 3975-3981.
- Reetz, M. T. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6(2):145-50.
- Ridley, C., E., Clark, C. M., LeDuc S. D, Bierwagen B. G., Lin B. B., Mehl A., Tobias D. A., 2012. Biofuels: Network analysis of the literature reveals key environmental and economic unknowns. *Environmental Science & Technology*. 46 (3): 1316-1325.
- Sharma, R., Y. Chisti, and U. C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.
- Shen, S.-C., S.-Z. Fang, Y.-H Zhou, and H. Liang. 2004. Synthesis and characterization of 3-aminopropyltriethoxylane-modified superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Chemistry Letters* 33: 1468-1469.
- Trodler P., Pleiss J. 2008. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology*. 8:9.
- Vakhlu, J., and A. Kour. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 69-85.
- Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille, and M. J. Haas. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9:113-148.